

**SİKLOSPORİN A İÇEREN
KATI LİPİT NANOPARTİKÜL,
MİKROEMÜLSİYON ve
POLİMERİK NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve
İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ebru Cengiz

Doktora Tezi

**SİKLOSPORİN A İÇEREN
KATI LİPİT NANOPARTİKÜL,
MİKROEMÜLSİYON ve
POLİMERİK NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve
İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ebru Cengiz

Doktora Tezi

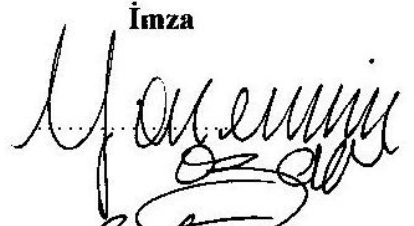




ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Mayıs 2007

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yasemin YAZAN

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 040342).

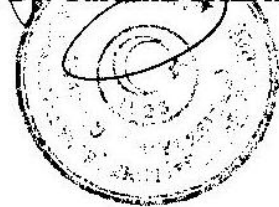
Ebru CENGİZ'in "SİKLOSPORİN A İÇEREN KATI LİPİT NANOPARTİKÜL, MİKROEMÜLSİYON ve POLİMERİK NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve *IN VITRO-İN VIVO* DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki Doktora Tezi, 24.05.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

| | Adı-Soyadı | İmza |
|---------------------|---|---|
| Üye (Tez Danışmanı) | Prof. Dr. Yasemin YAZAN Anadolu Üniversitesi |  |
| Üye | Prof. Dr. Betül DORTUNÇ Marmara Üniversitesi |  |
| Üye | Prof. Dr. Dilek AK Anadolu Üniversitesi |  |
| Üye | Yard. Doç. Dr. Lütfi GENÇ Anadolu Üniversitesi |  |
| Üye | Yard. Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL Anadolu Üniversitesi |  |

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.05.2007...tarih ve...15/2.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Yasemin YAZAN



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ebru CENGİZ
Doğum tarihi ve yeri : 1977, UŞAK
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Tel : 0 222 3350580/3739
Fax : 0 222 3350750
e-posta : ebcengiz@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : İsmail Özcan İlkokulu, 1983-1988
Ortaokul-Lise : Uşak Anadolu Lisesi, 1988-1995
Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
1995-1999
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 2000–2003
Yabancı Diller : İngilizce
Almanca (Temel Düzeyde)
İspanyolca (Temel Düzeyde)

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS)
International Federation Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC)
Kontrollü Salım Sistemleri Derneği (CRS)
Kozmetik Araştırmacıları Derneği (TÜKAD)
Türkiye Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

Yayınlar

Makaleler :

E. Cengiz, S. A. Wissing, R. H. Müller, Y. Yazan, Sunblocking efficiency of various TiO₂-loaded solid lipid nanoparticle formulations, Int. J. Cosmet. Sci., 28, 371-378 (2006).

Poster Bildiriler :

E. Cengiz, S. A. Wissing, Y. Yazan, R. H. Müller., “Formulation and Characterisation of TiO₂ Incorporated Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM)” Cosmoderm III and the 5th ICoS, 9-11 June, İstanbul, (2003).

E. Cengiz, S. A. Wissing, Y. Yazan, R. H. Müller, “TiO₂-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN): UV-Blocking efficiency of topical formulations”, Proceedings of the 30th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, 19-23 July, Glasgow, 224-225 (2003).

E. Cengiz, S. A. Wissing, Y. Yazan, R. H. Müller, “Solid Lipid Nanoparticles in Sun Protection”, Proceedings of European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology, 10-12 May, Sevilla, 115 (2004).

M. Demirel, **E. Cengiz**, E. Akyıl, M. S. Berkman, “Preliminary Study on the Stability of Sotalol Hydrochloride in Aqueous Solution”, Proceedings of 12th International Pharmaceutical Technology Symposium, 12-14 September, İstanbul, 259-260 (2004)

E. Cengiz, M. Demirel, Y. Yazan, “Cyclosporine A Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Drug Delivery”, Proceedings of EUFEPS- When Poor Solubility Becomes an Issue: From Early Stage to Proof of Principles, 26-27 April, Verona, 111-112 (2006).

E. Cengiz, M. Demirel, Y. Yazan, “In Vitro Characterization of Eudragit RS 100 Nanosuspensions for Ocular Drug Delivery of Cyclosporin A”, Proceedings of 13th International Pharmaceutical Technology Symposium, 10-13 September, Antalya, 51-52 (2006).

Bilimsel Ekinlikler

Burslar :

DAAD Bursu, 2002, (4 ay)

Projeler :

“Preparation and Evaluation of Solid Lipid Nano- and Microparticles Containing Sunscreen Agents”, Berlin Free University, 01.06.2002 (DAAD Proje)

“Siklosporin A İçeren Katı Lipit Nanopartikül ve Mikrosünger Hazırlanması ve *İn Vitro-İn Vivo* Değerlendirilmesi”, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (Proje No: 040342).

Diğer Bilimsel Etkinlikler

Görev Alınan Uluslararası Sempozyumlar

5th International Cosmetic Symposium, 9-11 June,İstanbul (2003)

6th International Cosmetic Symposium, 17-19 June,İstanbul (2005)

7th International Cosmetic Symposium, 20-22 June,İstanbul (2007)

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Siklosporin A'nın oküler uygulamaya yönelik olarak, katı lipid nanopartikül, mikroemülsiyon ve mikrosünger formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır. Kontrollü salım sağlayan bu sistemlerin topik uygulanmaları ile, Siklosporin A'nın gözde kalış süresinin uzatılması ile oküler emiliminin artırılması ve plazma konsantrasyonlarında oluşan bireylerarası farklılıkların en aza indirilmeye çalışılması amaçlanmıştır.

Gerçekleştirilen ön formülasyon denemeleri sonucunda ufak parçacık büyüklüğüne sahip mikrosüngerler oluşturulamamış ve bu nedenle, Eudragit® RS 100 polimeri kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır.

In vivo çalışmalarda, Siklosporin A'nın 8 saat olarak belirtilen yarı ömrü göz önüne alınarak, 2., 8., 16., 24., 48. ve 56. saatlerde analizlerin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Ancak, koyunların, kesim yerinde bekletilememesi nedeni ile 8. ve 56. saat analizlerinin yapılması mümkün olmamıştır.

Çalışma boyunca bana her türlü olanağı sağlayan, bilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Yard. Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve yardımlarını çalışmalar boyunca esirgemeyen bölüm arkadaşlarım, Öğr. Gör. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Araş. Gör. Ecz. Evrim YENİLMEZ'e, Araş. Gör. Ecz. Murat S. BERKMAN'a ve Kimyager Sefa AVCIER'e çok teşekkür ederim.

Parçacık büyüklüğü, elektriksel iletkenlik ve taramalı elektron mikroskobu analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan Prof. Dr. Aydın DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Geçirimli elektron mikroskobu analizleri ile liyofilizasyon ve sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan BİBAM Müdürü Prof. Dr. Rıdvan SAY'a ve BİBAM Müdür Yardımcısı Yard. Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

In vivo çalışmalarda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Beni her zaman destekleyen, yüreklendiren ve bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ebru CENGİZ

SİKLOSPORİN A İÇEREN KATI LİPİT NANOPARTİKÜL, MİKROEMÜLSİYON ve POLİMERİK NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO-İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Kornea nakillerinden sonraki ve kuru göz sendromu gibi rahatsızlıkların tedavisinde siklosporin A (CsA) göze topik olarak uygulanmaktadır. CsA'nın sistemik emilimi oldukça düşük olup, uygulanan dozaj şeklinin yapısı ve hastanın durumuna bağlı olarak plazma konsantrasyonları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, oküler uygulamaya yönelik olarak katı lipit nanopartikül (SLN), mikroemülsiyon (ME) ve polimerik nanopartikül (PN) formülasyonları hazırlanmış ve topik uygulama ile CsA'nın emiliminin artırılması yolu ile, bireyler arasındaki farklılıklar en aza indirilmeye çalışılmıştır.

Kararlılık çalışmalarında, hazırlanan sistemlerin farklı sıcaklık ortamlarındaki davranışları incelenmiştir. Formülasyonların parçacık ve damlacık büyüklükleri çalışma süresince nanometre aralığında kalmıştır. Katyonik lipit eklenerek pozitif duruma getirilen elektriksel iletkenlik değerleri, saklama süresince değişmeyerek hazırlanan sistemlerin kararlılığını göstermiştir. SLN sistemlerinde lipit yapıların değişmediği X-ışını kırınım (XRD), infrared (IR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri ile kanıtlanmıştır.

Hazırlanan üç farklı sistemden birer formülasyon kararlılık çalışmaları sonuçları doğrultusunda *in vivo* çalışmalar için belirlenmiştir.

Koyunlarda gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda, seçilen formülasyonlar koyunların gözlerinden birine uygulanmış, diğer göze kontrol amacı ile ilaç uygulanmamıştır. Belli sürelerde gerçekleştirilen kesimler sonrasında koyunların her iki gözleri de çıkartılarak hümör aköz ve hümör vitröz sıvıları toplanmış ve bu sıvılarda enzim immün yöntemi analiz cihazı (EIA) ile belirlenen CsA miktarları yardımıyla maddenin oküler emilimi araştırılmıştır.

Elde edilen *in vivo* analiz sonuçlarına göre, CsA'nın 48 saat süresince hümör aköz ve hümör vitrözde bulunduğu saptanmıştır. CsA'nın hümör vitrözde bulunması ile, emilimin gözün iç kısımlarına kadar arttırılabildiği gözlenmiştir. Analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlıkları, bireyler arasındaki farklılığın formülasyonların emilim derecesini değiştirmediğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Siklosporin A, oküler emilim, hümör aköz, hümör vitröz

**PREPARATION and *IN VITRO-IN VIVO* EVALUATION of
SOLID LIPID NANOPARTICLE, MICROEMULSION and
POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATIONS
CONTAINING CYCLOSPORINE A**

ABSTRACT

Cyclosporine A (CsA) is applied topically in the therapy of disorders after corneal transplantation and dry eye syndrome. Systemic absorption of CsA is quite low and there is inter-individual variation in plasma concentrations depending on the dosage form applied and the story of the patient. Therefore, in this study, solid lipid nanoparticle (SLN), microemulsion (ME) and polymeric nanoparticle (PN) formulations were prepared aiming the ocular delivery of CsA with an attempt to decrease the inter-individual variation through increasing the topical absorption.

In the stability studies, behaviours of the formulations prepared were investigated at different conditions. Particle and globule sizes of the formulations remained in the nanometer range during the stability studies. Positively charged zeta potentials obtained with the addition of cationic lipid remained unchanged showing the stability of the formulations. Lipid structures of SLNs were verified to be unchanged by the X-ray diffraction (XRD), infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) analyses.

Three formulations among the three different systems were selected for the *in vivo* studies considering the stability test results.

In the *in vivo* studies carried on the sheep, formulations were applied topically to the one of the eye and the other eye remained untreated as a reference. At appropriate time intervals, sheep were sacrificed and the aqueous and vitreous humour samples of the eyes were collected and analysed by enzyme immune assay (EIA) analyzer. Ocular absorption of CsA was evaluated according to the EIA results of the CsA samples obtained previously.

According to the *in vivo* analysis results, CsA was determined in the aqueous and vitreous humour samples in 48 hours. Detection of CsA in the vitreous humour showed the efficient absorption of the drug to the deeper layers of the eye. Similarity of the analysis results demonstrated that inter-individual variance did not affect the absorption level.

Key Words : Cyclosporine A, ocular absorption, aqueous humour, vitreous humour

| | SAYFA |
|--|-------|
| ÖZGEÇMİŞ | i |
| ÖNSÖZ | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xv |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ | xix |
| GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| KAYNAK BİLGİSİ | 2 |
| Gözün Anatomisi | 2 |
| Oküler Etkin Madde Taşıyıcı Sistemler ve Uygulanışları | 4 |
| Oküler Uygulamalarda Etkin Madde Dağılımı | 6 |
| Oküler Biyoyararlanım | 8 |
| <i>Kolloidal Oküler Sistemler</i> | 9 |
| Oküler Dozaj Şekillerinde Sterilite | 10 |
| Oküler Toksisite | 10 |
| Katı Lipit Nanopartiküller | 11 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri</i> | 12 |
| <i>Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi</i> | 12 |
| <i>Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi</i> | 14 |
| <i>Mikroemülsiyon Yöntemi</i> | 14 |
| <i>Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu</i> | 14 |
| <i>Parçacık Şekli</i> | 14 |
| <i>Parçacık Büyüklüğü</i> | 14 |
| <i>Zeta Potansiyel</i> | 15 |
| <i>Etkin Madde Yüklenmesi</i> | 15 |
| <i>Tekrar Kristallenme Özellikleri</i> | 16 |
| <i>Etkin Madde Salımı</i> | 16 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Sterilizasyonu</i> | 16 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Toksisitesi</i> | 17 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Uygulanışı</i> | 17 |
| Mikroemülsiyonlar | 18 |

| | |
|--|----|
| Mikroemülsiyon Hazırlama Yöntemleri | 19 |
| Mikroemülsiyon Karakterizasyonu | 20 |
| <i>Optik Özellikler</i> | 20 |
| <i>Damlacık Büyüklüğü Tayini</i> | 20 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizi</i> | 21 |
| <i>Reolojik Özellikler</i> | 21 |
| <i>Emülsiyon Tipi</i> | 21 |
| <i>Etkin Madde Salımı</i> | 22 |
| Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Uygulanışı | 22 |
| Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Toksisitesi | 23 |
| Polimerik Nanopartiküller | 24 |
| Polimerik Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri | 26 |
| Polimerik Nanopartikül Karakterizasyonu | 26 |
| <i>Parçacık Şekli</i> | 26 |
| <i>Parçacık Büyüklüğü</i> | 26 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizi</i> | 27 |
| <i>pH Analizi</i> | 27 |
| <i>Etkin Madde Salımı</i> | 27 |
| Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılığı | 27 |
| Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Toksisitesi | 28 |
| Siklosporin A | 29 |
| Siklosporin A'nın Farmakolojik Özellikleri | 30 |
| Siklosporin A'nın Farmakokinetik Özellikleri | 31 |
| Siklosporin A'nın Yan Etkileri ve Toksisitesi | 32 |
| Siklosporin A'nın Miktar Tayin Yöntemleri | 33 |
| <i>Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi</i> | 33 |
| <i>İmmün Yöntemler</i> | 33 |
| Siklosporin A İçeren Ticari Preparatlar | 34 |
| GEREÇLER | 35 |
| Kullanılan Maddeler | 35 |
| Kullanılan Cihazlar | 36 |
| YÖNTEMLER | 38 |
| İn Vitro Çalışmalar | 38 |
| Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar | 38 |

| | |
|--|----|
| <i>Siklosporin A ile Yapılan Çalışmalar</i> | 38 |
| <i>Termal Analiz</i> | 38 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 38 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 38 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 38 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 38 |
| <i>Siklosporin A'nın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Miktar Tayini</i> | 38 |
| <i>Doğrusallık</i> | 39 |
| <i>Keskinlik</i> | 39 |
| <i>Doğruluk</i> | 39 |
| <i>Duyarlılık</i> | 39 |
| <i>Seçicilik</i> | 39 |
| <i>Dynasan® 116 ile Yapılan Çalışmalar</i> | 39 |
| <i>Termal Analiz</i> | 39 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 39 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 39 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 39 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 39 |
| <i>Compritol® 888 ATO ile Yapılan Çalışmalar</i> | 40 |
| <i>Termal Analiz</i> | 40 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 40 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 40 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 40 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 40 |
| <i>Eudragit® RS 100 ile Yapılan Çalışmalar</i> | 41 |
| <i>Termal Analiz</i> | 41 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar</i> | 41 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 41 |
| <i>Formülasyonların Hazırlanışı</i> | 41 |
| <i>Formülasyonların Sterilizasyonu</i> | 42 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 42 |
| <i>Parçacık Şekli Analizleri</i> | 42 |

| | |
|---|----|
| <i>Parçacık Büyüklüğü Analizleri</i> | 42 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizleri</i> | 42 |
| <i>pH Analizleri</i> | 42 |
| <i>Termal Analizleri</i> | 42 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizleri</i> | 42 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 43 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri</i> | 43 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarında</i> | |
| <i>Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 43 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait</i> | |
| <i>Kararlılık Çalışmaları</i> | 43 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Çalışmalar</i> | 43 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 43 |
| <i>Formülasyonun Hazırlanışı</i> | 44 |
| <i>Formülasyonun Sterilizasyonu</i> | 44 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 44 |
| <i>Fiziksel Görünüm</i> | 44 |
| <i>Damlacık Büyüklüğü Analizi</i> | 44 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizi</i> | 44 |
| <i>pH Analizi</i> | 44 |
| <i>Reolojik Analiz</i> | 44 |
| <i>Faz Ayrışması İncelemesi</i> | 44 |
| <i>Emülsiyon Tipinin Tayini</i> | 45 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonunda Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 45 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonlarına ait Kararlılık Çalışmaları</i> | 45 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar</i> | 45 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 45 |
| <i>Formülasyonların Hazırlanışı</i> | 45 |
| <i>Formülasyonların Sterilizasyonu</i> | 45 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının</i> | |
| <i>Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 46 |
| <i>Parçacık Büyüklüğü Analizleri</i> | 46 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizleri</i> | 46 |
| <i>pH Analizleri</i> | 46 |

| | |
|---|----|
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 46 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Kararlılık Çalışmaları</i> | 46 |
| <i>İn Vivo Çalışmalar</i> | 46 |
| <i>İrritasyonun belirlenmesi</i> | 46 |
| <i>Formülasyonların Göze Uygulanması ve Örneklerin Alınması</i> | 46 |
| <i>Hümör Aköz ve Hümör Vitroz Sıvı Örneklerinde Siklosporin A Miktar Tayini</i> | 47 |
| BULGULAR ve TARTIŞMA | 48 |
| <i>İn Vitro Çalışmalar</i> | 48 |
| <i>Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar</i> | 48 |
| <i>Siklosporin A ile Yapılan Çalışmalar</i> | 48 |
| <i>Termal Analiz</i> | 48 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 48 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 49 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 49 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 50 |
| <i>Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Miktar Tayini</i> | 50 |
| <i>Doğrusallık</i> | 50 |
| <i>Keskinlik</i> | 50 |
| <i>Doğruluk</i> | 51 |
| <i>Duyarlılık</i> | 52 |
| <i>Seçicilik</i> | 52 |
| <i>Dynasan® 116 ile Yapılan Çalışmalar</i> | 58 |
| <i>Termal Analiz</i> | 58 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 58 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 58 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 59 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 60 |
| <i>Compritol 888 ATO ile Yapılan Çalışmalar</i> | 60 |
| <i>Termal Analiz</i> | 60 |
| <i>Erime Derecesi Tayini</i> | 60 |

| | |
|---|-----|
| <i>X-Işını Kırınım Analizi</i> | 61 |
| <i>İnfrared Analizi</i> | 62 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizi</i> | 62 |
| <i>Eudragit® RS 100 ile Yapılan Çalışmalar</i> | 62 |
| <i>Termal Analiz</i> | 62 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar</i> | 64 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 64 |
| <i>Formülasyonlarının Hazırlanışı</i> | 66 |
| <i>Formülasyonların Sterilizasyonu</i> | 67 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 67 |
| <i>Parçacık Şekli Analizleri</i> | 67 |
| <i>Parçacık Büyüklüğü Analizleri</i> | 69 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizleri</i> | 71 |
| <i>pH Analizleri</i> | 72 |
| <i>Termal Analizleri</i> | 74 |
| <i>X-Işını Kırınım Analizleri</i> | 78 |
| <i>İnfrared Analizleri</i> | 81 |
| <i>Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri</i> | 84 |
| <i>Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 87 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonlarına ait Çalışmalar</i> | 87 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 87 |
| <i>Üçgen Faz Diyagramı Çalışmaları</i> | 89 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı</i> | 91 |
| <i>Formülasyonun Sterilizasyonu</i> | 91 |
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 92 |
| <i>Fiziksel Görünüm</i> | 92 |
| <i>Damlacık Büyüklüğü Analizi</i> | 92 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizi</i> | 93 |
| <i>pH Analizi</i> | 95 |
| <i>Reolojik Analizler</i> | 96 |
| <i>Faz Ayrışması İncelemesi</i> | 100 |
| <i>Emülsiyon Tipinin Tayini</i> | 100 |

| | |
|---|-----|
| <i>Mikroemülsiyon Formülasyonunda Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 101 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar</i> | 101 |
| <i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i> | 101 |
| <i>Formülasyonların Hazırlanışı</i> | 102 |
| <i>Formülasyonların Sterilizasyonu</i> | 102 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının</i> | |
| <i>Özelliklerine ait Çalışmalar</i> | 102 |
| <i>Parçacık Büyüklüğü Analizleri</i> | 102 |
| <i>Zeta Potansiyel Analizleri</i> | 105 |
| <i>pH Analizleri</i> | 108 |
| <i>Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarında</i> | |
| <i>Etkin Madde Miktar Tayini</i> | 109 |
| <i>İn Vivo Çalışmalar</i> | 110 |
| <i>İrritasyonun Belirlenmesi</i> | 110 |
| <i>Hümör Aköz ve Hümör Vitröz Sıvı Örneklerinde</i> | |
| <i>Siklosporin A Miktar Tayini</i> | 110 |
| SONUÇ ve ÖNERİLER | 114 |
| KAYNAKLAR | 115 |
| EKLER | |
| EK-1 | |
| Etik Kurul Kararı | |
| EK-2 | |
| Poster Bildiriler | |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| ÇİZELGE NO ve ADI | SAYFA |
|--|-------|
| Çizelge 1 Oküler Sistemlerde Karşılaşılan Problemler ve Çözüm Yolları | 6 |
| Çizelge 2 Sıcak ve Soğuk Homojenizasyon Yöntemi ile Katı Lipit Nanopartikül Hazırlanması | 13 |
| Çizelge 3 Oküler Sistemler ve Hazırlanmalarında Kullanılan Polimerler | 25 |
| Çizelge 4 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları | 38 |
| Çizelge 5 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün-İçi ve Günler-Arası Kesinlik Sonuçları | 51 |
| Çizelge 6 Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Elde Edilen Doğruluk Değerleri | 51 |
| Çizelge 7 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri | 66 |
| Çizelge 8 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları | 73 |
| Çizelge 9 Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesinde Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kod ve bileşenleri | 89 |
| Çizelge 10 Kararlılık Çalışmalarında Kullanılan Mikroemülsiyon Formülasyonunun Bileşimi | 91 |
| Çizelge 11 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları | 95 |
| Çizelge 12 Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri | 101 |
| Çizelge 13 Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları | 109 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| ŞEKİL NO ve ADI | SAYFA |
|---|-------|
| Şekil 1 Gözün Anatomik Yapısı | 3 |
| Şekil 2 Korneanın Anatomik Yapısı | 3 |
| Şekil 3 Lakrimal Sistem | 7 |
| Şekil 4 Katı Lipit Nanopartikül'lere Yüklenmiş Etkin Maddelerin Yerleşim Şekilleri | 15 |
| Şekil 5 Yardımcı Yüzey Etkin Madde'nin Yüzeyler Arası Film Tabakasının Akışkanlığını Arttırmadaki Etkisi | 19 |
| Şekil 6 Siklosporin A'nın Kimyasal Yapısı | 29 |
| Şekil 7 Siklosporin A'nın Termal Analizine ait Termogram | 48 |
| Şekil 8 Siklosporin A'nın X-Işını Kırınım Profili | 49 |
| Şekil 9 Siklosporin A'nın İnfrared Analiz Spektrumu | 49 |
| Şekil 10 Siklosporin A'nın Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu | 50 |
| Şekil 11 Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Standart Eğrisi | 51 |
| Şekil 12 Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları | 53 |
| Şekil 13 Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları | 54 |
| Şekil 14 Mikroemülsiyon Formülasyonunun Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları | 55 |
| Şekil 15 % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları | 56 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Şekil 16 | % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları | 57 |
| Şekil 17 | Dynasan® 116'nın Termal Analizine ait Termogram | 58 |
| Şekil 18 | Dynasan® 116'nın X-Işını Kırınım Profili | 59 |
| Şekil 19 | Dynasan® 116'nın İnfrared Analiz Spektrumu | 59 |
| Şekil 20 | Dynasan® 116'nın Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu | 60 |
| Şekil 21 | Compritol® 888 ATO'nun Termal Analizine ait Termogram | 61 |
| Şekil 22 | Compritol® 888 ATO'nun X-Işını Kırınım Profili | 61 |
| Şekil 23 | Compritol® 888 ATO'nun İnfrared Analiz Spektrumu | 62 |
| Şekil 24 | Compritol® 888 ATO'nun Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu | 63 |
| Şekil 25 | Eudragit® RS 100'ün Termal Analizine ait Termogram | 63 |
| Şekil 26 | Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri | 68 |
| Şekil 27 | Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleri | 69 |
| Şekil 28 | Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Parçacık Büyüklük Bulguları | 70 |
| Şekil 29 | Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Parçacık Büyüklük Bulguları | 70 |
| Şekil 30 | Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları | 71 |
| Şekil 31 | Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları | 72 |

| | | |
|-----------------|---|----|
| Şekil 32 | Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmalarını ve Kararlılık Çalışmalarını Takiben Elde Edilen Termal Analizlerine ait Termogramlar | 75 |
| Şekil 33 | Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen X-Işını Kırınım Profilleri | 79 |
| Şekil 34 | Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen X-Işını Kırınım Profilleri | 80 |
| Şekil 35 | Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen İnfrared Analiz Spektrumları | 82 |
| Şekil 36 | Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen İnfrared Analiz Spektrumları | 83 |
| Şekil 37 | Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanma ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumları | 85 |
| Şekil 38 | Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanma ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumları | 86 |
| Şekil 39 | Farklı Yüzey Etkin Madde/Yardımcı Yüzey Etkin Madde Oranlarına Sahip Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramları | 90 |
| Şekil 40 | Etkin Madde Yüklenmiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Damlacık Büyüklüğü Bulguları | 92 |
| Şekil 41 | Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Damlacık Büyüklüğü Bulguları | 93 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Şekil 42 | Etkin Madde Yüklenmiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Bulguları | 94 |
| Şekil 43 | Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Bulguları | 94 |
| Şekil 44 | 25°C ±1°C’de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 96 |
| Şekil 45 | 40°C ±1°C’de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 97 |
| Şekil 46 | 4°C ±1°C’de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 97 |
| Şekil 47 | 40°C ±1°C’de ve % 60 Bağlı Nemde Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 98 |
| Şekil 48 | 25°C ±1°C’de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 98 |
| Şekil 49 | 40°C ±1°C’de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 99 |
| Şekil 50 | 4°C ±1°C’de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 99 |
| Şekil 51 | 40°C ±1°C’de ve % 60 Bağlı Nemde Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar | 100 |
| Şekil 52 | % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Parçacık Büyüklüğü Bulguları | 103 |
| Şekil 53 | % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Parçacık Büyüklüğü Bulguları | 104 |
| Şekil 54 | % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları | 106 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Şekil 55 | % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları | 107 |
| Şekil 56 | Hümör Aközde Belirlenen Siklosporin A Miktarları | 110 |
| Şekil 57 | Hümör Vitrözde Belirlenen Siklosporin A Miktarları | 111 |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------|--|
| AEM | : Analitik Elektron Mikroskobu |
| AFM | : Atomik Kuvvet Mikroskobu |
| AUC | : Eğri Altında Kalan Alan |
| BK | : Benzalkonyum Klorür |
| BP | : İngiliz Farmakopesi |
| CAP | : Selüloz Asetat Ftalat |
| C-888 | : Compritol® 888 ATO (Gliseril Dibehenat) |
| C _{maks} | : En Yüksek Kan Konsantrasyonu |
| CMC | : Karboksimetil Selüloz |
| CsA | : Siklosporin A |
| D-116 | : Dynasan® 116 (Tripalmitin) |
| DLS | : Hareketli Lazer Saçınımı |
| DSC | : Diferansiyel Taramalı Kalorimetri |
| EIA | : Enzim İmmün Yöntemi Analiz Cihazı |
| ELISA | : Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi |
| EM | : Etkin Madde |
| EMIA | : Enzim Çoğaltılmış İmmün Yöntemi |
| E-RS 100 | : Eudragit® RS 100 |
| FC4 | : Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu |
| FC4-BOŞ | : Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Ancak Etkin Madde İçermeyen Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu |
| FD4 | : Dynasan® 116 ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu |
| FD4-BOŞ | : Dynasan® 116 ile Hazırlanan Ancak Etkin Madde İçermeyen Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu |
| FPIA | : Floresans Polarizasyon İmmün Yöntemi |
| GRAS | : Genellikle Güvenli Kabul Edilen |
| HEC | : Hidroksietil Selüloz |
| HEMA | : Hidroksietil Metakrilat |
| HEPC | : Hidroksietilpropil Selüloz |
| HLB | : Hidrofilik Lipofilik Denge |
| HMC | : Hidroksimetil Selüloz |

| | |
|---------|---|
| HMGCoA | : 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A |
| HPC | : Hidroksipropil Selüloz |
| HPLC | : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi |
| IL-1 | : İnterlökin-1 |
| IL-2 | : İnterlökin-2 |
| IPA | : İzopropil Alkol |
| IPM | : İzopropil Miristat |
| IR | : İnfrared |
| KBr | : Potasyum Bromür |
| KD | : Kilo Dalton |
| KL | : Katyonik Lipit |
| LD | : Lazer Kırınım |
| LOD | : Saptama Sınırı |
| LOQ | : Tayin Alt Sınırı |
| ME | : Mikroemülsiyon |
| ME-BOŞ | : Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonu |
| MC | : Metil Selüloz |
| NLC | : Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemler |
| NMR | : Nükleer Manyetik Rezonans |
| OA | : Oktadesilamin |
| Ort.GB | : Ortalama Damlacık Büyüklüğü |
| Ort.PB | : Ortalama Parçacık Büyüklüğü |
| P | : Polimer |
| PACA | : Polialkilsiyano Akriyat |
| PCL | : Poli-ε-Kaprolakton |
| PCS | : Foton Korelasyon Spektroskopisi |
| PEG 400 | : Polietilen Glikol 400 |
| PGA | : Poliglikolik Asit |
| PGLA | : Poliglikolik Laktik Asit |
| PI | : Polidisperslik İndisi |
| PIT | : Faz Değişim Sıcaklığı |
| PLA | : Polilaktik Asit |
| PMMA | : Polimetil Metakrilat |
| PN | : Polimerik Nanopartikül |

| | |
|--------|--|
| POE | : Poliortoester |
| PN1 | : Etkin Madde Polimer Oranı 1:1, Etkin Madde Konsantrasyonu: % 0.1 Olan Polimerik Süspansiyon Formülasyonu |
| PN2 | : Etkin Madde Polimer Oranı 1:3, Etkin Madde Konsantrasyonu: % 0.1 Olan Polimerik Süspansiyon Formülasyonu |
| PN3 | : Etkin Madde Polimer Oranı 1:1, Etkin Madde Konsantrasyonu: % 0.2 Olan Polimerik Süspansiyon Formülasyonu |
| PN4 | : Etkin Madde Polimer Oranı 1:3, Etkin Madde Konsantrasyonu: % 0.2 Olan Polimerik Süspansiyon Formülasyonu |
| PVA | : Polivinil Alkol |
| PVP | : Polivinil Prolidon |
| PVM/MA | : Polivinilmetakrilat/ Maleik Anhidrit |
| RA | : Romatoid Artrit |
| RIA | : Radyo İmmün Yöntemi |
| SANS | : Küçük Açılı Nötron Saçınımı |
| SAXS | : Küçük Açılı X Işını Saçınımı |
| SEM | : Taramalı Elektron Mikroskobu |
| SLN | : Katı Lipit Nanopartikül |
| Soya | : Soya fosfotidilkolin |
| T-80 | : Tween [®] 80 (Polioksietilen-80-sorbitan monooleat) |
| TEM | : Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| USP | : Amerikan Farmakopesi |
| XRD | : X-Işını Kırınımı |
| YEM | :Yüzey Etkin Madde |
| YYEM | :Yardımcı Yüzey Etkin Madde |

GİRİŞ ve AMAÇ

Organ nakillerinde ve otoimmün rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan en etkili maddelerden olan CsA'nın ait olduğu kimyasal madde sınıfı, genellikle doğal bileşiklerden oluşan ve immün sistem üzerine sitotoksik etkisi bulunmayan maddeleri içermektedir.

Dar terapötik pencereye sahip olması ve emilim, dağılım, metabolizasyon ve eliminasyonunda bireylerarası çeşitlilik nedeniyle, başarılı bir tedavi için etkin madde kan düzeylerinin izlenmesi gerekmektedir.

CsA, kornea nakillerinin reddinin önlenmesi haricinde, kuru göz sendromu (*keratokonjunctivitis sicca*) tedavisinde gözyaşı salgısının artırılması amacıyla kullanılmıştır. Kornea nakilleri ve kuru göz sendromu gözün yüzeyi ile ilgili rahatsızlıklar olduğu için CsA'nın topik olarak uygulanması mümkün olmaktadır.

CsA'nın önemli yan etkileri arasında, nefrotoksisite, titreme, özellikle kadınlarda tüylenme artışı, yüksek tansiyon, diş etlerinde şişme ve organ nakillerinin ardından görülen lenfoproliferatif rahatsızlıklar sayılabilmektedir. Renal vazokonstrüksiyona neden olurken, glomerüler filtrasyon oranını da azalttığı belirtilmiştir. Uzun süreli kullanımı sonucu, kansızlık, kemik iliğinde gelişim bozukluğu, karaciğer iltihabı ve renal tübül hücre hasarı, lenfositlerde azalma (*lymphopenia*) gibi zararlı ama geri dönüşümü olan etkiler de oluşturmaktadır.

CsA'nın pratik olarak suda çözünmemesi nedeniyle, su ile temasta katı şekle dönüşüp ayrılma eğilimi göstermektedir. Formülasyondaki bu güçlükler nedeniyle, maddenin oküler uygulanmasını mümkün kılan sistemlerin geliştirilmesi bu çalışmanın amaçları içersindedir.

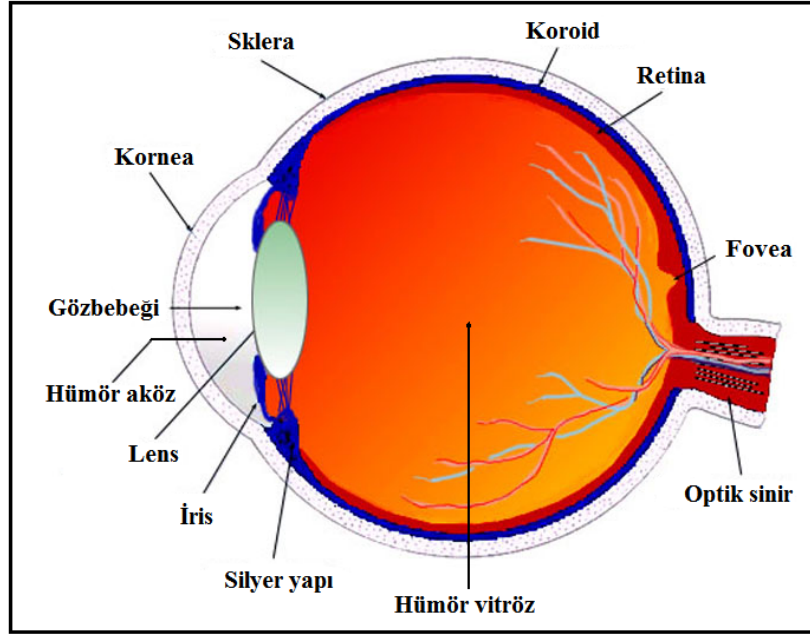
Bu çalışmada, ayrıca, SLN, ME ve PN formülasyonları ile maddenin gözde kalış süresinin, kullanılan yardımcı maddeler ile emilim derecesinin artırılarak gözün iç tabakalarına madde geçişinin sağlanması yoluyla etkinliğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

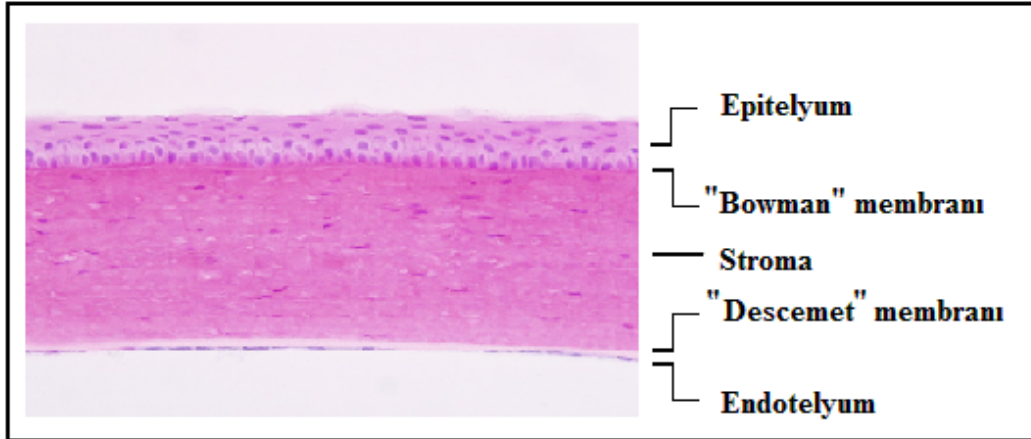
Gözün Anatomisi

Görme için gerekli olan sınırları taşıyan göz (**Şekil 1**), izole bir halde kafatasının ön kısmında, “orbita” denilen göz çukurunda yer alır (Reddy ve Ganesan, 1996; http-1; http-2). Fibröz tabaka, vasküler tabaka ve retinal tabaka olmak üzere başlıca 3 tabakadan oluşmuştur (Lloyd ve ark., 2001). “Sklera” olarak adlandırılan fibröz tabaka (göz akı) gözün en dış katmanını oluşturur ve gözün görme fonksiyonunu yerine getirebilmesi için gerekli olan mekanik dayanıklılığını sağlar (Reddy ve Ganesan, 1996). Bu tabaka, gözün ön bölümünde ışığın göz içine odaklanmasını sağlayan saydam korneaya dönüşür (http-3). Kornea (**Şekil 2**), dışta epitelyum, iç bölümde stroma ve en altta endotelyum tabakası olmak üzere başlıca üç tabakadan oluşmaktadır (Hecht ve ark., 1996; Gürsoy, 2002; http-4). Epitel tabaka, 5-6 hücre tabakası kalınlığında olup hasar görmesi durumunda rejenere olabilen yapıya sahip bir tabakadır (http-5). Hidrofobik özelliktedir ve birçok etkin madde (EM) için hız sınırlayıcı tabakadır (Gürsoy, 2002). Epitel tabakanın altında korneayı hasara karşı koruyan sert, penetrasyonun güç olduğu “Bowman” membranı yer alır. Bu membranın altında, çok küçük birbirine paralel kolajen fibrillerden oluşan stroma tabakası bulunur (Richter ve Keipert, 2004; http-5). Kolajen fibrillerin bu özel yapısı korneaya saydamlığını verir (http-5). Korneanın en kalın tabakası olan stroma (~ 450 µm) tabakası (Richter ve Keipert, 2004), korneanın % 90’ını oluşturur ve % 85 su içerir (Gürsoy, 2002; http-5). “Descemet” membranı ise, stroma ile endotelyum tabakası arasında yer alan, yaklaşık bir hücre kalınlığındaki bir tabakadır (Richter ve Keipert, 2004; http-5). Endotelyum tabakası ise, gözün iç kısmına bakar ve epitel tabakası gibi stromadan daha fazla lipidik yapı gösterir (Gürsoy, 2002). Kornea için aktif su pompası görevini görür; hidrasyon/dehidrasyon işleminin % 75’ini üstlenmiştir (Gürsoy, 2002; http-5). Hücrelerarası boşlukları geniş olduğu için gözenekli bir yapı gösterir (Gürsoy, 2002).

Gözün ikinci katmanı olan vasküler tabaka (Uveal Bölge), iris-silyer yapı ve koroidden (retina ile sklera arasındaki damar tabaka) oluşmaktadır (Reddy ve Ganesan, 1996). İris, ışığın göze girdiği değişken açıklık (Lloyd ve ark., 2001), göze rengini veren damarsal tabaka olarak tanımlanmaktadır (http-6). Gözün, yani irisin rengi, melanositler tarafından üretilen ömelanin (kahverengi/siyah melaninler) ve feomelaninlerin (kırmızı/sarı melaninler) farklı miktarları sonucunda oluşmaktadır (http-1). İris, koroid yapının en uç kısmıdır ve silyer yapının anterior yüzünde yer alır. Merkezinde gözbebeği (pupilla) olan iris, dilatör ve sfinkter olarak adlandırılan iki tip kas grubundan oluşmaktadır. Dilatör kaslar sempatik uyarıyı algılayarak, sfinkter kaslar parasempatik uyarılara karşı duyarlıdır. Dilatör kasların aktivitelerindeki artış midriazisi oluşturur; sfinkter kasların aktivitelerindeki artış miyozisi oluşturur ve gözbebeği genişler (Reddy ve Ganesan, 1996; Apaydın, 2001). Silyer yapı, hümör aközün salgılandığı bölümdür; ayrıca, silyer kaslar parasempatik uyarıları alan düz kaslardan oluşmaktadır. Vasküler tabaka olan koroid ise retinaya kan akımını sağlamakla görevli olan yapıdır (Reddy ve Ganesan, 1996).



Şekil 1. Gözün Anatomik Yapısı (<http-1>)



Şekil 2. Korneanın Anatomik Yapısı (<http-4>)

Gözün en içteki sinirsel katmanına da retina adı verilmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996; <http-7>). Bu tabaka, temelde, iç duysal tabaka (nörosensoryel) ve dış pigmentli tabakadan oluşmaktadır. Işığın algılanması için gerekli elektrokimyasal reaksiyonlar duysal tabakada meydana gelir (<http-2>). Retinadaki gangliyon hücrelerinin aksonlarının, globu terk edip myelin kılıfı ile sarıldığı yapı optik sinir olarak isimlendirilir. Optik siniri oluşturan yaklaşık 1.2 milyon sinir lifi içinde iletiyi en hızlı taşıyanlar kalın olanlar ile en çok miyelin içerenlerdir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Göz merceği, gözü anterior ve posterior olmak üzere iki bölüme ayırmaktadır. Anterior bölüm kornea, hümr aköz ve iris-silyer yapıdan oluşurken, posterior bölümde retina ve vitröz yapı bulunmaktadır (Reddy ve Ganesan, 1996). Kornea,

mercek ve vitröz yapı kan damarları içermeyen saydam yapılardır (Reddy ve Ganesan, 1996; Lloyd ve ark., 2001). Oksijen ve besinler nonvasküler dokulara hümör aköz ile taşınır (Reddy ve Ganesan, 1996).

Göz kapaklarının iç bölümünü kaplayan ve göz küresinin ön bölümünü örten ince, saydam membran, konjonktiva, gözyaşı bezinden gelen gözyaşı ile ıslak ve temiz tutulur (Reddy ve Ganesan, 1996; Gürsoy, 2002; Lee Y.C.ve ark., 2002). Gözyaşı yaklaşık 7µL hacimde, pH'sı 7.2-7.4 olan bir sıvıdır ve gözyaşı kanalı aracılığı ile buruna boşalır (Reddy ve Ganesan, 1996; Gürsoy, 2002). Göz oldukça geniş pH aralığındaki maddeleri tolere edebilecek yapıdadır (Kaur ve Kanwar, 2000).

Oküler Etkin Madde Taşıyıcı Sistemler ve Uygulanışları

Göz yüzeyinin ve gözün iç kısımlarının tedavisinde EM'ler çoğunlukla topik yoldan uygulanmaktadır. Gözün anteriyör kısmını ilgilendiren pek çok patolojik durumun tedavisinde topik kullanım diğer yollara tercih edilmektedir. Bunun başlıca iki nedeni, uygulama kolaylığı ve sistemik uygulamaya kıyasla hedef bölgede daha yüksek EM konsantrasyonunun sağlanmasıdır (Plazonnet, 2002). Topik uygulanan EM taşıyıcı oküler sistemler arasında, çözeltiler, emülsiyonlar, süspansiyonlar, merhemler, çözünebilir jeller, kullanılacağı zaman sulandırılan tozlar, katı (hidrofilik) insertler, EM yüklenmiş hidrofilik kontakt mercekler ve diğer kontrollü salım sistemleri yer almaktadır (Plazonnet, 2002; Özsoy, 2004). Topik uygulanan EM'lerin intraoküler absorpsiyonları hem korneal hem de non-korneal yoldan gerçekleşebilmekte ve sonrasında EM konjonktiva ve skleradan geçiş yaparak gözün daha iç kısımlarına ulaşmaktadır (Plazonnet, 2002). Bununla birlikte, topik uygulanan oküler EM taşıyıcı sistemler, genellikle, istenilen etkiyi sağlayamayan sistemler olarak kabul edilmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996). Bu nedenle, EM'nin gözde daha uzun süre kalabildiği, EM kaybının azaldığı ve bu sayede yan etkilerin de en aza indirildiği yeni EM taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Gulsen ve Chauhan, 2005)

Çözelti, süspansiyon ve merhem şeklinde hazırlanan formülasyonlar arasında en çok kullanılan sistem çözeltilerdir (% 68) (Gangrade ve ark., 1996; Hecht ve ark., 1996; Klang ve ark., 1998; Lv ve ark., 2005). Çözeltilerin en önemli sakıncaları gözde tutunma sürelerinin çok kısa olmasıdır (Klang ve ark., 1998).

Göz damlası şeklindeki oküler çözeltiler göze uygulandıklarında, başlangıç olarak, önceden tam olarak belirlenemeyen bir başlangıç dozu ve bunu takip eden bir sürede azalarak etkin konsantrasyonun altına düşen EM konsantrasyonu ile genellikle birinci derece kinetiğe uygun sistemler oluşmaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda EM konsantrasyonunun sağlanabilmesi için göz damlalarının sık aralıklarla kullanılmaları gerekmektedir. Bazı durumlarda, yüksek konsantrasyonda EM içeren formülasyonlar hazırlanarak bu durumun üstesinden gelinmeye çalışılmış ancak sistemik yan etkileri tetiklemesi nedeniyle tercih edilen formülasyon hazırlama şekli olmamıştır (Reddy ve Ganesan, 1996).

Göz damlası şeklinde hazırlanan formülasyonlar iki şekilde geliştirilmeye çalışılmıştır. Birinci yöntemde, formülasyonun gözde kalış süresi artırılarak etkinin artırılması amaçlanmıştır (Kompella ve Lee, 1999). Bu amaçla, polimerlerin göz damlalarında kullanılması, emülsiyonlar, süspansiyonlar, merhemler, çözünebilen jeller, kolajen koruyucular, yumuşak kontakt mercekler

gibi hidrofilik matrislere EM yüklenmesi, insertler ve oküsertler gibi yeni yaklaşımlarda bulunulmuştur (Reddy ve Ganesan, 1996).

İkinci yöntemde ise, korneal geçirgenlik artırılarak etkide artış hedeflenmiştir (Kompella ve Lee, 1999). Şelat yapıcı maddeler ve YEM'ler, iyon çiftleri, lipozomlar ve ön ilaçlar kullanılarak korneal geçirgenlik arttırılmaya çalışılmıştır (Reddy ve Ganesan, 1996).

EM'nin sulu ortamda çözünmediği durumlarda, kararlılığı, aktiviteyi ve/veya etkinliği arttırmak için, madde, süspansiyon şeklinde formüle edilebilmektedir (Hecht ve ark., 1996; Özsoy, 2004). Süspansiyonlar, oküler formülasyonlar arasında % 7'lik bir paya sahiptir (Gangrade ve ark., 1996). Süspansiyonlardaki partiküllerin % 95'inin boyutlarının 10 µm'den küçük olması, partiküllerin hassas göz dokularında iritasyona neden olmaması ve her defada uygulanan EM miktarının eşit olması açısından büyük önem taşımaktadır (Hecht ve ark., 1996). Merhemler yaklaşık olarak % 23'lük bir kısmı oluşturmaktadır. Merhemlerin daha uzun süre gözde kalmaları, uzatılmış etki sağlamaları ve daha iyi kararlılıkları çözümlere olan üstünlükleri olarak gösterilebilir (Reddy ve Ganesan, 1996). % 2'lik kısmı ise, jeller, spreyleyler ve insertler oluşturmaktadır (Gangrade ve ark., 1996).

Bu sistemlerin yanısıra kolloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, (Brandl, 1998) katı ve steril sistemler olan insertler (Gürsoy, 2002; Rao, 2002; Sultana ve ark., 2005), göze cerrahi işleme yerleştirilen implantlar (Gürsoy, 2002), genellikle görme kusurlarının tedavisinde kullanılan kontakt mercekler (Lloyd ve ark., 2001; Gulsen ve Chauhan, 2005), yeni oküler ilaç taşıyıcı sistemler (NODS) gibi yeni geliştirilen sistemler (Rao, 2002) ve oküler amaçlı ön ilaçlar (Kompella ve Lee, 1999), oküler uygulama için hazırlanmış EM taşıyıcı sistemler ve uygulama şekilleridir.

Topik uygulama dışında, EM'ler, göze perioküler enjeksiyon (Reddy ve Ganesan, 1996; Lloyd ve ark., 2001), intrakameral veya intravitreal olabilen intraoküler enjeksiyonlar (Reddy ve Ganesan, 1996; Gangrade ve ark., 1996), sistemik olarak (Plazonnet, 2002), ve iyontoforez ile (Reddy ve Ganesan, 1996; Washington, 2000; Plazonnet, 2002), çok nadir de olsa göz küresinin arka kısmına enjeksiyon şeklinde uygulanabilmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Oküler sistemlerde karşılaşılan zorluklar ve çözüm yolları **Çizelge 1**'de sunulmuştur.

EM taşıyıcı sistemlerde aranılan güvenilirlik, etkinlik, kararlılık gibi özelliklere ek olarak oküler sistemlerin sahip olması istenilen bazı özellikler vardır. Oküler bir sistem EM'yi doğru bölgeye ulaştırmalıdır. Örneğin hedef bölge iris-silyer yapı ise yüksek konjonktival konsantrasyon anlamsızdır. Sistemik etkiye kıyasla lokal etki daha etkin olmalıdır. Uygulama sıklığını azaltacak şekilde (örn. günde 1 doz) formüle edilmelidir. Hasta kendi kendine uygulayabilmeli, uygulama sonrasında rahatsızlık vermemeli, görmeyi engellememeli ve tadı kötü olmamalıdır. Güvenilir maddeler ile formüle edilmelidir. Etkin bir antimikrobiyal madde ile karışabilir olmalı veya tek dozluk şekilde hazırlanmalıdır. Endüstriyel düzeyde sterilize edilebilmelidir. Özel koşullarda saklanması gerekmemelidir (Plazonnet, 2002).

Çizelge 1 . Oküler Sistemlerde Karşılaşılan Problemler ve Çözüm Yolları (Kompella ve Lee, 1999).

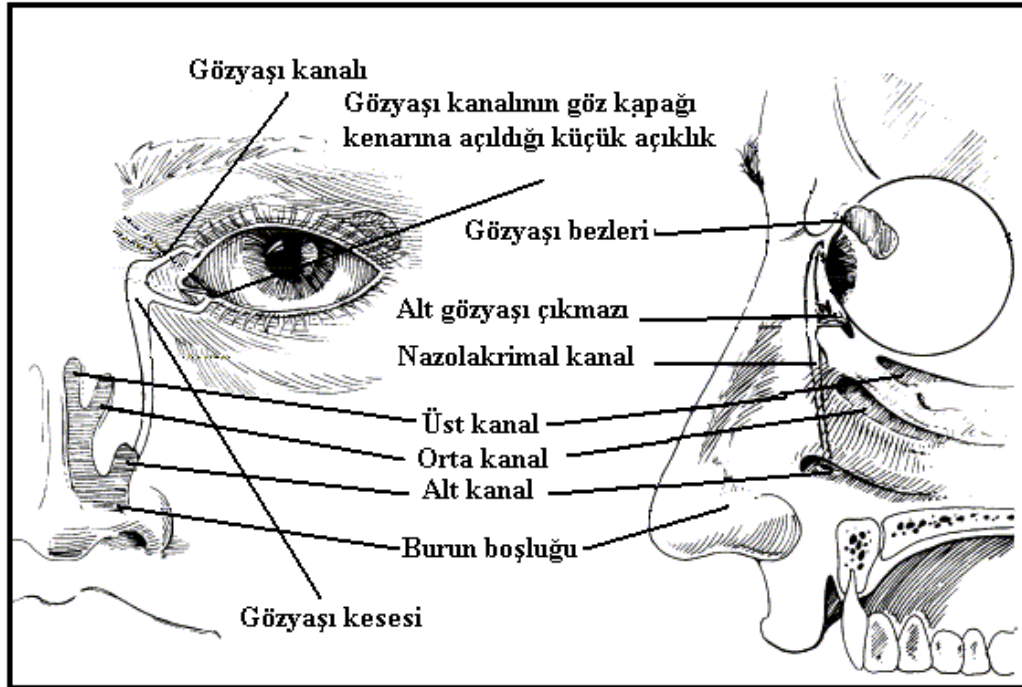
| Sınırlayıcı Faktörler | Çözüm Yolları |
|--|---|
| Kısa prekorneal temas zamanı | Viskoz jeller <i>In situ</i> jelleşen sistemler İnsertler Biyoadezifler Biyoadezifler ile kaplanan lipozomlar Kolajen koruyucular içindeki lipozomlar Kolajen koruyucular Oftalmik çubuklar Doz hacminin azaltılması Dozlar arasında 5 dakika bekleme İlaçlar ile gözyaşı akış miktarının azaltılması |
| EM'nin gözyaşı proteinlerine bağlanması | Proteinlerin bağlanma noktalarına bağlanmak için yarışan adjuvanlar |
| Nazal ve konjonktival dolaşımdaki kayıp | Ön ilaçlar Vazokonstrüktörler Nanokapsüller |
| Geçirgenlik engeli | Penetrasyon artırıcılar Ön ilaçlar İyon çifti ajanları |
| Enzimatik engel | Proteaz inhibitörleri |

Oküler Uygulamalarda Etkin Madde Dağılımı

EM 'nin oküler bölgeye (**Şekil 3**) verilmiş yolları içerisinde, topik uygulama, kolay olması, hastanın kendi kendine uygulama yapabilmesi, lokal etkiye imkan vermesi ve sistemik EM yüklemesine yol açmaması nedenleriyle en çok tercih edilen yol olmaktadır (Gangrade ve ark., 1996). Topik olarak uygulanan EM'nin konsantrasyonu, prekorneal bölgedeki yer değiştirdiği gözyaşı hacminin drenajına, gözyaşı üretimine ve gözyaşı sirkülasyonuna, EM protein etkileşimine (protein bağlanması), gözyaşı buharlaşmasına, çok yüksek olmayan konjonktival absorpsiyona ve etkili korneal absorpsiyona bağlı olarak değişmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Gözyaşı çıkmazında tutulan gözyaşı miktarı normal şartlarda 8 μ L'dir (Reddy ve Ganesan, 1996). Ancak, göz kırpması durduğunda bu değer 30 μ L'ye kadar

çıkabilmektedir (Hecht ve ark., 1996). Gözyaşının fizyolojik pH'sı 7.2-7.4'tür. Gözyaşı, lakrimal bezlerden dakikada yaklaşık 1.5 mL.dk⁻¹ oranında üretilir ve normal fizyolojik durumlarda konjonktiva üzerine boşaltılır (Reddy ve Ganesan, 1996). Üst göz kapağı yardımıyla dakikada yaklaşık % 16'lık bir kısmı devreder (Diane ve ark., 1996). Göz çıkmazında fazla miktarda sıvı olduğunda, gözyaşı kanalının göz kapağı kenarına açıldığı küçük deliğe (*punctum lacrimale*) gelir ve negatif basıncın etkisiyle gözyaşı kesesi'ne geçer. Göz kırpması gerçekleştiğinde, gözyaşı kesesi baskılanır ve her kırpma sırasında yaklaşık 2 µL gözyaşı nazolakrimal kanala geçer (Reddy ve Ganesan, 1996). EM çözeltisi prekorneal alana uygulandığında, EM'nin büyük bir bölümü refleks drenajına bağlı olarak göz kapakları kenarından kaybedilerek yanaklara akmaktadır (Diane ve ark., 1996). Bu nedenle oküler uygulanan EM için biyoyararlanım % 10'dan az olmaktadır (Diane ve ark., 1996; Hecht ve ark., 1996).



Şekil 3. Lakrimal Sistem (Lee Y.C. ve ark., 2002)

Dikkat edilmesi gereken başka bir konu ise, EM'nin proteinlerle olan etkileşimidir. Lakrimal sıvı, toplam % 0.7 protein ve % 0.4 albumin içerir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Çok katmanlı epitelyum ile kaplı bağ dokudan oluşan bir membran olan konjonktival bölgenin tamamı 16 cm²'dir ki, bu da korneal bölgenin altı kat daha fazla alanını oluşturmaktadır. Konjonktival absorpsiyon, prekorneal biyoyararlanımı etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Kornea ile karşılaştırıldığında, konjonktival absorpsiyon, bu bölgenin yüksek vaskülaritesine rağmen göz ardı edilebilecek kadar düşüktür. Toksikolojik özellikler dikkate alındığında, EM'lerin sistemik dolaşıma geçişindeki en önemli yol olan korneal

yolun yanısıra, EM'lerin konjonktivadan çok düşük oranlarda absorpsiyonları da dikkate alınmalıdır (Reddy ve Ganesan, 1996).

Prekorneal alanda korneadan EM absorpsiyonu, kornea ile EM'nin temas süresine, prekorneal gözyaşı dinamiklerine ve korneal epitelin geçirgenliğine bağlı olarak değişmektedir. Anatomik olarak üç tabakadan oluşan korneada, hidrofilik yapıdaki stromal tabaka, yüksek lipofilik yapı gösteren epitel tabaka ile düşük lipofilik yapı gösteren endotel tabaka arasında yer almaktadır. EM'lerin korneadan absorpsiyonları iki şekilde olmaktadır; transselüler (epitel hücrelerin içinden) ve paraselüler (epitel hücrelerin arasından). Topik uygulanan EM'lerin çoğu transselüler yol ile korneadan emilmektedir ve bu absorpsiyon EM'nin lipofilitesine, pKa değerine ve bazı durumlarda molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. İki fazlı çözünmeye neden olma özelliği ile, kornea, engel olmasının yanısıra, EM deposu olarak da davranmaktadır. EM'nin hidrofilik stromal tabakadan difüze olabilmesi için maddenin suda uygun bir çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Oküler Biyoyararlanım

Hızlı drenaj, gözün yaşarması ve gözyaşının sirkülasyonu nedeni ile bir çoğu su bazlı sistem olan oküler EM taşıyıcı sistemler gözden çabuk uzaklaşmakta ve bu nedenle biyoyararlanımları düşük (% 1-10) olmaktadır (Klang ve ark., 1998; Lv ve ark.,2006). Göze uygulanan EM'nin yaklaşık olarak % 5'lik kısmı göze geçebilmekte, kalan kısım nazolakrimal kanala geçerek sistemik dolaşıma karışmaktadır (Lv ve ark., 2005; Alany ve ark., 2006).

Oküler absorpsiyon, başlıca kornea ve konjonktivadan olmaktadır. EM'ler kornea epitel hücreleri içinden difüze olurlar; sınırlı olmakla birlikte bazı maddeler epitel hücreler arasından da geçebilmektedir. EM'nin korneadan geçiş hızı ile yapısı ve fizikokimyasal özellikleri arasında ilişki vardır. Lipit çözünürlüğü fazla olan madde için stroma, sudaki çözünürlüğü fazla olan EM için ise kornea epiteli hız sınırlayıcı membran gibi davranır. Dolayısıyla, lipofil özellikteki EM'ler kornea epitelinden kolayca geçerken, hidrofil EM'ler için kornea epiteli bir engel oluşturmaktadır. Kısmen lipofil maddelere ise, kornea epiteli % 50, stroma ve endotelyum % 25 direnç gösterir (Gürsoy, 2002). EM'lerin , sıcaklığa bağlı olarak *in situ* jelleşen sistemler, nanopartiküller, niozomlar, lipozomlar ve ME gibi sistemleri hazırlanarak, gözdeki penetrasyon sorunlarının üstesinden gelinmeye çalışılmıştır (Alany ve ark., 2006).

Oküler uygulanan EM'lerin farmakokinetiklerinin bilinmesi, göz preparatlarının kullanımı ve EM'lerin prekorneal, korneal ve intraoküler dispozisyonları hakkında temel bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Gözün yapısına bağlı olarak karşılaşılan anatomik ve fizyolojik engeller, EM'nin fizikokimyasal özellikleri ve tüm bunların etkileşimleri nedeniyle, oküler farmakokinetikler çok karmaşık ve anlaşılması güç bir hal almaktadır. İntraoküler dokular arasında metabolitlerin çok hızlı değişmesi nedeniyle, EM dağılımı için bilinen genel kompartmanlar, gözde geçerliliğini kaybetmektedir (Reddy ve Ganesan, 1996).

Kolloidal Oküler Sistemler

Göze uygulanan kolloidal sistemler, mikro- ve nanoküreler, nanokapsüller, lipozomlar ve mikro- ve nanoemülsiyonlar olarak sınıflandırılabilir. Bu sistemler, yapısal üstünlükleri ile göze uygulanan çözelti sistemlerine kıyasla yüksek tedavi değeri oluşturmalarının yanısıra, partiküler sistemler ile de daha iyi biyoyararlanım oluşturmaktadır. Ayrıca, göz damlaları gibi göze kolayca uygulanabilmektedir. Kolloidal oküler sistemlerden, yeterli miktarda EM taşımaları, tedavi süresince EM'nin aktivitesini devam ettirmeleri, salım süresince yavaş yavaş parçalanmaları veya salım bittiğinde gözden uzaklaştırılmaları, immünojenik olmamaları ve kolayca sterilize edilebilmeleri beklenmektedir (Gürsoy, 2002).

Mikroküreler, çapları birkaç µm ile birkaç yüz µm arasında değişebilen, monolitik yapıdaki mikro- taşıyıcılar olarak tanımlanmaktadır. Mikrokürelerin geliştirilmesindeki amaçlar şunlardır: EM'yi kontrollü şekilde salması, EM'nin yapı aktivitesini değiştirmemesi, EM'yi hedef organ, doku veya hücreye taşıması, hedefe ulaşana dek EM sızıntısı olmaması, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda dayanıklı olması, düşük dozda ilaç kullanımına olanak sağlaması, düşük doza bağlı olarak toksisitenin azalması, biyolojik sistemle uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması (Kaş, 2002).

Mikroküre, nanoküre ve nanokapsüller gibi polimerik yapıdaki partiküller gözde parçalanmayan, parçalanmayan ve iyon değiştirebilen polimerlerden hazırlanmaktadır. EM, partiküllerden, difüzyon, polimerin erozyonu, hidrolizi ve iyon değiştirmesi ile salınmaktadır. Bu mekanizmaların bir veya birkaçı bir arada olabilir. Partiküller, oküler yüzey ile uzun süre temas ederek EM'nin korneadan penetrasyonunu uzatırlar (Gürsoy, 2002).

Saydam ve termodinamik olarak dayanıklı sistemler olarak tanımlanan ME'lar ise, EM'nin çözünürlüğünü, kararlılığını ve biyoyararlanımını arttırmaktadır (Saettone ve ark., 2000; Gürsoy, 2002). ME'lar, 0.1 µm'den daha küçük damlacık boyutları ile ışığın daha az dağılmasına neden olup, saydam bir yapı gösterirler ve uygulandıklarında bulanık görmeye neden olmazlar (Saettone ve ark., 2000). Kolloidal sistemlerde EM'nin penetrasyonunun artmasına karşın, emülsiyonun pozitif veya negatif yüklü olması da korneadan penetrasyonu ve oküler dokuda dağılımı etkilemektedir. Bu nedenle, pozitif yüklü nanoemülsiyonlar ile negatif yüklü nanoemülsiyonlar karşılaştırıldıklarında, pozitif yüklü nanoemülsiyonlarda endositozun daha fazla olmasına bağlı olarak, kornea ve konjonktivadaki C_{maks} ve AUC değerleri, negatif yüklü nanoemülsiyonlardan daha yüksek bulunmuştur. ME'lardaki tek sorun, yüksek konsantrasyonda YEM içermelerine bağlı olarak toksik etki gösterme olasılığıdır (Gürsoy, 2002).

Hidrofilik veya hidrofobik EM'ler ile, vücutla uyumlu ve vücutta metabolize olabilen katı lipidlerin sudaki dispersiyonlarından oluşan SLN'lerin (Müller ve ark., 1997; Gohla ve Dingler, 2001) oküler uygulamalarında diğer taşıyıcı sistemlere göre gözde daha uzun kalış süresi sağlanmıştır (Müller ve Böhm, 1998; Müller ve ark., 2002). SLN'lerin farmasötik endüstride kullanılan tüm sterilizasyon yöntemleri ile sterilize edilebilmeleri, oküler sistemlerin hazırlanmasında sisteme önemli üstünlük kazandırmaktadır (Müller ve ark., 2000b).

Aynı tip içerik ve YEM konsantrasyonuna sahip koloidal lipit emülsiyon ve süspansiyon formülasyonları karşılaştırıldığında, büyük benzerliklerine karşın, hazırlama yöntemleri ve kimyasal kompozisyonları nedeniyle, temel fizikokimyasal farklılıklar ortaya çıkmıştır (Westesen ve Siekmann, 1997).

Oküler Dozaj Şekillerinde Sterilite

Oküler kullanım amacıyla hazırlanan her farmasötik dozaj şeklinin valide edilmiş koşullar altında sterilitesinin sağlanması gerekmektedir. Sterilizasyon yöntemleri, sistemin özelliğine göre çeşitlilik gösterebilmektedir (Hecht ve ark., 1996). USP ve BP’de belirtilen yöntemler, kısaca, buhar sterilizasyonu, kuru hava sterilizasyonu, gaz sterilizasyonu, iyonize radyasyon ile yapılan sterilizasyon, filtrasyon ve aseptik koşullarda hazırlamadır (Hecht ve ark., 1996; USP 24-NF 19, 2000). Son ambalajın özellikleri de göz önüne alınarak bu sterilizasyon yöntemlerinden birisi veya birkaçı birlikte kullanılabilir (Hecht ve ark., 1996).

Oküler Toksikite

1930’lu yıllarda, Amerika’da, bir kozmetik rimelin güvenilirlik testi yapılmadan piyasaya sunulması ve çok ciddi yan etkilerin ortaya çıkmasının ardından, oküler güvenlik testlerinin yapılması gerekliliği açıkça anlaşılmıştır (Curren ve Harbell, 2001).

Oküler olarak uygulanan EM’lerin yaklaşık olarak % 5’lik kısmı istenilen bölgelere lokalize olabilirken, kalan kısım gözyaşı sıvısı ile taşınarak nazolakrimal kanala ve oradan da burun boşluğuna geçer. Buradan sistemik dolaşıma karışarak istenmeyen yan etkilerin oluşmasına neden olabilirler (Gulsen ve Chauhan, 2005). Örneğin, geniş açılı glokom tedavisinde kullanılan göz içi basıncını düşüren timolol (Timoptic®) veya betaksolol (Betoptic®) gibi beta blokör maddeler, yaşları itibarıyla kalp veya solunum yolları rahatsızlıklarının fazla görüldüğü hasta grubunda glokom rahatsızlığının görüldüğü çoğu 60 yaş üzeri hastalarda sistemik dolaşıma geçtiğinde kalpte hasarlara neden olabileceği belirtilmiştir (Jani ve Rhone, 2002).

Oküler uygulanan maddelerin sistemik dolaşıma geçerek neden oldukları yan etkilerin önlenmesi amacıyla, korneal penetrasyonun arttırılmasına yönelik çalışmalarda, ön ilaçların oluşturulması, tutunma süresinin arttırılarak gözyaşı drenajının azaltılması, iyon çiftlerinin oluşturulması, iyontoforez ve penetrasyon arttırıcılar denenmiştir. Denenen bu yöntemler arasında, EM’nin oküler farmakokinetiğinin geliştirilmesinde, ön ilaç oluşturulmasının en iyi yaklaşım olduğu kararlaştırılmıştır (Tammara ve Crider, 1996).

Katı Lipit Nanopartiküller

SLN'ler, kozmetik ve farmasötik EM'ler için kontrollü salım yapan ve hedeflenebilen yeni taşıyıcı sistemler olarak tanımlanmaktadır (Müller ve Böhm, 1998; Zimmermann ve Müller, 2001)

Foton korelasyon verilerine göre, 50-1000 nm aralığında parçacık büyüklüğü dağılımına sahip olan kolloidal yapılu bu sistemler, hidrofilik veya hidrofobik EM'ler ile vücutla uyumlu ve vücutta metabolize olabilen katı lipitlerin sudaki dispersiyonlarından oluşmaktadır (Müller ve ark., 1997; Gohla ve Dingler, 2001). SLN'leri oluşturmak üzere, oda sıcaklığında katı halde bulunan lipitler kullanılmaktadır (Müller ve ark., 2000a).

Trigliseritler, kısmen esterleşmiş gliseritler, yağ asitleri, steroidler ve balmumu gibi çok sayıda lipit, SLN'lerin hazırlanmasında kullanılabilir (Mehnert ve Mäder, 2001). Formülasyonun başarısı açısından, kullanılacak lipitlerin nanometre büyüklüğünde partikül oluşturmaya elverişli, yüksek EM yükleme kapasitesine sahip, otoklav ile sterilizasyona uygun, sulu dispersiyonlarda kararlı veya liyofilize edilebilir, toksikolojik olarak kabul edilebilir ve vücutta metabolize olabilmeleri önemlidir (Manjunath ve ark., 2005).

Molekül ağırlıkları ve elektriksel yapıları göz önüne alınarak, bütün YEM'ler lipit dispersiyonların kararlılığını sağlamak için kullanılabilir. YEM'lerin karışım halinde kullanıldığı çalışma sonuçları, aglomerasyonun daha etkili biçimde engellendiğini ortaya koymuştur (Mehnert ve Mäder, 2001). Kullanılacak YEM'ler, toksik olmamalı, diğer maddeler ile karışabilmeli, kullanıldığı en az konsantrasyon ile istenilen boyutlarda partikül oluşmasını sağlamalı ve SLN'lerin yüzeylerini kaplayarak kararlılıklarını arttırmalıdır (Manjunath ve ark., 2005).

Klasik EM taşıyıcı sistemlere alternatif olarak geliştirilen SLN'ler, emülsiyonların ve lipozomların aksine, yüklenen EM'yi katı lipit yapıları sayesinde kimyasal ve fiziksel bozunmaya karşı koruyabilmekte (Dingler ve ark., 1997; Müller, 1998; Dingler ve ark., 1998a; Müller ve ark., 2000a), hem lipofilik hem de hidrofilik EM yüklenmesi sağlanabilmekte (Kristl ve ark.2003; Sanna ve ark., 2004), uzatılmış EM salımını gerçekleştirebilmekte (Demirel ve Yazan, 2000), EM hedeflendirilmesine olanak sağlamakta (Demirel ve Yazan, 2000; Kristl ve ark. 2003; Sanna ve ark., 2004) ve daha kararlı bir yapı sergilemektedir (Dingler ve ark., 1998b). SLN'lerin fiziksel kararlılıkları, DSC ile kolayca kanıtlanabilmektedir (Jenning ve ark., 2000a). Kolloidal yapılu SLN'lerin en önemli üstünlüklerinden birisi de, sudaki çözünürlüğü düşük olan EM'lerin biyoyararlanımını arttırabilmeleridir (Jores ve ark., 2004; Müller, 1998). Bunların yanısıra, SLN'ler büyük miktarlarda (2-2000 kg.sa⁻¹) üretilebilmektedir (Müller ve ark., 1997; Müller, 1998; Gohla ve Dingler, 2001). Bileşimlerinde, genellikle, güvenli kabul edilen (GRAS) özellikteki Dynasan[®] 114, Dynasan[®] 116, Dynasan[®] 118, Compritol[®] ve setil palmitat gibi lipitler ile, Miranol[®] ve Tego Care[®] gibi YEM'ler kullanıldığında ve EM'nin de özelliklerinin uygun olduğu durumlarda, vücutta metabolize olabilen, düşük toksisiteye sahip partiküller elde edilebilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000; Kristl ve ark.2003; Sanna ve ark., 2004). SLN'lerin ekonomik olması, moleküllere bağlanma kapasitelerinin yüksek olması (Mehnert ve Mäder, 2001, Gualbert ve ark., 2003) ve aseptik olarak üretilebilmeleri veya farmasötik endüstride kullanılan tüm yöntemlerle (otoklav,

gama ışınlama, vs.) sterilize edilebilmeleri diğer üstünlükleri arasında sayılabilir (Müller ve ark., 2000b; Jores ve ark., 2004). SLN'ler, ayrıca, katı lipit matrisleri sayesinde ürünlerin istenmeyen renk ve kokularını maskeleyerek amacıyla da kullanılabilir (Dingler ve ark., 1997).

SLN'ler ile yapılan çalışmalar sonucunda, parçacık büyüklüğünün zamanla büyümesi, jelleşme eğiliminin olması, katı lipitin beklenmedik polimorfik geçişleri, katı lipitin kristal yapısından dolayı düşük bağlama kapasitesi gibi istenmeyen durumlar sistemin sakıncaları olarak değerlendirilmiştir (Jores ve ark., 2004; Venkateswarlu ve ark. 2004).

Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

SLN'ler, yüksek basınç homojenizasyon yöntemi başta olmak üzere, lipit partiküllerin çöktürülmesi, eriyik haldeki lipitin karıştırma ve çalkalama ile YEM çözeltisinde dağıtılması (lipit nanopelletler ve lipit nanoküreler) (Müller ve ark., 2000b), çözücü emülsifikasyonu veya çözücü uçurulması (Mehnert ve Mäder, 2001), eriterek emülsifikasyon (Ahlin ve ark., 1998), ME'ların seyreltilmesi (Trotta ve ark., 2003; Müller ve ark., 2000b) ve yüksek devirli homojenizasyon (Müller ve ark., 1995) gibi çok çeşitli yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Ayrıca, püskürterek kurutma (Freitas ve Müller, 1998b; Demirel ve Yazan, 2000) ve liyofilizasyon (Mehnert ve Mäder, 2001) yöntemleriyle de kuru halde SLN elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınç homojenizatörü, sıvıyı yüksek basınçla (100-2000 bar), birkaç mikron büyüklüğünde olan dar bir delikten geçecek şekilde iter. Sıvı çok yüksek hız ile (1000 km. sa⁻¹'in üstünde) çok dar bir alandan geçmeye zorlanır. Oldukça yüksek yüzey gerilim ve sürtünme kuvveti etkisiyle, parçacık boyutları mikronaltı büyüklüklere iner (Mehnert ve Mäder, 2001). % 5-10 aralığında lipit içeriğine sahip olan bir sıvıda herhangi bir homojenizasyon sorunu yaşanmaz. Lipit konsantrasyonu yaklaşık % 40 olan formülasyonlar da bu yöntemle oldukça kolay şekilde homojenize edilmiştir (Müller ve ark., 2000b). Yöntemde 45-85°C'lik aralıkta sıcaklık kontrolü sağlanabilmektedir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile SLN'ler geniş çapta üretim imkanına sahiptir (Müller ve Böhm, 1998).

Yüksek basınçlı sıcak homojenizasyon yönteminde (**Çizelge 2**), istenilen basınç ayarlanarak ve istenilen sayıda homojenizasyon gerçekleştirilerek üretim yapmak mümkündür. Çalışmalar göstermiştir ki, çoğu durumda, 3-5 homojenizasyon sayısı ile 500-1500 bar basınç kullanılması SLN'lerin hazırlanmasında etkili olmaktadır (Schwarz ve ark., 1994, Cengiz ve ark., 2006). Ancak, homojenizasyon sırasında sıcaklığın arttığı (500 bar basınç ile ~10°C) göz önünde tutulmalıdır. Yapılan bir çalışmada, artan sıcaklık ile EM'nin taşıyıcı içindeki parçalanma oranının da artabileceği belirlenmiştir (Mehnert ve Mäder, 2001).

Hidrofilik EM'lerin formülasyonunda, lipit eriyiğinin sulu YEM çözeltisinde dağıtılması, hidrofilik EM için, % 90'ından fazlasının su fazında kaybı anlamına gelmektedir (Müller ve ark., 2000a). Bu nedenle, hidrofilik EM'ler ile sıcaklığa aşırı duyarlı maddelerin SLN'lerinin oluşturulmasında sıcak homojenizasyon yöntemi uygun bir üretim yöntemi olmamaktadır (Müller ve ark., 2000b). Bu tip

maddelerin formülasyonları ancak soğuk homojenizasyon yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir (**Çizelge 2**).

Çizelge 2. Sıcak ve Soğuk Homojenizasyon Yöntemi ile Katı Lipit Nanopartikül Hazırlanması

| SICAK HOMOJENİZASYON | SOĞUK HOMOJENİZASYON |
|---|--|
| [Lipofilik EM] | [Hidrofilik veya Sıcaklığa Duyarlı EM] |
| Lipit eritilir (erime noktasının 5-10°C üstündeki sıcaklıkta), EM çözündürülür veya dağıtılır | Lipit eritilir, EM çözündürülür veya dağıtılır |
| ↓ | ↓ |
| Karışım, sıcak YEM çözeltisinde dağıtılır | Kuru buz veya sıvı azot yardımıyla karışım aniden soğutulur. |
| ↓ | (Yüksek soğutma sıcaklığı ile lipit matriste EM homojen dağılır ve lipit kırılabilirliği artar) |
| ÖN-EMÜLSİYON | ↓ |
| ↓ | EM içeren lipit öğütücüler yardımıyla öğütülür |
| Yüksek basınçlı homojenizasyon (Lipitin erime noktasının 5-10°C üstündeki sıcaklık ve 200-1500 bar basınç) | ↓ |
| ↓ | MİKROPARTİKÜLLER (50-100 µm) |
| ↓ | ↓ |
| Sıcak y/s NANOEMÜLSİYONU | Soğuk YEM çözeltisinde veya EM'nin çözünürlüğünün az olduğu sıvılarda (PEG 600 veya yağlar) mikropartiküller dağıtılır |
| ↓ | ↓ |
| Soğutma, rekristalizasyon | ÖN SÜSPANSİYON |
| ↓ | ↓ |
| SLN'ler | Yüksek basınçlı homojenizasyon (Oda sıcaklığında veya çok daha düşük sıcaklıklarda) |
| | ↓ |
| | SLN'ler |

Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek devirli homojenizasyon, katı lipit nanodispersiyon hazırlamak için kullanılan bir başka yöntemdir. Yöntem, kolaylığından dolayı sık uygulanır; ancak dispersiyon kalitesi mikropartikül içermesi nedeniyle iyi değildir (Müller ve ark. 1995)

Karışımlar, eriyik-emülsiyon tekniği ile yüksek hızda (örneğin, 20000-25000 rpm) belirli süre homojenize edilirler. Hazırlanan sıcak emülsiyon, belirli hızda (örneğin, 5000 rpm) ve sürede oda sıcaklığına getirilir. Yüksek hızda karıştırma, parçacık büyüklüklerini nanometre büyüklüğüne getirebilmektedir, ancak PI yüksek değerlerdedir. Hazırlama basamaklarından, emülsiyonun oluşturulma ve soğutma yöntemleri parçacık büyüklüğünü etkilemektedir (Mehnert ve Mäder, 2001).

Mikroemülsiyon Yöntemi

Gasco araştırma grubu tarafından geliştirilen bu yöntemde, lipit eritildikten sonra EM erimiş lipit içersinde dağıtılır (Wissing ve ark., 2004; Manjunath ve ark., 2005). YEM, YYEM ve distile sudan oluşan sulu faz da lipitin erime sıcaklığına getirilir ve saydam ME oluşması için erimiş lipit içersine karıştırıcı ile karıştırılarak eklenir (Trotta ve ark., 2003). Yaklaşık olarak, % 10 EM, % 15 YEM ve % 10 YYEM'den oluşan ME'un, yine karıştırıcı yardımı ile 2-10°C deki suya eklenmesinin ardından, yağ damlacığının ani soğuması ile SLN'ler oluşmaktadır. Sıcak ME ile soğuk suyun hacim oranları 1:25 ve 1:50 olarak belirlenmiştir (Wissing ve ark., 2004; Manjunath ve ark., 2005).

Yukarıdaki yöntemlere ek olarak, SLN hazırlamada kullanılan diğer yöntemler arasında, sonikasyon sonrası homojenizasyon (Venkateswarlu ve ark. 2004), çözücü difüzyon yöntemi (Manjunath ve ark., 2005), çözücü enjeksiyon yöntemi (Schubert ve Müller-Goymann, 2003; Manjunath ve ark., 2005) ve eriterek dispersiyon yöntemi sayılabilir (Manjunath ve ark., 2005).

Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Parçacık Şekli

SLN şekillerinin belirlenmesinde, AFM, elektron mikroskobu (Dingler ve ark., 1999; Demirel, 1999), ışık mikroskobu (Müller ve ark., 1992; Müller ve ark., 1993, Cengiz, 2003) ve TEM kullanılabilir (Cavalli ve ark., 1997; Igartua ve ark., 2002). AFM, genellikle, SLN'lerin morfolojik yapılarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Mehnert ve Mäder, 2001).

Parçacık Büyüklüğü

Kolloidal bir taşıyıcı sistem olan SLN'lerin karakterizasyonunda parçacık büyüklüğü ve parçacık büyüklük dağılımı en önemli fizikokimyasal özelliktir (Ahlin ve ark., 1998). Ufak parçacık büyüklüğü ile yüksek kararlılık ve düşük toksisite sağlamak mümkündür (Demirel ve Yazan, 2000). PCS ve LD parçacık büyüklüklerinin rutin ölçümleri için kullanılan en etkili yöntemlerdir (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001, Cengiz, 2003). Küçük partiküllerin saptanmasındaki güçlükler ve kolloidal dispersiyonu kararsız hale getirecek elektrolitlere olan gereksinim nedeniyle, Coulter Counter yöntemi SLN'lerin parçacık büyüklüğü ölçümlerinde çok nadir kullanılmaktadır (Müller ve ark.,

2000b; Mehnert ve Mäder, 2001). Alan-akış-ayırıştırma (FFF) yöntemi ile partiküller doğrusal akım altında, dikey bir alanın yapısına bağlı olarak kütlelerine, büyüklüklerine veya elektriksel iletkenliklerine göre ayrılmaktadır. Bu yöntem ile çok ufak parçacık büyüklük farklarına sahip olan partiküller dahi ayırıldabilmektedir (Müller ve ark., 2000b).

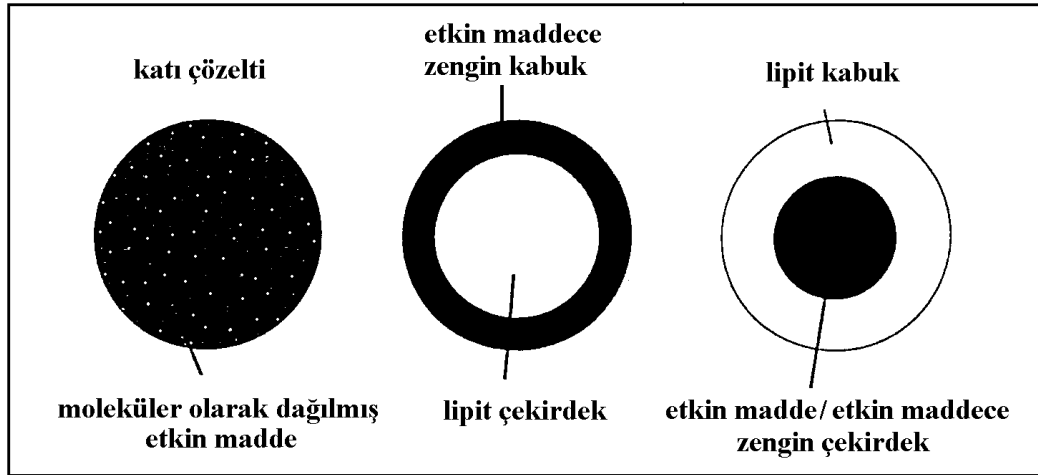
Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel, agregasyonun en önemli nedenlerinden birisidir (Schwarz ve Mehnert, 1997). Yüklü partiküllerin itme kuvvetleri sayesinde, partiküller yeteri kadar hıza ve kinetik enerjiye sahip olduklarında, birbirleri ile çarpışmakta ve agregasyon daha az oluşmaktadır. Bu nedenle, zeta potansiyelin azalması fiziksel kararsızlığı da beraberinde getirmektedir (Freitas ve Müller, 1998a). Zeta potansiyelin belirlenmesi ise, koloidal dispersiyonların saklama esnasındaki kararlılıklarının öngörülmesine olanak sağlamaktadır (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001).

Elektriksel iletkenlikte artış olmaması için, NaCl elektrolit bazı olarak eklenerek, 50-100 μ S iletkenlik aralığında sabit potansiyellerin oluşması sağlanabilmektedir. Elektrolit bazın eklenmesi ve distile sudaki iletkenliğin neden olduğu küçük değişimlerin emülsiyonları etkilememesinin sağlanması ile, çok daha etkili ölçümler gerçekleştirilebilmektedir (Müller ve Heinemann, 1993).

Etkin Madde Yüklmesi

EM'ler, hazırlanan lipit matris içinde katı çözelti halinde homojen olarak dağıtılabilir; lipit kabuk tarafından çevrelenerek çekirdekte yoğunlaşabilir; partikül yüzeyinde veya partikül yüzeyine yakın bir yere yerleşebilir (**Şekil 4**) (Müller ve ark., 2000b).



Şekil 4. Katı Lipit Nanopartikül'lere Yüklü Etkin Madde Yerleşim Şekilleri (Müller ve ark., 2000b)

SLN'lerin EM yükleme kapasitesini, EM'nin erimiş lipitteki çözünürlüğü veya karışılabilirliği, katı lipit matrisin kimyasal ve fiziksel yapısı, lipit maddenin

polimorfik durumu ve lipitin konsantrasyonu belirlemektedir (Kaş, 2002). Lipitin kimyasal yapısı da EM yükleme kapasitesini etkileyen çok önemli bir etkidir. Yüksek kristal yapılu partiküller oluşturan lipitler mükemmel bir kafes oluşturarak EM'nin partikül içine alınmasını engelleyebilmektedir. Bu oluşumun önlenmesi için, EM'nin daha fazla yer alabileceği, birbiri ile karışmayan katı ve sıvı lipitlerin bir arada kullanıldığı "Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemler" (NLC) oluşturulmuştur. NLC'ler, SLN'ler gibi katı halde ancak kristal yapıda değildir (Müller ve ark., 2002).

Tekrar Kristallenme Özellikleri

Partikül dispersiyonlarının kristallenme derecesinin belirlenmesi için DSC kullanılmaktadır (Wissing ve ark., 2001a; Olbrich ve ark., 2002). EM'nin fiziksel durumu ve yerleşimi de DSC ve XRD cihazı ile saptanabilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000).

SLN'lerin hazırlanmaları sırasında, ortamda bulunan YEM'ler, EM'ler veya diğer yardımcı maddelerden dolayı katı lipitin fiziksel özelliği değişir. Kristalizasyon derecesi ve lipit yapıda oluşan değişikliklerin değerlendirilmesi, doğrudan doğruya hapsedilen EM miktarını ve salım hızını etkilemektedir (Yazıksız İşcan, 2003). Üretimden sonra partiküllerin kristallenme oranları, kullanılan lipitin, YEM'nin ve kullanılan kararlılık sağlayıcı maddelerin fonksiyonu ile değişebilir ve bu etkenler partiküllerin saklama süresince değişmesine neden olabilir (Freitas and Müller, 1998a; Olbrich ve ark., 2002). Bazı durumlarda ise, saklama süresince lipit daha mükemmel olan ve EM için daha az boşluk içeren β -modifikasyonuna geçerek EM'nin sızmasına neden olabilmektedir (Müller ve ark., 2002).

Etkin Madde Salımı

SLN'lerde EM salımı lipit yapının modifikasyonu, YEM konsantrasyonu, hazırlama yöntem ve şartlarına göre değişmektedir (Müller ve ark., 2000b).

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Sterilizasyonu

Sterilizasyon yönteminin, formülasyonun özelliklerini değiştirmemesi, fiziksel kararlılığı ve EM salım kinetiklerini etkilememesi gerekmektedir (Müller ve ark., 2000b). SLN'lerin aseptik hazırlanabilmelerinin yanısıra, filtrasyon, buhar ve gama ışınları ile sterilize edilmeleri de mümkün olabilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000).

SLN'lerin filtrasyon ile sterilizasyonlarında yüksek basınç gerekmektedir ve 0.2 μm 'den büyük partiküller için uygun bir yöntem değildir. Filtrasyon, formülasyonlar sıvı haldeyken yani sıcakken uygulanmalıdır. Böylece, filtrenin por çapından daha büyük partiküller içeren formülasyonlardaki partiküller oluşmalarından önce sterilize edilmiş olmaktadır (Müller ve ark., 2000b).

Buhar ile sterilizasyon, SLN'lerin sterilizasyonunda çoğunlukla tercih edilen yöntemdir. Lipozomların sterilizasyonunda da kullanılan bu yöntemde, sıcaklığa bağlı olarak fiziksel kararlılıkta değişiklikler ve partiküllerin aglomerasyonu görülebilmektedir. Sterilizasyon, 121°C'de 15 dakika süreyle gerçekleştirilirken, (Schwarz ve ark., 1994) SLN'ler erimekte ve soğuma esnasında tekrar oluşmaktadırlar (Müller ve ark., 2000b). Isıya duyarlı maddelerin sterilizasyonu için gama ışınları ile sterilizasyon da alternatif bir yöntem olmaktadır (Mehnert ve

Mäder, 2001). Işınlr ile sterilizasyonda, gama ışınları, yüksek enerjileri nedeniyle, serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu radikaller de formülasyondaki maddeler ile etkileşerek kimyasal farklılıklara neden olabilmektedir (Müller ve ark., 2000b).

Kısacası, literatür bilgilerine göre, SLN'ler farmasötik endüstride kullanılan tüm sterilizasyon yöntemleri ile sterilize edilebilirler (Müller ve ark., 2000b).

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Toksisitesi

Bileşenlerin seçimi, SLN'lerin uygulama yoluna bağlı olarak değerlendirilmelidir. Topik ve oral uygulamalar en problemsiz yollardır. Topik olarak uygulanan SLN formülasyonlarında tüm krem ve losyon içerikleri kullanılabilir. Oral olarak kullanılan SLN formülasyonlarında da, tablet, pellet ve kapsüllerde kullanılan tüm lipit ve YEM'ler kullanılabilir. Ayrıca, GRAS özellikte veya gıda endüstrisinde kullanılan tüm maddeler ile formülasyon oluşturulabilmektedir (Müller ve ark., 2000b).

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Uygulanışı

EM'lerin, SLN'ler ile, oral, topik, oküler ve parenteral yolla uygulanabilmeleri için çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Müller ve Böhm, 1998; Runge ve Müller, 1998, Lippacher ve ark., 2001; Cengiz ve ark., 2006). Topik uygulamalarda SLN'ler, EM'nin kontrollü salımı ve kimyasal bozunmaya karşı korunması amacıyla kullanılabilir (Müller ve ark., 1997).

SLN'lerin oküler uygulamalarında, gözde, diğer taşıyıcı sistemlere göre daha uzun kalış süresi sağlanmıştır (Müller ve Böhm, 1998; Müller ve ark., 2002). SLN sistemi, pilokarpin ve tobramisin oküler uygulamasında umut verici olmuştur. Bu sistemle, EM'lerin gözdeki kalış süreleri uzamış ve kararlı preorneal film oluşturulmuştur. Tavşanlara uygulanan SLN'ler ile klasik göz damlaları kıyaslandığında, tobramisin EM'si SLN'ler ile daha iyi biyoyararlanım göstermiştir (Manjunath ve ark., 2005).

Mikroemülsiyonlar

ME'lar, 1940'lı yılların başında, süt görünümlü bir emülsiyonun hekzanol ile titrasyonunu gerçekleştiren Hoar ve Schulman tarafından ortaya konmuş ve pek çok kez yeniden tanımlanmıştır (Lawrence ve Rees, 2000).

Kritik çözeltiler olarak da tanımlanan ME'lar, emülsiyonlara benzer özellikte olup, düşük yüzey gerilimleri, izotropik ve termodinamik açıdan daha kararlı yapıları ile bu sistemlerden farklılık göstermektedir (Binks ve ark., 1997; Alany ve ark., 2006). Kararlılıklarının yüksek olması, saydam görünümleri, hazırlanmalarındaki kolaylık, düşük viskozite, süzme ile sterilize edilebilme gibi üstünlükleriyle çok araştırılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadırlar (Moulik ve Paul, 1998). ME'ların damlacık büyüklüğünün 10-100 Å aralığında olması suda az çözünen maddelerin taşınmasını kolaylaştırmaktadır (Binks ve ark., 1997). ME, damlacıklarının miseller yapıdan daha büyük olması nedeniyle "şişkin miseller" olarak da tanımlanmaktadır. Miseller yapıdan farkı, ME'ların oluşması için belli bileşenlere ihtiyaç duyulması ve çözündürme kapasitelerinin fazla olmasıdır. Hidrofilik EM'ler polar faza, lipofilik EM'ler de apolar faza eklenerek formüle edilebilir (Yazan, 2002). Çözünürlük problemi olan lipofilik maddelerin yüksek miktarlarının ME'un yağ damlacıklarında kolaylıkla çözünebilmesi, sistemin EM çözme kapasitesini ve biyoyararlanımını arttırmaktadır (Grassi ve ark., 2000). ME'lar, bu özellikleri sayesinde, oküler ve biyofarmasötik sistemlerin hazırlanmasında EM'lerin çözünürlüğünü arttırmak, sistemik ve topik etkiyi yükseltmek için kullanılmaktadır (Corswant ve Thoren, 1999; Lv ve ark., 2005).

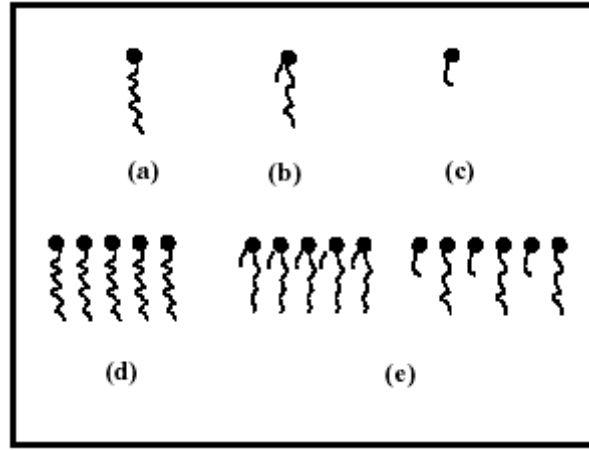
ME'lar, y/s (su-içinde-yağ) ME'ları, s/y (yağ-içinde-su) ME'ları ve bikontinyus (yağ ve su fazı birbiri içine geçmiş durumda) ME'ları olmak üzere üç tiptir (Lv ve ark., 2005); ME tipleri, kullanılan YEM ve yağın özelliğine göre değişmektedir (Biruss ve ark., 2007). Temel olarak, ME sistemleri, su, yağ, non-iyonik veya iyonik YEM ve düşük alkanoller (butanol, pentanol ve hekzanol), aminler (butilamin, heksilamin) veya organik asit gibi yardımcı maddeleri içerir (Watarai, 1997). Suda çözünen veya su ile karışabilen hidrofilik maddeler de sulu faz olarak kullanılabilir. Gliserin, propilen glikol, polietilen glikol (PEG), suda çözünen polimerler, renk maddeleri, elektrolitler ve hidrolize edilmiş proteinler sulu fazda yer alabilir (Yazan, 2002).

Yağlı faz olarak, doğal yağlar, hidrokarbonlar, trigliseritler, silikon ve esterler kullanılır. Bu fazda, su ile uyuşmayan non-polar bileşenler vardır (Binks ve ark., 1997; Bachhav ve ark. 2006). Çözünürlüğün artırılması için daha çok orta veya uzun zincirli trigliseritler gibi polar yağlar tercih edilmektedir; ancak, polaritenin fazla olmasının ME oluşmasını engelleyebileceği göz önünde tutulmalıdır. Orta zincirli trigliseritler, uzun zincirli yağlara göre sudaki daha yüksek çözünürlükleri ve yüksek miktarda EM'nin dissolüsyonuna olanak vermeleri nedeniyle tercih edilmektedir. En fazla kullanılanlar arasında, soya ve hintyağı gibi yaklaşık % 95 oranında 8-10 karbon atomundan oluşan yağ asitlerini içeren trigliseritler, Myglyol® 812, IPM, yağ asitleri, sakkaroz esterleri sayılabilir (Vandamme, 2002).

ME formülasyonunda, sulu ve yağlı fazın birarada bulunabilmesi için, yüzey gerilimi düşürecek YEM ve YYEM'lere gereksinim duyulur. Kullanılması düşünülen YEM/YYEM oranının, yüzey gerilimi istenilen derecede düşürmeye ve

sistem beklenen saydamlığı göstermeye yetecek miktarda olması istenir (Ayannides ve Ktistis, 1999).

ME sistemlerde, YEM olarak, non-iyonik maddeler, iyonik maddeler veya iki grubun karışımları kullanılabilir. YEM'ler iki faz arasındaki yüzey gerilimi düşürürler (Binks ve ark., 1997; Bachhav ve ark. 2006). YYEM'ler, YEM'lerle birlikte, dallanmış YEM'ler gibi davranarak ME'da iç fazı damlacıklar halinde ayırıp sistemin akıcılığını ve kararlılığını sağlar (Vandamme, 2002) (**Şekil 5**). YYEM olarak, düşük molekül ağırlıklı, C₂-C₁₀ aralığında karbon zincire sahip orta zincirli alkoller, glikol türevleri, organik asitler, non-iyonik YEM'ler ve alkil aminler kullanılmaktadır (Binks ve ark., 1997; Vandamme, 2002; Bachhav ve ark. 2006). Orta zincirli alkoller ve alken dioller arasında, butanol ve heksandiol en etkili maddeler olarak belirlenmiş, ancak diğer kısa zincirli alkoller ve alken dioller gibi, farmasötik teknolojide tercih edilmemişlerdir (Bachhav ve ark. 2006).



Şekil 5. Yardımcı Yüzey Etkin Madde'nin Yüzeyler Arası Film Tabakasının Akışkanlığını Arttırmadaki Etkisi (a: doğrusal YEM, b: dallanmış YEM, c: YYEM, d: sert film tabaka, e: akıcı film tabaka) (Vandamme, 2002).

ME'ların pek çok penetrasyon artırıcı etki mekanizmaları belirtilmiştir (Chen ve ark, 2006). Yapılan bir çalışmada, penetrasyon artışının kullanılan etanol YYEM'sinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Biruss ve ark., 2007).

Mikroemülsiyon Hazırlama Yöntemleri

ME formülasyonunda, sulu faz, yağlı faz, YEM ve YYEM uygun şekilde karıştırılır; oluşan sistem y/s ME'u, s/y ME'u, y/s makroemülsiyonu, s/y makroemülsiyonu, lameller veya heksagonal kristal yapılı sıvı olabilir (Warisnoicharoen ve ark., 2000).

ME hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden birisi, yüksek basınçlı homojenizasyondur. Yöntemde, önceden hazırlanan makroemülsiyonlar yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek, saydam ME'lar elde edilmektedir (Warisnoicharoen ve ark., 2000; Hwang ve ark., 2004).

Bir diğer yöntemde ise, faz değişim sıcaklığı (PIT) kullanılır. Yöntemde, y/s ME'u hazırlamak için uygun bileşenlerle 59-80°C'da s/y emülsiyonu hazırlanır,

oluşan emülsiyon oda sıcaklığına soğutulduğunda faz ayrımı oluşmakta ve faz ayrımının olduğu bu sıcaklık faz ayrım sıcaklığı olarak adlandırılmaktadır. Faz ayrımı aşamasından sonra sisteme YYEM eklenmesi ile ME elde edilebilmektedir. YYEM'siz hazırlanan sistemlerin yüksek basınç homojenizatörü kullanılarak da ME'ları oluşturulabilmektedir (Warisnoicharoen ve ark., 2000).

ME'lar için en uygun su miktarı, titrasyon yöntemi veya deneme-yanılma yöntemi ile belirlenebilmektedir. Deneme-yanılma yöntemi aşırı madde kaybı ve ampirik bir yöntem olması nedeniyle çok tercih edilmemektedir (Bhargava ve ark., 1987).

ME bileşenlerinin seçiminde, bileşenlerin birbirleri ile etkileşiminin amaç doğrultusunda olmasına dikkat edilmelidir (Yazan, 2002). ME'ların hazırlanmasındaki en önemli konu ise, sistemi oluşturan maddelerin, özellikle yüksek oranda içerdikleri YEM'lerin (ortalama % 20) toksik ve iritan etki göstermemeleridir (Yazan, 2002; Lv ve ark., 2006).

Mikroemülsiyon Karakterizasyonu

Optik Özellikler

ME'lar, damlacık büyüklükleri ufak olduğundan saydamdırlar ve görünür ışığın dalga boyunu geçirirler. S/Y sistemlerde az miktar YEM ile saydamlık sağlanırken, y/s ME'larında gerekli olan YEM miktarı daha yüksektir (Coursant ve ark., 1998).

ME kararlılığının bozulması, fiziksel görünümde meydana gelen değişikliklerin gözlenmesi ile kolaylıkla anlaşılır (Ayannides ve Ktistis, 1999).

Buna bağlı olarak, camsı yapı oluşturan ME'ların optik incelemeleri, TEM'unda doğrudan görüntüleme ile sınırlı da olsa yapılabilmektedir (Moulik ve Paul, 1998).

Damlacık Büyüklüğü Tayini

ME'ların damlacık büyüklüğünü ölçmek için elektron mikroskobu ve ışık saçınımı (SANS ve SAXS) ile DLS yöntemleri gibi farklı yöntemler kullanılabilir (Watarai, 1997). SAXS ve SANS gibi ışık saçınım tekniklerinde, örneğe belli bir açı ile gönderilen dalgalar, örneğin içinde birbirlerini etkileyerek sonradan örneğin görünümünü oluşturacak modeli meydana getirmek üzere tüm yönlere saçılırlar. SANS yöntemi ile ayrıca yapısal özellikler de ortaya konmaktadır (Tomšič ve ark., 2006).

Yapısal bilgiler açısından, yöntemin, agregatların çaplarını da ölçebilecek kapasitede olması gerekmektedir. Misel ve ME damlacıkları için, nötron ve X-ışınları (dalga boyu <1.0 nm) kullanılabilir. Dar açılı saçınım yönteminde ölçülen yoğunluk, saçınım neden olan maddelerin yoğunluğu, damlacıklararası oluşumlar, damlacıklararası yapısal farklılıklar ile orantılı olarak, damlacığın yapısal korelasyonu ve parçacık büyüklüğü verilerini etkilemektedir (Moulik ve Paul, 1998).

DLS yönteminde ise, gönderilen ışın demeti koloidal parçacıkla *Brown* hareketi ile etkileşir. Korelasyon fonksiyonunun yoğunluğu, ışını dağıtan parçacıkların difüzyon katsayılarını ve buradan hareketle de ME damlacıklarının çaplarını Stokes-Einstein eşitliğine göre vermektedir (Moulik ve Paul, 1998; Goddeeris ve ark., 2006) (**Eşitlik 1**).

$$R_h = \frac{k T}{6 \pi \eta D} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Stokes-Einstein Eşitliği.

Burada, R_h : Hidrodinamik çap; k : Boltzman sabiti; T : Sıcaklık; η : Dış faz viskozitesi; D : Difüzyon katsayısı'dır (Goddeeris ve ark., 2006).

Zeta Potansiyel Analizi

ME sistemlerinde zeta potansiyel analizleri de gerçekleştirilmektedir. Küçük damlacıklı y/s tip emülsiyonlar düşük direnç gösterirken, s/y tipi emülsiyonlarda damlacık koagülasyonu görüldüğünde iletkenlik izlenmektedir. Direncin zamanla artması, agregasyonun, yani dayanıksızlığın belirtisidir (Swafford ve ark., 1991). Sistem, $50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ iletkenliğe sahip bidistile suda seyreltilerek analizler Helmholtz–Smoluchowski eşitliğine göre değerlendirilir (Mei ve ark., 2003).

$$Z = \frac{4 \pi \eta (9 \cdot 10^4)}{D} \times \frac{V}{E} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Helmholtz–Smoluchowski Eşitliği

Burada, Z : Zeta potansiyel; V/E : Elektroforetik hareketlilik; η : Viskozluk, D : Ortamın dielektrik sabitesi'dir (Öner, 2004)

Oküler olarak kullanılan ME'lerde, iç faz damlacıklarının yükleri oküler absorpsiyonlarını etkilemektedir. Negatif yüke sahip olan korneaya uygulanan pozitif yüklü damlacıklar, dokulara tutunmuş, gözde kalış süresinin artması ile EM'nin salımında da artış sağlamıştır (Vandamme, 2002).

Reolojik Özellikler

ME'lerin kullanım kolaylıkları ve biyoyararlanımın artması açısından sistemin viskozitesi büyük önem taşır. Viskozitenin ölçümünde tek nokta viskometreleri ve çok nokta viskometreleri kullanılmaktadır (Corswant ve ark., 1998). Reolojik analizler için, çok nokta viskozimetrelerinden koni-tabla yöntemini kullanan rotasyon tipi reometreler sıklıkla kullanılmaktadır (Polizelli ve ark., 2006).

Makroemülsiyonlar genellikle psödo-plastik akış gösterirken, ME'lar Newtonian akış göstermektedir (Ayannides ve Ktistis, 1999; Vandamme, 2002).

ME formülasyonunun, özellikle topik uygulamada belli reolojik özellikleri taşınması gerekmektedir (Ayannides ve Ktistis, 1999).

Emülsiyon Tipi

Dış fazın ve emülsiyon sisteminin dispersiyon özellikleri benzerdir. Bu nedenle, emülsiyon tipinin belirlenmesi için dış fazın belirlenmesi yeterlidir. Dış fazın belirlenmesi amacıyla birkaç yöntem kullanılabilir. Cam yüzeyine veya süzgeç kağıdına dış fazı yağ olan emülsiyon damlatıldığında damlalar dağılmamakta, dış

faz su olan emülsiyon damlacığı ise dağılmaktadır. Emülsiyonlar, ayrıca, dış fazları ile seyreltildiğinde seyreltme ortamı ile karışırlar. Sulu faz çoğunlukla elektrolit olduğu için zeta potansiyel ölçümü de emülsiyonların tipinin belirlenmesinde kullanılabilir. Dış fazı su olan emülsiyonlarda, emülsiyonun iletkenliği dış faz oranına bağlı iken, dış fazı yağ olan emülsiyonlarda zeta potansiyel çok düşük bir değerdir. Ayrıca, faz değişimleri de potansiyeller arasındaki büyük fark nedeniyle kolaylıkla belirlenebilmektedir (Yazan, 2004).

Etkin Madde Salımı

ME'larda EM iç fazda çözündürüldükten sonra sistem oluştuğu ve EM içeren damlacıklar dış faz ile çevrelendiği için, iç fazdaki damlacıklar EM deposu şeklinde davranmaktadır ve dış faz ile çevrelendikleri için de iç faz damlacıklarındaki EM'nin salımı gecikmiş olmaktadır. Uygulama yerine ve ME tipine bağlı olarak, örneğin EM yağ damlacıklarında çözünmüş halde ise, biyolojik dokularda daha çabuk fagosite olarak EM alımının hızlanmasına da olanak sağlayabilmektedir (Grassi ve ark., 2000). EM'nin ME sisteminden absorpsiyonu kullanılan yağa bağlı olarak değişebilmektedir (Klang ve ark., 1998).

ME'ların yapısı, sistemden EM salımını etkileyen en önemli özelliktir. Özellikle y/s tipi ME'larda EM difüzyonu ve buna bağlı olarak hidrofobik EM'lerin salımı yavaş olurken, hidrofilik EM'lerin salımı hızlı olmaktadır. S/Y tipi ME'larda ise durum tam tersidir. ME yapısından bağımsız olarak, EM salım oranı, maddenin yağlı ve sulu fazlarındaki dağılım katsayılarına bağlı olarak değişmektedir ve bu değişiklik EM'nin su-yağ dağılımının değiştirilmesi ile EM salımının kontrol edilmesine imkan vermektedir (Malmsten, 2002a).

Kolloidal sistemlerden EM salımının belirlenmesi çok güç olmaktadır. ME'larda membran yardımıyla gerçekleştirilen difüzyon çalışmasına dönüşen salım çalışmalarında, donör fazda ME'un EM'yi içeren yağlı fazı, alıcı fazda ise ME'un sulu fazı olacak şekilde düzenek hazırlanıp, maddenin difüzyonuna bağlı olarak maddenin konsantrasyonu zamana karşı araştırılmaktadır (Grassi ve ark., 2000).

Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Uygulanışı

ME'lar, topik, oral, oküler, parenteral, pulmoner olarak (Kawakami ve ark., 2002a; Yazan, 2004; Biruss ve ark., 2007) ayrıca, intravajinal ve intrarektal olarak uygulanmakta ve böylece sistem pek çok membranla temas etmektedir (Kogan ve Garti, 2006).

Kornea, lipid çözünürlüğü fazla olan maddelerin oküler uygulamasında, tıpkı *Stratum corneum*'un ciltteki etkisi gibi engelleyici etkiye sahiptir; bir anlamda gözdeki hız sınırlayıcı tabakadır (Hasse ve Keipert, 1997). EM sistemde çözünüyor ise, korneadan geçişi, absorpsiyonu ve dolayısıyla biyoyararlanımı arttır (Binks ve ark., 1997; Grassi ve ark., 2000; Gürsoy, 2002). ME'un pozitif veya negatif yüklü olması, EM'nin korneadan penetrasyonunu ve oküler dokuda dağılımını etkilemektedir. Pozitif yüklü ME'ların korneada oluşturduğu C_{maks} ve AUC değerleri, negatif yüklü ME'a kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, kolloidal halde bulunma durumunun korneadan penetrasyonu arttırmasına

rağmen, pozitif yüklü nanoemülsiyonlarda endositozun daha fazla olması ile açıklanmıştır (Gürsoy, 2002).

Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Toksisitesi

Oküler uygulama ile, lokal etkinin yanında nazolakrimal kanala geçiş ile sistemik etki de görülmektedir (Chan ve ark., 2007). Yüksek miktarda YEM içermeleri nedeniyle, toksik etki gösterme olasılığı göz önünde tutulmalıdır (Gürsoy, 2002). İyonik YEM'ler oküler ME'lar için fazla toksik özellikte olduğu için, oküler olarak noniyonik YEM'ler tercih edilmektedir. Noniyonik YEM'ler, eter fonksiyonel grupları nedeniyle suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. En çok, poloksamerler, polisorbattlar, PEG ve tiloksapol tercih edilmektedir (Vandamme, 2002).

Non-iyonik YEM'ler topik kullanım için çok uygundur ancak oral ve parenteral uygulamaları sınırlıdır. Kısa ve orta zincirli alkollerin YYEM olarak kullanılmasında toksik ve iritan etkiye dikkat edilmelidir; ayrıca, alkolün uçması da kararlılığı olumsuz etkilemektedir (Yazan, 2002).

Polimerik Nanopartiküller

PN'ler, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan EM'yi kontrollü olarak salan koloidal partiküllerdir. PN'ler, nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilmektedir. Nanokapsülde, EM bir polimerik membranla çevrilidir. Nanokürede ise, EM matris sistem içinde homojen olarak dağılmıştır. Bu sistemler için genel olarak nanopartikül terimi kullanılmaktadır (Kaş, 2002; Rieux ve ark., 2006). Vücutta parçalanabilen veya parçalanmayan polimerlerden oluşan partiküller ile, vücutta EM'nin hedeflenen bölgeye gönderilmesi ve kontrollü salımı sağlanabilmektedir (Gürsoy, 2002; Wissing ve ark., 2004).

PN'ler, farmasötik çalışmalarda çokça tercih edilen sistemlerdir. Özellikle gastrointestinal sistemde, diğer koloidal taşıyıcı sistemler ile kıyaslandıklarında, çok daha kararlı bir yapı sergilemektedir. Hapsettikleri EM'yi gastrointestinal sistemin etkisine karşı korumaktadırlar. Polimerlerin kullanılması ile nanopartiküllerin hidrofobiklik veya zeta potansiyel değerleri gibi fizikokimyasal özellikleri değiştirilebilmektedir. Geciktirilmiş veya uzatılmış EM salımını oluşturacak partiküller de elde edilebilmektedir; ayrıca, partiküllerin hedeflendirilmesi, biyoadezyonu, hücreler tarafından alınması da polimerik yapı ile sağlanabilmektedir (Rieux ve ark., 2006).

PN'lerin hedeflendirilmesi söz konusu olduğunda, 100 nm'den daha düşük parçacık büyüklüğüne sahip hidrofilik yüzeyli parçacıklar daha başarılı olmaktadır. Vücudun savunma mekanizması olan retikuloendotelial sistem (RES) ve özellikle karaciğerdeki *Kupffer* hücreleri, hidrofobik yüzeyli partikülleri tutarak hemen dolaşım sisteminden uzaklaştırır. Bu partiküllerin hazırlanmasında, PEG gibi amfifilik polimerler ve poloksamin veya poloksamerler gibi YEM'ler kullanılarak yüzey özellikleri hidrofilik olacak şekilde değiştirilip, dolaşım sisteminde daha uzun süre kalmaları sağlanabilmektedir. Vücutta parçalanabilen polimerler vücut ile geçimli, antijenik özellikleri olmayan hidrofilik yapıdaki polimerlerdir (Nimesh ve ark., 2006). Ancak, bazı polimerlerin sitotoksik etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır (Wissing ve ark., 2004). Benzer şekilde, lektin gibi biyoaktif maddeler de PN'lerin yüzey özelliklerini modifiye edebilmektedir (Rieux ve ark., 2006).

Hidrofilik polimerlerden hazırlanan nanopartiküllerin hücrelerin içine alınması, hidrofobik polimerler ile kıyaslandığında daha düşük olmakta ve bu nedenle dolaşım sisteminden kolayca uzaklaştırılmaktadır (Reis ve ark., 2006). Partiküllerin yüzey özellikleri EM'nin hedeflendirilmesinde önemli bir etkidir (Chambers ve Mitragotri, 2004). Yüzey özellikleri değiştirilmemiş partiküller ve negatif yüklü partiküller makrofajlar tarafından süratle kan dolaşımından uzaklaştırılırlar. Polimerik yapının hidrofobikliği, yüzey yükü ve biyodegradasyon profili, kullanılan maddeler, EM'nin molekül ağırlığı, yükü ve partiküllerdeki yerleşme şekli, absorpsiyonda, vücuttaki dağılımda ve eliminasyonda büyük önem taşımaktadır (Reis ve ark., 2006).

PN'lerin geniş çapta üretimleri sorun yaratmaktadır (Wissing ve ark., 2004).

Oküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerler (**Çizelge 3**), doğal, sentetik ve yarı sentetik olarak sınıflandırılacakları gibi, vücutta parçalanmayan ve vücutta parçalanmayan polimerler olarak da sınıflandırılabilir (Brannon-Peppas ve

Peppas, 2002). Vücutta parçalanmayan polimerlerden hazırlanan sistemler, tedavi süresi boyunca aşınarak sonuçta gözde artık bırakmazken, vücutta parçalanmayan polimerlerden hazırlanan sistemlerin tedavi süresi sonunda gözden çıkarılmaları gerekmektedir. Oküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılacak polimerlerin inert olması ve toksik olmaması gerekmektedir (Gürsoy, 2002).

Çizelge 3. Oküler Sistemler ve Hazırlanmalarında Kullanılan Polimerler (Gürsoy, 2002)

| Polimerler | Oküler Sistemler |
|------------------------------|---|
| MC, HMC, HEC, HPC, HEPC | Viskoz çözelti, yapay gözyaşı, insert |
| CMC | Viskoz çözelti, mukoadezif jel |
| CAP | <i>İn-situ</i> jel |
| Hiyoluronik asit sodyum tuzu | Mukoadezif jel, insert |
| Kondroidin sülfat | Viskoz çözelti |
| Kitosan | Mikroküre, implant, insert |
| Pektin | Mikroküre |
| Aljinik asit | Mukoadezif jel |
| Karagen | Viskoz jel, insert |
| Kolajen | Kolajen kalkan, insert, implant |
| Jelatin | Jelatin sünger, mikroküre |
| Albumin | Mikroküre |
| PVP | Viskoz çözelti |
| PVA | Viskoz çözelti, film, insert |
| PLA, PGA, PGLA | Mikro- ve nanopartikül, insert, implant |
| PCL | Nanoküre, nanokapsül, implant |
| Polianhidrit | İnsert |
| POE | Enjeksiyonluk çözelti |
| PACA | Nanopartikül |
| PMMA | Göz içi mercek, implant |
| HEMA | EM'li kontakt mercek |
| PAA | Mukoadezif jel |
| Silikon | İnsert, implant |
| Polikarbonat, polisülfon | İnsert |
| Poliüretan | İnsert |
| PVM/MA | İnsert |

Polisakkarit yapılı selüloz, selüloz eter ve esterleri, yarı sentetik polimerlerden MC, HMC, HEC, CMC, hiyoluronik asit sodyum tuzu, kondroidin sülfat, kitosan, aljinik asit, karragen, dekstran, ksantan ve gellan, polipeptit yapılarından ise kolajen, jelatin ve albumin oküler sistemlerde doğal polimer olarak kullanılmaktadır (Gürsoy, 2002).

Sentetik polimerlerden biyoparçalanabilenler, PVA, PLA, PGA ve kopolimerleri olan PGLA, PCL, PACA, POE, polianhidritler, polivinil eter/ MA'tir (Gürsoy, 2002).

Biyoparçalanmayanlara örnekler ise, poliakrilik asit türevleri, PMMA, HEMA, çapraz bağlı PAA (Carbomer, Carbopol), polietilen, polipropilen, polibütilen ve kopolimerleri, Pluronic[®], Tetronic[®], silikonlar, polimetil siloksan, poliüretan, polikarbonat, polisülfon ve fluorapolimerlerdir (Gürsoy, 2002).

Sonuç olarak, PN'lerden istenilen özellikler arasında, EM'nin kontrollü salımı, etki etmeleri istenen bölgede toplanması, kararlılık sorunlarının olmaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmesi sayılabilmektedir (Kaş, 2002).

Polimerik Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Emülsifikasyon-difüzyon yönteminde, EM ve yardımcı maddeler, polimerin çözündüğü ve su ile kısmen karışabilen bir çözücüde çözündürülür. Karışım, YEM içeren sulu faza eklendiğinde aralarında y/s emülsiyonu oluşur (Guerrero ve ark., 2005; Wang ve ark., 2006). Oluşan emülsiyon suya eklenerek, çözücünün dış faza difüze olması sağlanır ve nanopartiküller oluşur (Galindo-Rodríguez ve ark., 2005). Çözücünün kaynama noktasına bağlı olarak, bu basamak alçak basınç veya çapraz-akış filtrasyonu ile ortadan kaldırılabilir. Yapılan çalışmalar, bu yöntemin etkili, kolay uygulanabilen, polimerik çeper içerisinde yüksek konsantrasyonda lipofilik EM yüklenmesine olanak sağlayan bir yöntem olduğunu göstermiştir (Guerrero ve ark., 2005).

EM ve yardımcı maddeleri içeren ve köprü görevi üstlenen çözücü, çözme kapasitesi düşük olan çözücüye karıştırılarak eklendiğinde disperse olan damlacıkların yarı şeffaf emülsiyon oluşturdukları gözle görülebilmektedir. Çözücü özelliği yüksek olan çözücünün, damlacıklardan, çözücü özelliği düşük olan çözücüye difüzyonu sonucunda, polimer ve EM damlacıklar içinde çökerek nanopartikülleri oluşturur. Mikrokürelerin oluşmasında emülsiyon damlacıklarının oluşması, konsolidasyon ve katılma parametreleri rol oynar. Oluşan mikrokürelerin büyüklüğü, başlangıç aşamasında sistemde oluşan ME damlacıklarının büyüklüklerine bağlıdır. Homojen parçacık büyüklüğü dağılımına sahip ürünün oluşması, başlangıç basamağının uzatılması ile mümkün olabilmektedir (You ve ark., 2005).

Emülsifikasyon-difüzyon yönteminin yanısıra, nanoçöktürme yöntemi (Galindo-Rodríguez ve ark., 2005; Sun ve ark., 2006), çoklu emülsiyon yöntemi (Damgé ve ark., 2006), monomer polimerizasyonu yöntemi, yüzeyleyici polimerizasyon yöntemi, yüzeyleyici polikondenzasyon yöntemi, tuz etkisi ile çöktürme (Reis ve ark., 2006) gibi yöntemler PN'lerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Parçacık Şekli

PN'lerin morfolojik yapılarının belirlenmesinde, AFM (Sun ve ark., 2006), TEM (Nimesh ve ark., 2006; Wang ve ark., 2006), SEM (Galindo-Rodríguez ve ark., 2005) ile yüksek çözünürlük özelliği ile morfolojik yapıların yanısıra kimyasal özelliklerin de belirlenebildiği analitik elektron mikroskobu (AEM) kullanılmaktadır (Sun ve ark., 2006).

Parçacık Büyüklüğü

PN'lerin parçacık büyüklük analizleri, SLN'lerde olduğu gibi, PCS kullanılarak yapılabilmektedir (Damgé ve ark., 2006). Daha çok, 500 nm ve altındaki partiküllerin analizi için uygulanan PCS yöntemi, dispersiyonlardaki partiküllerin difüzyonu nedeniyle, partiküllerden bireysel olarak saçılan ışığın şiddetinde meydana gelen dalgalanma sonucundaki gecikmeden hareketle parçacık

büyükliğini analiz eder. Otokorelasyon fonksiyonu ile partiküllerin difüzyon katsayıları hesaplanabilmektedir (Malmsten, 2002b).

Parçacık büyüklük dağılımı geniş olan sistemlerde otokorelasyon fonksiyonunu kullanmak zor olabilmektedir. PCS yöntemi ile parçacık büyüklük dağılımının incelenmesinde karşılaşılan en önemli sorun, büyük partiküllerin bu yöntem ile belirlenememesidir. Seyreltilen sistemlerdeki olası büyük partiküller gözden kaçabilmekte, özellikle intravenöz kullanım için hazırlanan sistemlerde sorun çıkabilmektedir (Malmsten, 2002b).

Sistemdeki büyük partiküller ise, PCS yönteminin yanısıra, LD yönteminin de kullanılması ile analiz edilebilmektedir (Müller ve Böhm, 1998).

Zeta Potansiyel Analizi

PN'lerin zeta potansiyel analizleri, SLN'lerde olduğu gibi, PCS yardımıyla analiz edilebilmektedir (Ubrich ve ark., 2005).

pH Analizi

Polimerlerin yapısından ve oluştuğu monomerlerden bağımsız olarak, vücutta parçalanabilen poliesterlerin hidrolizindeki farklılıkları ortaya çıkaran en önemli parametre pH'dır. Düşük molekül ağırlıklı esterlerde olduğu gibi, poliester hidrolizi de hem asit hem de baz ile katalize olabilir. Hidrolitik bozunma ve bozunmaya bağlı olarak, oluşan EM salımı, düşük ve yüksek pH değerleri ile artırılabilirken, nötral pH da genellikle sınırlanmıştır (Malmsten, 2002c).

Polimerler, kimyasal bozunmanın yanısıra, enzimatik bozunmaya da uğrayabilirler. Enzimlerin aktivitelerini etkileyen önemli parametrelerden birisi de pH olduğu için, polimerlerin hem enzimatik hem de kimyasal bozunmasında pH dikkate alınmalıdır (Malmsten, 2002c).

Etkin Madde Salımı

PN'lerde EM salımı, difüzyon, polimerin erozyonu, hidrolizi ve iyon değiştirilmesi ile gerçekleşir. Mekanizmalardan bir veya birkaçı bir arada olabilmektedir (Gürsoy, 2002). EM salımı, parçacık büyüklüğü, yüzey özellikleri, çeper ile matrisin gözenek sayısı ve yapısı, EM'nin ve polimerin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Gürsoy, 2004).

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılığı

Partiküler sistemlerin çoğu termodinamik olarak kararlı sistemler değildir. Bu nedenle, bu tür dispers sistemlerde partiküller eninde sonunda floküle olarak makroskobik faz ayrışması gözlenecektir (Malmsten, 2002b). Ancak, PN'lerde oluşan bu değişimlerin süspansiyonlarda olduğu gibi geri dönüşümlü olması beklenir (Öner, 2004). Parçacık büyüklüğü ve dağılımı, kristal yapısı ve sıvı ortamda EM'nin tekdüze dağılımı değişmemelidir. Hazırlanan sistemin viskozluğu, yeniden dağılılabilmesi, şişeden kolay akması, enjektör iğnesinden geçmesi, deriye kolay uygulanması ve cilt yüzeyinde kalabilmesi için uygun olmalıdır (Öner, 2004).

Süspansiyonların kararlılıklarının sağlanabilmesi için yardımcı maddeler kullanılabilir. Tatlandırıcılar, kokular, boyalar, pH ayarlayıcılar, tamponlar, antioksidanlar ve antimikrobiyal koruyucular, kullanılan madde grupları arasında

sayılabilmektedir. Parenteral süspansiyonlara ayrıca ozmotik etkili maddelerin eklenmesi gerekmektedir. Elektrolit yapıda NaCl veya elektrolit olmayan yapıdaki mannitol, sorbitol ve dekstroz kullanılabilir (Öner, 2004)

Parenteral ve oküler amaçla hazırlanan sistemler steril hazırlanabilmelidir. Tadı, görüntüsü ve kokusu hoş olmalıdır (Öner, 2004).

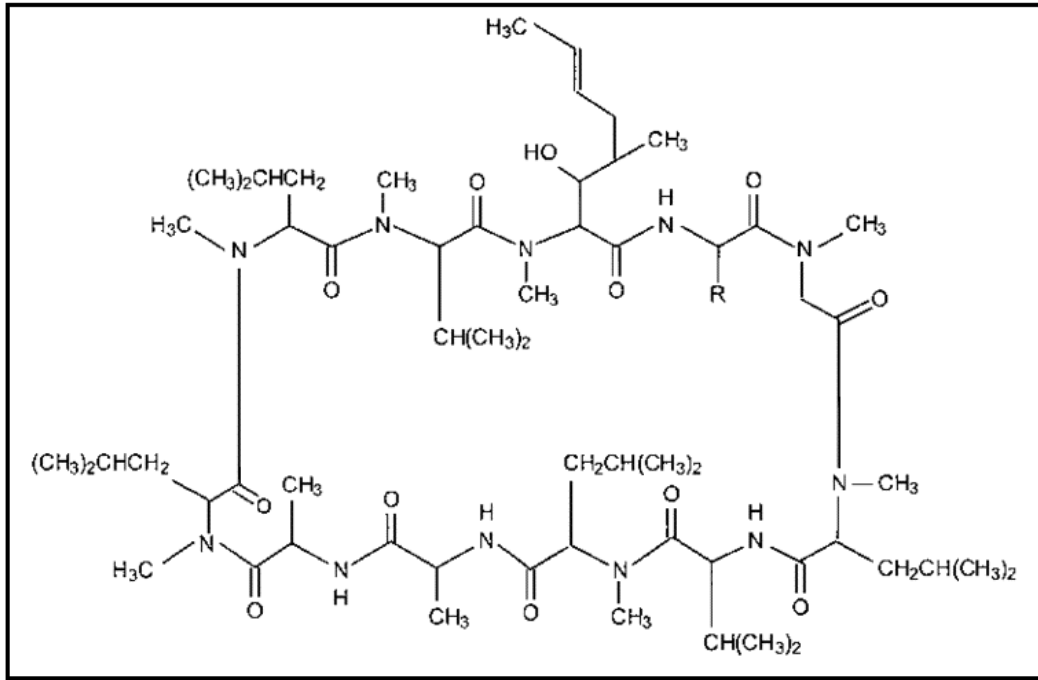
Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Toksisitesi

Biyolojik olarak parçalanmayan polimerlerin birçok yararı olmasına rağmen, vücutta uzun süre kalmasından kaynaklanan bazı sakıncaları vardır. Polimer, EM salımı süresince bütünlüğünü koruyorsa, bunun bazı avantajlarının yanısıra, bazı sakıncaları da vardır. Tedavi süresince vücudun polimer ile uzun süreli teması sakıncalı olabilmektedir. EM salımı sırasında parçalanmayan polimerler bu açıdan daha az toksiktir. Doku inflamasyonu veya doku kapsülasyonu olması polimerin parçalanma hızını değiştirir. Polimerin parçalanması sonucu oluşan monomerlerin, diğer metabolitlerin ve yan ürünlerin dolaşıma geçebileceklerini unutmamak gerekir. Polimerlerde toksisite sorunu, genellikle, polimerin üretimi ve işlenmesi sırasında kullanılan (katalizörler, YEM'ler, stabilizatörler, vb.) veya yapıya katılan (plastikleştiriciler ve diğer katkı maddeleri) maddeler, çevreden karışan kirlilikler ve yapıda polimerleşme sırasında kalan monomerlerden kaynaklanmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonundan arta kalan monomerin, milyonda bir düzeyde bulunmasının dahi toksik etki yaratacağı bilinmelidir (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

Polimerik nanopartiküller oluşturularak EM'nin uzun süre salınması ile kazanılan yararlarla, polimerin parçalanmasından gelecek zararın çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

Siklosporin A

Siklosporin A (CsA) 1972’de, güçlü immünoşpresif etkisi olan *Tolypocledium Inflatum* denilen mantar kültürlerinden elde edilmiş, 11 aminoasitten meydana gelen siklik polipeptittir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 1200 KD olan CsA nötr bir bileşiktir (The Merck Index, 1989; Chock, 2000). Lipofiliktir (Kumar ve ark., 2001). Beyaz veya beyazımsı tozudur. Pratik olarak suda çözünmez, ancak etanolde, pek çok organik çözücüde ve lipitlerde oldukça fazla çözünür (British Pharmacopoeia, 1993). Siklik yapısına bağlı olarak çok dayanıklı bir bileşiktir, ancak dayanıklılığı sınırsız değildir (Husek, 1997; Kumar ve ark., 2001). Hava geçirmeyen ambalaj içinde güneşten korunarak saklanmalıdır (British Pharmacopoeia, 1993). Dehidratasyon, [MeBmt¹] yan zincirinin kaybı, fotooksidasyon, açık zincirli oligopeptit yapıların oluşması ve izosiklosporin A’nın oluşması gibi kararsızlıkları bildirilmiştir (Husek, 1997; Kumar ve ark., 2001).



Şekil 6. Siklosporin A’nın Kimyasal Yapısı (The Merck Index, 1989)

İmmün sistem baskılayıcı ajandır. Otoimmün rahatsızlıklarda ve organ nakillerindeki reddi önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Chimalakonda ve ark., 2002). Ait olduğu sınıf, özel tedavilerde oldukça spesifik olarak kullanılan, ancak immün sistem üzerine sitotoksik etkisi bulunmayan, genellikle doğal bileşiklerden oluşturulmuş maddelerden oluşmaktadır (Ugazio ve ark., 2002). CsA’nın sistemik absorpsiyonu oldukça düşük olup, uygulanan dozaj şeklinin yapısı ve hastanın durumuna bağlı plazma kan konsantrasyonları bireyler arasında çeşitlilik göstermektedir (Chock, 2000; Chimalakonda ve ark., 2002). Bireyler arasında görülen bu çeşitliliğin nedeninin, CsA’nın yüksek molekül ağırlığına, yüksek lipofilitesine, düşük intestinal absorpsiyonuna, karaciğer ile intestinal mukozada

bulunan ve maddenin biyotransformasyonundan sorumlu sitokromlara bağlı olduğu düşünülmektedir (Dai ve ark., 2004).

Siklosporin A'nın Farmakolojik Özellikleri

CsA en çok araştırılan immünomodülatör maddelerden birisidir. Romatoid artrit (RA) tedavilerindeki etkisi, metotreksat ve altın ile kombine kullanımları sonucu yapılan çalışma ile de geçerlilik kazanmıştır (Ugazio ve ark., 2002). Endojen üveitis, nefrotik sendrom, psoriasis, atopik dermatit, *Lupus eritematosus*, skleroderma, aktif *Crohn* hastalığı ve Behçet hastalığı gibi diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde, mevcut otoimmün bozukluğu düzelterek kısa sürede etkin bir iyileşme sağlar (Urata, 1999; Inoue ve ark., 2000; Kaş, 2002). Bazı tedavilerde, düşük doz kortikosteroid ile kombine kullanımı yanıt oranını arttırabilir. İlaç, trombosit alloantikör titrelerini azaltıcı ek etkisi ile birlikte, kemik iliği nakline uygun olmayan ciddi veya orta derecede aplastik anemisi olan hastalarda ilk basamak tedavisi olarak düşünülebilmektedir. Kısıtlı veriler, Cs'nin, dirençli piyoderma gangrenosum, polimiyozit veya ciddi kortikosteroid bağımlı astımda etkili olabileceğini öne sürmüştür. CsA'nın mevcut kortikosteroid tutucu etkisi ise, bazı endikasyonlarda önemli bir avantajdır (Inoue ve ark., 2000).

CsA, geriye dönüşümlü olarak spesifik olarak lenfositlere (özellikle T *helper* hücrelerine) etki eder ve hücrel bağışıklığı selektif olarak baskılar. Bu baskılanma, aktivasyon modu ile ilişkilidir ve kalsiyuma bağımlıdır (Inoue ve ark., 2000). Lenfositlerin aktivite aralıkları, CsA'nın immünofilin proteinine bağlanarak oluşturduğu kompleks ile kalsinörin enziminin aktivitesini engelleyerek önlenmesi ile değişmektedir. Bu etki, interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-2 (IL-2) lenfositlerinin oluşmasında önemli olan gen transkripsiyonunun başlaması için gerekli olan hücre döngüsünün oluşmasını engeller (Ortiz, 2002; Zaghoul ve ark., 2003). T-*helper* hücreleri ile lenfosit aktivasyonunun inhibisyonu ve T-hücre sitotoksik fonksiyonunun azalması, T-baskı mekanizmasını yetersiz kılmaktadır (Ortiz, 2002).

CsA, bir grup sitokinlerin üretimini azaltır ve hücrel bağışıklıkta rol alan hücreleri de içine alan çeşitli hücre tiplerinin aktivasyonunu ve/veya matürasyonunu inhibe eder (Inoue ve ark., 2000). Bu nedenle Cs'nin immünoşüpresif özellikleri vardır ve nakil rejeksiyonun önlenmesi ve tedavisinde birinci basamaktır. Organ transplantasyonunda, böbrek, karaciğer, kalp, akciğer, kalp-akciğer, pankreasın alojenik transplantasyonlarında, graft reddinin önlenmesinde, kemik iliği transplantasyonundan sonra graft reddinin önlenmesinde veya tedavisinde başarı ile kullanılır (Urata, 1999; Inoue ve ark., 2000).

İdame tedavisinin aktif *Crohn* hastalığı olan hastalarda yetersiz bulunması ile, hastalığın tedaviden sonra tekrarını önlemek için hastalar en düşük etkili dozda Cs tedavisi almaları gerekliliği ortaya çıkmıştır (Inoue ve ark., 2000).

CsA, oküler amaçlı, kornea nakillerinin reddinin önlenmesi haricinde, kuru göz sendromu (*keratokonjunktivitis sicca*) tedavisinde gözyaşı salgısının arttırılması amacıyla kullanılmıştır (Kachi ve ark., 2000; Tamilvanan ve ark., 2001). Kuru göz sendromu, 40 yaş ve üzerindeki nüfusun % 6'sında, 65 yaş ve üzerindeki yaş grubunda % 14.6'lık kısmında yaygın olan bir rahatsızlıktır. Kuru göz sendromu görmeyi engelleyen bir rahatsızlık değildir; ancak, verdiği rahatsızlık ile günlük

yaşamı etkilemektedir. Kornea nakilleri ve kuru göz sendromu, gözün yüzeyi ile ilgili rahatsızlıklar olduğu için, CsA'nın topik olarak uygulanması uygun olmaktadır (Lallemand ve ark., 2005a).

Toshida ve ark. (1998), CsA'nın gözyaşı sıvısını arttırıcı etkisini araştırmışlar ve hem kolinerjik hem de takikinerjik sinirler aracılığıyla gözyaşı sekresyonunu arttırdığını görmüşlerdir. CsA'nın, özellikle oküler kullanımına yönelik yapılan çalışmalarda, katyonik yüke sahip formülasyonların, anyonik yüke sahip olan formülasyonlar ile karşılaştırıldıklarında çok daha etkili oldukları görülmüştür (Abdulrazik ve ark., 2001; Tamilvanan ve Benita, 2004).

Siklosporin A'nın Farmakokinetik Özellikleri

Organ nakillerinde ve otoimmün rahatsızlıkların tedavisinde en etkili EM'lerden birisi olan CsA'nın dar terapötik pencereye sahip olması ve absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon ve eliminasyonunda bireylerarası çeşitlilik olması nedeniyle, başarılı bir tedavi için kan seviyelerinin takip edilmesi gerekmektedir (Stettin ve ark., 2006). Maddenin absorpsiyonunun dozaj şeklinin yapısı ve hastanın durumuna bağlı olarak sınırlanması ile absorpsiyonu % 10-89 aralığında farklı değerlere ulaşabilmektedir (Chock, 2000; Tamilvanan ve ark., 2001). Kanda istenilen EM düzeylerine ulaşmak ise, oluşturduğu farklı biyoyararlanım sonuçlarına bağlı olarak güç olmaktadır (Cooney ve ark., 1998; Ortiz, 2002).

Sudaki çözünürlüğünün pratik olarak olmaması nedeniyle, su ile temasta madde katı hale dönüşüp ayrılma eğilimi göstermektedir (Abdulrazik ve ark., 2001). Lallemand ve grubu (Lallemand ve ark., 2005a; Lallemand ve ark., 2005b), yaptıkları çalışmalarda, CsA'nın suda çözünürlüğü bulunan ön ilacını hazırlamışlar ve oküler olarak uyguladıkları maddenin etkinlik ve kararlılık çalışmalarını yaparak başarılı bir ön ilaç hazırladıklarını göstermişlerdir.

Allergan® firmasının piyasada Restasis® adlı oküler amaçlı ME formundaki bir ilacının mevcut olmasına rağmen (Lallemand ve ark., 2005b), yapılan bazı çalışmalarda, ME formunun uygulanması sırasında, verilen dozdan sonra açığa çıkacak CsA miktarının aynı olmasının sağlanamadığı bildirilmiştir. Bu sistemlerde, ME sisteminin biyoyararlanımı arttırması beklentisi ile uygulama dozu azaltılmış, buna bağlı olarak da terapötik düzeye ulaşamayan veya toksik düzeye kadar yükselmiş kan konsantrasyonları ortaya çıkmıştır (Gref ve ark., 2001).

Lipofilik yapısı nedeniyle, CsA, 3-5 L.kg⁻¹ gibi büyük bir oranda kan dışına dağılır. Kan ile plazma arasındaki bu dağılım sıcaklığa bağlı olarak değişebilmektedir. Plazmada ise büyük oranda lipoproteinlere bağlanır (Chock, 2000).

Behçet sendromlu hastalara, 5 mg.kg⁻¹gün⁻¹ dozunda oral CsA verildiğinde, salya ve göz yaşında ölçülebilir miktarda bulunduğu, ilacın verilmesinden 1 saat sonra alınan salgı örneğinin poliklonal RIA yöntemiyle araştırılmasıyla kanıtlanmıştır. Madde aköz sıvıya, ancak ağır bir oküler hastalık varsa geçmekte, kan-retina bariyerinin harap olduğu durumlarda ise, vitröz sıvıya da penetre olabilmektedir. Ağır üveit gibi hastalıklarda, ilacın oküler penetrasyonunun yüksek olması istenir. Zeytinyağı içindeki % 2'lik göz damlası çözeltisi göze damlatıldığında, CsA, kan, salya ile aköz ve vitröz sıvılara penetre olmamıştır. Ancak, topik CsA

preparatlarının uygulanmasıyla, orta derecede oküler yapılara penetre olabildiği hayvan deneylerinde gösterilmiştir (Inoue ve ark., 2000).

CsA'nın metabolizması yaşa bağımlıdır ve CsA klirens oranı $0.38-3 \text{ L.saat}^{-1}\text{kg}^{-1}$ ile doğrusal eliminasyon göstermektedir (Châteauvert ve Côte, 1998; Inoue ve ark., 2000). Erişkinlerle çocuklar karşılaştırıldığında, klirens ve eliminasyonları arasında 1.5-2.5 kat oynama olabilmektedir. CsA absorpsiyonu erişkinlere oranla çocuklarda düşük olduğu için bu hastaların doz miktarı arttırılabilir. Çocuklarda klirensin yüksek olmasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır (Inoue ve ark., 2000).

Maddenin eliminasyon yarı ömrünün 19 saat olarak ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur; gerçek değer ise büyük olasılıkla bu değer daha altında olduğu düşünülmektedir (Châteauvert ve Côte, 1998; Inoue ve ark., 2000). Birçok çalışmada, CsA'nın eliminasyon yarı ömrü 8 saat olarak belirtilmektedir (Chock, 2000). Oral uygulamanın ardından, dozun % 90'ı safra ile (<% 1 değişmeden) ve % 6'sı idrarla (< % 0.1 değişmeden) atılmaktadır (Inoue ve ark., 2000).

CsA'nın metabolizasyonundan sorumlu olan sitokrom P450III A enzimleri, ketakonazol, diltiazem ve eritromisin gibi başka maddelerin de metabolizasyonunu gerçekleştirdikleri için, bu maddelerin varlığında CsA'nın sistemik konsantrasyonunda artış olmaktadır. Bunun yanısıra, bu maddeler P-glikoproteine de bağlanarak metabolik inhibisyon ile birlikte EM'nin absorpsiyonuna etki ederler (Chock, 2000).

Siklosporin A'nın Yan Etkileri ve Toksisitesi

Oküler olarak uygulanan EM'lerin yaklaşık olarak % 5'lik kısmı istenilen bölgelere lokalize olabilirken, kalan kısım gözyaşı sıvısı ile taşınarak nazolakrimal kanala ve oradan da burun boşluğuna geçmekte ve buradan sistemik dolaşıma karışarak istenmeyen yan etkilerin oluşmasına neden olabilmektedirler (Gulsen ve Chauhan, 2005).

CsA'nın önemli yan etkileri arasında, nefrotoksisite, titreme, özellikle kadınlarda tüylenme artışı, yüksek tansiyon (Allison, 2000), diş etlerinde şişme ve organ nakillerinin ardından görülen lenfoproliferatif rahatsızlıklar sayılabilir (Ortiz, 2002). Ayrıca, renal vasokonstrüksiyona neden olmakta ve glomerüler filtrasyon oranını da azaltmaktadır (Allison, 2000). Uzun süreli kullanımı sonucu, kansızlık, kemik iliğinde gelişim bozukluğu, karaciğer iltihabı (Tran ve ark., 1999) ve renal tübüler hücre hasarı (Tran ve ark., 1999; Allison, 2000), lenfositlerde azalma (lymphopenia) gibi zararlı ama geri dönüşümlü olan etkiler de oluşturmaktadır (Tran ve ark., 1999).

Nefrotoksisiteyi arttıran aminoglikozitler ve vankomisin gibi ilaçlar ile, kandaki CsA miktarını arttırarak toksisiteye neden olabilen antifungaller, makrolitler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMGCoA), redüktaz inhibitörleri, greyfurt suyu, diltiazem, verapamil ile geçimsizdir (Ortiz, 2002). Diltiazem, verapamil ve nikardipin, CsA'nın hepatik metabolizasyonunu ve/veya dağılımını etkileyerek kan konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (Châteauvert ve Côte, 1998). Rifampin, antiepileptikler, sigara ve kömürde pişmiş yemekler kan düzeyinde düşmeye neden oldukları için, birlikte tüketilmemelidir (Ortiz, 2002). Kortikosteroidler, CsA'nın metabolizasyonunu, sitokrom P450III A enzimatik

sisteminde yarışmalı olarak inhibe ederler. Azatioprin de CsA'nın absorpsiyonunu etkileyerek kan konsantrasyonunu düşürmektedir (Châteauvert ve Côté, 1998).

Yapılan çalışmalar sonucunda, CsA'nın oluşturduğu oksidatif baskı, *Wistar* sıçanlarının testis dokusunda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara ve sperm sayı ve kalitesinde azalmaya da neden olmuştur (Türk ve ark., 2007).

Siklosporin A'nın Miktar Tayin Yöntemleri

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

CsA'nın araştırmacılar tarafından en çok tercih edilen miktar tayin yöntemlerinin başında HPLC gelmektedir. Örnek olarak, Ugazio ve ark. (2002) hazırladıkları SLN'lere yükledikleri CsA miktarını, HPLC yöntemini kullanarak, 210 nm'de analiz ederek belirlemişlerdir.

CsA'nın bozunması sonucunda oluşan dihidrosiklosporin A ve izosiklosporin maddelerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, 80°C ve 210 nm de analizler gerçekleştirilmiş, ancak USP'de belirtilen HPLC yöntemi ile izosiklosporin A belirlenememiştir. Dihidrosiklosporin A'da CsA'nın oluşturduğu pikten ayrılamamıştır. Çalışmada geliştirilen yöntemle, bozunma ürünleri CsA'dan ayrılarak belirlenebilmiştir (Kumar ve ark, 2001).

Najib ve arkadaşları (2003), internal standart olarak kullandıkları siklosporin B (CsB) çözeltisi yardımıyla, gönüllülerden elde edilen serum örnekleri üzerinde HPLC yöntemi ile CsA miktarını belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada, internal standart olarak kullanılan ve piyasada bulunmayan siklosporin C (CsC) ve D (CsD) maddelerinin yerine, kolayca bulunabilen tamoksifen internal standart olarak kullanılmış ve sıçan kanındaki CsA, HPLC yöntemi kullanılarak, 70°C'de başarılı bir şekilde analiz edilebilmiştir (Chimalakonda ve ark., 2002). Zaghoul ve ark. (2003) ise, internal standart olarak naproksen maddesini kullanmışlar, 70°C'de ve 205 nm'de CsA miktarını *Sprague-Dawley* sıçanlarının kuyruklarından alınan kanlarda analiz etmişlerdir.

HPLC yöntemi ile yapılan bir başka çalışmada, USP'deki yöntemin bazı parametreler yönünden sınanması amacıyla, analizler 80°C ve 210 nm'de gerçekleştirilmiş, ancak, Hypersil® ODS ile doldurulan kolonlar ile farmakopedeki yöntemin valide edilmesinin ardından belirlenen CsA miktarlarında, istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmamıştır (Husek, 1997).

İmmün Yöntemler

Diğer öne çıkan miktar tayin yöntemi ise, RIA'dır. Yapılan çalışmada, immün yöntemlerin de HPLC kadar güvenilir olduğu kanıtlanmış ve uygulama kolaylığı sayesinde pek çok araştırmacı tarafından HPLC'ye tercih edilmiştir (Stettin ve ark., 2006).

Lee Y.J. ve ark. (2000), CsA'nın ticari preparatı olan 175 mg CsA içeren Sandimmune Neoral® kapsülleri ile 22 gönüllü üzerinde çalışmalar yapmıştır. CsA miktarını, internal standart olarak CsD kullanarak HPLC ve ¹²⁵I-RIA yöntemleri ile belirlemişler, her iki yöntemle analiz ettikleri CsA miktarlarında birbirine yakın değerler bulmuşlardır. ¹²⁵I-RIA yönteminin dikkatli bir şekilde validasyonunun ardından, HPLC'ye alternatif bir yöntem olarak değerlendirmişlerdir.

Lee E.J. ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, hazırladıkları mikrokürelerdeki CsA miktarını RIA yöntemiyle bulmuşlardır

BenEzra ve Maftzir'in (1990) CsA'nın oküler penetrasyonunu araştırdıkları bir çalışmada, zeytin yağı içerisinde, günde üç kez olmak üzere göze uyguladıkları CsA çözeltisinin tavşan korneasından penetrasyonunun belirlenmesi amacıyla, tavşanın kornea ve sklerası uygun işlemlere tabi tutulmuş ve ardından inkübasyon ortamında RIA yöntemi kullanılarak CsA'nın miktar tayin analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yocum ve ark.'nın (2000) yaptıkları çalışmada, RA hastalarının kullandıkları CsA'nın oral ME formülasyonu olan Sandimmun Neoral® ve orjinal CsA formülasyonu olan Sandimmun® hastalara uygulanmış ve alınan kan örneklerindeki miktar tayinleri RIA ile gerçekleştirilmiştir.

Ubrich ve ark.'nın (2005) yaptıkları çalışmada ise, CsA'nın PN'leri hazırlanmış ve partiküllerin oral biyoyararlanımları EIA ile belirlenmiştir.

Karaciğer nakli yapılmış 24 hasta ile yapılan bir çalışmada, hastalara 100 mg'lık Neoral® kapsül verilmiş ve alınan kan örneklerinde CsA'nın miktar tayini FPIA ile analiz edilmiştir (Casale ve ark., 2006)

Gulbis ve ark.'nın (1997) kalp ve karaciğer nakli yapılmış hastalarda yaptıkları çalışmada, FPIA ve EMIA yöntemleri ile HPLC yöntemi karşılaştırmalı olarak kullanılmış, FPIA yöntemi HPLC'den oldukça farklı sonuçlar verirken, EMIA yöntemi HPLC değerlerine yakın sonuçlar vermiştir. FPIA ve EMIA yöntemleri karşılaştırıldıklarında da, FPIA yöntemi ile, EMIA yöntemine kıyasla daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Gulbis ve ark., 1997).

Siklosporin A İçeren Ticari Preparatlar

CsA içeren ticari preparatlar arasında, Novartis firmasının ürünlerinden Sandimmun Neoral® 25 mg ve 100 mg yumuşak jelatin kapsül, Sandimmun Neoral® 100 mg.mL⁻¹ 50 mL oral solüsyon, Sandimmun® 50 mg.mL⁻¹ 10 ampul (http-8) ve Allergan® firmasının ürünlerinden Restasis® oküler emülsiyonu (% 0.05 CsA) sayılabilir (http-9).

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

| | |
|--|---|
| Asetik asit | : Kimetsan, Ankara, Türkiye |
| Asetonitril | : Merck, Almanya |
| Benzalkonyum klorür | : Fluka, Steinheim, Almanya |
| Bergabest [®] MCT | : Selectchemie, Zürich, İsviçre |
| Compritol [®] 888 ATO (Gliseril dibehenat) | : Gattefossé, Cedex, Fransa |
| Cyclosporine Plus Assay | : CEDIA, Amerika |
| Dötorokloroform | : Merck, Almanya |
| Dynasan [®] 116 (Tripalmitin) | : Condea, Witten, Almanya |
| Etanol | : Carlo Erba, Rodano, İtalya |
| Eudragit [®] RL 100 (Metil Akrilat Kopolimeri) | : Degussa Röhm Pharma Polymers, Darmstadt, Almanya |
| Eudragit [®] RS 100 (Metil Akrilat Kopolimeri) | : Degussa Röhm Pharma Polymers, Darmstadt, Almanya |
| Gelucire [®] 33/01 (Çöktürülmüş C8-C18 yağ asitlerinin gliserol esteri) | : Gattefossé SAS, Cedex, Fransa |
| Gelucire [®] 44/14 (Mono-, di- ve trigliseritler ile bir ve ikili polietilen yağ asidi esteri) | : Gattefossé SAS, Cedex, Fransa |
| Gelucire [®] 50/13 (PEG-32 gliseril polmitostearat) | : Gattefossé SAS, Cedex, Fransa |
| Gelucire [®] 53/10 (PEG-32 gliseril stearat) | : Gattefossé SAS, Cedex, Fransa |
| Hidroklorik asit | : Carlo Erba, Milan, İtalya |
| İzopropil alkol | : Detsan, Eskişehir, Türkiye |
| İzopropil miristat | : Merck, Hohenbrunn, Almanya |
| Oktadesilamin | : Fluka, Steinheim, Almanya |
| Polietilen glikol 400 | : Riedel de Haën, Seelze, Almanya |
| Potasyum bromür | : Merck, Almanya |
| Siklosporin A | : Novartis, İstanbul, Türkiye |
| Sodyum hidroksit | : Riedel de Haën, Seelze, Almanya |
| Sodyum klorür | : Riedel de Haën, Seelze, Almanya |
| Soyafosfotidil kolin | : Sigma, Steinheim, Almanya |
| Tween [®] 80 (Polioksietilen-80-sorbitan monooleat) | : Merck, Hohenbrunn, Almanya |

Kullanılan Cihazlar

| | |
|---|---|
| Buzdolabı | : Arçelik No Frost, Türkiye |
| Diferansiyel Taramalı Kalorimetri | : Shimadzu DSC-60, Japonya |
| Erime Derecesi Tayin Cihazı | : Electrothermal 9100, Amerika |
| Etüv | : Elektro-mag M 5040BD, Türkiye |
| Föriyer Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometresi | : Perkin Elmer Spektrum 2000, İngiltere |
| Hassas Terazi | : Ohaus, İsviçre |
| Enzim İmmün Yöntemi Analiz Cihazı | : EIA-912 Automatic Analyzer, Hitachi/Boehringer Mannheim, Japonya |
| Manyetik Isıtıcı | : Yellow Line MSH Basic, Staufen, Almanya Heidolph MR 3001K, Almanya IKA® -Werke, Almanya |
| Mekanik Karıştırıcı | : Heidolph RZR2051 Electronic, Almanya |
| Nükleer Manyetik Rezonans Spektrofotometresi | : Ultra Shield CP MAS NMR, Bruker, Almanya |
| Otoklav | : Hirayama HVE 50, Japonya |
| Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı | : Zetasizer Nano Series, İngiltere |
| pH Metre | : WTW Profi Lab pH 597, Weilheim, Almanya |
| Reometre | : Brookfield, Middleboro, Amerika |
| Santrifüj | : Hettich Zentrifugen-EBA 8, Tuttlingen, Almanya |
| Geçirimli Elektron Mikroskobu | : Tecnai™ G ² Spirit Bio TWIN, Amerika |
| Taramalı Elektron Mikroskobu | : Zeiss Supra 50 VP, Almanya |
| Ultrasonik Banyo | : Elma T470/H, Singen, Almanya |
| Ultraturaks | : T25 Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen, Almanya |
| X Işını Kırınım Cihazı | : XRD-RIKAGU D/Max-3C, Japonya |

Yüksek Basınçlı Sıvı
Kromatografisi

: Shimadzu 20-A, Japonya

Zeta Potansiyel Analiz Cihazı

: Zetasizer Nano Series, İngiltere

YÖNTEMLER

İn Vitro Çalışmalar

Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

Siklosporin A ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

CsA'nın (~4 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 30-250°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

Erime Derecesi Tayini

CsA'nın erime derecesi analizi, erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

X-Işını Kırınım Analizi

CsA'nın XRD analizi, 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İnfrared Analizi

CsA'nın IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, potasyum bromür (KBr) ile hazırlanan diski kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

CsA'nın yapısı, ¹H-NMR analizi ile 25°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Miktar Tayini

İn vitro çalışmalarda, CsA'nın analitik miktar tayini HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan çalışma şartları **Çizelge 4'**de sunulmuştur.

Çizelge 4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları

| | |
|-----------------------------|--|
| Cihaz | Shimadzu-20 A |
| Kolon | Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (Kolon Çapı: 6.0 mm, Kolon Uzunluğu: 15.0 cm) (Parçacık Çapı : 5 µm, Parçacık Boyutu: 100Å) |
| Çözücü Sistemi | Asetonitril:Distile su [75:25, h/h] |
| Dedektör | Shimadzu Fotodiyot Dizisi |
| Çalışılan Dalga Boyu | 210 nm |
| Akış Hızı | 1 mL.dk ⁻¹ |
| Enjeksiyon Hacmi | 20 µL |

Doğrusallık

CsA'nın HPLC yönteminde kullanılacak standart eğrilerinin belirlenmesi amacıyla, 100 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda stok çözeltilerinden 1-10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. CsA konsantrasyonuna karşılık gelen alan değerleri bulunarak kullanılacak kalibrasyon eşitlikleri oluşturulmuş ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Deney 6 kez tekrarlanmıştır.

Kesinlik

CsA'nın 3 farklı konsantrasyonda (2 µg.mL⁻¹, 6 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹) çözeltileri hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Her bir konsantrasyon için, analizler, 6 kez tekrarlanmıştır. 1. gün içinde yapılan tüm çalışmalar 3. ve 5. günde de tekrarlanmıştır (k=3). Üç günde elde edilen değerler ile yöntemin gün-içi ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk

CsA'nın 3 farklı konsantrasyonda (6 µg.mL⁻¹, 5 µg.mL⁻¹, 5.25 µg.mL⁻¹) çözeltileri hazırlanmış, HPLC yöntemi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların doğru denklemi yardımı ile hesaplamaları yapılarak, eklenen CsA konsantrasyonları ile bulunan değerler karşılaştırılmış ve yöntemin doğruluğu yüzde geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Her deney 6 kez tekrarlanmıştır.

Duyarlılık

Duyarlılık çalışmalarında, sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan LOD değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = \frac{[3.3 \times \text{SS}]}{m} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Burada, SS: y eksenini kesim değerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimi'dir (ICH, 1996)

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği LOQ değeri ise **Eşitlik 4** kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{LOQ} = \frac{[10 \times \text{SS}]}{m} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Burada, SS: y eksenini kesim değerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimi'dir (ICH, 1996)

Seçicilik

Seçicilik, karışım içerisindeki tek bir maddenin, formülasyonda bulunan diğer maddelerin varlığında, derişiminin tam ve doğru olarak belirlenebileceğini gösteren en önemli analitik parametrelerden biridir. Çalışmada, EM içermeyen

plasebo formülasyonlar ile EM içeren formülasyonlar analiz edilerek sistemin seçiciliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Dynasan® 116 ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

10^{-4} duyarlılıkta, ~4 mg Dynasan® 116 tartılarak, alüminyum örnek kabında basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 30-250°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi gerçekleştirilmiştir.

Erime Derecesi Tayini

Dynasan® 116'nın erime derecesi analizi, erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

X-Işını Kırınım Analizi

Dynasan® 116'nın XRD analizi, 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İnfrared Analizi

Dynasan® 116'nın IR analizi 4000-400 cm⁻¹ dalgaboyu aralığında, KBr ile hazırlanan disk kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

Dynasan® 116'nın yapısı, ¹H-NMR analizi ile, 25°C'de, çözücü olarak dötörokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

Compritol® 888 ATO ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

10^{-4} duyarlılıkta, ~4 mg Compritol® 888 ATO tartılarak, alüminyum örnek kabında basınç yardımıyla kapatılmış, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 30-250°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi yapılmıştır.

Erime Derecesi Tayini

Compritol® 888 ATO'nun erime derecesi analizi, erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş, analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

X-Işını Kırınım Analizi

Compritol® 888 ATO'nun XRD analizi, 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında, Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İnfrared Analizi

Compritol® 888 ATO'nun IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalgaboyu aralığında, KBr ile hazırlanan disk kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

Compritol® 888 ATO'nun yapısı, ¹H-NMR analizi ile, 25°C'de, çözücü olarak dötörokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

Eudragit® RS 100 ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

10⁻⁴ duyarlılıkta, ~4 mg Eudragit® RS 100 tartılarak, alüminyum örnek kabında basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 30-250°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi yapılmıştır.

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

SLN hazırlamaya yönelik yapılan ön formülasyon çalışmalarında, katı lipit olarak Gelucire® 44/14, 50/13, 53/10, 33/01, Compritol® 888 ATO ve Dynasan® 116'nın, YEM olarak da soya fosfotidil kolin (Soya), PEG 400 ve Tween® 80'in kullanıldığı formülasyonlar tasarlanmıştır.

Formülasyonların hazırlanışında, lipit erime derecesinden 5°C daha yüksek sıcaklığa ısıtılarak (örn. Dynasan® 116 için 70°C, Compritol® 888 ATO için 80°C) eritilmiştir. Aynı sıcaklıktaki YEM çözeltisine eklenen erimiş lipitin, ultraturaks kullanılarak, 9500 rpm'de, 3 dakika karıştırılması ile formülasyonlar elde edilmiştir. Daha sonra, formülasyonların oda sıcaklığına yavaş yavaş soğuması sağlanmıştır. Formülasyon işlemi sırasında lipitin erime sıcaklığına bağlı olarak hazırlama sıcaklıkları değişmiştir.

Ön çalışmalarda, farklı konsantrasyonda (%5-10-20 gibi) YEM, katyonik lipit ve koruyucu madde içeren formülasyonlar hazırlanıp incelenerek, homojen ve ufak parçacıkların olduğu formülasyonlar belirlenerek, bileşenlerin kullanım konsantrasyonlarına karar verilmiştir.

Örnek olarak, OA katyonik lipiti, formülasyonlara % 0-2 aralığında beş farklı konsantrasyonda eklenmiş ve formülasyonlardaki etkinliği, zeta potansiyel sonuçlarının parçacık büyüklük analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi ile uygun konsantrasyonuna karar verilmiştir.

Gerçekleştirilen ön çalışmalar ışığında, kararlılık çalışmalarında (25°C ±1, 40°C ±1 ve 4°C ±1°C'lik koşullarda yapılan) izlenmek üzere, birisi Compritol® 888 ATO diğeri Dynasan® 116 taşıyıcı ile hazırlanmış iki formülasyon seçilmiştir. Seçilen formülasyonlardaki diğeri bileşenler ve konsantrasyonları her iki formülasyon için aynıdır.

Formülasyonların Hazırlanışı

Formülasyonlar, ön formülasyonlara benzer olarak ve SLN Hazırlama Yöntemleri'nde (Sayfa 14) anlatıldığı şekilde, yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. EM'nin eritilmiş katı lipit içerisinde yaklaşık 100°C'de çözündürülmesinin ardından oluşan eriyik, hazırlama sıcaklığı olan 80°C'ye soğutulmuştur. Bu soğutma sırasında EM'de herhangi bir çökme olmamıştır. Karışıma katyonik lipit eklenerek yağlı faz tamamlanmıştır. YEM, koruyucu ve distile sudan oluşan sulu faz da aynı sıcaklığa getirilmiş ve yağlı faz eklenerek, 13500 rpm'de, 5 dakika karıştırılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan sistem oda sıcaklığına yavaş yavaş soğutulmuştur. Formülasyonların pH değerleri HCl kullanılarak fizyolojik pH'ya (pH 7.20) ayarlanmıştır.

Formülasyonlar 1 mL'lik renkli steril ampullere doldurularak sterilizasyon için kapatılmışlardır.

Formülasyonların Sterilizasyonu

SLN formülasyonlarının sterilizasyonu, otoklavda, 121°C'de, 15 dakika sürede gerçekleştirilmiştir.

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar

Parçacık Şekli Analizleri

SLN'lerin yüzey özelliklerinin ve şekillerinin belirlenmesi amacıyla SEM ve ayrıca TEM kullanılmıştır.

Parçacık Büyüklüğü Analizleri

SLN'lerin parçacık büyüklük ölçümleri, zeta potansiyel analiz cihazı ile, iletkenliği NaCl ile 50 µS'e ayarlanmış distile sudaki dispersiyonları kullanılarak elde edilmiştir.

Her üç koşulda (25°C ±1°C, 40°C ±1°C, 4°C ±1°C) saklanan iki formülasyonda, 0. zaman, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. ay analizleri gerçekleştirilmiştir.

Zeta Potansiyel Analizleri

SLN'lerin zeta potansiyelleri zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Bu analizlerde, zeta potansiyelde artış olmaması için, NaCl elektroliti baz olarak eklenerek, 50-100 µS iletkenlik aralığında sabit potansiyellerin oluşması sağlanabilmektedir. Elektrolit bazın eklenmesiyle, distile sudaki iletkenliğin neden olduğu küçük değişimlerin emülsiyonları etkilememesinin sağlanması sonucu, çok daha güvenilir ölçümler gerçekleştirilebilmektedir (Müller ve Heinemann, 1993). Bu çalışma referans alınarak, formülasyonların iletkenliği NaCl ile 50 µS'e ayarlanmış distile suda dağıtılmasının ardından, her üç koşulda (25°C ±1°C, 40°C ±1°C, 4°C ±1°C) saklanan tüm formülasyonların, 0. zaman, 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. ay analizleri gerçekleştirilmiştir.

pH Analizleri

Hazırlanan SLN'lerin pH değerleri, gözyaşı pH'sı olan 7.2'ye HCl ile ayarlanmıştır. Kararlılık çalışması süresince tüm formülasyonların pH ölçümleri, 0. zaman, 2., 3., 4., 5. ve 6. ay analizleri ile elde edilmiştir.

Termal Analizleri

SLN formülasyonlarının termal analizleri, DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile, 30-250°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

X-Işını Kırınım Analizleri

SLN formülasyonlarının XRD analizleri, 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 20 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında, Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İnfrared Analizleri

SLN formülasyonlarının IR analizleri, 4000-400 cm⁻¹ dalgaboyu aralığında, KBr ile hazırlanan diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri

SLN formülasyonlarının bileşimi, yapı şekli, moleküller arası veya moleküliçi olası değişimleri, ¹H-NMR analizi ile, 25°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak araştırılmıştır.

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini

SLN formülasyonlarında CsA miktar tayini, CsA'nın HPLC ile Analitik Miktar Tayini (**Sayfa 38**) bölümünde anlatılan analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

~5 mg tam tartımı alınan formülasyon, 2 mL etanolde ağzı sıkıca kapalı tüplerde 80°C'de eritilmiştir. Eriyik -18°C'ye aniden soğutularak lipitin çökmesi sağlanmıştır. Karışım 11000 rpm de 10 dk süre ile santrifüj edilmiş ve üstteki berrak çözelti ayrılarak HPLC ile analizler gerçekleştirilmiştir. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait Kararlılık Çalışmaları

Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerden seçilen iki formülasyon, oda sıcaklığı (25°C ±1°C), buzdolabı (4°C ±1°C) ve etüvde (40°C ±1°C) saklanmıştır. Formülasyonların kararlılıklarının incelenmesi amacıyla, 1, 3 ve 6 aylık sürelerin sonunda, formülasyonlar üzerinde parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel, pH ve termal analizler yapılmıştır. Ayrıca, incelenen formülasyonların belirtilen ortamlardaki 10 aylık sürelerin sonunda, partikül şekilleri, XRD, IR ve NMR incelemeleri de yapılmıştır.

Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

CsA'nın ME'unu hazırlamak amacıyla yapılan ön çalışmalarda, yağlı faz olarak seçilen Bergabest® MCT ve IPM sıvı yağı ile YEM olarak Tween® 80, YYEM olarak da PEG 400 ve IPA'ün kullanıldığı ME formülasyonları geliştirilmiştir.

Formülasyonlar, 25°C ±1°C'de ve 1000 rpm karıştırma hızı ile (Bergabest® MCT kullanılan formülasyonlarda 300 rpm) mekanik karıştırıcı kullanılarak hazırlanmış ve sistemlerin berraklaşma noktaları belirlenmiştir. [1:1], [1:2] ve [2:1] YEM/YYEM oranlarında ve her oran için yedi ayrı yağ/YEM-YYEM konsantrasyonuna sahip formülasyonlar hazırlanmış ve oluşan ME'lardaki maddelerin yüzde değerleri belirlenerek üçgen faz diyagramlarının çizimi gerçekleştirilmiştir.

Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan üç YEM/YYEM oranına ait üçgen faz diyagramları milimetrik kağıt kullanılarak el ile çizilmiş ve diyagramlar yardımıyla, en geniş ME alanını oluşturan oran bulunmuştur. Bu alanın ağırlık merkezinde oluşacak formülasyon ise, EM ve yardımcı maddelerin ekleneceği ve kararlılık çalışmalarında kullanılacak olan ME sistemi olarak seçilmiştir.

Formülasyonun Hazırlanışı

EM ve katyonik lipit yağlı fazda 50°C’de ısıtılarak çözündürülmüş ve karışım oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğutma sırasında çökme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Önceden belirlenen oranlarda YEM ve YYEM yağlı faza eklenmiştir. Karışımın, 25°C ±1°C sabit sıcaklıkta, 1000 rpm hızda mekanik karıştırıcı ile karıştırılması sırasında, sisteme damla damla distile su eklenmiştir. Sistemin berraklaşmasının ardından bulanık olduğu noktaya kadar titrasyona devam edilmiş ve harcanan distile su miktarı belirlenerek formülasyonun tutabileceği en fazla su miktarı hesaplanmıştır. Belirlenen noktadaki yağ, su ve YEM/YYEM miktarları ile formülasyon tekrar hazırlanmıştır. Formülasyonların pH değerleri asetik asit kullanılarak pH 7.4’e ayarlanmıştır.

Formülasyonun Sterilizasyonu

ME formülasyonu, 0.2 µm gözenek çapına sahip poliamit yapıdaki steril membran filtre kullanılarak sterilize edilmiştir.

Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Çalışmalar

Fiziksel Görünüm

ME formülasyonlarının saydam görünümlü sistemler olmaları nedeni ile, hazırlanan formülasyonun saydamlığı ve rengi günışığında göz ile kontrol edilmiştir.

Damlacık Büyüklüğü Analizi

ME formülasyonunun damlacık büyüklüğü ölçümü, formülasyonun iletkenliği NaCl ile 50 µS’e ayarlanmış distile su içerisinde dispersiyonu hazırlanarak, zeta potansiyel analiz cihazı ile yapılmıştır.

Zeta Potansiyel Analizi

ME formülasyonunun zeta potansiyel analizi, zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla, SLN’lerde gerçekleştirilen zeta potansiyel analizleri ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

pH Analizi

ME formülasyonunun pH’sı 7.4’e asetik asit kullanılarak ayarlanmış ve pH-metre ile 0, 1, 3 ve 6. aylarda ölçülmüştür.

Reolojik Analiz

Taze hazırlanmış ME’un akış tipinin belirlenmesi amacıyla koni-tabla reometresi kullanılarak reolojik analiz yapılmıştır. 25°C ±1°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilen analize, 200 rpm hızda başlanarak 10 rpm.sn⁻¹ hız artışı ile 250 rpm’e kadar çıkmıştır.

Faz Ayrışması İncelemesi

ME formülasyonları hazırlanışlarının ardından ve kararlılık çalışmaları süresince 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek formülasyonda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Emülsiyon Tipinin Tayini

Hazırlanan ME formülasyonlarının emülsiyon tipi dış faz olan distile su ile seyreltilerek belirlenmiş ve kararlılık çalışmaları süresince de kontrol edilmiştir.

Mikroemülsiyon Formülasyonunda Etkin Madde Miktar Tayini

ME formülasyonlarının EM miktar tayini, CsA'nın HPLC ile Analitik Miktar Tayini (**Sayfa 38**) bölümünde anlatılan analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

ME formülasyonundan ~5 mg formülasyon tam tartılmış, 2 mL etanolde çözündürülmüş ve HPLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Mikroemülsiyon Formülasyonlarına ait Kararlılık Çalışmaları

Hazırlanan formülasyon oda sıcaklığı ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), buzdolabı ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) etüv ($40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) ve iklim dolabında ($40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve % 60 bağıl nem) olmak üzere dört farklı koşulda saklanmıştır. Formülasyonun kararlılığının incelenmesi amacıyla, 1, 3 ve 6 aylık sürelerin sonunda formülasyon üzerinde, fiziksel görünümü, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel, pH analizi, reolojik analiz, faz ayrışmasının incelenmesi ve tip tayini çalışmaları yapılmıştır.

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

Yapılan ön çalışmalarda, polimer olarak Eudragit® RS 100 ve RL 100'ün kullanıldığı çok sayıda formülasyon emülsifikasyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır (Pignatello ve ark., 2002a; Guerrero ve ark., 2005; Wang ve ark., 2006). Yöntemde, polimer ve EM etanolde çözündürülmekte, çözelti sulu dış faza eklendiğinde polimer-EM-etanol kuasi-emülsiyonuna dönüşmektedir. Etanolün ters difüzyonu ve organik çözücünün kademeli buharlaşması polimerin *in situ* çökmesine neden olmakta ve EM içeren matris tipi nanopartiküller oluşmaktadır. Hazırlanan formülasyonlarda, parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel ve pH analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, iki farklı EM-polimer oranına ve iki ayrı EM konsantrasyonuna sahip dört formülasyon kararlılık çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Formülasyonların Hazırlanışı

Formülasyonların hazırlanışında, EM ve polimer, 2 mL etanol içerisinde oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Çözelti, % 0.02 [a/h] Tween® 80 ve % 0.1 [a/h] BK içeren buz banyosundaki 50 mL distile su içerisine enjektör yardımıyla $0.5 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ hızla enjekte edilmiş ve enjeksiyon sırasında karışım 20500 rpm hızla ultraturaks ile karıştırılarak PN'ler hazırlanmıştır. Formülasyonlar, düşük sıcaklıklarda bir müddet saklanmış, daha sonra manyetik karıştırıcı ile 18 saat karıştırılarak etanol artıklarının ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. PN formülasyonlarının pH değerlerinin fizyolojik pH'ya yakın olması nedeniyle, (pH: 7.2-7.4) herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır.

Formülasyonların Sterilizasyonu

PN formülasyonları, otoklav sterilizasyonu ile, 121°C 'de, 15 dakika sürede sterilize edilmiştir.

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar

Parçacık Büyüklüğü Analizleri

Hazırlanan PN formülasyonlarının parçacık büyüklükleri, iletkenliği NaCl ile 50 μ S'e ayarlanmış distile sudaki dispersiyonlarının zeta potansiyel analiz cihazı ile analizleri sonucunda elde edilmiştir.

Zeta Potansiyel Analizleri

PN formülasyonlarının zeta potansiyel analizleri, zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla, SLN'lerde gerçekleştirilen zeta potansiyel analizleri ile benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

pH Analizleri

Taze hazırlanan PN formülasyonlarının pH değerleri, pH-metre ile 0, 1, 3 ve 6. aylarda ölçülmüştür.

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini

PN formülasyonlarının EM miktar tayini, CsA'nın HPLC ile Analitik Miktar Tayini (**Sayfa 38**) bölümünde anlatılan analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

PN formülasyonlarından ~5 mg formülasyon tam tartılmış, 2 mL etanolde çözüldürülmüş ve HPLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Kararlılık Çalışmaları

Emülsifikasyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlardan seçilen dört formülasyon, oda sıcaklığı (25°C \pm 1°C), buzdolabı (4°C \pm 1°C) ve etüvde (40°C \pm 1°C) saklanmıştır. Formülasyonların kararlılıklarının incelenmesi amacıyla 0, 1, 3 ve 6 aylık sürelerin sonunda formülasyonlar üzerinde parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel ve pH analizleri yapılmıştır.

İn Vivo Çalışmalar

Hazırlanan SLN, ME ve PN formülasyonlarında gerçekleştirilen *in vitro* analiz sonuçları göz önünde tutularak, üç farklı taşıyıcı sistemden birer formülasyon *in vivo* çalışmalar için belirlenmiştir. *In vivo* çalışmalar için seçilen üç formülasyon, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alındıktan sonra (**Ek-1**) koyunlara oküler olarak uygulanmış ve göz sıvılarına geçebilen EM miktarları karşılaştırılmıştır. EM'nin biyolojik yarılanma ömrü göz önünde tutularak son sıvı örneklerinin 48. saatte alınması uygun bulunmuştur. CsA'nın normal hepatik fonksiyona sahip kişilerdeki yarı ömrü 8-10 saat olarak belirtilmiştir (Châteauvert ve Côté, 1998).

İrritasyonun Belirlenmesi

Hayvanlara formülasyon uygulanmasının ardından gözde oluşabilecek irritasyon, uygulama yapılmayan göz referans alınarak kontrol edilmiştir.

Formülasyonların Göze Uygulanması ve Örneklerin Alınması

Oküler biyoyararlanım çalışmaları için, yaklaşık olarak 30-35 kg ağırlığındaki koyunlar kullanılmıştır. SLN formülasyonu, koyunların gözlerinden birine 200 μ L

dozda uygulanmış ve diğer göze kontrol amaçlı olarak uygulama yapılmamıştır. Koyunlar 2., 16., 24. ve 48. saatlerde kesime gönderilmiş ve sonrasında her iki göz de neşter yardımıyla çıkartılmıştır. Çıkarılan gözlerden hümör aköz ve hümör vitröz sıvı örnekleri enjektör yardımıyla alınarak, örnekler buzdolabında (4°C ±1°C) analiz yapılıncaya kadar saklanmıştır (Amini ve Ahmadiani, 2003).

SLN formülasyonu ile aynı dozda (200 µL) ME ve konsantrasyonu doğrultusunda aynı miktar CsA içeren 100 µL PN formülasyonu göze uygulanmış ve aynı şekilde sıvı örnekleri alınmıştır.

Hümör Aköz ve Hümör Vitröz Sıvı Örneklerinde Siklosporin A Miktar Tayini

CsA'nın miktar tayininde rekombinant DNA teknolojisi (Henderson, 1987) ile analiz yapan EIA cihazı kullanılmıştır. Yöntemde genetik olarak iki inaktif yapıya ayrılmış olan bakteri kaynaklı β-galaktosidaz enzimi kullanılmaktadır.

Analiz sırasında, örnekteki analit (CsA) β-galaktosidaz enziminin inaktif şekli ile yarışmalı olarak antikorun birleşme bölgesine ulaşmaya çalışmaktadır. Eğer örnekte analit var ise bu madde antikora bağlanmakta, inaktif şekiller ise enzim oluşturmak üzere açıkta kalmaktadır. Serbest halde kalan inaktif şekillerin aktif enzim oluşturması sonucu spektrofotometrik olarak ölçülebilen bir renk değişimi gerçekleşmektedir. Sonuçta oluşan enzim miktarı ve absorbans değişikliği ile, örnekteki analit miktarı saptanabilmektedir (Cyclosporine PLUS Assay, 2006).

Çalışmada, hümör aköz ve hümör vitröz sıvı örneklerindeki CsA miktarları "CEDIA Cyclosporine Plus Assay" kiti kullanılarak, EIA cihazı yardımıyla analiz edilmiştir (Cyclosporine PLUS Assay, 2006).

In vivo çalışmalar Osmangazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Kevser Erol denetiminde gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

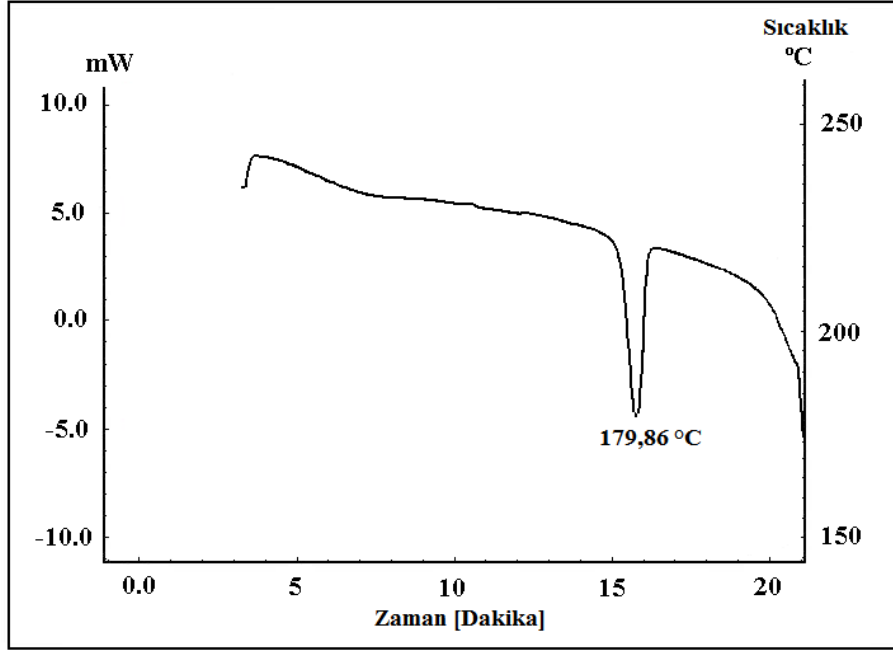
İn Vitro Çalışmalar

Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

Siklosporin A ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

CsA'nın, DSC cihazı ile 30-250°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 179.86°C olarak bulunmuş, termogramı **Şekil 7**'de sunulmuştur.



Şekil 7. Siklosporin A'nın Termal Analizine ait Termogram

CsA'nın termal analizi, SLN formülasyonlarının hazırlanması sırasında uygulanacak yüksek sıcaklıktaki davranışını, saklama şartlarındaki kararlılığını belirlemek amacıyla DSC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Novartis (İstanbul, Türkiye) tarafından başlatılan maddenin, firma tarafından gönderilmiş spesifikasyonunda, erime derecesi 148-151°C olarak belirtilmiştir.

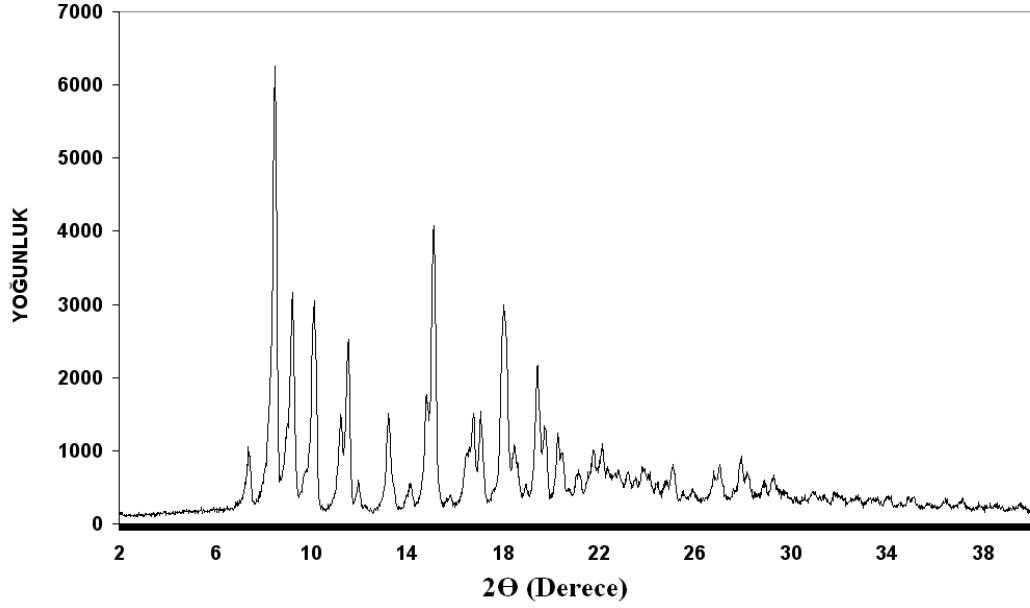
Erime Derecesi Tayini

CsA'nın erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizlerinde erime derecesi 182°C bulunmuştur.

Maddenin spesifikasyonu ile, her iki yöntemde de ortaya çıkan erime derecesi arasındaki farkın nedeni araştırıldığında, maddenin nem çekmesine bağlı olarak erime derecesinde bir artış olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, olası bir kararsızlık probleminin aydınlatılması amacı ile CsA'nın IR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrum firma spesifikasyonlarında belirtilen IR spektrumu ile karşılaştırılmış ve yapısal herhangi bir farklılık gözlenmediğinden, maddenin yalnızca nem çektiğine karar verilmiştir.

X-Işını Kırınım Analizi

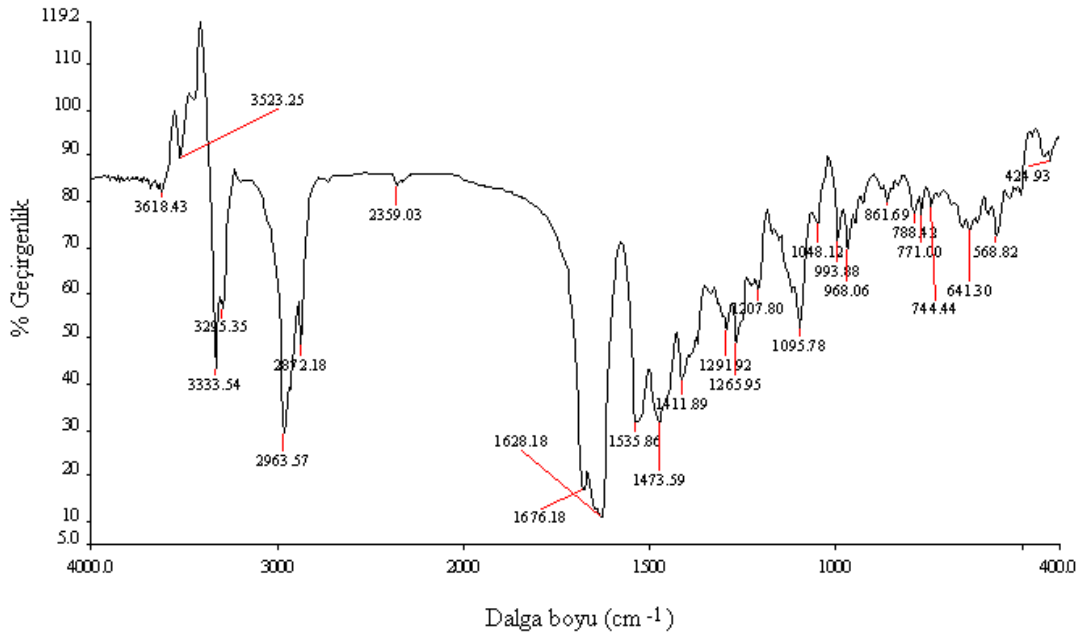
CsA'nın XRD profili Şekil 8'de sunulmuştur.



Şekil 8. Siklosporin A'nın X-Işını Kırınım Profili

İnfrared Analizi

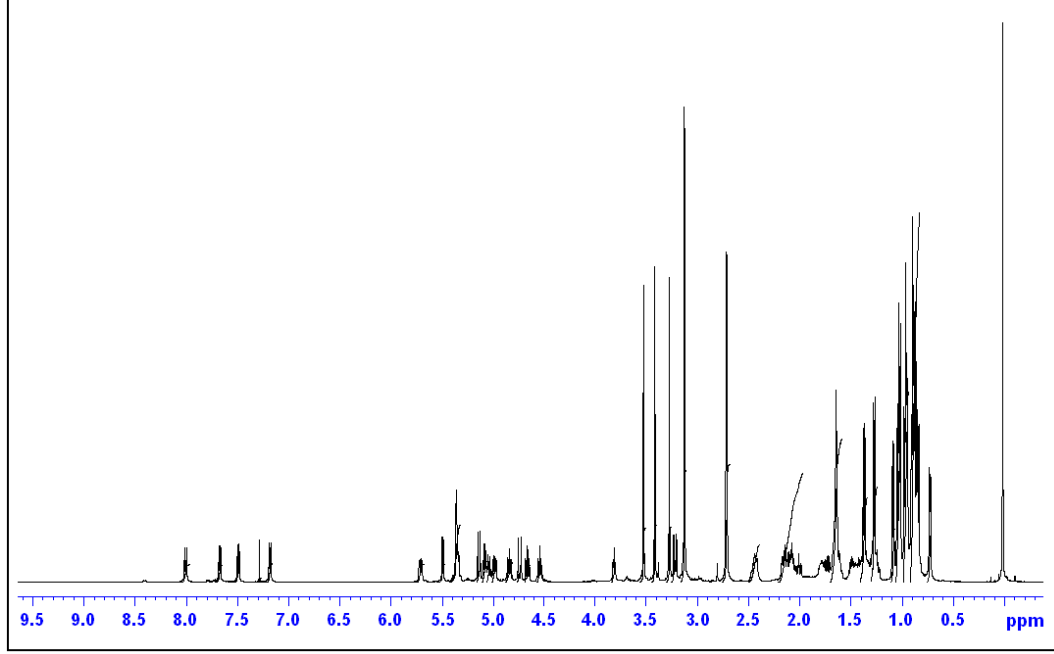
CsA'nın KBr ile hazırlanan diski kullanılarak elde edilen IR spektrumu Şekil 9'da sunulmuştur.



Şekil 9. Siklosporin A'nın İnfrared Analiz Spektrumu

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

CsA'nın NMR analizine ait spektrumu **Şekil 10**'da sunulmuştur.



Şekil 10. Siklosporin A'nın Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu

CsA'nın XRD, IR ve NMR yöntemleri ile yapısal özelliklerinin belirlenmesindeki amaç, maddenin formülasyonlardaki bileşenler ve formülasyon hazırlama parametreleri nedeniyle kimyasal bir değişikliğe uğrayıp uğramayacağını kontrol edilebilmesidir. Değerlendirmeler, analiz sonuçları referans alınarak yapılmıştır.

Siklosporin A'nın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Miktar Tayini Doğrusallık

CsA'nın etanolde hazırlanan 1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi **Şekil 11**'de sunulmuştur.

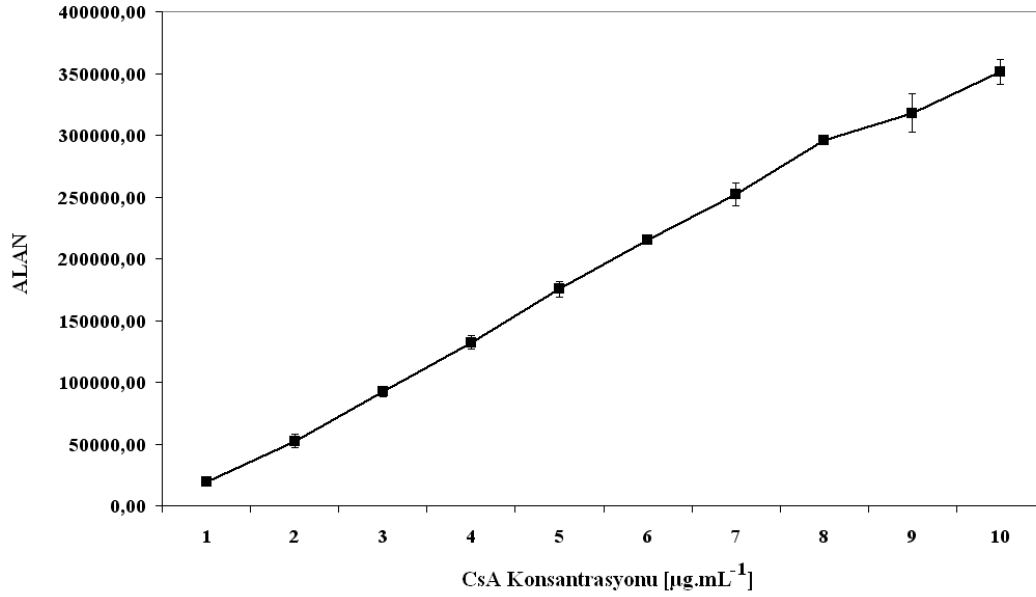
Kesinlik

Yapılan analizler ile elde edilen sonuçlar formüller yardımıyla değerlendirilerek yöntemin RSD (Rölatif Standart Sapma) değerleri hesaplanmış ve sonuçları **Çizelge 5**'te sunulmuştur.

Çizelge 5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Gün-İçi ve Günler-Arası Kesinlik Sonuçları (RSD)

| CsA Konsantrasyonu ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Gün-İçi \pm SH | Günler-Arası \pm SH |
|--|------------------|-----------------------|
| 2 | 4.47 \pm 0.07 | 15.24 \pm 0.05 |
| 6 | 2.02 \pm 0.03 | 10.11 \pm 0.02 |
| 10 | 3.90 \pm 0.01 | 7.02 \pm 0.01 |

k=3, n=6, SH: Standart hata



Şekil 11. Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Standart Eğrisi (n=6)
 [Dikey bar= Standart Hata (SH)]
 [Doğru Denklemi: $y=37828.88x-20286.13$, $r= 0.997$, Eğim= 37828.88 ± 837.36 , Eğimin % 95 Güven Aralığı= $36283.53--39688.25$, Y Eksen Kesim Noktası= -20286.13 ± 5195.65 , Y Eksen Kesim Noktasının % 95 Güven Aralığı= $(-30688.35) -- (-9883.92)$]

Doğruluk

Doğruluk çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve doğru denklemi yardımı ile CsA miktarları hesaplanmış, eklenen CsA miktarları ile bulunan değerler karşılaştırılarak **Çizelge 6**'da sunulmuştur.

Çizelge 6. Siklosporin A'nın Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Elde Edilen Doğruluk Değerleri

| Eklenen CsA Konsantrasyonu ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Bulunan CsA Konsantrasyonu \pm SH ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Geri Kazanılan CsA Konsantrasyonu [%] |
|--|---|---------------------------------------|
| 6.00 | 5.54 \pm 0.03 | 92.33 \pm 0.02 |
| 5.00 | 5.46 \pm 0.01 | 109.20 \pm 0.01 |
| 5.25 | 5.43 \pm 0.07 | 103.43 \pm 0.03 |

n=6, SH: Standart hata

Duyarlılık

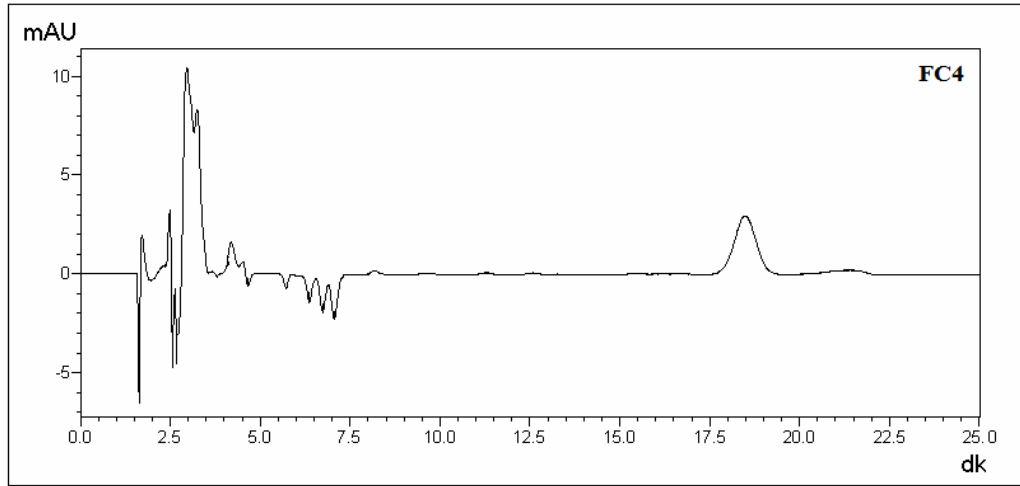
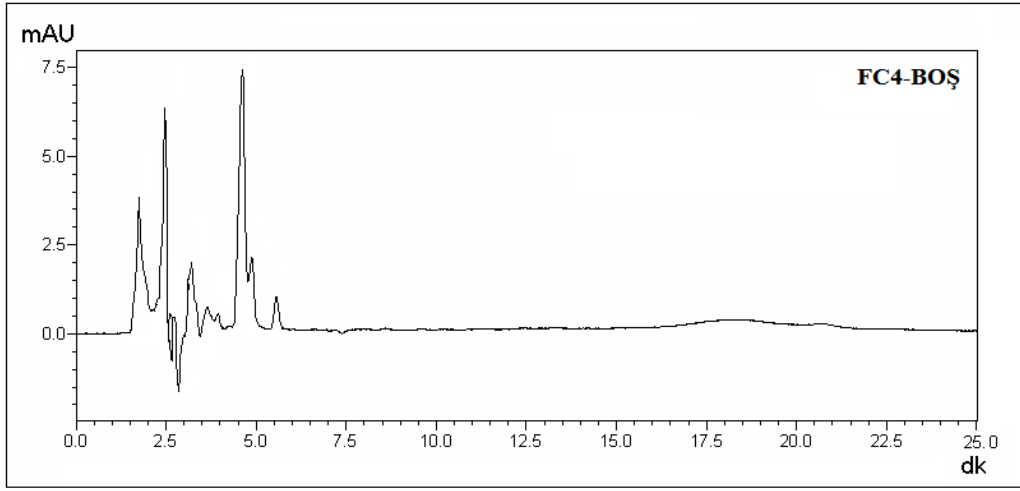
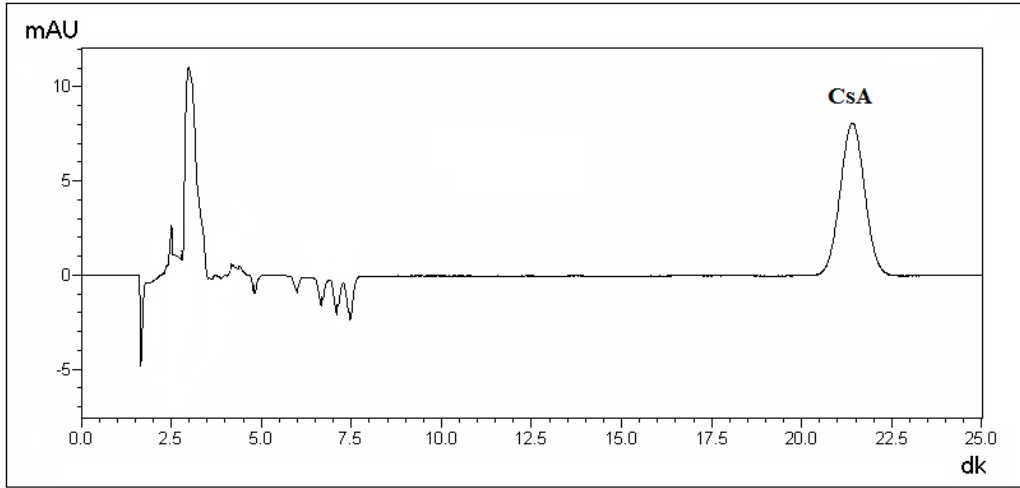
Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanan LOD değeri $0.453 \mu\text{g.mL}^{-1}$, **Eşitlik 4** kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise $1.373 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Seçicilik

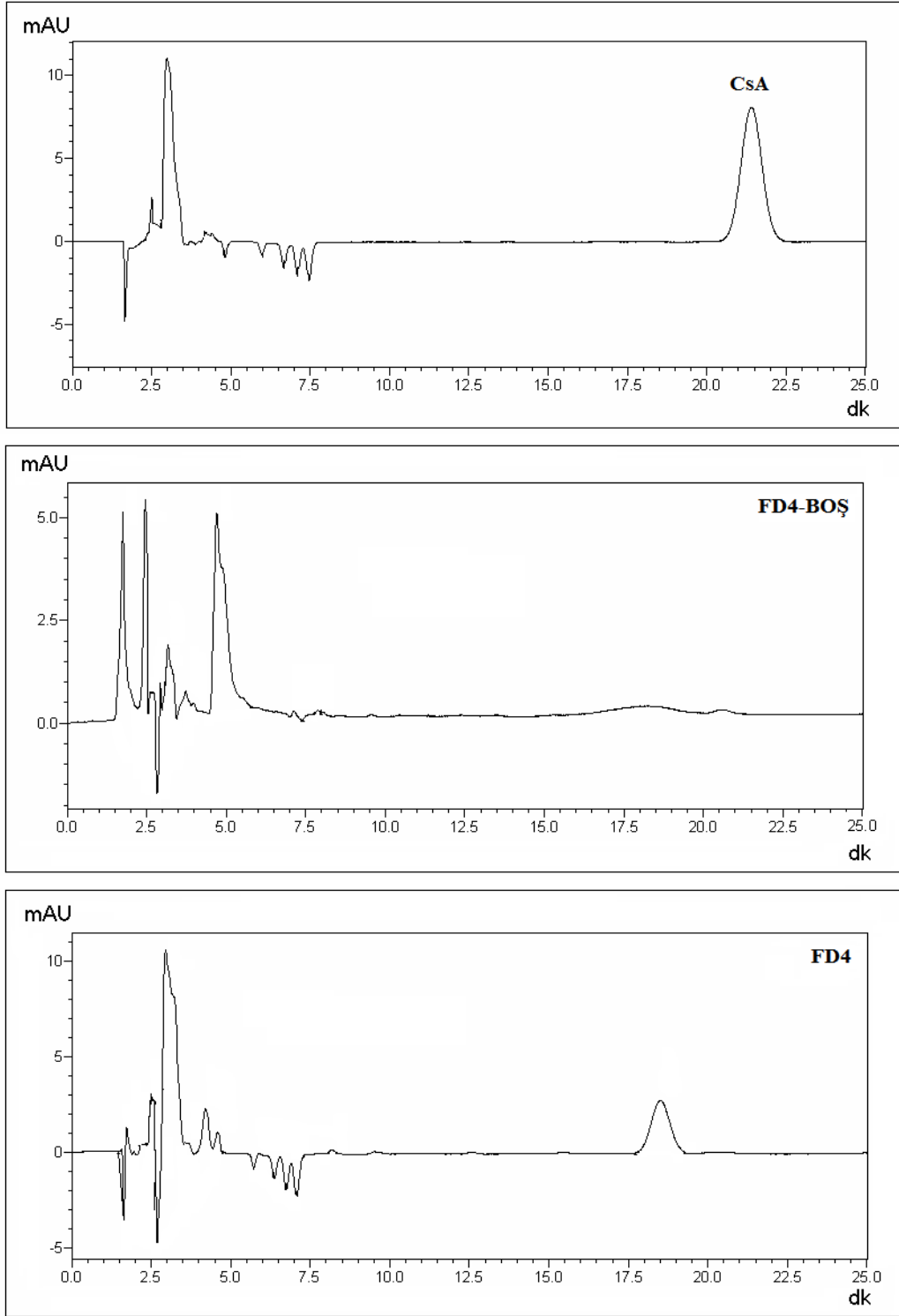
Çalışmada, EM içermeyen formülasyonlar ile EM içeren formülasyonlar analiz edilerek sistemin seçiciliği belirlenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan formülasyonların HPLC seçicilik analiz kromatogramları **Şekil 12-16**'da sunulmuştur.

Analitik çalışmalarda, yöntemin belirli bir madde için seçici olduğunun kanıtlanması ve safsızlıkların belirlenebilmesi amacıyla seçicilik analizi mutlaka yapılmalıdır (ICH, 1996).

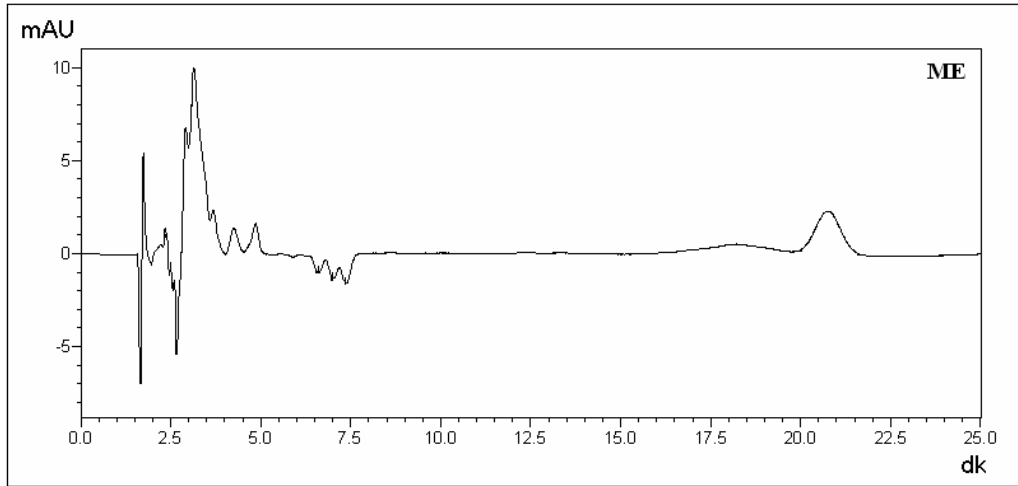
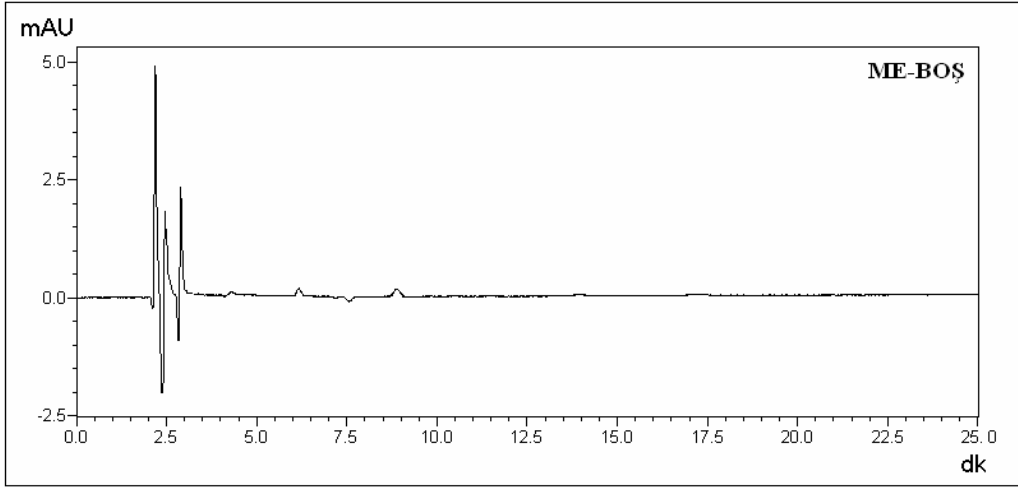
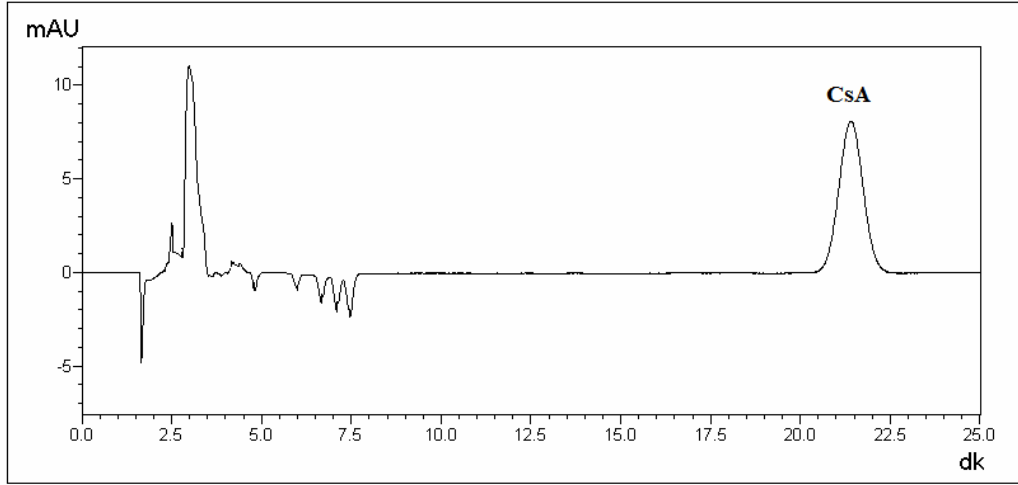
Gerçekleştirilen HPLC analiz kromatogramlarında EM içermeyen plasebo formülasyonlarda herhangi bir pik görülmezken, EM içeren formülasyonlarda CsA kolaylıkla belirlenmiştir. Formülasyonda kullanılan diğer yardımcı maddelerden sistemin etkilenmemesi ile yöntemin CsA için seçici olduğu görülmüştür.



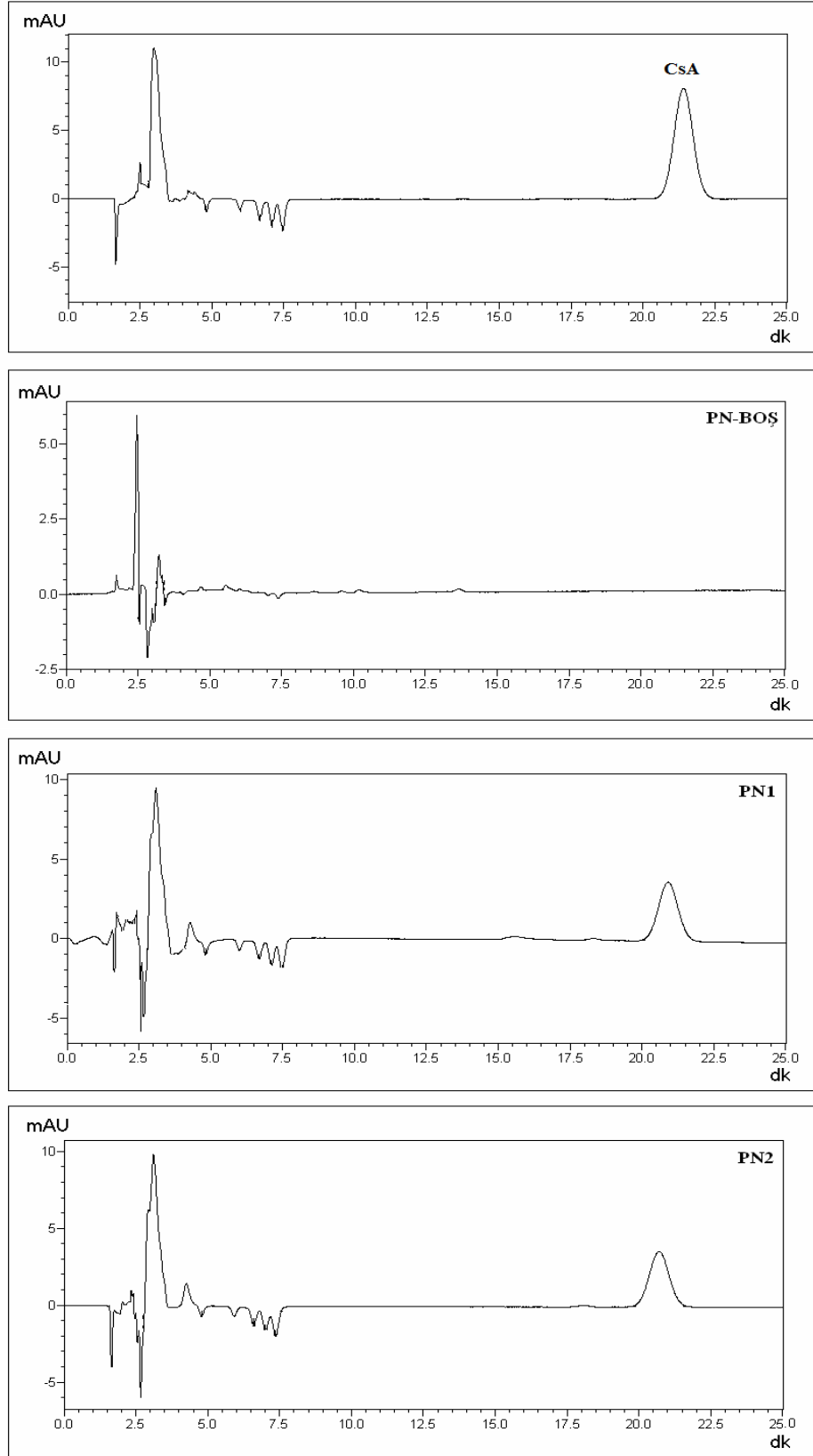
Şekil 12. Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları (BOŞ= EM İçermeyen Formülasyon)



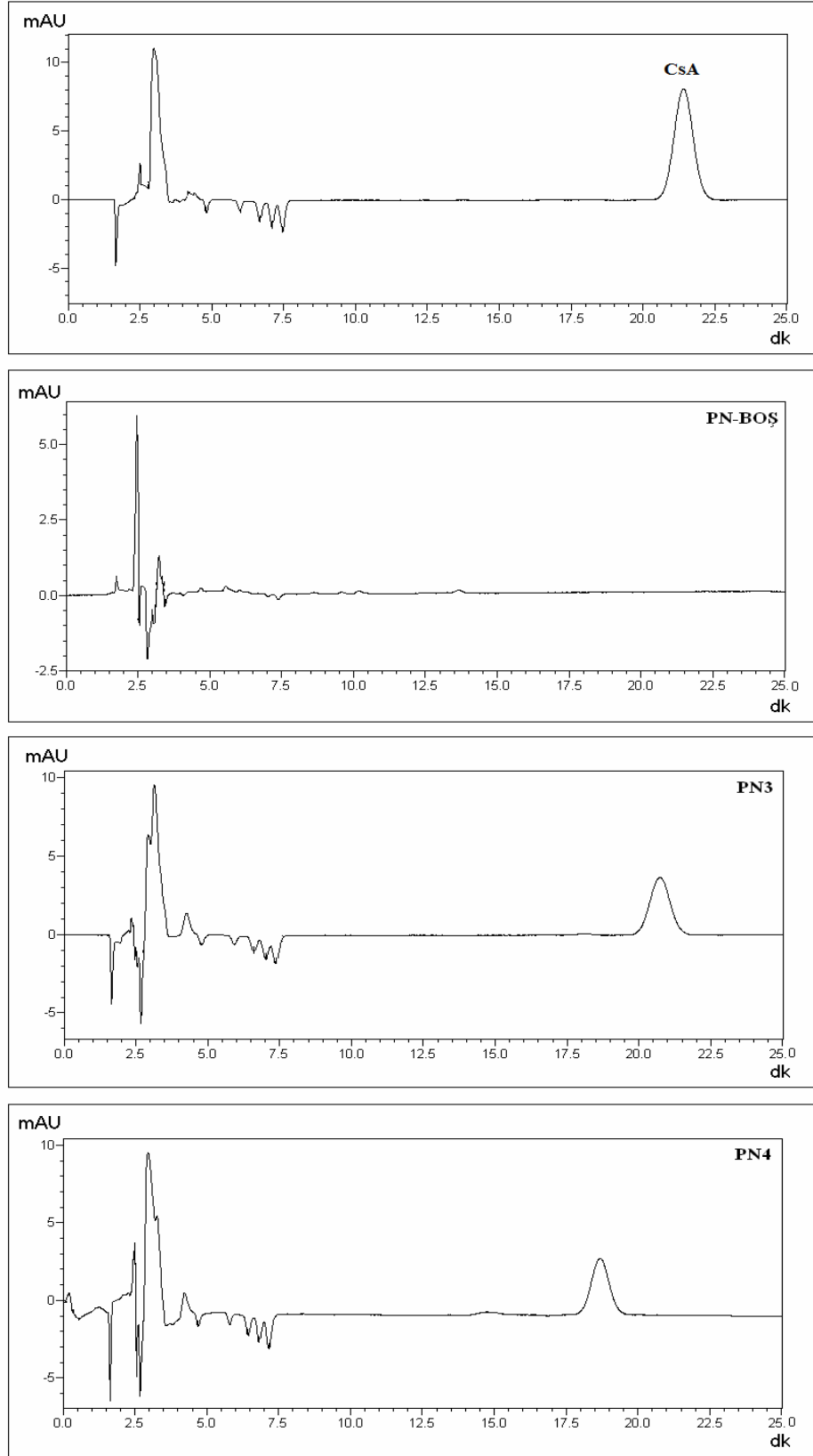
Şekil 13. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları (BOŞ= EM İçermeyen Formülasyon)



Şekil 14. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları (BOŞ= EM İçermeyen Formülasyon)



Şekil 15. % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları (PN1: EM/P Oranı [1:1], PN2: EM/P Oranı [1:3]; BOŞ= EM İçermeyen Formülasyon)

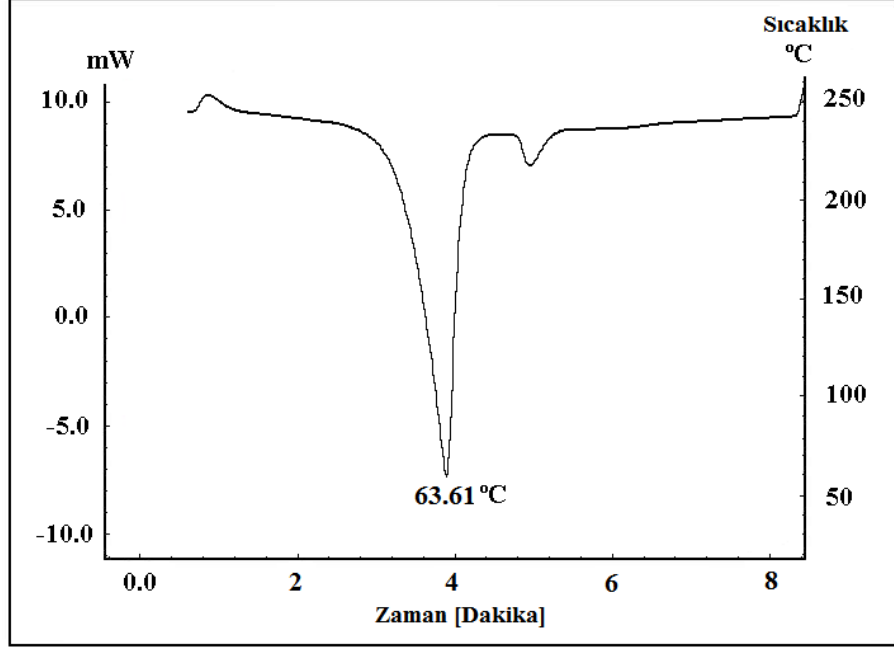


Şekil 16. % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Seçicilik Analizi Kromatogramları (PN3: EM/P Oranı [1:1], PN4: EM/P Oranı [1:3]; BOŞ= EM İçermeyen Formülasyon)

Dynasan[®] 116 ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

Dynasan[®] 116'nın DSC ile 30-250°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 63.61°C olarak bulunmuş, termogramı **Şekil 17**'de sunulmuştur.



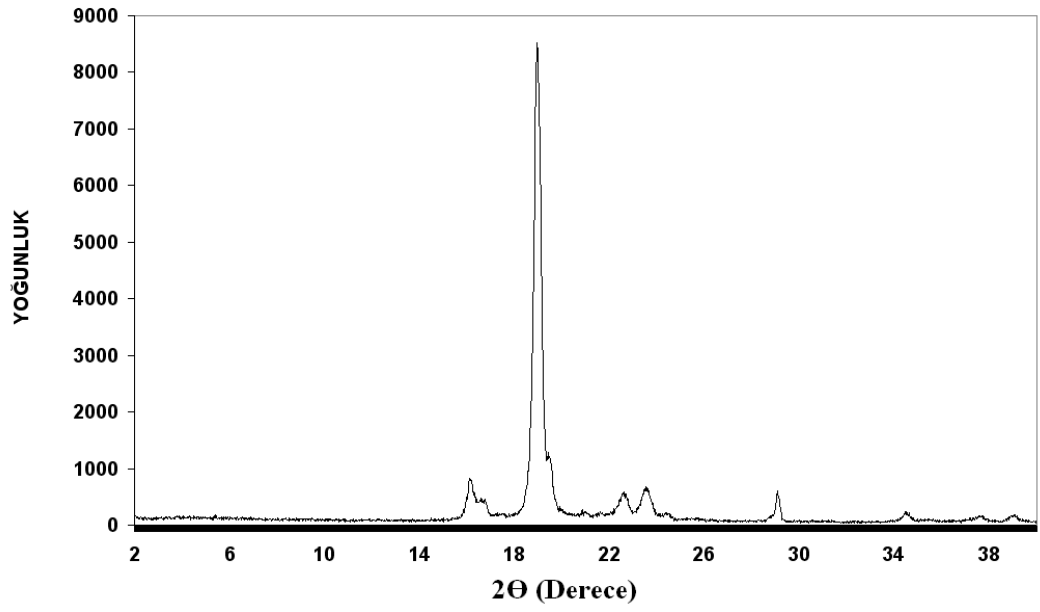
Şekil 17. Dynasan[®] 116'nın Termal Analizine ait Termogram

Erime Derecesi Tayini

Dynasan[®] 116'nın erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizlerinde erime derecesi 63°C bulunmuştur. Erime derecesi tayin cihazı ile bulunan erime derecesi, DSC analiz verilerini destekler nitelikte olmuştur. Ayrıca, Dynasan[®] 116'nın bu çalışmada bulunan erime derecesi sonuçları, literatür bilgileri ile paralellik göstermiştir (Siekmann ve Westesen, 1996; Westesen ve Siekmann, 1997; Olbrich ve ark., 2002).

X-Işını Kırınım Analizi

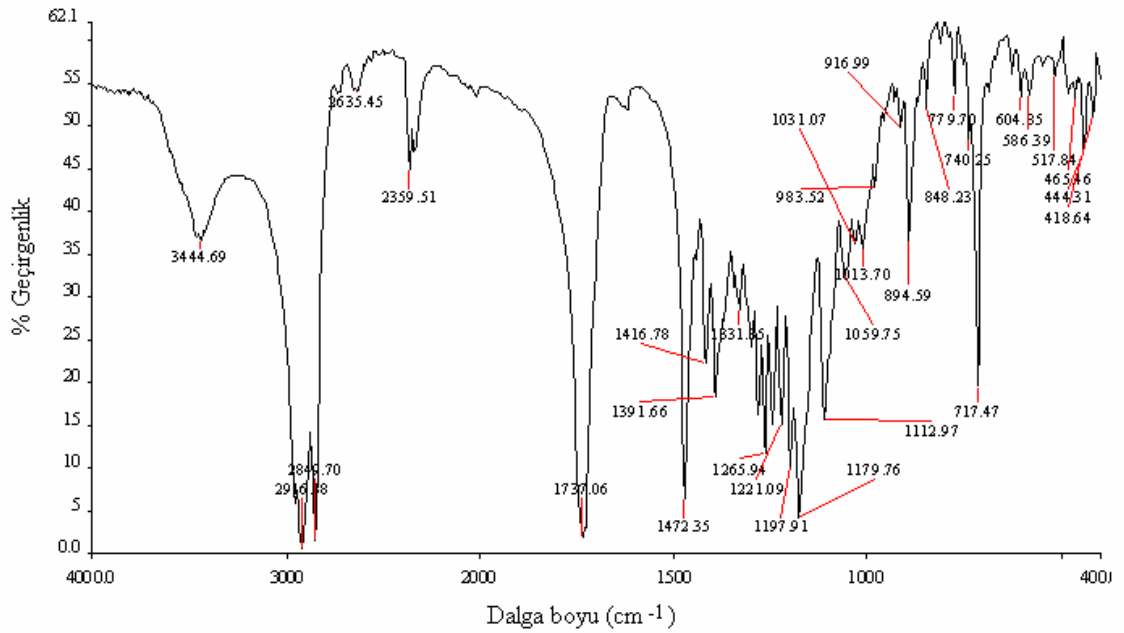
Dynasan[®] 116'nın XRD profili **Şekil 18**'de sunulmuştur.



Şekil 18. Dynasan® 116'nın X-Işını Kırınım Profili

İnfrared Analizi

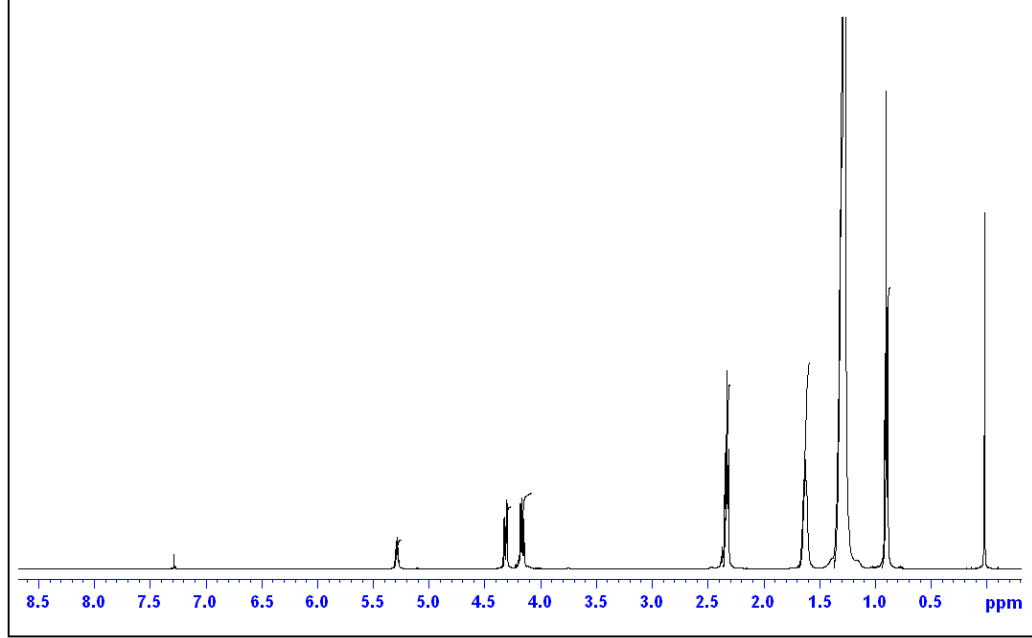
Dynasan® 116'nın KBr ile hazırlanan diski kullanılarak gerçekleştirilen IR analizine ait spektrum Şekil 19'da sunulmuştur.



Şekil 19. Dynasan® 116'nın İnfrared Analiz Spektrumu

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

Dynasan[®] 116'nın NMR analizine ait spektrum **Şekil 20**'de sunulmuştur.



Şekil 20. Dynasan[®] 116'nın Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu

Oluşturulacak SLN formülasyonlarında, saklama süresince oluşabilecek olası değişikliklerin belirlenebilmesinde referans olarak kullanılmak üzere, Dynasan[®] 116'nın da CsA gibi yapısal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, maddenin XRD, IR ve NMR analizleri gerçekleştirilmiş ve formülasyonların kararlılık çalışmaları süresince oluşabilecek olası değişikliklerin belirlenebilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

Compritol[®] 888 ATO ile Yapılan Çalışmalar

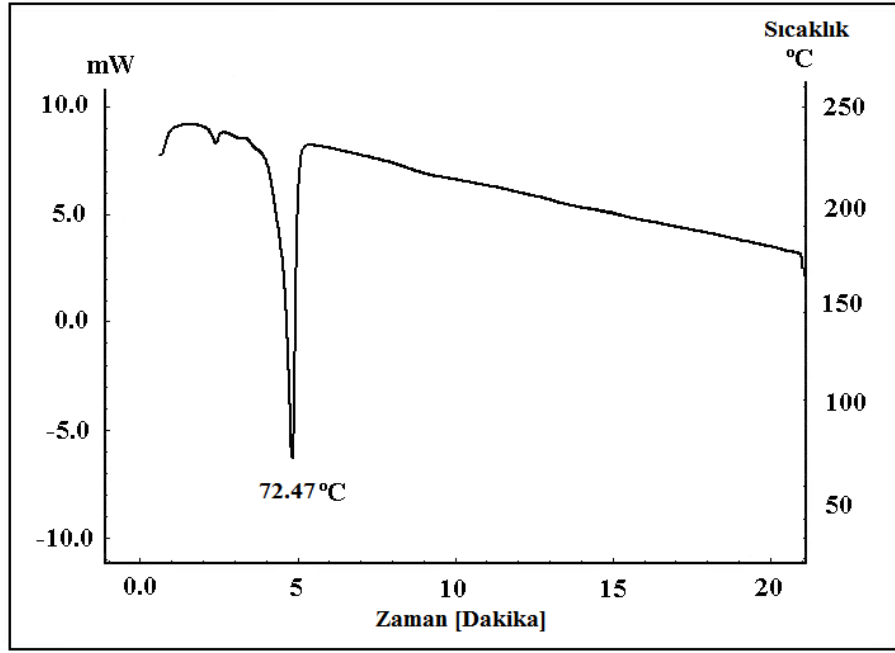
Termal Analiz

Compritol[®] 888 ATO'nun DSC ile gerçekleştirilen termal analizinde erime sıcaklığı 72.47°C olarak belirlenmiş, termogramı **Şekil 21**'de sunulmuştur.

Erime Derecesi Tayini

Compritol[®] 888 ATO'nun erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizinde erime derecesi 73°C bulunmuştur.

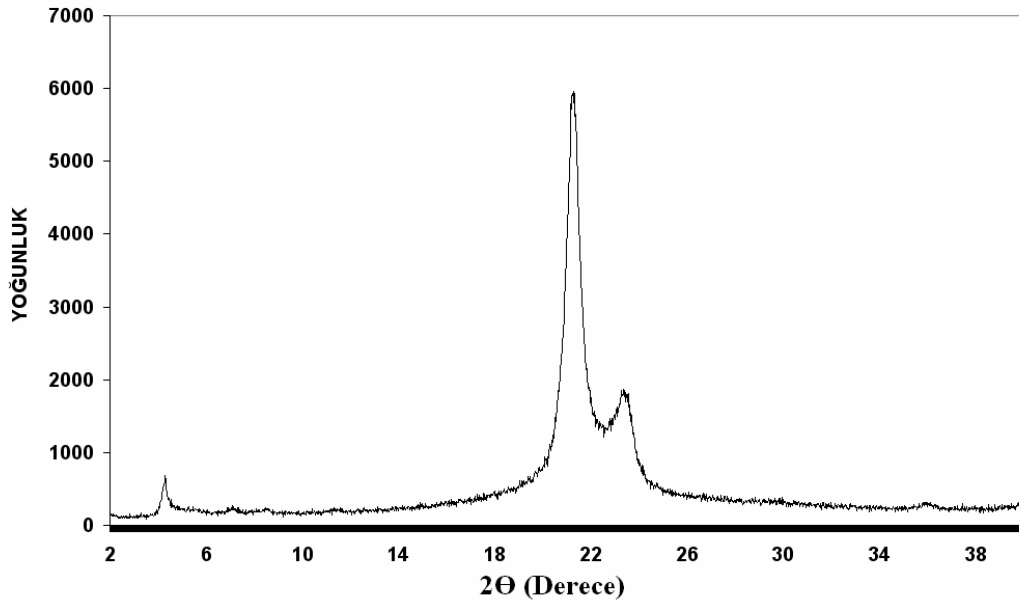
Compritol[®] 888 ATO'nun erime derecesi tayin cihazı ile bulunan erime derecesi, DSC analiz verilerini destekler nitelikte olmuştur.



Şekil 21. Compritol® 888 ATO'nun Termal Analizine ait Termogram

X-Işını Kırınım Analizi

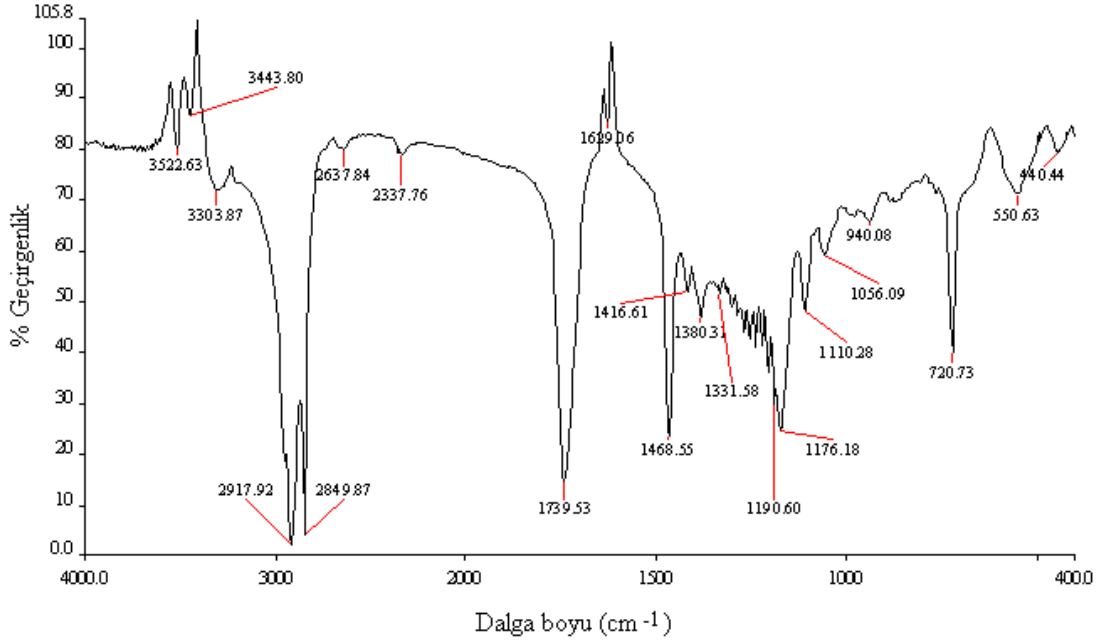
Compritol® 888 ATO'nun XRD profili Şekil 22'de sunulmuştur.



Şekil 22. Compritol® 888 ATO'nun X-Işını Kırınım Profili

İnfrared Analizi

Compritol® 888 ATO'nun KBr ile hazırlanan diski kullanılarak gerçekleştirilen IR analizine ait spektrum **Şekil 23**'de sunulmuştur.



Şekil 23. Compritol® 888 ATO'nun İnfrared Analiz Spektrumu

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

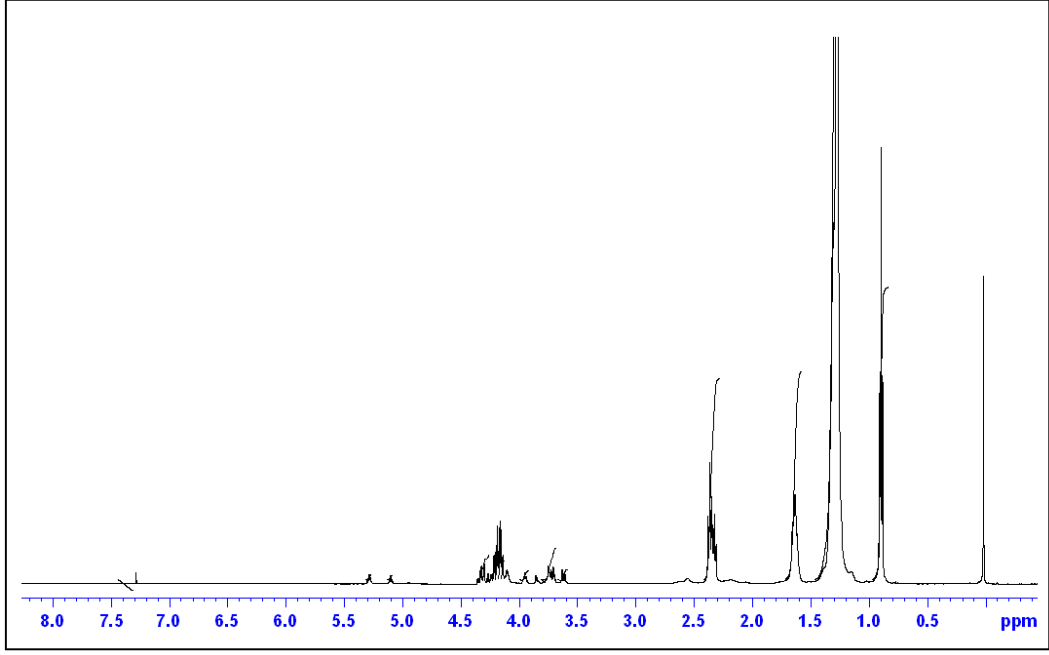
Compritol® 888 ATO'nun NMR analizine ait spektrumu **Şekil 24**'de sunulmuştur.

Compritol® 888 ATO'nun yapısal analizi için XRD, IR ve NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kararlılık çalışmalarında referans olarak kullanılmıştır.

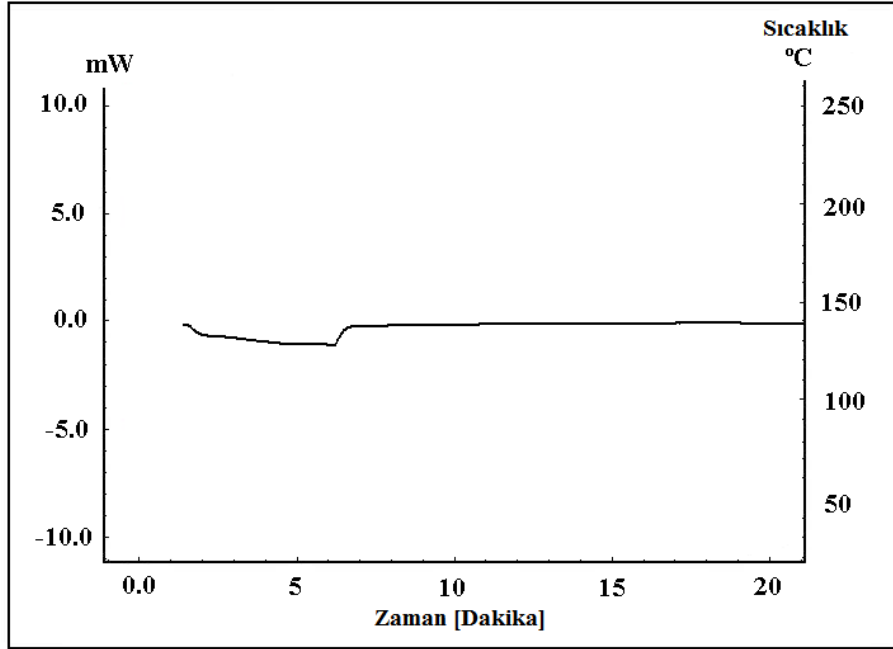
Eudragit® RS 100 ile Yapılan Çalışmalar

Termal Analiz

Eudragit® RS 100'ün DSC ile gerçekleştirilen termal analizine ait termogram **Şekil 25**'de sunulmuştur.



Şekil 24. Compritol® 888 ATO'nun Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumu



Şekil 25. Eudragit® RS 100'ün Termal Analizine ait Termogram

PN'lerde ön formülasyonların değerlendirilmesi sonucunda çeper maddesi olarak belirlenen Eudragit® RS 100'ün DSC ile gerçekleştirilen termal analizinde, erime piki elde edilememiş ve maddenin dekompoze olduğu görülmüştür. PN'lerin hazırlanmasında oda sıcaklığında çalışılacağı ve madde etanolde çözündürüleceği için çeper maddesi değiştirilmemiş ve PN'ler Eudragit® RS 100 ile hazırlanmıştır.

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında, katı lipit olarak Gelucire® 44/14, ile soya ve PEG 400'ün YEM olarak kullanıldığı plasebo (boş) formülasyonlar hazırlanmış, ancak formülasyon oda sıcaklığına soğutulduğunda parçacıklar oluşmamış ve sistem neredeyse berrak bir hal almıştır.

Literatürde, Gelucire® 44/14'ün daha çok biyoyararlanımı ve çözünürlüğü arttırmak amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir (He ve ark., 2005). Bu nedenle Gelucire® grubu diğer lipitlerle de formülasyonlar hazırlanmıştır. Oluşturulan sistemlerin parçacık büyüklük analizlerinde, artan hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri ile bağlantılı olarak parçacık büyüklüğünün ufaldığı tespit edilmiştir. Şöyle ki; Gelucire® 33/01 ile 2.479 µm, Gelucire® 53/10 ile 0.193 µm, Gelucire® 50/13 ile ise 0.181 µm ortalama parçacık büyüklüğüne sahip formülasyonlar elde edilmiş ve en uygun formülasyon Gelucire® 53/10 ile hazırlanan formülasyon olmuştur.

Gelucire® grubu lipitler ile kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında daha çok Gelucire® 50/13'ün tercih edildiği belirtilmiştir (Cavallari ve ark., 2005). Çalışmalarda kullanılacak Gelucire® 50/13'ün üretiminin durdurulması nedeni ile yeni katı lipit arayışına gidilmiştir.

Dynasan® 116 ile soya ve PEG 400 kullanılarak yeni formülasyon denemeleri yapılmış, ancak yine istenilen parçacık büyüklüğüne sahip formülasyonlar oluşturulamamıştır. Bu çalışmada elde edilen formülasyonlardaki parçacık büyüklüğü ~10 µm olarak ölçülmüştür. Parçacıkların 10 µm'den küçük olması, hassas göz dokularında iritasyona neden olmaması ve her defada uygulanan EM miktarının eşit olması açısından büyük önem taşımaktadır (Hecht ve ark., 1996). Oküler poliestere nanokapsüllerin hazırlandığı bir çalışmada, 200-250 nm parçacık büyüklüğüne sahip partiküller hazırlanmıştır (Calvo ve ark., 1996). Çalışmada hedeflediğimiz 200 nm'den oldukça büyük parçacıkların oluşma nedeni olarak, YEM'lerin yeterince etkili olamayışı düşünülerek, YEM'ler farklı konsantrasyonlarda denenmiş ancak artan soya miktarına bağlı olarak sistemin viskozitesinin arttığı gözlenmiştir. Göz damlası olarak uygulanması düşünülen olası formülasyon için, daha düşük viskoziteye sahip, akıcı formülasyonlar elde edilmek istenmektedir; bu nedenle, soya'nın hazırlanacak sistemler için uygun YEM olmadığına kararına varılmıştır. PEG 400 ile yapılan çalışmalarda da homojen sistemler elde edilemediğinden, YEM olarak kullanılmamasına karar verilmiştir.

Tween® 80 YEM'si ile Dynasan® 116 ve Compritol® 888 ATO lipitlerinin farklı konsantrasyonlardaki karışımları denenmiş ve ufak parçacık büyüklüğüne sahip homojen sistemler oluşmuştur. Parçacık büyüklüğü analizi sonuçlarına göre, % 6 lipit (Dynasan® 116 veya Compritol® 888 ATO) ve % 4 YEM (Tween® 80) konsantrasyonu ile kararlı formülasyonlar hazırlanabileceği belirlenmiştir.

Yapılan pek çok çalışmada da kullanılarak güvenilirliği kanıtlanmış Tween® 80 (Zimmermann ve Müller, 2001; Lallemand ve ark., 2003) SLN formülasyonları için YEM olarak belirlenmiştir.

Formülasyonlara eklenecek CsA'nın konsantrasyonu, % 0.1 olarak belirlenmiştir.

Sisteme eklenecek EM'nin konsantrasyonu, daha önceden yapılan çalışmalar değerlendirilerek belirlenmiştir (Toshida ve ark., 1998; Lallemand ve ark., 2003).

Tavşanlarla yapılan bir çalışmada, CsA % 0.01, % 0.03, % 0.1'lik konsantrasyonlarda kullanılmış ve oluşturduğu gözyaşı hacmi *Schirmer* gözyaşı test bantları kullanılarak ölçülmüştür (Toshida ve ark., 1998). Kuru göz hastalığının tedavisinde kullanılan CsA'nın % 0.1'lik konsantrasyonu, uygulamanın ardından gözyaşı miktarını kayda değer şekilde arttırmış ve 5. saatin sonunda da etki en yüksek düzeye çıkmıştır (Toshida ve ark., 1998).

Sisteme eklenecek CsA'nın kullanılacak konsantrasyonu belirlendikten sonra, SLN'lere katyonik yük kazandırmak amacıyla katyonik lipit olan OA % 0.5-1 aralığında farklı konsantrasyonlarda formülasyonlara eklenmiştir. Kullanılan konsantrasyonda parçacık büyüklüğünde artışa neden olmuştur. Artışın nedeni olarak, katı lipitlerin negatif olan yüklerini kullanılan konsantrasyonlardaki katyonik lipitin yeterince pozitif yöne kaydırmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Daha sonra % 1-2 aralığında farklı konsantrasyonlarda denenilen ve formülasyonlardaki etkinliği, zeta potansiyel ve parçacık büyüklük analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilen katyonik lipit, % 1.5 konsantrasyonda kullanıldığı formülasyonlarda yüksek potansiyellerin yanısıra ufak parçacık büyüklüklerinin (~300 nm) elde edilmesini sağlamış ve katyonik lipit için uygun konsantrasyon % 1.5 olarak belirlenmiştir.

Emülsiyonlar ile yapılan bir çalışmada, katyonik yüke sahip formülasyonun anyonik lipit emülsiyonuna kıyasla oküler biyoyararlanımı arttırdığı belirlenmiştir (Tamilvanan ve ark., 2001, Tamilvanan ve Benita, 2004). Asiklovir içeren lipozom formülasyonları ile yapılan bir çalışmada da, katyonik yüke sahip lipozomların oküler penetrasyonları negatif yüke sahip ve serbest asiklovire göre daha yüksek olmuştur (Law ve ark., 2000).

Katyonik yüke sahip SLN formülasyonlarının hazırlanması ile oküler biyoyararlanımın ve formülasyonların gözde kalış sürelerinin uzatılması amaçlanmıştır.

Koruyucu ve penetrasyon arttırıcı olarak seçilen BK, diğer çalışmalara benzer olarak, % 0.01 konsantrasyonunda tüm formülasyonlara eklenmiştir (Hecht ve ark., 1996).

Oküler sistemlerde sınırlı sayıda koruyucu madde kullanılabilir. BK, Polyquad[®], tiyomersal, metil ve propil paraben, feniletanol, klorhekzidin ve poliaminopropil biguanid, güvenli ve etkili koruyucular olarak belirlenmiştir (Hecht ve ark., 1996). Bu maddeler içersinden en sık kullanılan BK, hızlı ve yüksek etki gösteren, mükemmel kimyasal kararlılığa sahip koruyucu olarak tanımlanmaktadır. Geniş pH aralığında kararlı, yüksek sıcaklıklarda bozunmayan bir yapıya sahiptir ve katyoniktir. BK, bazı durumlarda, koruyucu etkinin arttırılması amacı ile şelat yapıcı ajan olan etilendiamintetra asetik asit (EDTA) ile birlikte kullanılmaktadır. BK'ün oküler dokulara geçişi sınırlı değerlerdedir, ancak EM'lerin oküler penetrasyonunu arttırdığı belirtilmektedir (Hecht ve ark., 1996).

Yukarıda belirtilen özellikleri göz önüne alınarak, formülasyon bileşimine koruyucu ve penetrasyon arttırıcı madde olarak BK seçilmiştir. BK, göz

damlalarında % 0.004-0.02 aralığında, genellikle % 0.01 oranında kullanılmaktadır (Hecht ve ark., 1996). Bu çalışmada da, BK tüm formülasyonlara % 0.01'lik konsantrasyonda eklenmiştir.

Sonuç olarak, hazırlanan ön formülasyonlarda, öncelikli olarak elde edilmeye çalışılan yüksek zeta potansiyel ve düşük parçacık büyüklüğü değerlerine ulaşılmıştır.

Gerçekleştirilen ön formülasyon çalışmaları sonucunda, kararlılık ve oküler biyoyararlanım çalışmalarında kullanılmak üzere iki formülasyon seçilmiştir. Seçilen formülasyonların içerikleri **Çizelge 7**'de sunulmuştur.

Çizelge 7. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri

| KOD | Dynasan® 116 | Compritol® 888 ATO | CsA | OA | BK | Tween® 80 |
|-----|--------------|--------------------|------|------|------|-----------|
| FC4 | - | 6.00 | 0.10 | 1.50 | 0.01 | 4.00 |
| FD4 | 6.00 | - | 0.10 | 1.50 | 0.01 | 4.00 |

Tüm değerler % ağırlığı [a/a] ifade etmektedir

Formülasyonlarının Hazırlanışı

Ön formülasyon çalışmalarında belirlenen bileşen ve oranlara sahip formülasyonlar, SLN Hazırlanma Yöntemleri (**Sayfa 14**)'de anlatılan şekilde "yüksek devirli homojenizasyon yöntemi" ile hazırlanmıştır. Kullanılan yöntem ve katyonik lipitin yardımıyla nanometre boyutunda parçacıklar elde edilmiş ve parçacık büyüklüğünün ufaltılmasına yönelik ek işlemlere (yüksek basınçlı sıcak homojenizasyon gibi) gerek kalmamıştır. Formülasyonlar daha sonra 1 mL'lik renkli steril ampullere doldurularak, ampuller sterilizasyon için kapatılmıştır.

SLN sistemleri temel olarak, sıcak homojenizasyon yöntemine göre hazırlanmıştır (Müller ve Böhm, 1998;). Lipit, erime derecesinin yaklaşık 10°C üzerine ısıtılmış, EM ve katyonik madde lipitte çözündürülerek, BK lipit çözeltisi ile aynı sıcaklıktaki YEM çözeltisine eklenerek yüksek devirde yine aynı sıcaklıkta 5 dakika karıştırılmıştır. Sistem kendi haline bırakılarak oda sıcaklığına yavaş yavaş soğutulmuştur. Laboratuvarımızda bulunan APV-2000 model yüksek basınçlı homojenizatörün istenilen sıcaklıkta (lipitlerin erime derecelerinden 5°C-10°C yüksek sıcaklık) çalışmaya imkan vermemesi nedeniyle formülasyonlar oda sıcaklığına soğuduktan sonra homojenize edilmiştir. Yapılan parçacık büyüklük analizlerinde, yüksek basınçlı homojenizatör ile homojenize edilen sistemler ile homojenize edilmeyen sistemlerin parçacık büyüklükleri arasında kayda değer bir fark gözlenmemiştir. Katyonik lipitin oluşturduğu yüksek zeta potansiyel değerleri yardımıyla ufak parçacıklar ve düşük polidisperslik indisi PI oluşturulabilmiştir.

Yüksek basınçlı homojenizatör ile yapılan homojenizasyon işlemi sırasında akışın devamlılığının sağlanması amacıyla, sistem su ile çalıştırılırken formülasyon suya eklenmektedir. Formülasyonların su ile seyrelmesine yol açan bu şartlarda EM kaybının önlenmesi amacıyla ve parçacık büyüklüğündeki düşük fark göz önünde

tutularak, yüksek basınçlı homojenizasyon basamağı ortadan kaldırılmış ve sistemler yüksek devirli homojenizasyon tekniği ile hazırlanmıştır.

Formülasyonların Sterilizasyonu

Oküler amaçla hazırlanmış formülasyonların steril olması gerekliliği ile SLN formülasyonları hazırlanmalarını takiben 1 mL'lik steril renkli ampullere doldurulmuş, ampuller kapatılmış ve 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sırasında otoklavın sterilizasyon sıcaklığına ulaşip ulaşmadığı otoklav bantları kullanılarak kontrol edilmiştir.

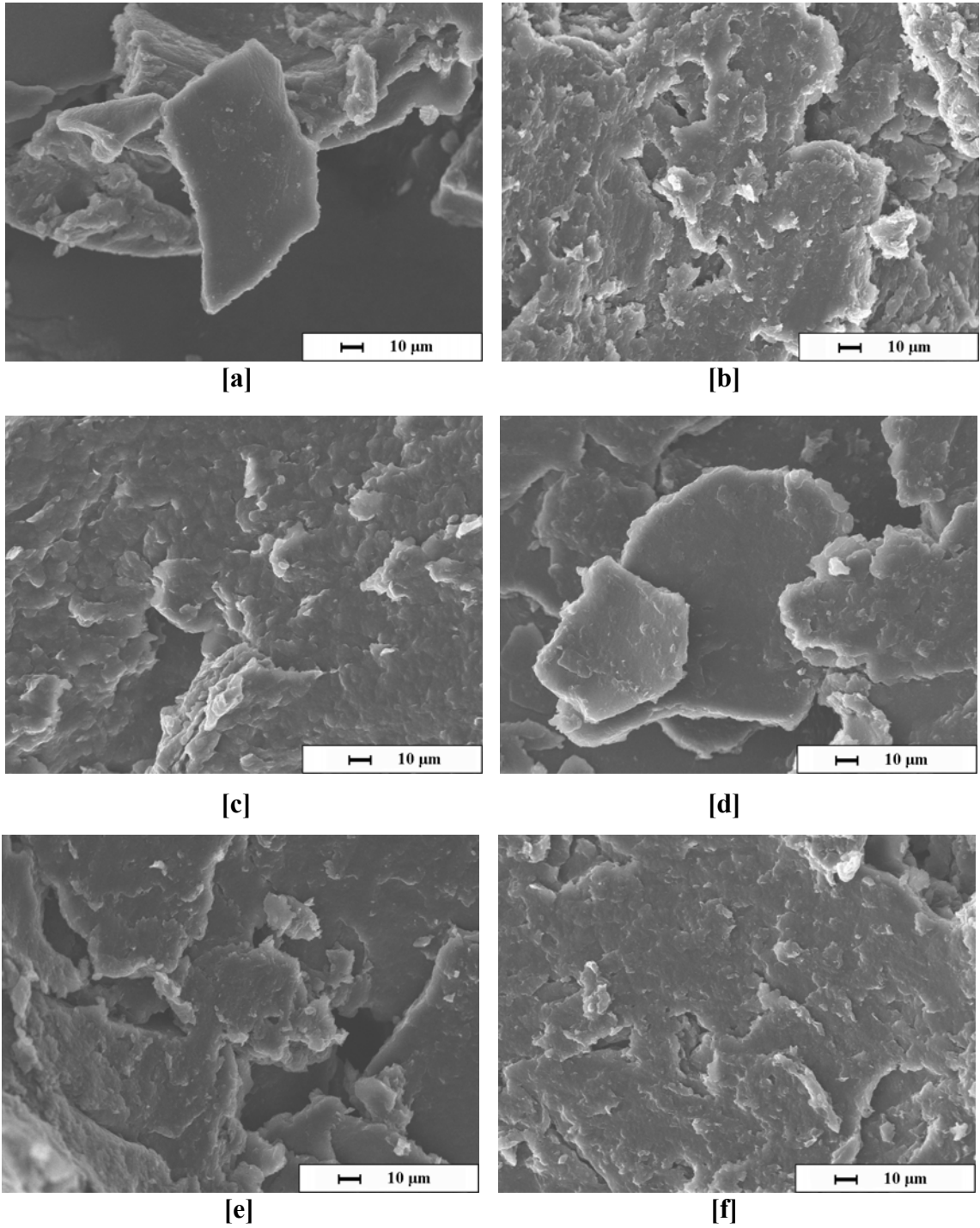
SLN'lerin sterilizasyonunda, otoklav sterilizasyonu başta olmak üzere, süzme, γ -ışınları ile sterilizasyon veya aseptik şartlarda hazırlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (Manjunath ve ark., 2005). Otoklav ile sterilizasyon yönteminin kullanılacağı formülasyonlarda YEM seçimine dikkat edilmelidir. Yapılan çalışmalar, yaş ısı ile sterilizasyon sonrası parçacık büyüklüğünde çok az da olsa bir artış olduğunu göstermiştir (Mehnert ve Mäder, 2001). Poloxamer[®] 188 ile kararlı hale getirilen Compritol[®] 888 ATO ile hazırlanmış SLN'lerin parçacık büyüklüklerinde gözlenen artışa neden olarak, sterilizasyon sıcaklığı ile polimerlerin kritik flokülasyon sıcaklıklarının çok yakın olması gösterilmiştir. Bu nedenle, Poloxamer[®] serilerinin kullanıldığı formülasyonların yaş ısı ile sterilize edilmemeleri veya sterilizasyon sıcaklığının azaltılması (örn. 110°C) ve buna bağlı olarak sterilizasyon süresinin uzatılması gerekmektedir (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001). Ayrıca, yaş ısı ile sterilizasyonda, bu tip YEM'ler etilen glikol bağlarından su kaybına uğramakta ve bunun sonucunda koruyucu tabakanın kalınlığı azalmaktadır (Mehnert ve Mäder, 2001). Ek olarak, erimiş lipitin kristale dönüşmesi sırasında, parçacık yüzeyinde artışa (Heiati ve ark., 1998) ve hapsedilme oranında azalmaya neden olarak, kararlılık problemlerini arttırdığı da belirtilmiştir (Mehnert ve Mäder, 2001). Filtrasyon ile sterilizasyon yöntemi ancak 200 nm'den küçük partiküller içeren sistemler için uygun bir yöntem olmaktadır. Bu çalışmada hazırlanan formülasyonlarda ortalama parçacık büyüklüğünün 200 nm'den büyük olması nedeniyle, sterilizasyon yöntemi olarak filtrasyon tercih edilmemiştir. Işınlar ile sterilizasyon yönteminde ise, daha önceki çalışmalarda, poliester nanopartiküllerinde flokülasyona neden olmasının fiziksel kararlılığı etkileyebileceği endişesini ortaya çıkarmıştır (Schwarz ve ark., 1994).

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar

Parçacık Şekli Analizleri

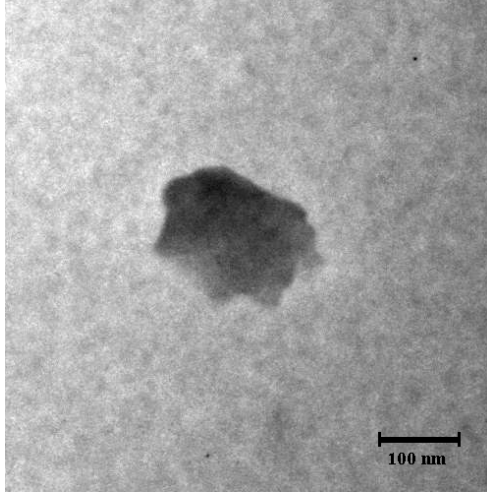
SLN'lerin SEM görüntüleri **Şekil 26**'da, TEM görüntüleri ise **Şekil 27**'de sunulmuştur.

SEM ve TEM analizleri nanopartiküllerin liyofilizasyonunun ardından gerçekleştirilmiştir.

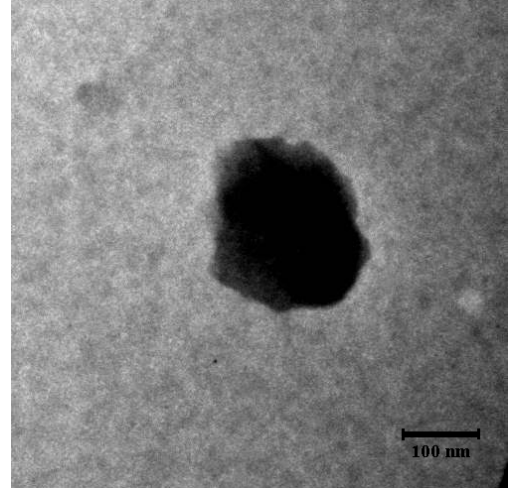


Şekil 26. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (a: FC4-BOŞ; b: FD4-BOŞ, c: FC4, d: FD4, e: FC4-25°C-10. Ay; f: FD4-25°C-10. Ay; x500 Görüntüleri)

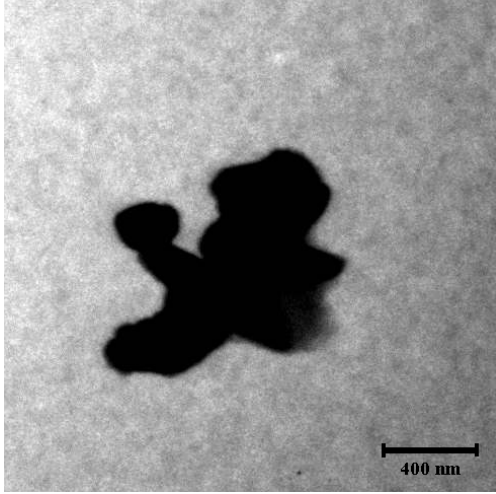
SEM analizleri sonucunda parçacıkların şekilleri ve büyüklükleri hakkında açıklayıcı bilgilere ulaşılamamıştır. Yapıların çok küçük olmasına bağlı olarak, altın ile kaplanmaları ve analiz sırasında artan sıcaklık nedeniyle erimeleri sonucunda, SEM ile elde edilen şekil ve büyüklükteki parçacıklar görülemez.



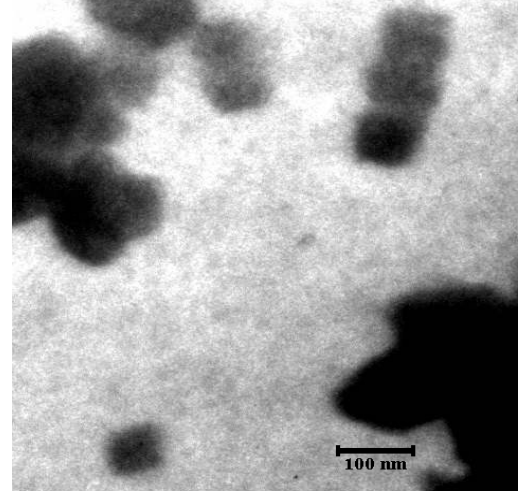
[a]



[b]



[c]



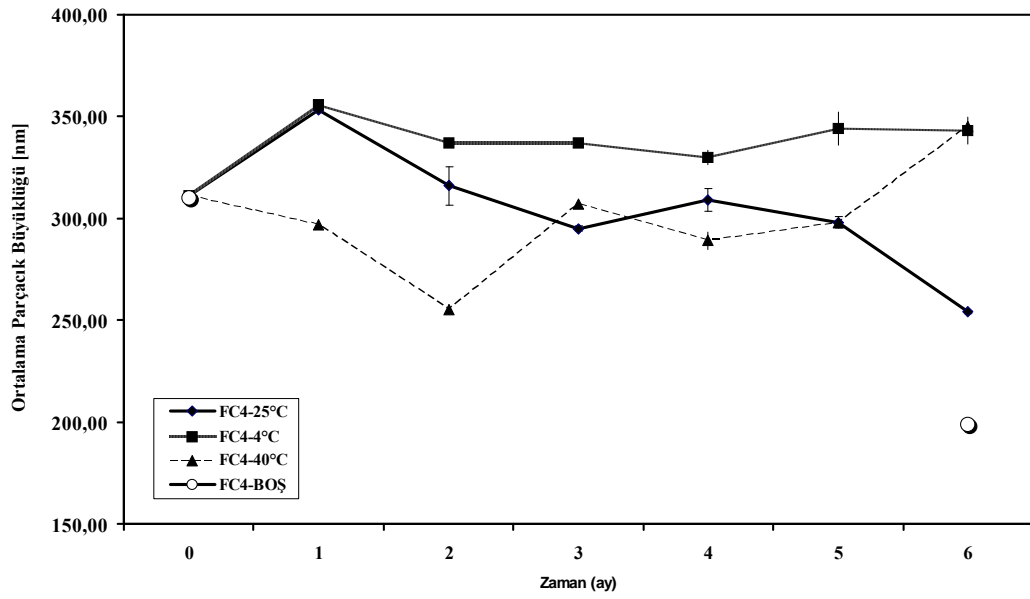
[d]

Şekil 27. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleri [a: FC4 x4200; b: FC4-25°C-10 Ay x4200; c: FD4 x4200; FD4-25°C-10 Ay x16500]

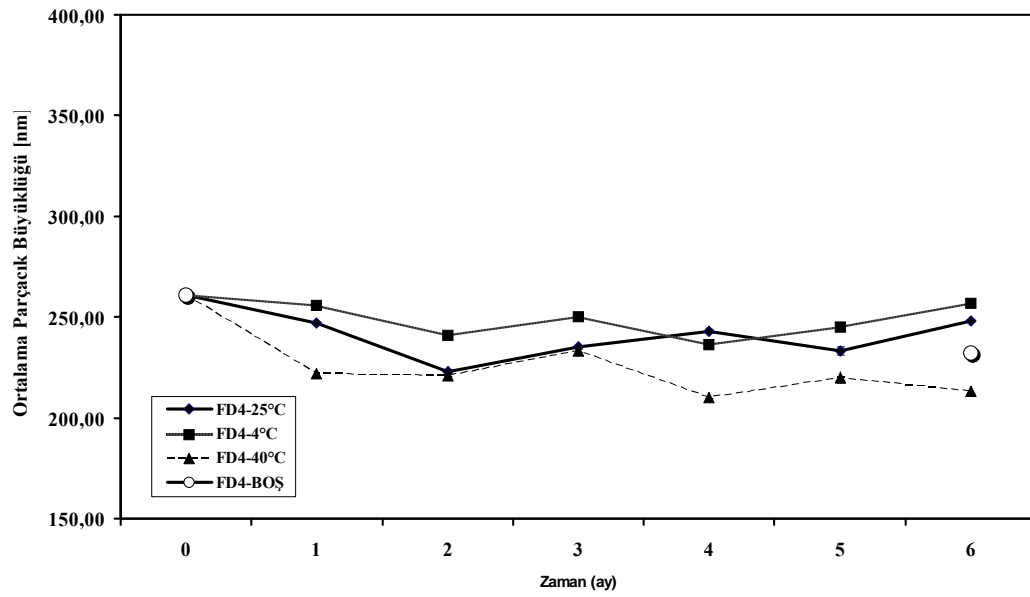
TEM analizinde ise, bazı agregatların olmasına karşın, parçacıkların şekil ve ~250 nm olan büyüklükleri 100-400 nm'lik ölçekler yardımıyla açıkça görülebilmektedir.

Parçacık Büyüklüğü Analizleri

SLN formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklükleri, hem hazırlanmalarını takiben hem de 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla ölçülmüştür. Bu çalışmalara ait bulgular **Şekil 28-29**'da verilmiştir.



Şekil 28. Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Parçacık Büyüklük Bulguları (n=3) [Dikey bar: Standart Hata (SH)]



Şekil 29. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Parçacık Büyüklük Bulguları (n=3) [Dikey bar: SH]

Parçacık büyüklük ve dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemede kullanılan en önemli veri olarak tanımlanmaktadır (Ahlin ve ark., 1998). Noniyonik YEM'ler ile hazırlanan formülasyonların parçacık büyüklükleri, iyonik YEM'ler ile hazırlanan formülasyonlardan daha yüksek değerler almaktadır (Manjunath ve ark., 2005).

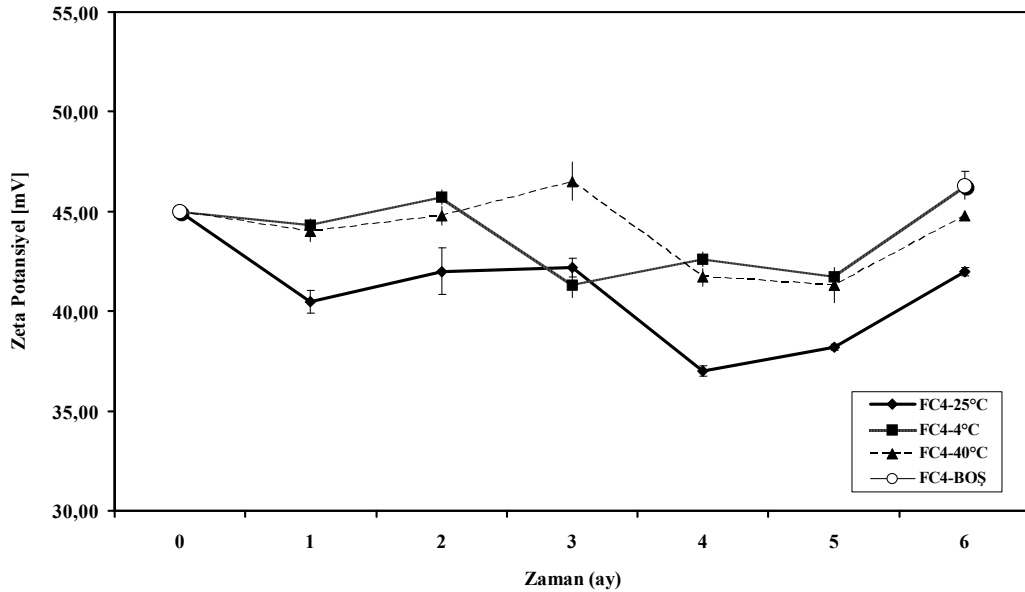
Parçacık büyüklük verileri ile birlikte elde edilen polidisperslik indisi (PI) verileri de, ayrıca, parçacık boyutu dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Parçacık boyutu

dağılımının genişliğini 0-1 arasında değerler olarak gösteren PI tek tip yani homojen bir dağılımda 0-0.5 aralığında değerler almaktadır (Ahlin ve ark., 1998; Dingler ve ark., 1999).

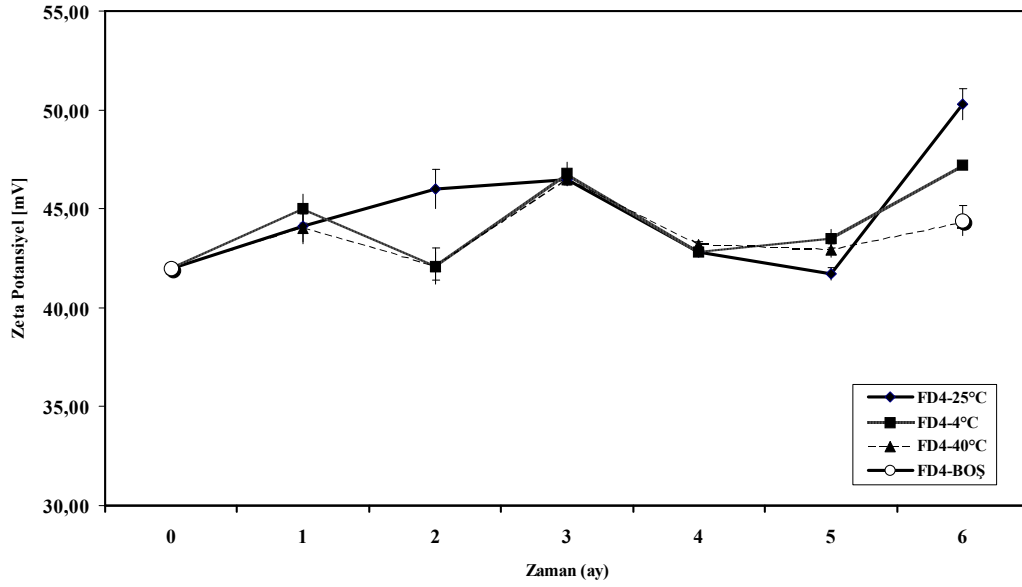
Bu çalışmada $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonların kararlılıkları, parçacık büyüklüklerindeki değişimlere bağlı olarak 6 ay süresince incelenmiştir. Compritol[®] 888 ATO ile hazırlanan FC4 formülasyonları ile Dynasan[®] 116 ile hazırlanan FD4 formülasyonları kararlılıklarını saklama süresince korumuşlardır. FC4 formülasyonunun hazırlanmasını takiben, zeta potansiyel analiz cihazı ile gerçekleştirilen analizinde parçacık büyüklüğü 311 ± 0.76 nm (PI= 0.513 ± 0.006) olarak bulunmuştur. Kararlılık çalışmalarının 6. ayında parçacık büyüklüğü, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonun 254 ± 0.88 nm (PI= 0.467 ± 0.012), $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonun 345 ± 1.45 nm (PI= 0.519 ± 0.004), $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonun ise 343 ± 6.56 nm (PI= 0.495 ± 0.004) olarak belirlenmiştir. FD4 formülasyonunun hazırlanmasını takiben 261 ± 0.58 nm (PI= 0.224 ± 0.013) olarak analiz edilen parçacık büyüklüğü ise 6. ayın sonunda, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 248 ± 0.33 nm (PI= 0.254 ± 0.001), $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 213 ± 0.88 nm (PI= 0.153 ± 0.001), $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 257 ± 0.07 nm (PI= 0.210 ± 0.012) olarak belirlenmiş ve formülasyonların kararlılıklarını 6 aylık saklama süresince korudukları belirlenmiştir.

Zeta Potansiyel Analizleri

SLN formülasyonlarının zeta potansiyelleri, hem hazırlanmalarını takiben hem de 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 30 ve 31).



Şekil 30. Compritol[®] 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları (n=3) [Dikey bar: SH]



Şekil 31. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları (n=3) [Dikey bar: SH]

Çalışmada gerçekleştirilen analizler sonucunda, farklı sıcaklıklarda saklanan formülasyonların kararlılıklarını 6 aylık saklama süresince koruduğu belirlenmiştir. FC4 formülasyonunun hazırlanmasını takiben analiz edilen zeta potansiyel değeri 45,00 mV olarak belirlenmiş, 6. ayın sonunda, 25°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 42,00 ±0,20 mV, 40°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 44,80 ±0,07 mV ve 4°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 46,30 ±0,17 mV bulunmuştur. FD4 formülasyonunun hazırlanmasının ardından analiz edilen elektriksel iletkenliği 42,00 ±0,20 mV olarak bulunmuş ve 6. ayın sonunda, 25°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 50,30 ±0,78 mV, 40°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 44,30 ±0,03 mV ve 4°C ±1°C’de saklanan formülasyonda ise 47,20 ±0,09 mV olarak belirlenmiştir.

SLN formülasyonlarının kararlılığını belirlemede, formülasyonların zeta potansiyellerinde zamana bağlı oluşan değişim kullanılan bir diğer veridir (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001). Süspansiyonlarda parçacıklar arasındaki Van der Waals kuvvetleri, lipofilik parçacıklar arasındaki hidrofobik etkileşimler ve ara yüzeyin azalması nedeniyle agregasyon oluşabilmektedir (Müller ve Heinemann, 1993).

Yapılan birçok çalışma referans alınarak, bu çalışmadaki analizlerde, formülasyonlar NaCl ile iletkenliği 50 µS’e ayarlanmış distile su içerisinde disperse edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir (Schwarz ve ark., 1994; Jennings ve ark., 1998).

pH Analizleri

SLN formülasyonlarının HCl ile 7,2’ye ayarlanan pH değerleri, 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince pH metre ile ölçülmüş ve sonuçlar **Çizelge 8**’de verilmiştir.

Çizelge 8. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları

| Formülasyon Kodu ve Saklama Sıcaklığı | pH ±SH | | | | | |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Zaman (ay) | | | | | |
| | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| FC4-25°C | 7.20 ±0.00 | 4.74 ±0.00 | 4.46 ±0.01 | 4.40 ±0.01 | 4.25 ±0.00 | 4.12 ±0.01 |
| FC4-40°C | 7.20 ±0.00 | 3.81 ±0.01 | 3.61 ±0.01 | 3.49 ±0.02 | 3.32 ±0.01 | 3.27 ±0.02 |
| FC4-4°C | 7.20 ±0.00 | 4.88 ±0.01 | 4.96 ±0.00 | 4.95 ±0.01 | 4.97 ±0.01 | 4.83 ±0.02 |
| FD4-25°C | 7.20 ±0.00 | 4.23 ±0.00 | 4.05 ±0.02 | 3.95 ±0.00 | 3.73 ±0.02 | 3.63 ±0.01 |
| FD4-40°C | 7.20 ±0.00 | 3.42 ±0.02 | 3.24 ±0.01 | 3.14 ±0.01 | 3.03 ±0.01 | 2.95 ±0.02 |
| FD4-4°C | 7.20 ±0.00 | 4.69 ±0.01 | 4.75 ±0.00 | 4.85 ±0.02 | 4.77 ±0.01 | 4.51 ±0.01 |

n=3, SH: Standart hata

Oküler sistemlerde pH değişimlerinin incelendiği bir çalışmada, CsA içeren pozitif yüklü ME'larda formülasyonların başlangıç pH değerleri HCl ile 7'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Tamilvanan ve ark., 2001). Sterilizasyonun ardından pH değerleri azalarak, 3-5 aralığında değerler almıştır. pH'daki düşmenin nedeni, YEM olarak kullanılan Lipoid® E 80'in oksidasyonunun yüksek sıcaklığın etkisi ile artması ve serbest yağ asitlerinin oluşmasına bağlanmıştır. Serbest yağ asitleri, trigliseritlerin mono- ve digliseritlere hidrolizi ile de oluşmaktadır; ancak uzun zincirli trigliseritler düşünüldüğünde, YEM'nin hidrolizi daha hızlı oluşmaktadır. pH'daki düşme, film yapıcı maddelerin iyonizasyon derecelerini etkileyerek zeta potansiyellerinde bir değişikliğe neden olmamıştır (Tamilvanan ve ark., 2001).

Bu çalışmada, pH değerlerindeki düşmeye karşın, zeta potansiyelde ve parçacık büyüklüğünde kayda değer bir değişiklik oluşmadığı göz önünde bulundurularak, ilk olarak pH değişiminin yukarıda belirtildiği şekilde YEM'nin otoklavda maruz kaldığı yüksek sıcaklık nedeniyle maddenin oksidasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Ancak, SLN'lerin otoklav sterilizasyonu yapılmayan örneklerinin pH değerlerinde de büyük düşmeler görülmesi, oksidasyonun nedeninin otoklavda maruz kalınan sıcaklık olarak değerlendirilmesinin hatalı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, otoklav ile sterilize edilen PN süspansiyonlarının pH değerlerine (>5.72) bakıldığında, SLN'lerdeki kadar fazla düşme olmadığı saptanmıştır. Aynı YEM'nin kullanıldığı sistemler arasında görülen bu farklılık, YEM'nin olası oksidasyonuna ek olarak, SLN'lerde kullanılan katı lipitlerin ve/veya katyonik lipitin de oksidasyona uğraması sonucunda pH değerlerinde kısa sürede bu derece büyük düşmenin olabileceği olasılığını düşündürmektedir.

Katı lipitlerin XRD, IR ve NMR ile gerçekleştirilen yapı analizlerinde, saf lipite kıyasla formülasyonlarda herhangi bir değişikliğin olmaması lipitlerin oksidasyonu fikrini ortadan kaldırmaktadır. Hazırlama şekilleri ve kullanılan maddeler açısından iki sistem arasındaki farklar göz önünde bulundurulduğunda, PN süspansiyonlarının pozitif yükleri nedeniyle formülasyonlara eklenmeyen OA'in de okside olabilme olasılığının değerlendirilmesi gerekmektedir.

Ayrıca, PN'lerde, başlangıç pH'larının fizyolojik pH'ya yakın olması nedeniyle herhangi bir ayarlama yapılmamış, dolayısı ile HCl kullanılmamıştır. Bu nedenle, SLN'lerde pH ayarlayıcı madde olarak kullanılan HCl'in etkisiyle, YEM veya diğer maddelerin okside olma olasılığının değerlendirilmesi gerekmektedir.

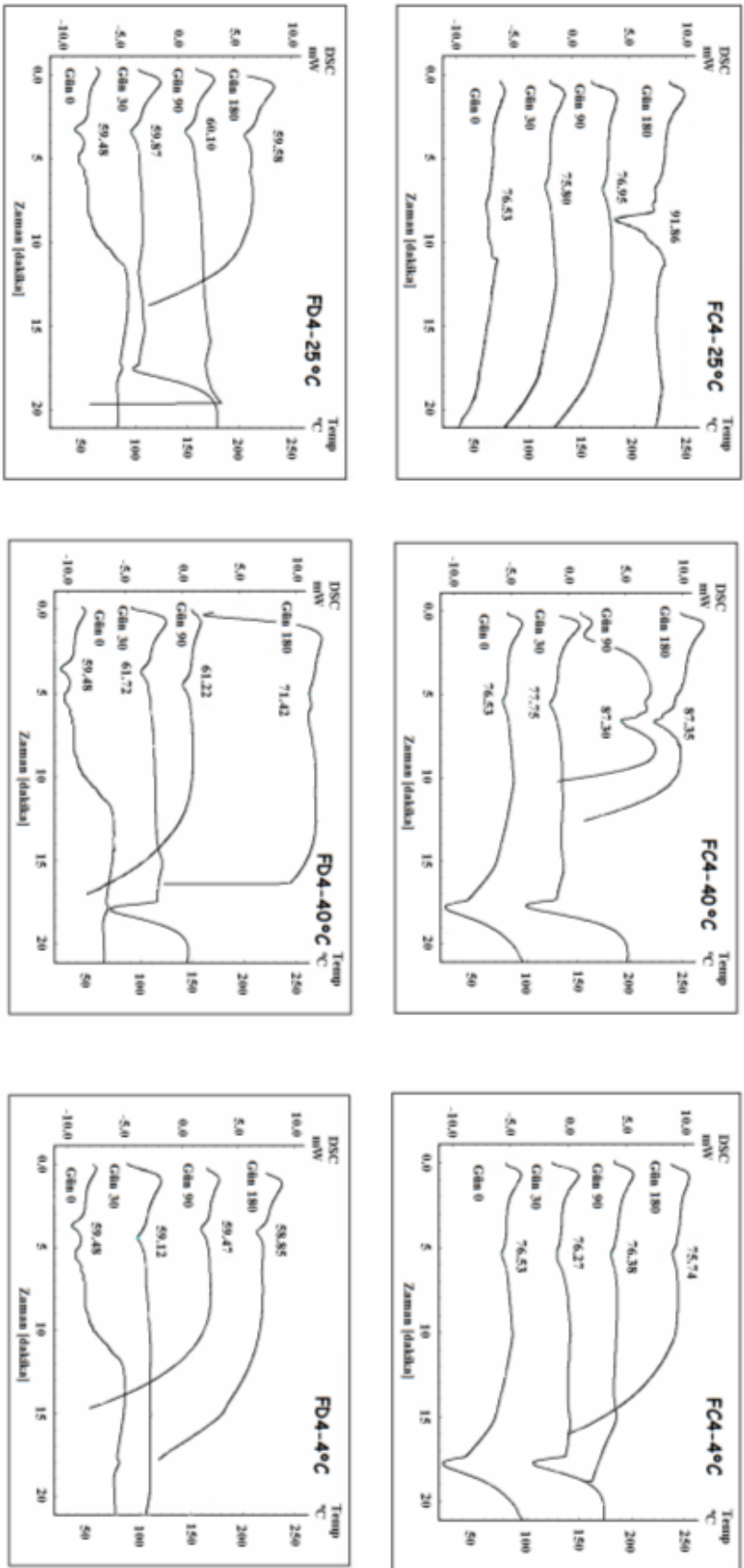
Bazı durumlarda, düşük pH'nın parçacıkların agregasyonu üzerindeki etkisinin elektrolit konsantrasyonunun etkisinden daha fazla olduğu belirtilmiştir (Zimmermann ve Müller, 2001). pH'daki azalma ortamdaki protonların artmasına sebep olmakta ve böylece parçacıkların yüzeyindeki fonksiyonel grupların proton kaybetmelerine engel olmaktadır. Böylece, zeta potansiyel azalmakta ve "sıfır noktası'ndan" sonra artı yöne doğru artmaktadır. pH'daki azalma elektrolit konsantrasyonunun artmasına neden olmakta ve difüzyon tabakasının azalarak parçacıkların elektrostatik itmelerinin azalması sonucunda nanodispersiyonlarda kararsızlığa neden olmaktadır (Zimmermann ve Müller, 2001).

Sonuç olarak, pH'daki azalmanın nedeninin tam olarak anlaşılabilmesi için YEM'ye ve katyonik lipite yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada hazırlanan sistemlerde pH değerlerindeki düşmeye rağmen, agregasyon, jelleşme veya koalesans gibi fiziksel kararsızlıklar oluşmamıştır. Göze uygulanan formülasyonların pH değerleri ≤ 2 ve ≥ 11.5 ise yakıcı ve aşındırıcı, ≤ 4.3 ve ≥ 8.4 ise iritasyon etki göstermektedir (Worth ve Cronin, 2001). 6 ay kararlılık çalışmaları sonunda, formülasyonların pH değerlerindeki azalmaya bağlı olarak karakteristik özelliklerinde herhangi bir değişikliğin meydana gelmemesi ve *in vivo* çalışmalarda taze hazırlanacak formülasyonların kullanılacağı düşünülerek bu problemin çözümüne gidilmemiştir.

Termal Analizleri

SLN formülasyonlarının, hazırlanmalarını takiben ve kararlılık çalışmaları süresince yapılan DSC analizlerine ait termogramlar **Şekil 32**'de sunulmuştur.

DSC, farklı lipit modifikasyonlarının farklı erime noktası ve erime entalpi değerleri oluşturması esasına dayanılarak kullanılan bir yöntemdir (Mehnert ve Mäder, 2001). Lipitin kristal yapısı ve oluşabilecek olası polimorfizm DSC ile saptanabilir (Almeida ve ark., 1997). Bu nedenle, SLN'lerin yapı analizlerinde sıkça tercih edilmektedir. Tekrar kristallenmenin belirlenmesi ile, hapsedilen EM'nin salım profili ve yerleşimi hakkındaki bilgileri öngörmek mümkün olabilmektedir (Dingler ve ark., 1997). Hazırlanan SLN'lerin erime derecelerinin, kullanılan saf lipitin erime derecesinden düşük olabileceği, analizler değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır (Venkateswarlu ve Manjunath, 2004).



Şekil 32. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmalarını ve Kararlılık Çalışmalarını Takiben Elde Edilen Termal Analizlerine ait Termogramlar

SLN'leri oluşturan çeper yapının kararlılık çalışmaları süresince yapısını koruyup koruyamayacağı, lipit yapının erime ve tekrar kristallenme davranışlarının belirlenmesinde kullanılan DSC yöntemiyle analiz edilmiştir. Lipit yapının sıcaklık ile yıkımının ardından, polimorfizm, kristal düzen, ötektik karışımlar, camsı geçiş sıcaklıkları ve katı lipitlerdeki gibi EM ile lipit arasındaki etkileşimleri hakkında bilgiler elde edilebilmektedir. Polimorfizm genellikle çok ufak parçacık boyutuna bağlı olarak gerçekleşmektedir (Jenning ve ark., 2000a). Supozituarlardan da bilindiği gibi, sıvı lipitlerin varlığı kararlı formun oluşacağı tekrar kristallenmeyi arttırmaktadır (Mühlen ve ark., 1998). Tripalmitin gibi trigliseritlerde EM yükleme kapasitesi ve salımı, lipitin yüksek kristallenme özelliği nedeniyle yüksek olmamaktadır (Manjunath ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda, yağ asitleri kullanarak yağların polimorfik geçişlerinin ve kristalizasyonun engellenmesinde, YEM'lerin ve saklama süresinin etkili olduğu bildirilmiştir (Wissing ve ark., 2001b; Heurtault ve ark. 2003). Jelleşme eğilimli SLN'lerde lipit değişimlerini engellemek için YEM'ler (örn. Poloxamer®'ler) kullanılmıştır (Venkateswarlu ve Manjunath, 2004). Yapılan bir başka çalışmada, Poloxamer® ile kararlı hale getirilen katı lipitler daha yayvan ve daha düşük sıcaklıkta erimeyi gösteren pikler oluşturmuştur. EM olarak prednisolon'un kullanıldığı çalışmada, EM'nin varlığı ile daha kararlı yapı olan polimorfun oluştuğu, diğer kararsız polimorflara ait piklerin ortadan kaybolması ile belirlenmiştir (Mühlen ve ark., 1998).

Trigliseritler, α , β' ve β olmak üzere üç farklı polimorfik formda kristallenmektedir. Polimorfik geçiş sırasıyla α , β' ve en kararlı yapı olan β şeklinde oluşmaktadır. Katı supozituar sıvağlarındaki gibi karmaşık gliserit yapılarında, β' ve β formları arasında ara form olan β_i formu da görülebilmektedir. Gliserit yapılı taşıyıcıların tekrar kristallenmelerinde ana maddeye kıyasla farklılık görülebilmektedir. Saf tripalmitinin (>%99) 67°C'de eridiği ve 37°C'de ise kristallenme piki oluşturduğu belirtilmiştir (Siekmann ve Westesen, 1994). Lipitin tekrar ısıtılması 44°C'de eriyen α -formunu oluşturmuştur (Siekmann ve Westesen, 1994). Kristal formlar arasındaki geçiş sıcaklıkları, 10 K.dk⁻¹ oranında gerçekleştirilen analizlerde belirlenemeyecek kadar küçük değişikliklerdir (Siekmann ve Westesen, 1994; Olbrich ve ark., 2002). Eritilmiş ve tekrar kristallenmiş lipitin erime derecesindeki düşme, tekrar ısıtma sırasında oluşan polimorfik geçişlerin kantitatif değerler olmadığı, sadece kristallik derecesinin azaldığı sonucunu ortaya koymaktadır. Çalışmalarda çoğunlukla daha az saflık derecesine sahip gliseritler kullanılmaktadır. Alınan enerji ve geçiş sıcaklıkları karşılaştırıldığında, yüksek saflıktaki maddeler ile arasında farklar ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni, safsızlığa neden olan çok az miktardaki monogliseritlerin veya digliseritlerin varlığı gösterilmektedir. Safsızlığa neden olan bu maddelerin % 1'lik konsantrasyonları dahi, α , β' formlarının oluşmasını sağlayarak β formun oluşmasını geciktirebilmektedir. β formun oluşmasını arttıran fosfolipitlerin varlığında da 3. ayın sonunda α -form analiz edilebilmiş, 5. ayın sonunda polimorf olarak yalnızca β' -form görülmüş, α -forma ise rastlanmamıştır (Siekmann ve Westesen, 1994).

Yapılan bir çalışmada, Dynasan® 116'nın tekrar kristallenme özelliği DSC yardımıyla analiz edilmiştir (Siekmann ve Westesen, 1996). Çözücü uçurulması yöntemi ile hazırlanan ve % 1.5 Dynasan® 116 içeren formülasyonda tekrar

kristallenme özelliği, formülasyonun hazırlanmasından 2 saat sonra saptanabilmiştir. Ancak, çözücünün uçması nedeniyle kesin bir konsantrasyon verilememiştir (Siekmann ve Westesen, 1996).

Bir başka çalışmada ise SLN yapılarındaki polimorfik geçişlerin belirlenmesi amacıyla, Dynasan® 114 ve Dynasan® 116 ile formülasyonlar hazırlanmış ve katı lipid çeperlerin yapıları ve tekrar kristallenme özellikleri DSC analizleri ile araştırılmıştır (Olbrich ve ark., 2002). Dynasan® 114 ile hazırlanan formülasyonlar ancak oda sıcaklığının altına düşürüldüklerinde SLN'ler oluşmuştur. Dynasan® 116 gibi uzun zincirli trigliseritler ile hazırlanan formülasyonlarda kristalizasyon sonrası polimorfik geçişin kısa zincirli olanlara göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir (Olbrich ve ark., 2002).

Bu çalışmada, Compritol® 888 ATO ile hazırlanan (FC4) formülasyonlarda erime derecelerinde artış olmuştur. Compritol®, ~71.10°C'de eriyen ve tekrar kristallenme problemi olmayan bir madde olarak tanımlanmaktadır. Compritol® ile yapılan bir çalışmada, katı lipidlerin hazırlandığı homojenizasyon işleminden sonra 71.10°C olan erime derecesinin 69.90°C'ye düştüğü ve bunun nedeninin de lipidlerin β' veya β_i formda olma olasılığı gösterilmiştir (Mühlen ve ark., 1998). Sistemlerin erime dereceleri 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince araştırılmış ve ilk gün elde edilen erime derecesi değerinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. 40°C \pm 1°C'de saklanan formülasyonda 6. ayda erime derecesindeki artış yaklaşık 11°C'ye ulaşmıştır (87.35°C). 25°C \pm 1°C'deki formülasyonda en büyük değişiklik 6. ayda meydana gelmiş (91.86°C), 4°C \pm 1°C'deki formülasyon ise çok fazla bir değişiklik göstermemiştir (75.74°C). Saklama sıcaklığına bağlı olarak erime derecesinde farklı oranlarda değişiklikler meydana gelmiş, bu artışların nedeni olarak, lipidin kristal yapısının dayanıklılığının kullanılan yardımcı maddelerin etkisiyle artarak, kararlılık çalışmaları süresince daha kararlı lipid kafesinin oluştuğu düşünülmektedir.

Dynasan® 116 ile hazırlanan (FD4) formülasyonların ilk gün yapılan erime derecesi analizlerinde ise, lipidin 59.48°C'de eridiği ve yayvan iki pikin var olduğu görülmüştür. Tek bir pikin oluşmaması, kararlı β polimorfik yapının ilk gün tam olarak oluşmadığını göstermiştir. Sonraki ölçümlerde, yayvan ancak tek pik elde edilmiş ve lipidin kararlı β kristal forma dönüştüğü görülmüştür. Yukarıda da anlatıldığı şekilde, karışım halindeki maddelerin erime dereceleri saf maddelerinkinden farklılık göstermektedir. 6 ay sonunda 25°C \pm 1°C'deki formülasyonun erime derecesi 59.58°C, 40°C \pm 1°C'de saklanan formülasyonun 71.42°C ve 4°C \pm 1°C'deki formülasyonun erime derecesi 58.85°C olarak bulunmuştur. Erime dereceleri ile saf lipidin erime derecesi (63.61°C) arasındaki fark, karışım halde bulunmaları ve YEM'lerin varlığının erime derecesinde düşüşe neden olmasından kaynaklanmaktadır denilebilir. 6 ay süresince gerçekleştirilen kararlılık çalışmaları sonucunda, formülasyonların erime derecelerinde ilk güne kıyasla 25°C \pm 1°C'deki ve 4°C \pm 1°C'deki formülasyonlarda çok büyük farklar ortaya çıkmamış ve lipid yapısını kararlılık çalışmaları süresince korumuştur. Formülasyonun erime derecesinde oluşan en büyük fark 40°C \pm 1°C'de saklanan formülasyonda görülmüştür.

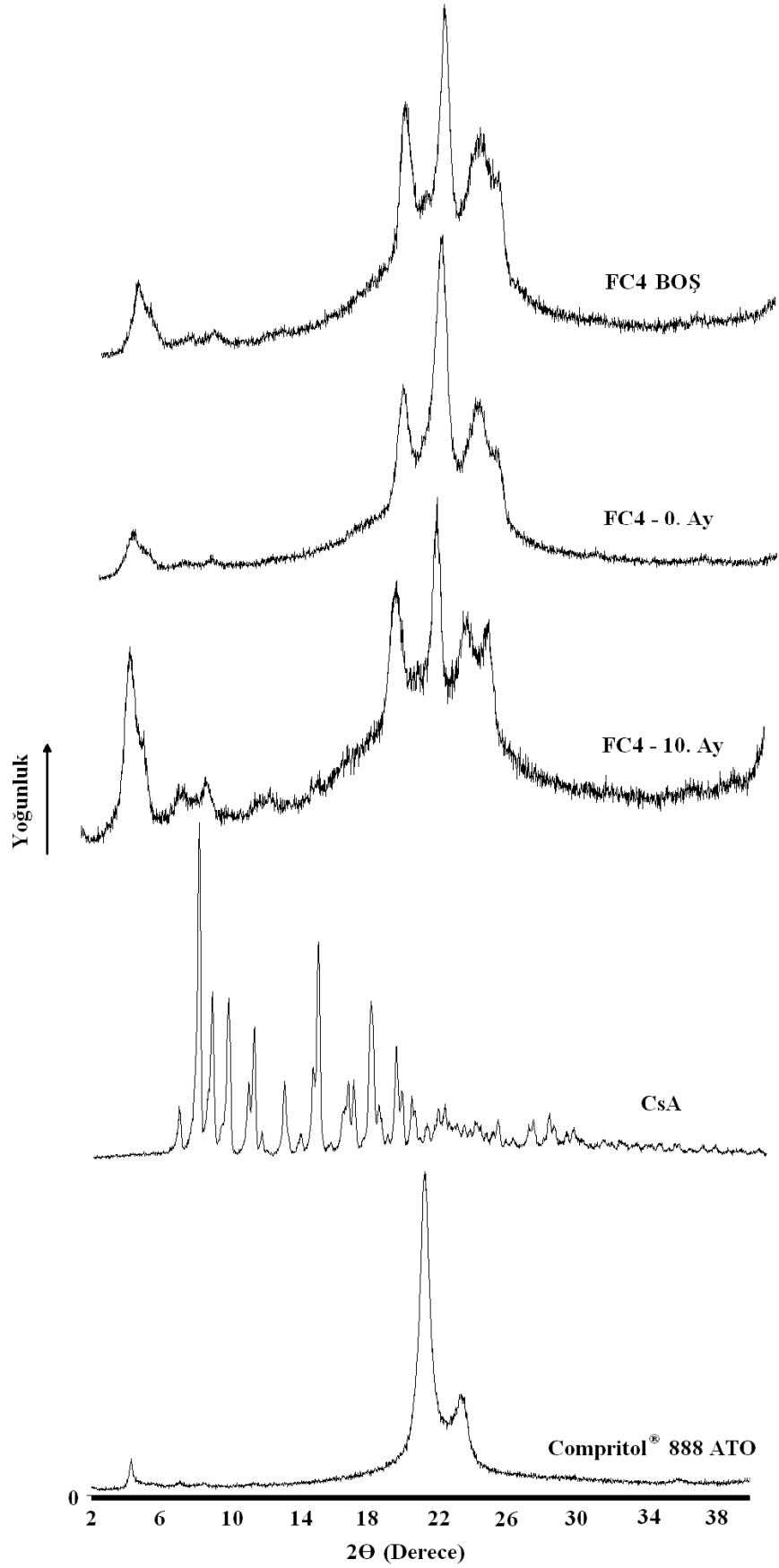
X-Işını Kırınım Analizleri

SLN formülasyonlarının, hazırlanmalarını takiben ve kararlılık çalışmaları sonunda yapılan XRD analizlerine ait sonuçlar **Şekil 33** ve **34**'de sunulmuştur.

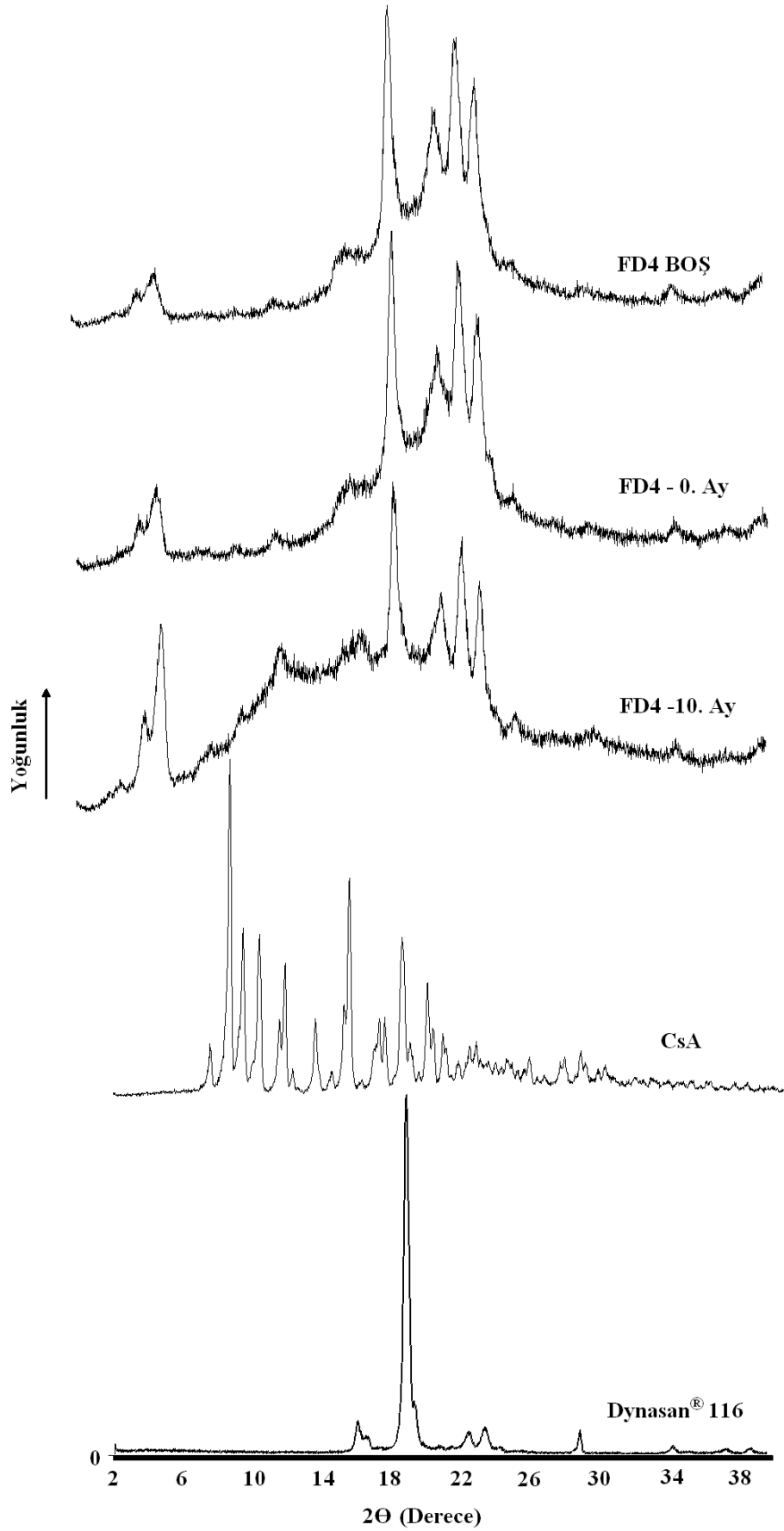
Bu çalışmada, lipit yapının özellikleri, ayrıca, XRD analizleri ile de kontrol edilmiştir. XRD ile SLN'lerde oluşacak lipit kafesin kısa ve uzun boşluklarının uzunlukları hesaplanabilmektedir (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001). Larsson'un ufak boşluklu trigliseritleri, hegzagonal yapıdaki 0.42 nm boşluklu kafes oluşturabilen trigliseritler α , 0.42-0.43 ve 0.37-0.40 nm boşluklu dayanıklı kafes oluşturabilen ortorombik dikey yapıdaki β' ve 0.46 nm boşluklu dayanıklı kafes oluşturabilen triklinik paralel yapıdaki β formu olmak üzere üç şekilde tanımlamıştır (Jenning ve ark., 2000a).

XRD analizlerinde, olası çözücü artığının farklılıklara neden olmaması için SLN dispersiyonlarının kendi başlarına analiz edilmeleri tavsiye edilmektedir (Müller ve ark., 2000b; Mehnert ve Mäder, 2001). Ayrıca, bu yöntemde, *synchrotron* ışınması ile kolloidal sistemlerin ara durumlarının belirlenmesi ve duyarlılık problemleri ile uzun ölçüm süresi gibi sakıncaların üstesinden gelmek mümkün olmaktadır (Mehnert ve Mäder, 2001).

FC4 ve FD4 formülasyonlarının XRD analiz spektrumlarında, lipitlerin karakteristik piklerinin özelliklerini kararlılık çalışmaları süresince koruduğu ve saklama şartları, hazırlama koşulları veya sterilizasyon işleminin lipit yapıda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmektedir. **Şekil 33** ve **34** incelendiğinde, yan zincir kristalinitesinde artış olduğu, bunun yanısıra 10. ay ölçümleri ile de kristalinitenin arttığı görülmektedir.



Şekil 33. Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen X-Işını Kırınım Profilleri ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de Saklanan Formülasyon)



Şekil 34. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen X-Işını Kırınım Profilleri (25°C ±1°C'de Saklanan Formülasyon)

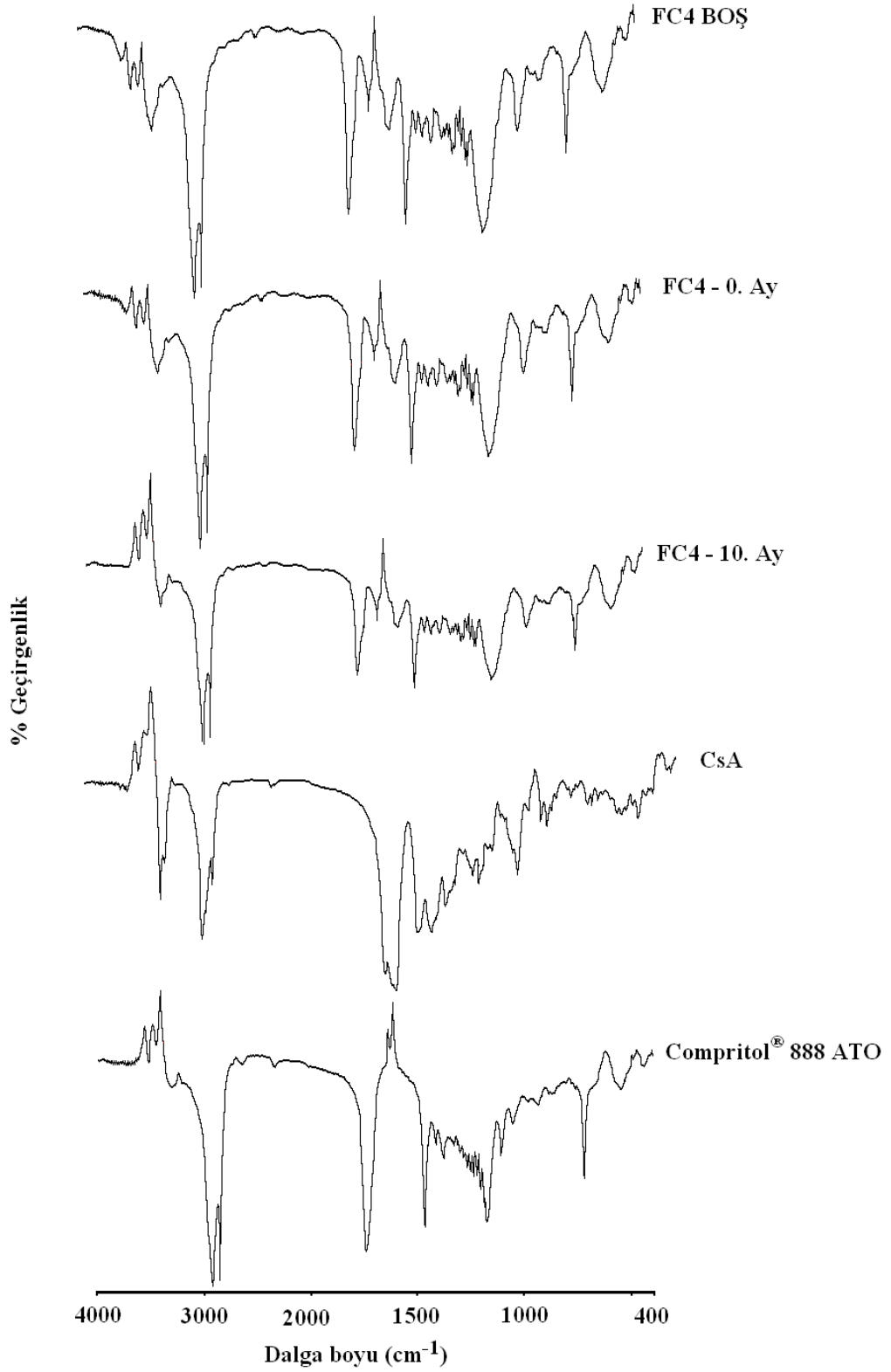
İnfrared Analizleri

SLN formülasyonlarının, hazırlanmalarını takiben ve kararlılık çalışmaları sonunda yapılan IR analizlerine ait sonuçlar **Şekil 35** ve **36**'da sunulmuştur.

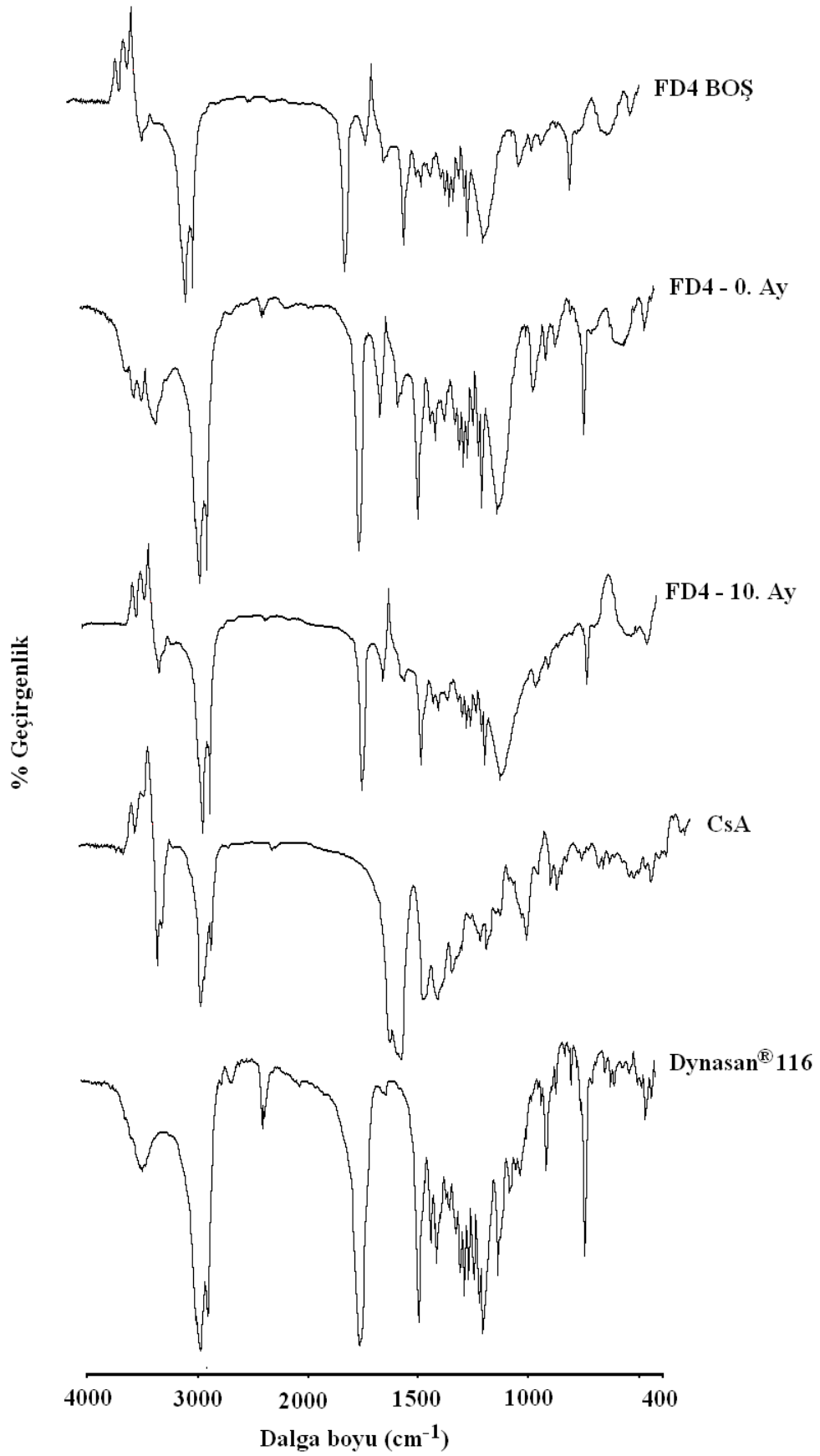
Bu çalışmada, SLN formülasyonlarından elde edilen IR analizlerinde, karbonil grupları ($\sim 1736.56 \text{ cm}^{-1}$), amin grupları ($\sim 2916.62 \text{ cm}^{-1}$), ve hidroksil grupları ($\sim 3333.34 \text{ cm}^{-1}$) gibi karakteristik pikler kararlılık çalışmaları süresince değişikliğe uğramamıştır.

IR bölgesinin 4000 cm^{-1} ile 1300 cm^{-1} arasında kalan kısmında karşılaşılan bantlar, moleküllerde bulunan çeşitli fonksiyonel gruplara ait belirgin bantlardır. Bantlar molekülün yapısında sadece o grubun varlığı ile ortaya çıkmakta ve molekülün diğer kısmından çok az etkilenmektedir. Bu nedenle, bantların geldiği bölgeye “belirgin fonksiyonel grup bölgesi” denmektedir. 3300 cm^{-1} civarında C-H, O-H ve N-H gerilme titreşimleri gözlenmektedir. 2500 cm^{-1} ile 2000 cm^{-1} arasında kalan bölgede $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$ ve $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimleri, 1650 cm^{-1} - 1450 cm^{-1} arasında benzen türü aromatik halkalardaki C-C gerilme titreşimleri, 1600 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} arasında C-H, N-H ve O-H eğilme titreşimleri, 1300 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} arasındaki bölgede ise C-O gerilme titreşimleri gözlenmektedir (İnfrared spektroskopisi, 1997).

CsA içeren stearik asit SLN'lerinin IR analizleri, dondurularak kurutulmalarının ardından gerçekleştirilmiş ve CsA ile stearik asit arasında kimyasal reaksiyon oluşmadığı, CsA'nın karakteristik pikleri ile stearik asit piklerinde kayma olmaması üzerine belirlenmiştir (Zhang Q. ve ark., 2000).



Şekil 35. Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen İnfrared Analiz Spektrumları (25°C ±1°C'de Saklanan Formülasyon)



Şekil 36. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlama ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen İnfrared Analiz Spektrumları (25°C ±1°C'de Saklanan Formülasyon)

Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri

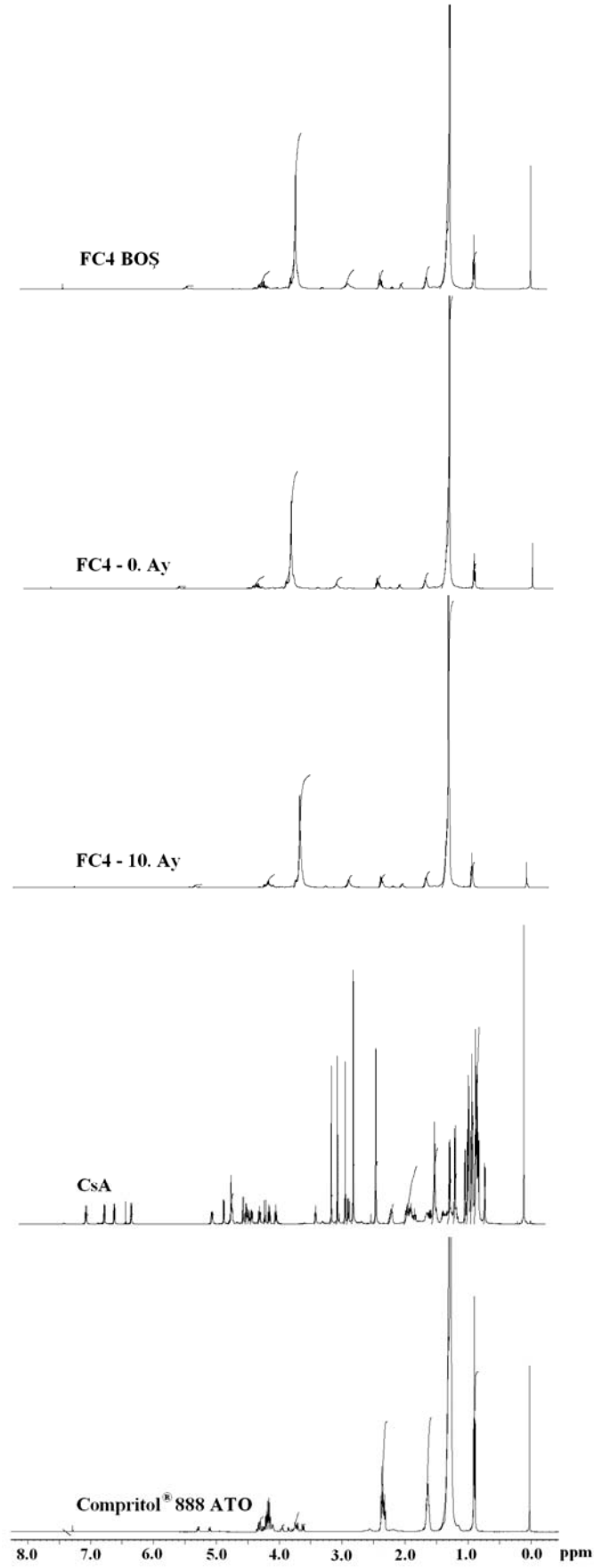
SLN formülasyonlarının, hazırlanmalarını takiben ve kararlılık çalışmaları sonunda yapılan NMR analizlerine ait spektrumlar **Şekil 37** ve **38**'de sunulmuştur.

Bu çalışmada, sinyallerin engellenmemesi amacıyla, SLN'ler liyofilize edilip formülasyonlardaki suyun ortamdan uzaklaştırılmasının ardından analiz edilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SLN'ler ile saf lipidlerin spektrumları arasında kayda değer farklılıklar oluşmamıştır. Spektrumlar diğer maddelerin veya hazırlama ve sterilizasyon şartlarının etkisi ile yapısal herhangi bir değişikliğin olmadığını açıkça göstermiştir.

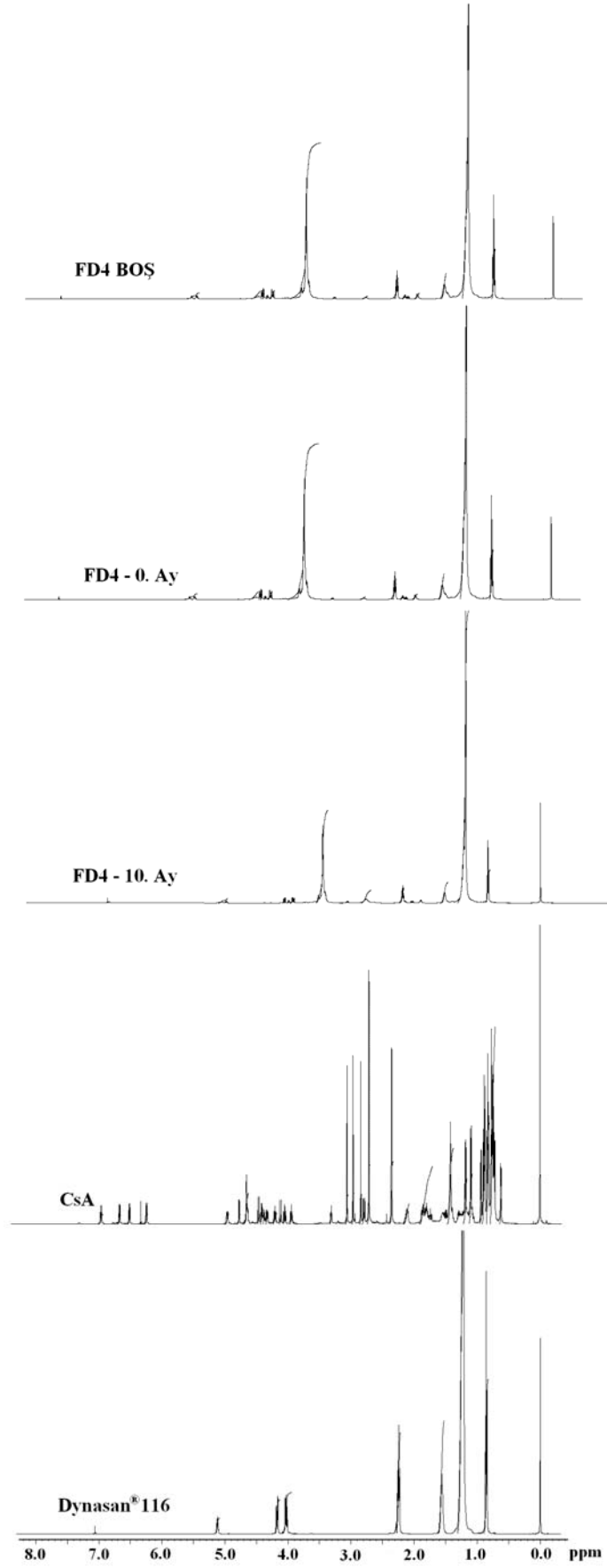
NMR spektroskopisi, YEM'lerin ve çözeltilerdeki maddelerin moleküler dönüşlerini, bu yapıların fiziksel özelliklerini belirlemede kullanan çok güçlü bir yöntemdir. Yöntem, kritik misel konsantrasyonu, agregasyon sayısı, *counter* iyon bağlanması, agregat oluşumu, şekil ve büyüklüğü, hidrasyonu, çözelti özelliği gibi misel yapıların karakterizasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Moulik ve Paul, 1998). Dynasan[®] 114 ile yapılan bir çalışmada, hazırlandıktan sonra düşük sıcaklıklarda bekletilen formülasyonlarda NMR analizleri gerçekleştirilmiş, oda sıcaklığında bekletilen formülasyonların süper soğutulmuş eriyikler olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (Westesen ve ark., 1997). NMR yönteminin üstünlüğü, iki veya üç faz karakteristikleri, mikrometre ölçeğinde tek bir faz alanında belirlenebilmektedir. Yöntem, ayrıca, anizotropi derecesini ve uzun aralıklı devamsızlıkların veya devamlılıkların analizine imkan tanımaktadır (Moulik ve Paul, 1998). Compritol[®] ile hazırlanan SLN formülasyonlarında yapılan bir çalışmada, katı lipidler ile sıvı lipidler karıştırılmış ve karışımın karakteristik yapısı ¹H-NMR analizi ile belirlenmiştir (Jenning ve ark., 2000b). Yağ moleküllerinin hareketliliği, alınan sinyallerin genişliğine bağlı olarak değerlendirilmektedir. Geniş ve zayıf sinyaller hareketliliği az olan yapıların karakteristik özellikleri olarak belirtilmiştir. Hareketliliğin azalması, moleküllerin protonlarının relaksasyon zamanlarında azalma ve sinyallerde genişlemeye neden olmaktadır (Jenning ve ark., 2000b).

Katı sistemlerde sinyallerdeki genişleme, sinyallerin giderek kaybolmasına neden olabilmektedir. Keskin sinyaller, hareketliliği yüksek yapılardan kaynaklanmaktadır. 0.9 ppm'de CH₃ protonları gelirken, 1.25 ppm CH₂ gruplarının varlığını göstermektedir (Jenning ve ark., 2000b).

NMR analizlerinden elde edilen spektrumlarda, kararlılık çalışmaları süresince formülasyonlardan alınan sinyallerin saf lipidin NMR sinyallerinden çok farklı olmaması, CsA'ya (% 0.1) ve diğer yardımcı maddelere ait sinyallerin, maddelerin karışımdaki çok düşük konsantrasyonları nedeniyle alınmadığını göstermektedir. Jennings ve arkadaşları (Jenning ve ark., 2000b) yaptıkları çalışmada, formülasyonlarda % 0.5 oranında kullandıkları retinol'ün NMR sinyallerini elde edememişlerdir. Bunun nedenini maddenin konsantrasyonunun çok düşük olmasına ve retinol'ün 4 ppm'den sonra gelen sinyallerinin suyun 4.7 ppm'deki yüksek sinyalleri nedeniyle gizlenmesi olarak belirtmişlerdir (Jenning ve ark., 2000b).



Şekil 37. Compritol® 888 ATO ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanma ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumları (25°C ±1°C'de Saklanan Formülasyon)



Şekil 38. Dynasan 116® ile Hazırlanan Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanma ve Kararlılık Çalışması Sonrasında Elde Edilen Nükleer Manyetik Rezonans Analiz Spektrumları (25°C ±1°C'de Saklanan Formülasyon)

Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini

SLN formülasyonlarında, EM Miktar Tayini bölümünde (**Sayfa 43**) açıklanan şekilde, HPLC yöntemi ile yapılan tayinlerden elde edilen sonuçlara göre, FC4 % 0.140 ± 0.000 (SH) ve FD4 % 0.143 ± 0.002 (SH) oranında EM taşımaktadır (n=3). 8. ayın sonunda gerçekleştirilen analizlerde ise, FC4'ün % 0.184 ± 0.002 (SH) ve FD4'ün % 0.173 ± 0.005 (SH) oranında ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonlar) EM taşıdığı belirlenmiştir.

CsA miktar tayininde araştırmacılar tarafından en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmesi ve yüksek seçiciliğe sahip olması nedeniyle, SLN formülasyonlarındaki EM miktarının belirlenmesinde HPLC kullanılmıştır.

SLN'lerin hazırlanmalarının ardından HPLC ile yapılan EM miktar tayini analizlerinde, başlangıçta sisteme % 0.1 konsantrasyonda olacak şekilde eklenen EM miktarı, FC4 formülasyonunda % 0.140 ± 0.000 (SH), FD4 formülasyonunda ise % 0.143 ± 0.002 (SH) olarak belirlenmiştir. Bu farkın nedeninin, SLN'lerin yüksek sıcaklıkta (80°C) hazırlanmaları ve hazırlama sırasında kütleli kaybın olması ile başlangıç şartlarının değişmiş olmasına bağlanmıştır.

Lipitin kimyasal yapısı EM SLN'lerde yükleme kapasitesini etkileyen çok önemli bir etken olarak tanımlanmıştır. Yüksek kristal yapıli partikülleri oluşturan lipitler mükemmel bir kafes oluşturarak EM'nin partikül içine alınmasını engelleyebilmektedir. Bazı durumlarda ise, saklama süresince, lipit daha mükemmel olan ve EM için daha az boşluk içeren β -modifikasyonuna geçerek EM'nin sızmasına neden olabilmektedir (Müller ve ark., 2002).

Kararlılık çalışmalarındaki DSC analizleri incelendiğinde, formülasyonların erime derecelerinde saf lipitin erime derecesine kıyasla zamana bağlı olarak artışın meydana geldiği görülmüştür. Meydana gelen artışın nedeni olarak lipitin zamanla daha kararlı olan β -modifikasyonuna geçtiği düşünülmektedir. Yapılan XRD analiz sonuçları değerlendirildiğinde de lipitin kristallinitesinin zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiş ve bu sonuç da DSC analiz sonuçlarını desteklemiştir.

Kumar ve ark. (2001) CsA'nın bozunması sonucunda oluşan dihidrosiklosporin A ve izosiklosporin A maddelerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada, USP'de belirtilen HPLC yöntemi ile izosiklosporin A belirlenememiştir. Dihidrosiklosporin A da CsA'nın oluşturduğu pikten ayrılamamıştır.

Tüm analiz sonuçlarından, Dynasan[®] 116 ve Compritol[®] 888 ATO lipitleri kullanılarak kararlı SLN formülasyonlarının hazırlandığı görülmüştür. Bu sonuçlar kararlılık çalışmaları sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde ise, en iyi sonucu veren FD4 formülasyonu *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenmiştir.

Mikroemülsiyon Formülasyonlarına ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

Bergabest[®] MCT sıvı yağı ile YEM olarak Tween[®] 80 ve YYEM olarak PEG 400'ün kullanımı ile başarılı ME'lar hazırlanmış, ancak, Bergabest[®] MCT sıvı yağının tekrar temin edilmesinin mümkün olamaması nedeni ile yeni formülasyon çalışmalarının yapılması zorunlu olmuştur. Yeni hazırlanan ME

formülasyonlarında, sıvı yağ olarak IPM, YEM olarak Tween® 80 ve YYEM olarak IPA kullanılmış ve bu maddeler ile kararlı ME formülasyonları hazırlanmıştır.

CsA'nın oküler kontrollü salım sistemlerinin hazırlandığı bu çalışmada ikinci EM taşıyıcı sistem olarak ME'lar tercih edilmiştir. Y/S tip emülsiyonlar lipofilik EM'lerin taşınmalarında etkili sistemlerdir. *In vivo* çalışma sonuçları, y/s tipi emülsiyonların uzatılmış salım profilleri ile oküler uygulamalarda da etkili olduklarını göstermiştir. Aseptik hazırlanabilmeleri, Tween® 80 gibi güvenli YEM'lerin kullanılması ile sistemler sürekli gelişmektedir. Ding ve arkadaşlarının geliştirdikleri % 0.4 CsA içeren ME formülasyonu, 9 ay süresince oda sıcaklığında kararlı kalmış ve tavşanlara 7 gün, günde 8 kez uygulanmaları ile kornea, gözyaşı kesesi, konjonktiva gibi dokulara immün sistemi baskılayacak oranda penetre olmuştur (Lallemand ve ark., 2003). Göz içi dokulara ve sistemik dolaşıma çok düşük geçiş göstermiştir. Sonuçlar doğrultusunda, kuru göz sendromu tedavisi amacıyla, sistemin Faz II ve Faz III çalışmalarına başlanmıştır (Lallemand ve ark., 2003).

Yapılan bir başka çalışmada, pilokarpin içeren ME'un göze uygulanması ile sistemden uzatılmış etki sağlanmıştır (Hasse ve Keipert, 1997). Bir başka çalışmada ise, CsA için ME sisteminin iyi bir taşıyıcı olduğuna karar verilmiş, çalışmalar kararlılık testleri ile desteklenmiştir (Tamilvanan ve ark., 2001).

Özellikle oküler ME'ların hazırlanmasında yağlı fazın belirlenmesi çok önem taşımaktadır. Uzun hidrokarbon zincirine sahip yağlar ile ME oluşturulamamaktadır. Trigliseritler gibi polar yağlar, EM'lerin daha iyi çözümleri nedeniyle, nonpolar yağlara tercih edilmektedir; ancak polaritenin fazla olmasının ME'un oluşmasını engelleyeceğinin de gözönünde bulundurulması gerekmektedir. Soyayağı, 8-10 karbon atomlu trigliseritler, Myglyol® 812 (gliserol ve kaprik kaprilik asit triesteri), IPM, oleik asit, formülasyonlarda en çok tercih edilen yağlardır (Vandamme, 2002).

Radomska ve Dobrucki (2000), yağlı faz olarak IPM, YEM olarak Tween® 80'i tercih ettikleri çalışmalarında, oküler kullanıma yönelik A vitamini içeren ME'larını başarı ile hazırlamışlardır. Çalışmada, Tween® 80, EM'nin göze uygulanmasını kolaylaştırarak uzatılmış etkinin görülmesi amacıyla tercih edilmiştir.

YYEM'ler, ME sistemlere, başlıca yüzey gerilimi çok azaltmaları, apolar gruplarına bağlı olarak ara yüzey eğim açısını düzeltmeleri ve ara yüzeyin akışkanlığını arttırmaları nedeniyle kullanılmaktadır. Kullanılan yağlı fazın akışkanlığı az ve oluşturduğu film tabaka çok katı yapı sergilediğinde, YYEM kullanılarak ME'un oluşması sağlanabilmektedir. YYEM olarak genellikle düşük molekül ağırlığına sahip alkoller, 2-10 karbon zincir uzunluğuna sahip glikoller ve aminler kullanılmaktadır. Pentanol ve hekzanol gibi alkoller, yüksek iritan özellikleri nedeniyle farmasötik amaçlı çalışmalarda tercih edilmemektedir (Vandamme, 2002).

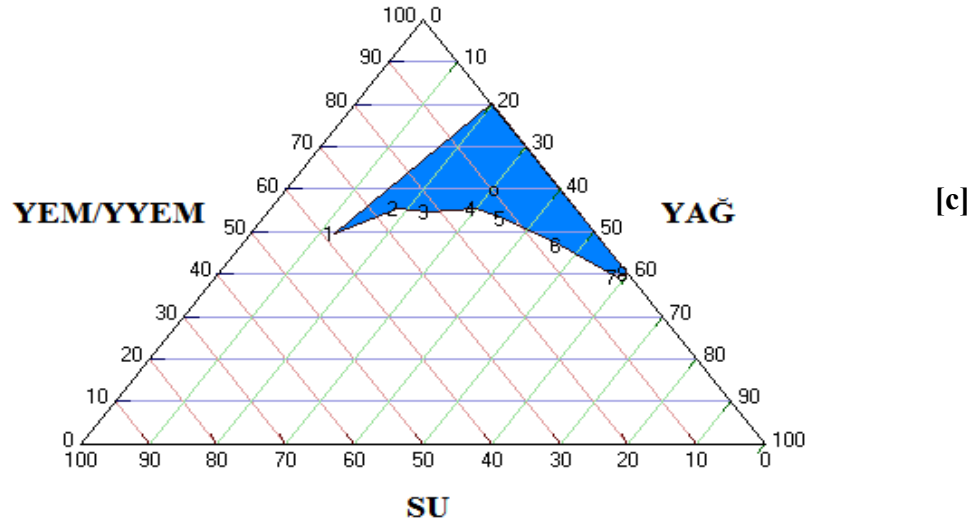
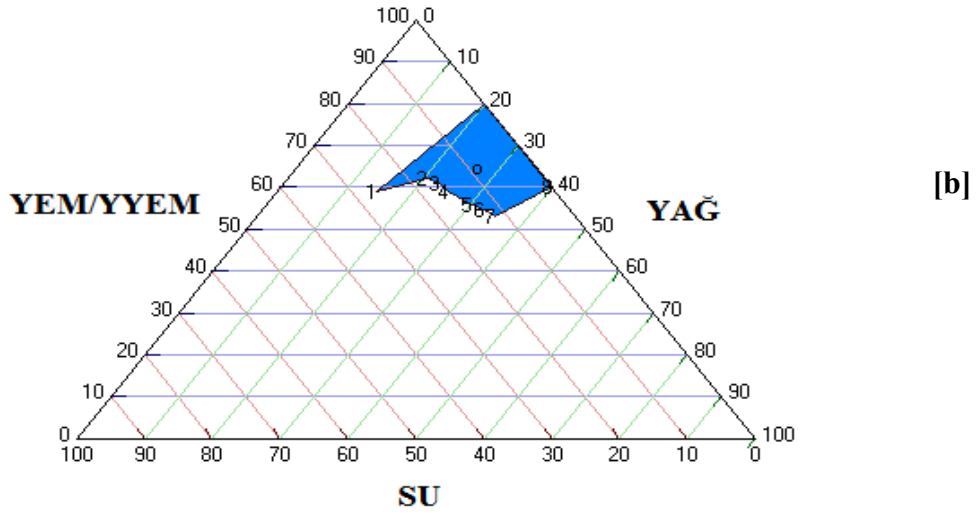
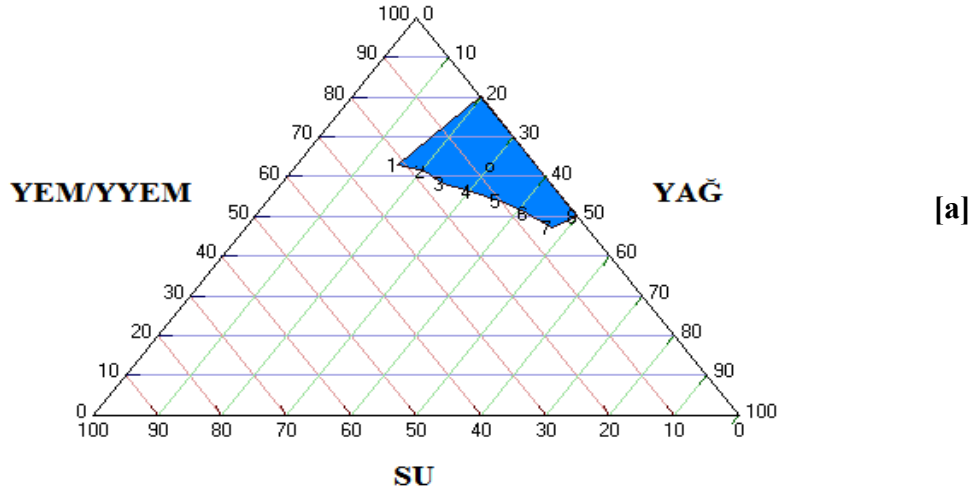
Üçgen Faz Diyagramı Çalışmaları

Üçgen faz diyagramı çalışmalarında, farklı YEM/YYEM oran ve konsantrasyonuna sahip toplam 21 ME formülasyonunun hazırlanması ile her bir formülasyon bileşimine giren maddelerin yüzde değerleri kütleli olarak belirlenmiştir (Çizelge 9).

Çizelge 9. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesinde Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kod ve bileşenleri

| KOD | YEM/ YYEM Oranı | IPM [g] | Tween® 80 + IPA [g] | Distile Su [g] |
|-----|--------------------|------------|------------------------|-------------------|
| MA2 | 1:1 | 2.00 | 8.00 | 3.60 |
| MA3 | | 2.50 | 7.50 | 2.10 |
| MA4 | | 2.75 | 7.25 | 1.90 |
| MA5 | | 3.00 | 7.00 | 1.85 |
| MA6 | | 3.50 | 6.50 | 1.60 |
| MA7 | | 3.75 | 6.25 | 1.45 |
| MA8 | | 4.00 | 6.00 | 1.35 |
| MC2 | | 1:2 | 2.00 | 8.00 |
| MC3 | 2.50 | | 7.50 | 2.20 |
| MC4 | 3.00 | | 7.00 | 2.00 |
| MC5 | 3.50 | | 6.50 | 1.55 |
| MC6 | 4.00 | | 6.00 | 1.10 |
| MC7 | 4.50 | | 5.50 | 0.80 |
| MC8 | 5.00 | | 5.00 | 0.60 |
| MB2 | 2:1 | | 2.00 | 8.00 |
| MB3 | | 2.50 | 7.50 | 3.50 |
| MB4 | | 3.00 | 7.00 | 2.80 |
| MB5 | | 3.50 | 6.50 | 1.70 |
| MB6 | | 4.00 | 6.00 | 1.30 |
| MB7 | | 5.00 | 5.00 | 0.70 |
| MB8 | | 6.00 | 4.00 | 0.20 |

Elde edilen değerler kullanılarak, her üç oran için ayrı ayrı üçgen faz diyagramları çizilmiş ve en geniş ME alanı [2:1] YEM/YYEM oranında gözlenmiştir (Şekil 39). [2:1] oranına ait diyagramın ağırlık merkezi hesaplanarak, EM yüklenmesinde ve kararlılık çalışmalarında kullanılacak formülasyonun kantitatif bileşeni belirlenmiştir.



Şekil 39. Farklı Yüzey Etkin Madde/Yardımcı Yüzey Etkin Madde Oranlarına Sahip Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramları (a: [1:1] YEM/YYEM Oranı, b: [1:2] YEM/YYEM Oranı, c: [2:1] YEM/YYEM Oranı)

Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı

En büyük ME alanını oluşturan [2:1] oranının ağırlık merkezinde oluşan ME'un yağ, distile su, YEM ve YYEM madde değerlerinin belirlenmesinin ardından etkin ve diğer yardımcı maddelerin sisteme eklenmesine çalışılmıştır.

Daha önce hazırlanan SLN formülasyonlarında olduğu gibi, CsA % 0.1 ve BK % 0.01 konsantrasyonda sisteme eklenmiştir. OA'nin farklı konsantrasyonları denenerek, formülasyonda faz ayrılmasına neden olmayan en yüksek konsantrasyonunun (% 0.75) kullanımına karar verilmiştir. Sonuç olarak, EM içeren ve aynı zamanda kararlılık çalışmalarında izlenen ME formülasyonunun kalitatif ve kantitatif bileşimi **Çizelge 10**'da sunulmuştur.

Çizelge 10. Kararlılık Çalışmalarında Kullanılan Mikroemülsiyon Formülasyonunun Bileşimi

| Formülasyon Kodu | IPM | Tween® 80 | IPA | CsA | OA | BK | Distile Su |
|------------------|-------|-----------|-------|------|------|------|------------|
| ME | 29.32 | 40.00 | 20.00 | 0.10 | 0.75 | 0.01 | 9.73 |

Tüm değerler % ağırlığı [a/a] ifade etmektedir

Hazırlanan SLN, ME ve PN formülasyonlarının *in vitro* ve *in vivo* etkinliklerinin karşılaştırılabilir olması açısından formülasyonların özellikleri göz önünde tutularak, aynı konsantrasyonda EM ve yardımcı maddeler kullanılmaya çalışılmıştır.

Kornea hücrelerinin negatif yükleri göz önünde bulundurularak pozitif yüklü formülasyonların kornea ile daha fazla etkileşeceği ve gözde kalış süresinin uzun olacağı düşünülmektedir (Lallemand ve ark., 2003). Stearilamin kullanılarak pozitif yük kazandırılan emülsiyon sistemine CsA yüklenerek oküler olarak uygulanmış ve negatif yüklü emülsiyona kıyasla kornea yüzeyinde 4 kat daha yüksek dağılım katsayısına ulaşmıştır (Abdulrazik ve ark., 2001).

Formülasyonların hazırlanışı özetle şöyledir: toplam kütlenin 10 g olduğu formülasyonda, 0.01 g EM ve 0.075 g katyonik lipit, 2.932 g IPM içersinde 50°C'de ısıtılarak çözündürülmüş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Soğuma sırasında maddelerde herhangi bir çökme olup olmadığı gözlenmiş ve sıvı yağ görünümünde bir çözelti elde edilmiştir. 4 g Tween® 80 ve 2 g IPA karışıma eklenmiştir. 25°C'de bulunan ve % 0.001 konsantrasyonda BK içeren 0.973 g distile su, 1000 rpm devirdeki mekanik karıştırıcı yardımıyla karıştırılan sisteme eklenerek ME formülasyonu oluşturulmuştur. Benzer şekilde, plasebo (ME-BOŞ) formülasyon da hazırlanarak, formülasyonlar sterilizasyonu takiben flakonlara doldurulup sıkıca kapatılmış, özellik ve kararlılıklarının incelenmesine yönelik çalışmalara başlanmıştır.

Formülasyonun Sterilizasyonu

Formülasyonun oküler kullanılacak olması nedeniyle, sterilitesi, steril membran filtre kullanılarak sağlanmış ve sterilizasyon sonrasında herhangi bir faz ayrışması oluşmamıştır.

Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Çalışmalar

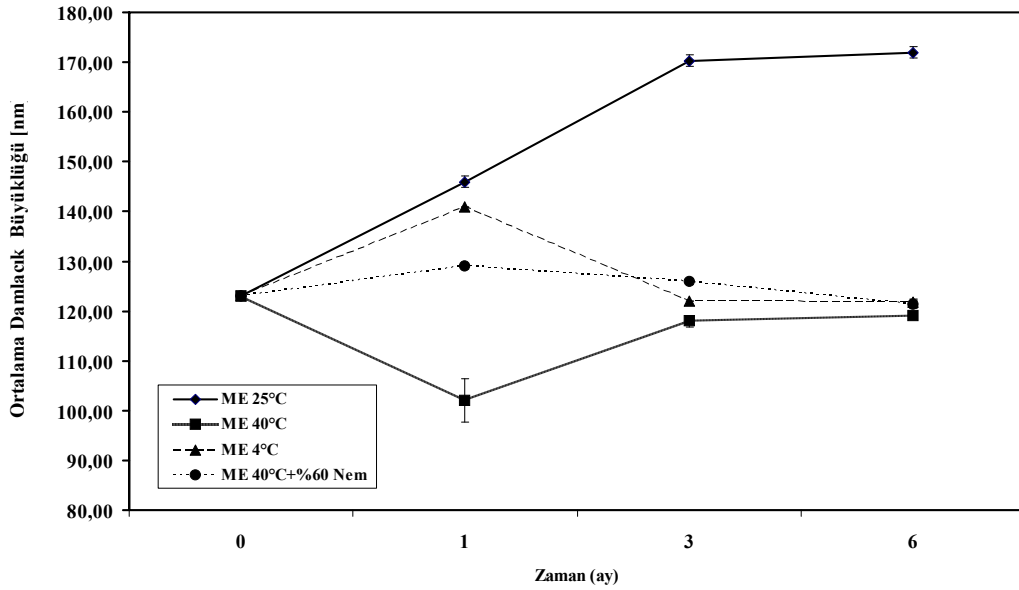
Fiziksel Görünüm

ME formülasyonlarının fiziksel görünüşleri 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince incelenmiştir. $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C} + \%60$ bağıl nem içeren ortamlarda saklanan formülasyonlarda sarı olan renk hafif turuncu renge dönüşmüş, faz ayrışması veya berraklığın kaybolması gibi bir değişim gözlenmemiştir. $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonlarda bir değişiklik olmamıştır.

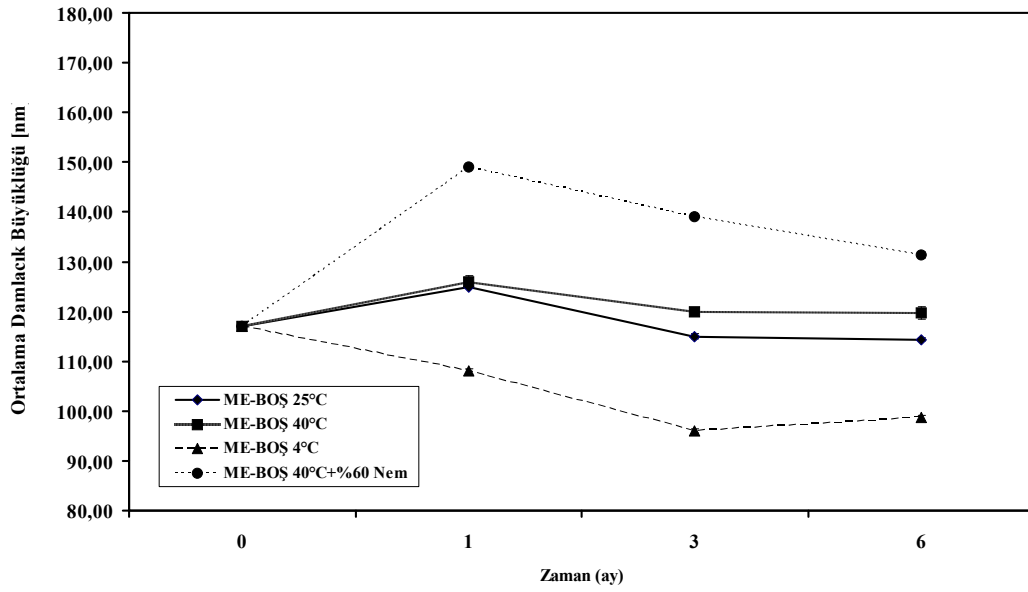
ME kararlılığının bozulması, en iyi, fiziksel görünümde meydana gelen değişiklikten anlaşılmaktadır (Ayannides ve Ktistis, 1999). ME'larda damlacık büyüklüğü ufak olduğundan görünür ışığın dalga boyunu geçirirler ve saydamdırlar. S/Y sistemlerinde az miktar YEM ile saydamlık sağlanırken, y/s ME'lerinde gerekli olan YEM miktarı daha yüksektir. Pek çok çalışmada, sistemin oluşturulmasının ardından optik özellikleri incelenmiştir (Corswant ve ark., 1998). Bu çalışmada, sistemdeki renk değişiminin oksidasyon sonucunda olduğu düşünülmüştür. $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonlarda renk değişiminin olmaması sıcaklığa bağlı olarak gelişen bir durum olduğunu göstermektedir. Oda ve buzdolabı sıcaklığında saklanan formülasyonlarda bir değişim gözlenmediği için formülasyonlara herhangi bir antioksidan madde eklenmemiştir.

Damlacık Büyüklüğü Analizi

EM içeren ve içermeyen ME formülasyonlarının ortalama damlacık büyüklükleri, hem hazırlanmalarını takiben hem de 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Bu analizlere ait bulgular Şekil 40-41'de verilmiştir.



Şekil 40. Etkin Madde Yüklenmiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Damlacık Büyüklüğü Bulguları (n=3) [Dikey bar: SH]



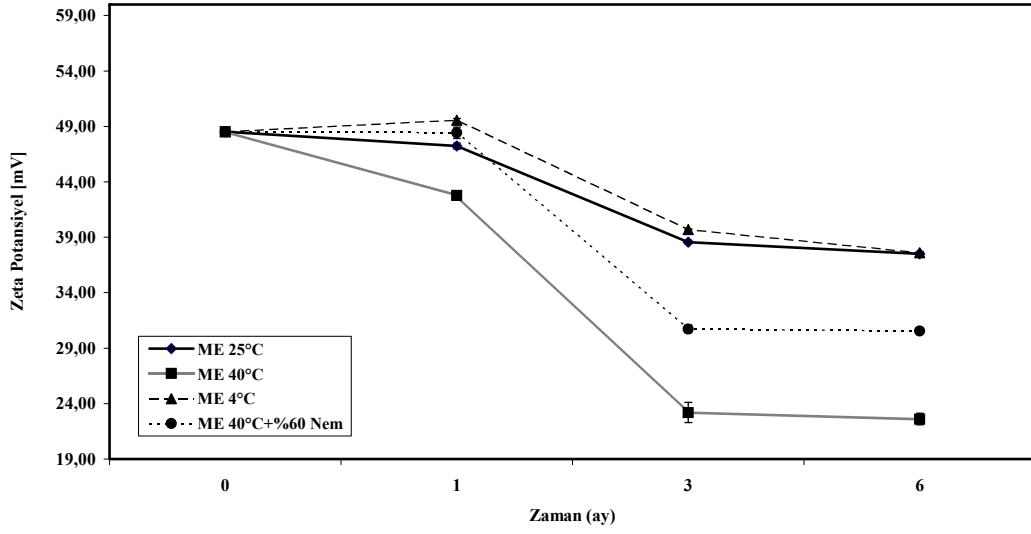
Şekil 41. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Damlacık Büyüklüğü Bulguları (n=3) [Dikey bar: SH]

Damlacık büyüklüklerine bakıldığında, ME'un hazırlanmasını takiben yapılan analizlerde bulunan 123.00 ± 0.33 nm'lik ($PI= 0.359 \pm 0.002$) başlangıçtaki damlacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda, $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 171.97 ± 1.08 nm ($PI= 0.253 \pm 0.001$), $40^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 119.13 ± 0.58 nm ($PI= 0.274 \pm 0.007$), $4^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 121.77 ± 0.62 nm ($PI= 0.248 \pm 0.004$), $40^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ve % 60 bağıl nemde saklanan formülasyonda ise 121.33 ± 0.88 nm ($PI= 0.244 \pm 0.005$) olarak belirlenmiştir. En büyük değişiklik $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda görülmüştür.

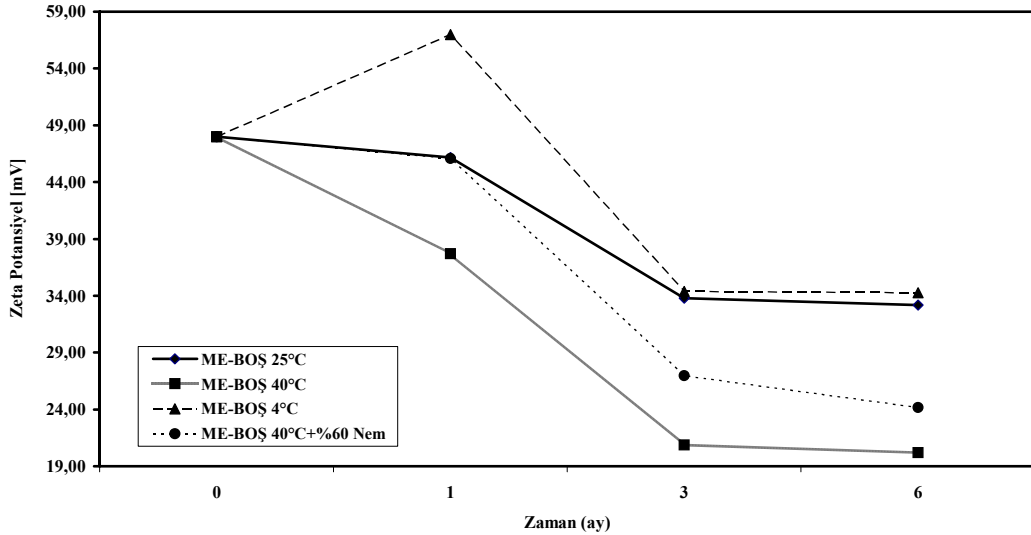
EM yüklenmemiş boş ME formülasyonunda, ME'un hazırlanmasını takiben yapılan analizlerde bulunan 117.10 ± 0.15 nm'lik ($PI= 0.257 \pm 0.002$) damlacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 114.33 ± 0.33 nm ($PI= 0.242 \pm 0.004$), $40^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 119.67 ± 1.20 nm ($PI= 0.251 \pm 0.002$), $4^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 'de saklanan formülasyonda 98.63 ± 0.50 nm ($PI= 0.275 \pm 0.002$), $40^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ve % 60 bağıl nemde saklanan formülasyonda ise 131.33 ± 0.67 nm ($PI= 0.278 \pm 0.002$) olarak saptanmış; kayda değer bir değişiklik belirlenmemiştir.

Zeta Potansiyel Analizi

ME formülasyonlarının zeta potansiyelleri, hem hazırlanmalarını takiben hem de 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 42 ve 43).



Şekil 42. Etkin Madde Yüklenmiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Bulguları (n=3) [Dikey bar: SH]



Şekil 43. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Bulguları (n=3) [Dikey bar: SH]

Hazırlanan ME'lerin zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde, farklı sıcaklıklarda saklanan ME formülasyonunun gerçekleştirilen zeta potansiyel ölçümlerinde farklılıklar saptanmış, ancak yine de formülasyonların pozitif yüklerini 6 aylık saklama süresince koruduğu belirlenmiştir. ME formülasyonunun hazırlanmasını takiben analiz edilen zeta potansiyel değeri 48.53 ± 0.07 mV olarak belirlenmiş, 6. ayın sonunda, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 37.50 ± 0.06 mV, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 22.60 ± 0.53 mV, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 37.60 ± 0.12 mV ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve % 60 bağıl nem'de saklanan formülasyonda 30.53 ± 0.09 mV olarak bulunmuştur.

Etkin madde içermeyen ME formülasyonunun hazırlanmasının ardından analiz edilen zeta potansiyel değeri 48.00 ± 0.10 mV olarak belirlenmiş, 6. ayın sonunda,

25°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 33.17 ±0.58 mV, 40°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 20.20 ±0.06 mV, 4°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 34.27 ±0.12 mV 40°C ±1°C ve % 60 bağıl nem’de saklanan formülasyonda 24.17 ±0.89 mV olarak bulunmuştur.

Korneanın negatif yüküne bağlı olarak uygulanacak sistemin pozitif yük taşımamasının sistemin gözde kalış süresini ve EM salımını arttıracak düşünülmemektedir (Vandamme, 2002). Çalışmamızda da pozitif yüklü mikroemülsiyon formülasyonu bu amaçla oluşturulmuştur.

Zeta potansiyelleri, -31 ile -60 mV aralığındaki formülasyonlar orta dereceli, -61 ile -80 mV aralığındaki formülasyonlar iyi ve -81 ile -100 mV aralığındaki formülasyonlar da mükemmel elektrostatik kararlılığa sahip sistemler olarak tanımlanmaktadır (Müller ve Heinemann, 1993).

Yağlı emülsiyonların düşük zeta potansiyel değerlerine karşın kararlı oldukları saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, yağlı emülsiyonların -45 mV zeta potansiyellerinin 24 aylık saklama süresince sabit kaldığı saptanmıştır. 24 ay sonunda oluşan artış, distile sudaki kısmen yüksek elektrolit konsantrasyonuna bağlanmıştır. Zeta potansiyel değerlerinde artış olmaması için, NaCl elektroliti baz olarak eklenerek, 50-100 µS iletkenlik aralığında sabit potansiyellerin oluşması sağlanabilmektedir. Elektrolit bazın eklenmesi, distile sudaki iletkenliğin neden olduğu küçük değişimlerin emülsiyonları etkilememesinin sağlanması ile çok daha etkili ölçümler gerçekleştirilebilmektedir (Müller ve Heinemann, 1993).

pH Analizi

ME formülasyonlarının pH’sı asetik asit kullanılarak 7.4’e ayarlanmıştır (gözyaşı pH’sı 7.2-7.4). EM içeren ve içermeyen formülasyonların pH değerleri 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince pH metre ile ölçülmüş ve sonuçlar **Çizelge 11**’de verilmiştir.

Çizelge 11. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları

| Formülasyon Kodu ve Saklama Koşulları | pH ±SH | | | |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | Zaman (ay) | | | |
| | 0 | 1 | 3 | 6 |
| ME-25°C | 7.40 ±0.00 | 7.48 ±0.01 | 7.36 ±0.00 | 7.34 ±0.01 |
| ME-40°C | 7.40 ±0.00 | 7.52 ±0.01 | 7.34 ±0.00 | 6.99 ±0.02 |
| ME-4°C | 7.40 ±0.00 | 7.45 ±0.00 | 7.37 ±0.00 | 7.08 ±0.00 |
| ME-40°C+% 60 Bağıl Nem | 7.40 ±0.00 | 7.55 ±0.01 | 7.49 ±0.00 | 6.99 ±0.01 |
| ME-BOŞ-25°C | 7.40 ±0.00 | 7.33 ±0.01 | 7.30 ±0.00 | 7.56 ±0.00 |
| ME-BOŞ- 40°C | 7.40 ±0.00 | 7.55 ±0.00 | 7.43 ±0.01 | 7.31 ±0.01 |
| ME-BOŞ- 4°C | 7.40 ±0.00 | 7.47 ±0.00 | 7.34 ±0.00 | 7.27 ±0.01 |
| ME-BOŞ-40°C +% 60 Bağıl Nem | 7.40 ±0.00 | 7.50 ±0.01 | 7.43 ±0.01 | 7.31 ±0.01 |

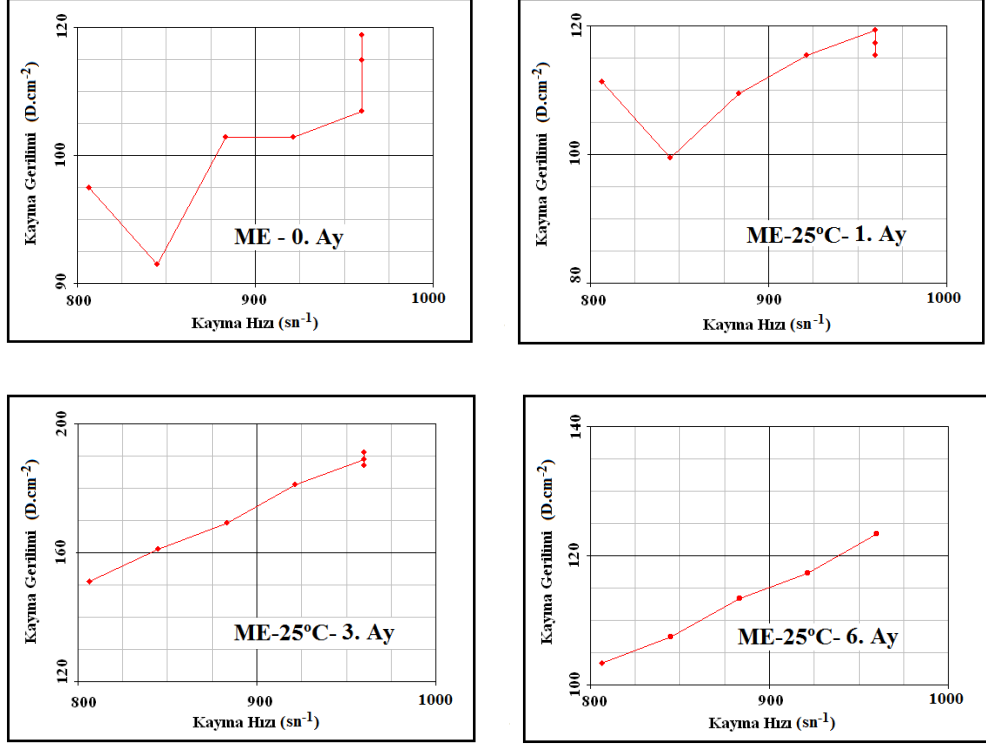
n=3, SH: Standart hata

ME’larda başlangıç pH’nın 7-8’e ayarlanması, pH’da düşmeye neden olan, fosfolipitlerin ve trigliseritlerin yağ asitlerine hidrolizini engellemektedir (Vandamme, 2002).

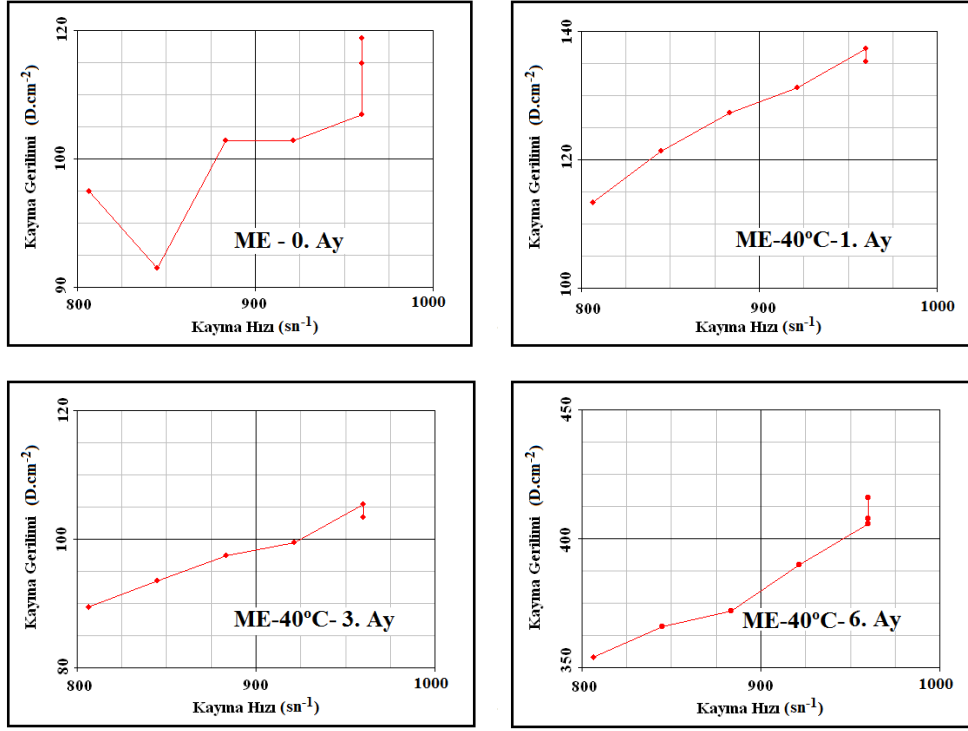
Sonuçlar değerlendirildiğinde, ME'ların pH değerlerindeki düşme gözün tolere edebileceği aralıkta kalmıştır (Worth ve Cronin, 2001).

Reolojik Analizler

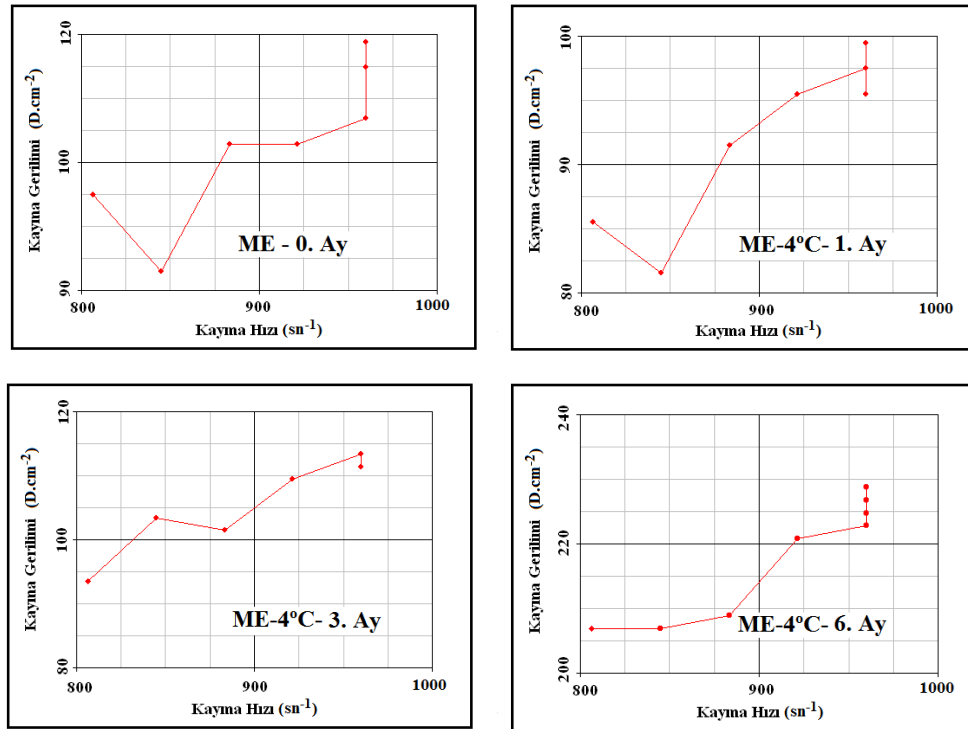
EM içeren ve içermeyen ME formülasyonlarının reolojik ölçümleri, formülasyonların hazırlanmalarının hemen ardından ve kararlılık çalışmaları süresince 1., 3., 6. aylarda gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlerden elde edilen reogramlar **Şekil 44-51**'de sunulmuştur.



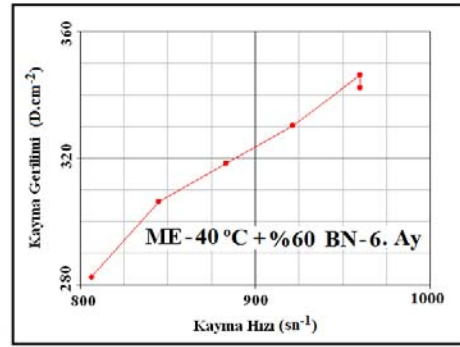
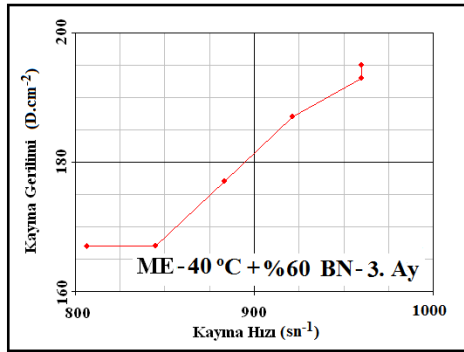
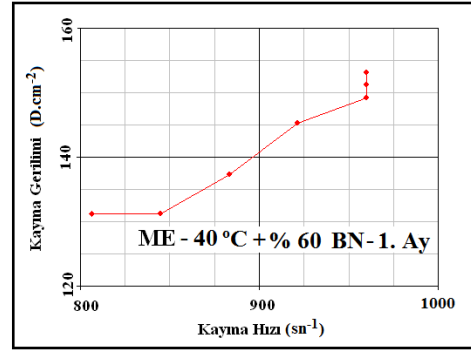
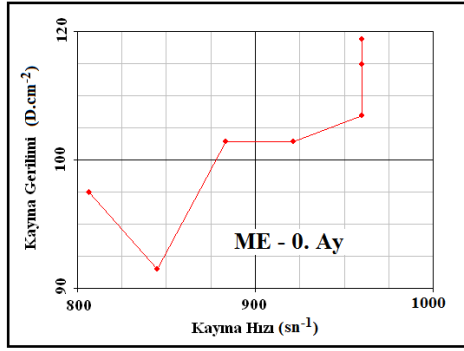
Şekil 44. 25°C ±1°C'de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar



Şekil 45. 40°C ± 1°C'de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar

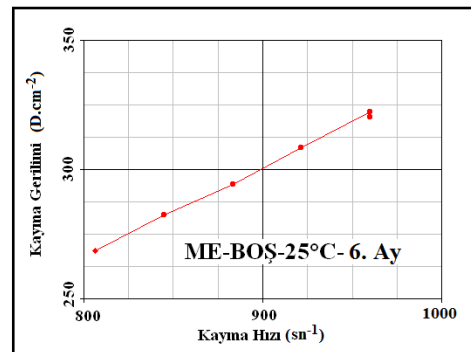
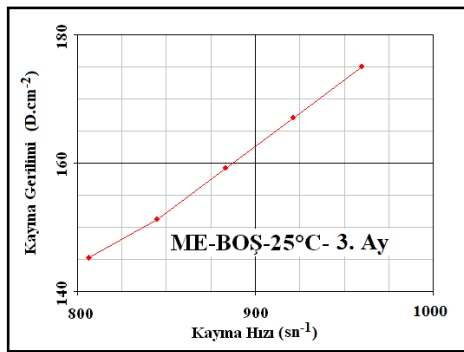
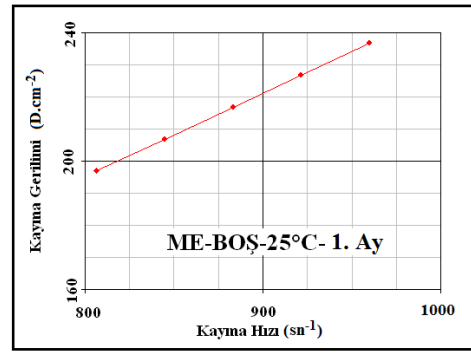
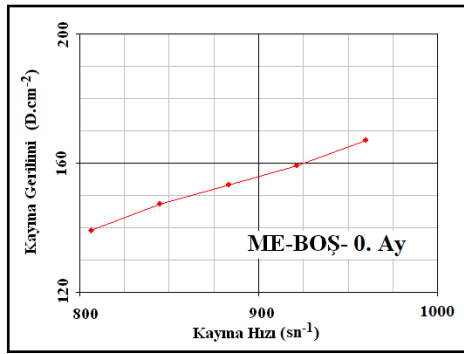


Şekil 46. 4°C ± 1°C'de Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar

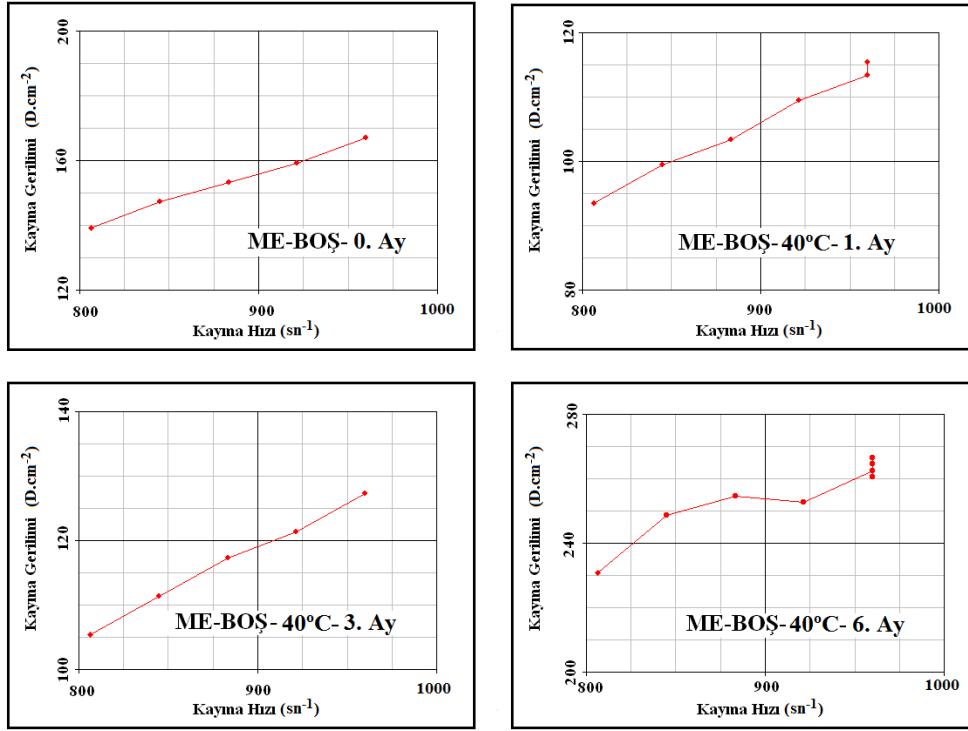


BN: Bağlı Nem

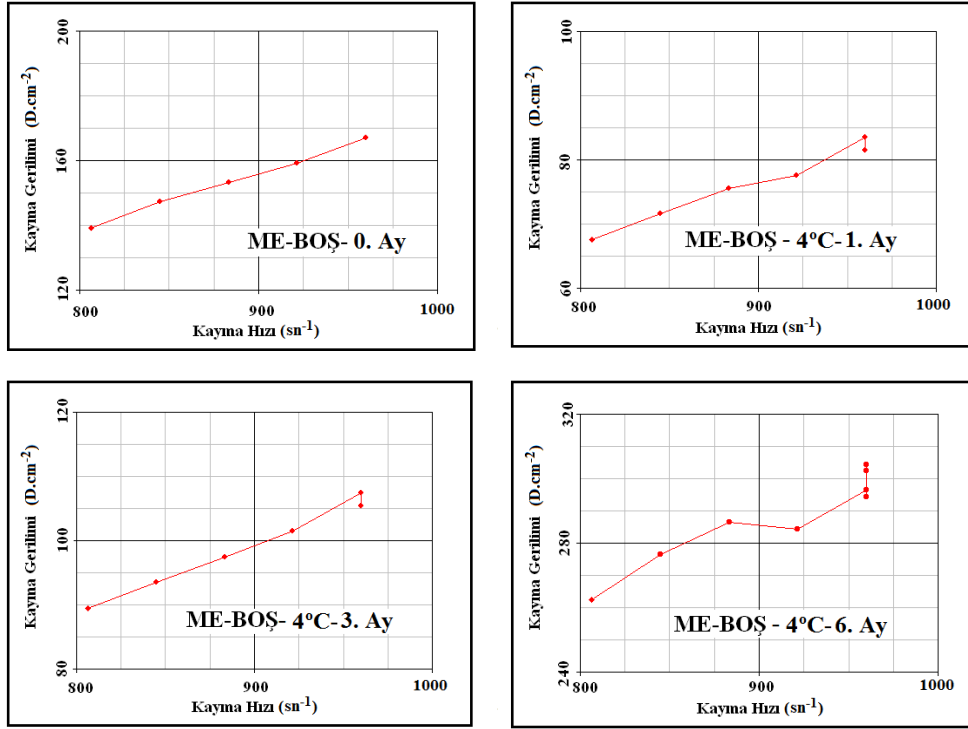
Şekil 47. 40°C ±1°C'de ve % 60 Bağlı Nemde Bekletilen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar



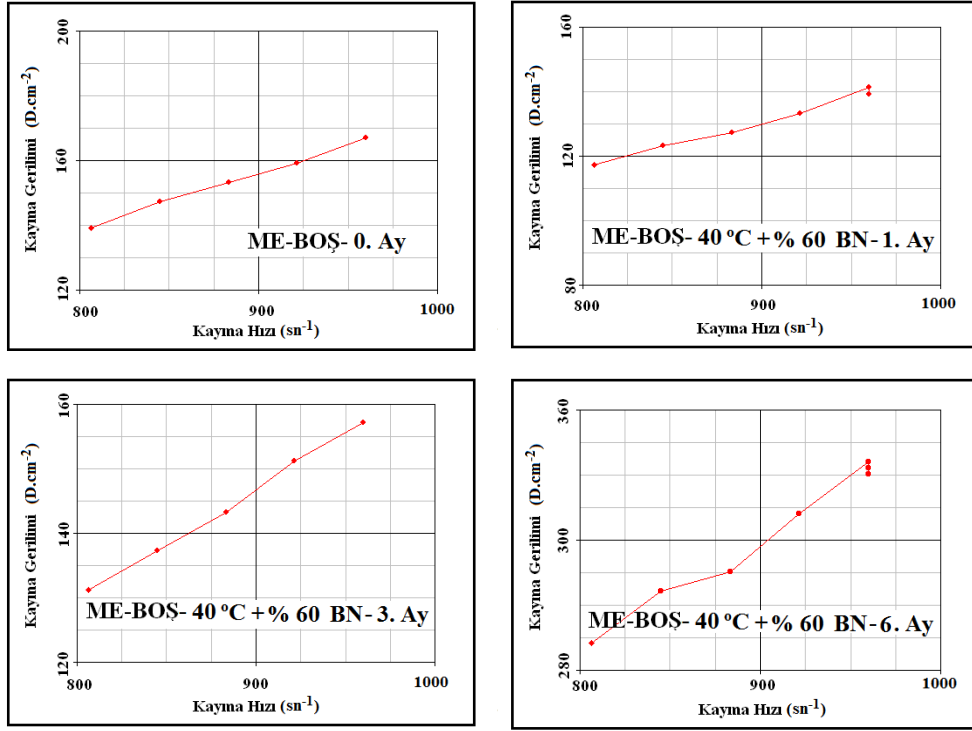
Şekil 48. 25°C ±1°C'de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar



Şekil 49. 40°C ±1°C'de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar



Şekil 50. 4°C ±1°C'de Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar



BN: Bağıl Nem

Şekil 51. 40°C ±1°C'de ve % 60 Bağıl Nemde Bekletilen Etkin Madde İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonuna ait Reogramlar

ME sistemlerinin akış özellikleri de kararlılık çalışmaları süresince koni-tabla reometresi kullanılarak, 25°C ±1°C'de analiz edilmişler ve Newtonian tip akış göstermişlerdir.

ME formülasyonunun, özellikle topik uygulamada belli reolojik özellikleri taşınması gerekmektedir (Ayannides ve Ktistis, 1999). Reolojik analizler için koni-tabla yöntemi ile çalışan rotasyon tipi reometreler kullanılabilir (Polizelli ve ark., 2006). Makroemülsiyonlar genellikle psödo-plastik akış gösterirken, ME'lar Newtonian akış göstermektedir (Ayannides ve Ktistis, 1999; Vandamme, 2002).

Faz Ayrışması İncelemesi

ME formülasyonları, kararlılık çalışmaları süresince 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, ancak herhangi bir faz ayrışması gözlenmemiştir.

Bu sonuç, formülasyonlardaki kalitatif ve kantitatif bileşimin uygunluğunu ispatlamaktadır.

Emülsiyon Tipinin Tayini

ME formülasyonlarının y/s emülsiyon tipi, dış faz olan distile su ile seyreltilerek belirlenmiş ve kararlılık çalışmaları süresince dış fazın değişmediği görülmüştür.

Mikroemülsiyon Formülasyonunda Etkin Madde Miktar Tayini

ME formülasyonunda EM Miktar Tayini bölümünde (**Sayfa 45**) açıklanan şekilde, HPLC yöntemi ile yapılan tayinlerden elde edilen sonuçlara göre, ME % 0.141 ±0.004 (SH) oranında EM taşımaktadır (n=3). 8. ayın sonunda gerçekleştirilen analizlerde ise, ME'nin % 0.145 ±0.030 (SH) (25°C ±1°C'de saklanan formülasyon) oranında EM taşıdığı belirlenmiştir.

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarına ait Çalışmalar

Ön Formülasyon Çalışmaları

Eudragit® RS 100 ve RL 100 polimerleri ile farklı EM/P oranına ve farklı EM konsantrasyonuna sahip çok sayıda formülasyon hazırlanmış, yapılan parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel analizlerine göre Eudragit® RS 100 ile hazırlanan sistemlerin daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Gerçekleştirilen ön formülasyon denemeleri sonucunda [1:1] ve [1:3] EM/P oranları ile % 0.1 ve 0.2 EM konsantrasyonlarının kullanımına karar verilmiştir. Kararlılık çalışmaları için seçilen formülasyonların içerikleri **Çizelge 12**'de sunulmuştur.

Çizelge 12. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri

| KOD | CsA | Eudragit® RS 100 | Tween® 80 | BK |
|-----|-----|------------------|-----------|-----|
| PN1 | 0.1 | 0.1 | 0.02 | 0.1 |
| PN2 | 0.1 | 0.3 | 0.02 | 0.1 |
| PN3 | 0.2 | 0.2 | 0.02 | 0.1 |
| PN4 | 0.2 | 0.6 | 0.02 | 0.1 |

Tüm değerler % ağırlığı [a/a] ifade etmektedir

Katı dispersiyonlar sudaki çözünürlüğü düşük olan EM'lerin çözünürlüğünü, salımını ve biyoyararlanımını arttırmak amacıyla polimerler kullanılarak hazırlanan sistemler olarak tanımlanmaktadır. Sistemler, çoğunlukla Eudragit®, sodyum CMC, HPC, kitosan, etil selüloz kullanılarak hazırlanmaktadır (Lee E.J. ve ark., 2001).

Eudragit® RS ve RL polimerleri genellikle tabletlerin enterik kaplanmasında ve kontrollü salım sağlayan EM taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Poli(etilakrilat, metil-metakrilat ve klorotrimetil-amonyoetil metakrilat) kopolimerleridir. Eudragit® RS % 4.5-6.8, RL ise % 8.8-12 oranında katerner amonyum gruplar içermektedir. Fizyolojik pH'da çözünürlüklerinin olmaması ve yutulabilmeleri ile EM'ler için iyi birer taşıyıcı olmaktadır (Pignatello ve ark., 2002b).

D, L-laktit/glikolit kopolimer (PLGA) kullanılarak hazırlanan CsA içeren polimerik mikrokürelerde, subkonjonktival enjeksiyondan 6 saat sonra kornea ve hümor aközde terapötik konsantrasyona erişilmiştir (Lallemand ve ark., 2003). Daha yüksek konsantrasyonda EM içeren aynı sistem ile tavşanlarda keratoplasti reddinin önlenmesi çalışması gerçekleştirilmiş, ancak CsA'nın yağlı çözeltisinden

çok farklı sonuçlar elde edilmemiştir. Buna karşın histopatoloji sonuçları artan bölgesel toleransı göstermiştir (Lallemand ve ark., 2003).

PLGA ile yapılan bir başka çalışmada, deksametazon içeren vücutta parçalanmış polimerik nanopartiküller hazırlanmış ve maddenin polimerik nanopartiküllerdeki enkapsülasyonunun optimizasyonu amaçlanarak intravitreal enjeksiyona yönelik formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Emülsifikasyon-difüzyon yöntemine göre hazırlanan parçacıklar ile PLGA nanopartiküllerine EM yüklenmesi ve sistemlerin optimizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir (Gómez-Gaete ve ark., 2007).

Formülasyonların Hazırlanışı

PN'in ön formülasyon çalışmalarında belirlenen bileşenlere sahip formülasyonlar, **Sayfa 45**'de Formülasyonların Hazırlanışı bölümünde anlatılan şekilde emülsifikasyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanıp, 1 mL'lik renkli steril ampullere doldurulmuş ve ampuller sterilizasyon için kapatılmıştır.

Formülasyonların Sterilizasyonu

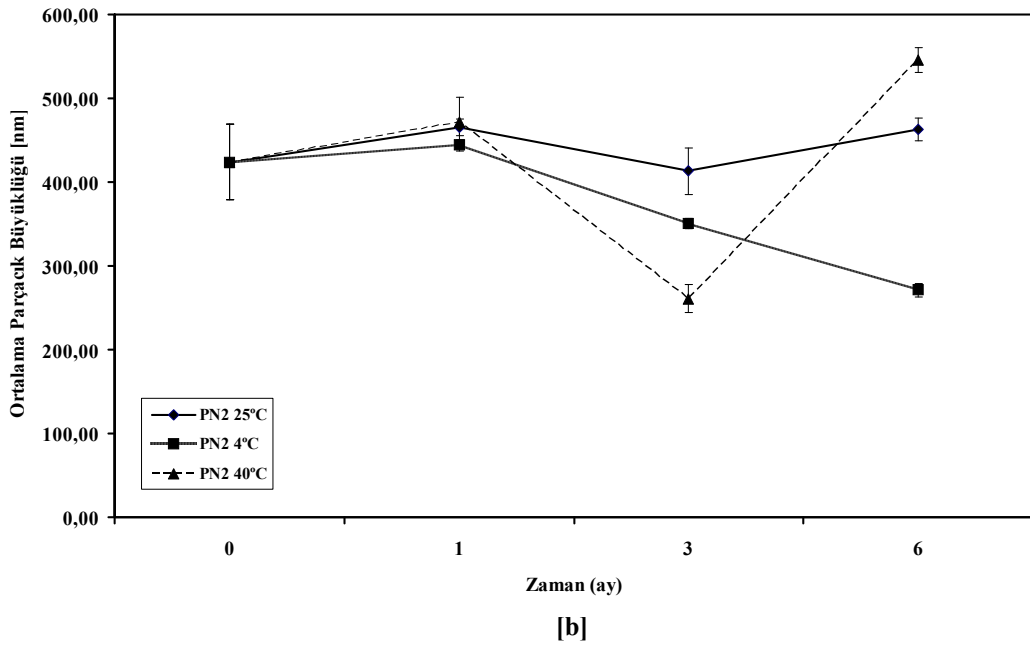
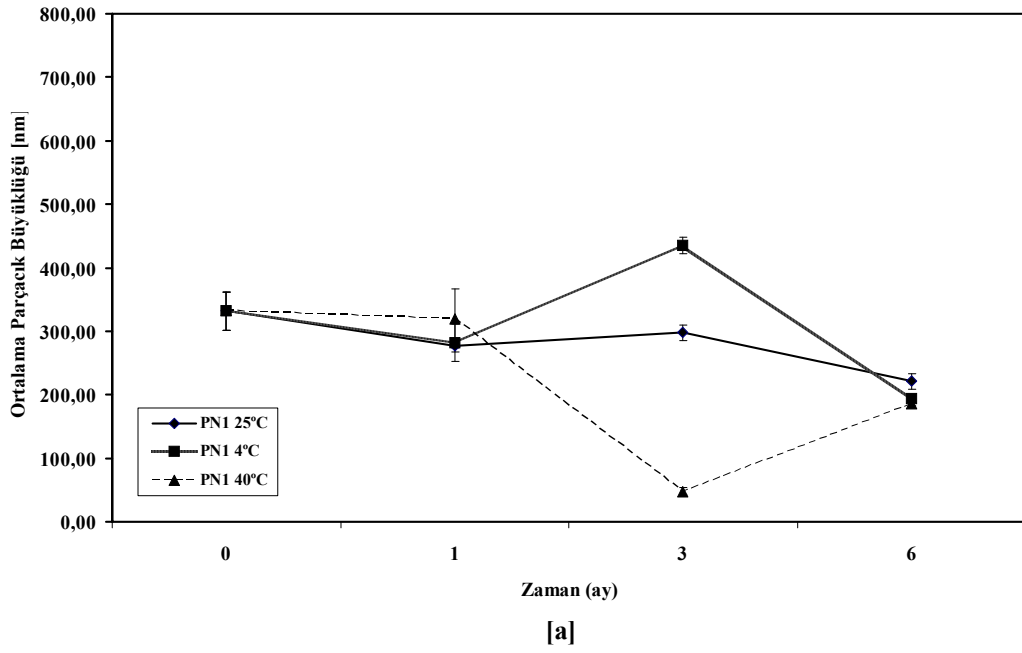
PN formülasyonlarının sterilizasyonu otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiş ve sistemin sterilizasyon sıcaklığına ulaştığı otoklav bantları ile kontrol edilmiştir.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu, hazırlanan sistemin özelliklerinin belirlenebilmesi ve uygulama yoluna uygunluğunun değerlendirilebilmesi için önem taşımaktadır. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarının başında, parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri ile yüklenen EM miktarının belirlenmesi gelmektedir. Yüzey özelliklerinin belirlenmesi, çeper kalınlığının, gözenek çap ve hacminin analizinin gerekliliği hazırlanan sistemlerin özellikleri göz önünde tutularak gerçekleştirilmektedir. Steril uygulama zorunluluğu bulunan uygulama yollarına (örn: parenteral, oküler) yönelik çalışmalarda sterilizasyon basamağının hazırlanan sistemin özelliklerini değiştirmeyecek nitelikte olmasına dikkat edilmelidir (Kaş, 2002).

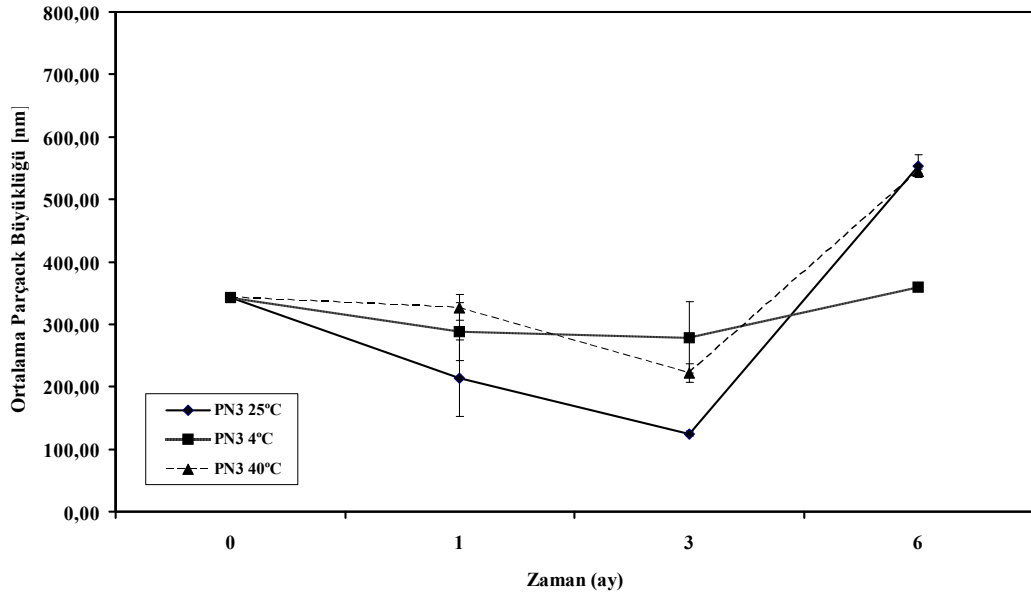
Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerine ait Çalışmalar

Parçacık Büyüklüğü Analizleri

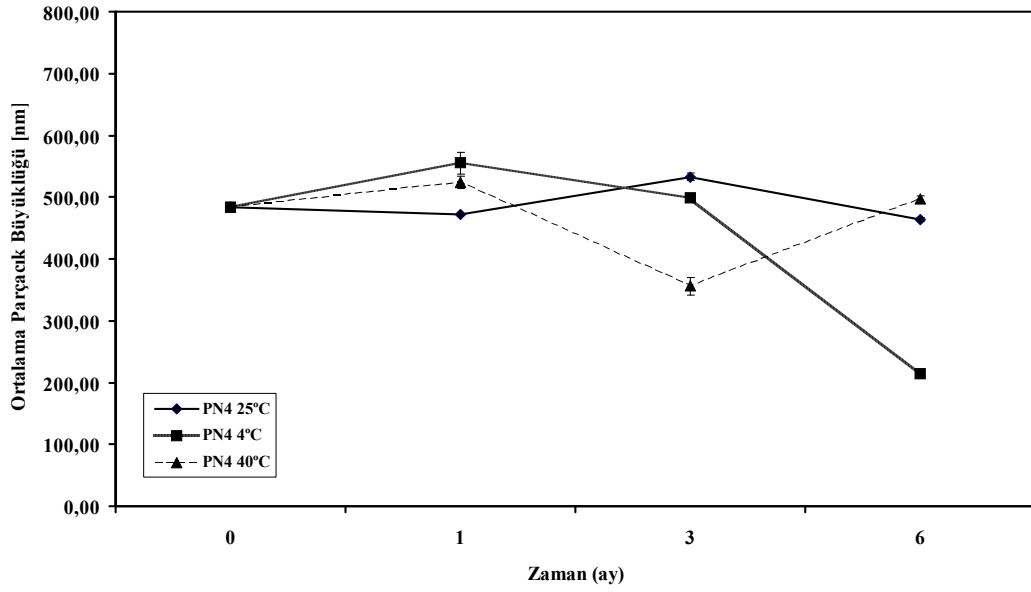
PN formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklükleri, hazırlanmalarının ardından ve 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla ölçülmüş, elde edilen sonuçlar **Şekil 52-53**'de verilmiştir.



Şekil 52. % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Parçacık Büyüklüğü Bulguları (a: EM/P Oranı [1:1], b: EM/P Oranı [1:3]; n=3) [Dikey bar: SH]



[a]



[b]

Şekil 53. % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Parçacık Büyüklüğü Bulguları (a: EM/P Oranı [1:1], b: EM/P Oranı [1:3]; n=3) [Dikey bar: SH]

Bu çalışmada, formülasyonların parçacık büyüklük analizleri, SLN'lerde olduğu gibi foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. PN'lerin hazırlanmalarını takiben yapılan analizlerde, PN1 formülasyonunun (EM= % 0.1 ve EM/polimer oranı [1:1]) 312.33 ± 10.76 nm ($PI= 0.943 \pm 0.032$) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 220.67 ± 11.68 nm ($PI= 0.274 \pm 0,001$), $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda

185.60 ±3.17 nm (PI= 0.600 ±0.078), 4°C ±1°C'de saklanan formülasyonda ise 193.67 ±5.85 nm (PI= 0.558 ±0.022) olarak belirlenmiştir.

PN2 formülasyonunun (EM= % 0.1 ve EM/polimer oranı [1:3]) 423.67 ±44.72 nm (PI= 0.721 ±0.046) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda, 25°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 463.33 ±13.13 nm (PI= 1.000±0.000), 40°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 546.00 ±14.99 nm (PI= 0.715 ±0.025), 4°C ±1°C'de saklanan formülasyonda ise 271.00 ±8.34 nm (PI= 0.495 ±0.011) olarak belirlenmiştir.

PN3 formülasyonunun (EM= % 0.2 ve EM/polimer oranı [1:1]) 343.33 ±5.93 nm (PI= 1.000 ±0.000) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda, 25°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 552.67±17.92 nm (PI= 0.575 ±0.117), 40°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 545.33 ±2.91 nm (PI= 0.859 ±0.007) ve 4°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 359.00 ±2.08 nm (PI= 0.839 ±0.084) olarak belirlenmiştir.

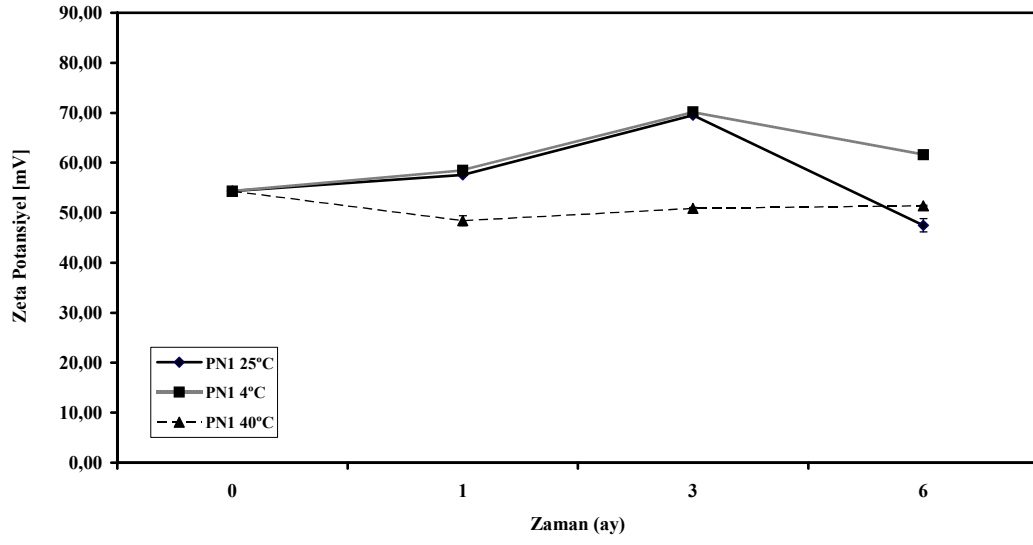
PN4 formülasyonunun ise (EM= % 0.2 ve EM/polimer oranı [1:3] olan) 484.33 ±4.34 nm (PI= 0.478 ±0.007) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 6. ayın sonunda, 25°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 462.67 ±3.48 nm (PI= 0.546 ±0.001), 40°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 497.00 ±5.78 nm (PI= 0.546 ±0.024) ve 4°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 215.00 ±4.51 nm (PI= 0.995 ±0.003) olarak belirlenmiştir.

Parçacık büyüklüğü analizleri sonuçları değerlendirildiğinde, 6. ay analizlerinde çoğu PN formülasyonu için daha düşük değerler elde edilmiştir. PI değerlerinin de yüksek olması ile, sistemlerde agregatların oluştuğu açıkça görülmüştür. Parçacık büyüklüğü analizleri, iletkenliği 50 µS olan distile suda formülasyonların disperse edilmesinin ardından gerçekleştirilmiştir. 6 ayın sonunda parçacık büyüklüğünde görülen azalma, dispersiyonların hazırlanmasında agregatların ayrılmasının sağlanamadığını göstermiştir. Agregatların ayrılmasını sağlayacak yöntem ve cihazların kullanılması ile daha uygun sonuçların elde edilebileceği görülmüştür.

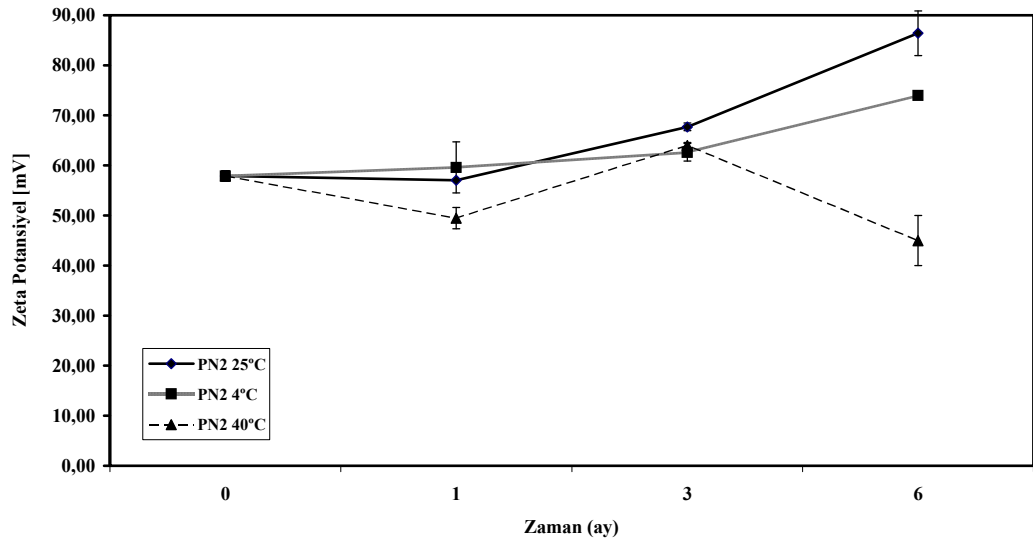
Agregat oluşumuna karşın, 6 aylık saklama süresince her üç koşuldaki PN formülasyonlarının parçacık büyüklükleri nanometre aralığında kalmıştır.

Zeta Potansiyel Analizleri

PN formülasyonlarının zeta potansiyel analizleri, hazırlanmalarının ardından ve 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince zeta potansiyel analiz cihazı yardımıyla gerçekleştirilmiş ve sonuçlar **Şekil 54-55**'de verilmiştir.

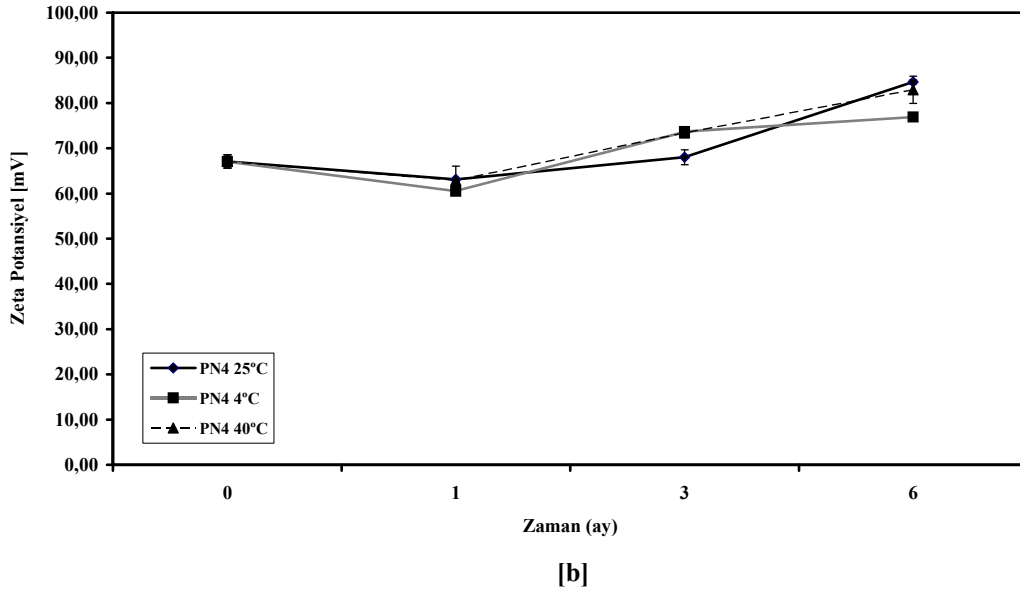
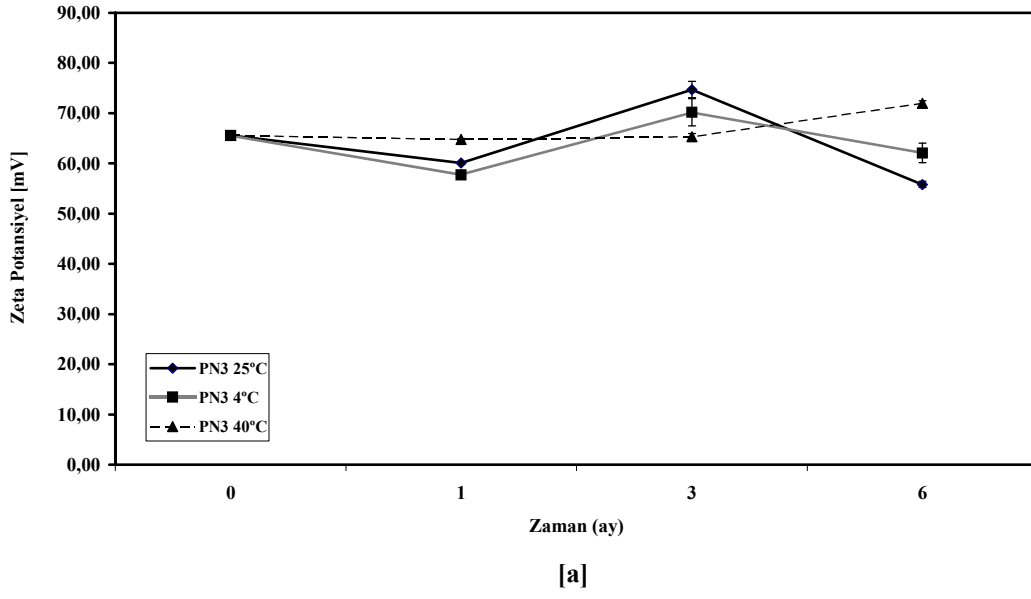


[a]



[b]

Şekil 54. % 0.1 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları (a: EM/P Oranı [1:1], b: EM/P Oranı [1:3]; n=3) [Dikey bar: SH]



Şekil 55. % 0.2 Etkin Madde Konsantrasyonuna Sahip Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları (a: EM/P Oranı [1:1], b: EM/P Oranı [1:3]; n=3) [Dikey bar: SH]

Çalışmada hazırlanan sistemlerin zeta potansiyel analizleri değerlendirildiğinde, çok kararlı oldukları, oldukça yüksek zeta potansiyel değerleri (50-70 mV) ile kolayca görülmektedir. Sistemlerin pozitif yükleri sayesinde, diğer sistemlere eklenen OA gibi yardımcı katyonik lipid eklenmesine gerek duyulmamıştır.

PN'lerin hazırlanmalarını takiben yapılan analizlerde, PN1 formülasyonunun (EM= % 0.1 ve EM/polimer oranı [1:1]) 54.30 ± 0.33 mV olan başlangıç elektriksel iletkenliği, 6. ayın sonunda, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 47.50 ± 0.62 , $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 51.40 ± 1.14 mV, $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 61.6 ± 1.11 mV olarak belirlenmiştir.

PN2 formülasyonunun (EM= % 0.1 ve EM/polimer oranı [1:3]) 57.90 ± 1.01 mV olan başlangıç elektriksel iletkenliği, 6. ayın sonunda, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 86.40 ± 0.82 mV, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 45.00 ± 2.33 mV, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 74.00 ± 0.15 mV olarak saptanmıştır.

PN3 formülasyonunun (EM= % 0.2 ve EM/polimer oranı [1:1]) 65.60 ± 0.59 mV olan başlangıç elektriksel iletkenliğinin, 6. ayın sonunda, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 55.80 ± 2.45 mV, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 72.00 ± 0.6 mV, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 62.10 ± 5.34 mV olduğu bulunmuştur.

PN4 formülasyonunun ise (EM= % 0.2 ve EM/polimer oranı [1:3]), 67.10 ± 1.48 mV olan başlangıç elektriksel iletkenliği, 6. ayın sonunda $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 84.70 ± 1.17 mV, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 82.90 ± 0.80 mV, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 76.90 ± 4.51 mV olarak belirlenmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, PN'lerin pozitif yüklerinin diğer sistemlerde olduğu gibi oküler uygulamalarda da kornea yüzeyine tutunmayı, düşük sıcaklıklarda dahi yüksek kararlılık sağlamayı başardığı belirtilmiştir. Eudaragit[®] RS 100 ile hazırlanan pozitif yüklü ibuprofen içeren PN'lerin oküler uygulamalarında, parçacıkların pozitif yükleri ile korneaya tutunma süreleri artmış, bu sayede uzatılmış salıma bağlı olarak hüme aközde yüksek EM konsantrasyonu elde edilmiştir (Pignatello ve ark., 2002b).

Kolloidal sistemler arasındaki etkileşimlerin çoğunlukla Van der Waals kuvvetlerine bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Partiküllerarası kırılma indisi farkı ne kadar yüksekse, Van der Waals kuvvetlerinin etkisi o derece artmaktadır. Pek çok dispers sistemde Van der Waals kuvvetleri elektrostatik kuvvetler ile dengelenmiştir. Tek tip partiküllerin olduğu sistemlerde benzer yüke sahip partiküller, aralarındaki yük yoğunluğuna bağlı olarak artan itici elektrostatik kuvvet oluşturmaktadır. Ortamdaki tuz miktarı artırılarak bu etki azaltılabilmektedir (Malmsten, 2002a).

Partiküler sistemlerin çoğu termodinamik olarak kararlı sistemler değildir; bu nedenle, bu tür dispers sistemlerde partiküller eninde sonunda floküle olarak makroskobik faz ayrışması gözlenecektir (Malmsten, 2002a). Ancak süspansiyonlarda olduğu gibi, PN'lerde oluşan bu değişimlerin geri dönüşümlü olması beklenmektedir (Öner, 2004).

Çalışmanın 6 aylık saklama süresi sonunda, sistemlerde çökme gözlenmiş, ancak hafif çalkalanmaları ile sistemler yine eski hallerine dönmüştür.

pH Analizleri

PN formülasyonlarının pH değerlerinin fizyolojik pH'ya yakın olması nedeniyle, (pH: 7.2-7.4) herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır. pH değerleri 6 aylık kararlılık çalışmaları süresince ölçülerek, sonuçlar **Çizelge 13**'de verilmiştir.

Çizelge 13. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Kararlılık Çalışmalarına ait pH Sonuçları

| Formülasyon Kodu ve Saklama Sıcaklığı | pH ±SH | | | |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | Zaman (ay) | | | |
| | 0 | 1 | 3 | 6 |
| PN1-25°C | 7.39 ±0.00 | 6.77 ±0.01 | 7.60 ±0.00 | 6.25 ±0.00 |
| PN1-40°C | 7.39 ±0.00 | 6.19 ±0.00 | 7.36 ±0.02 | 6.08 ±0.02 |
| PN1-4°C | 7.39 ±0.00 | 6.30 ±0.01 | 6.83 ±0.01 | 7.05 ±0.01 |
| PN1* | 7.39 ±0.00 | 7.24 ±0.02 | 7.85 ±0.00 | 6.44 ±0.01 |
| PN2-25°C | 7.31 ±0.01 | 6.54 ±0.01 | 7.80 ±0.01 | 6.22 ±0.01 |
| PN2-40°C | 7.31 ±0.01 | 6.22 ±0.02 | 6.79 ±0.02 | 6.07 ±0.02 |
| PN2-4°C | 7.31 ±0.01 | 6.54 ±0.00 | 6.76 ±0.00 | 6.52 ±0.01 |
| PN2* | 7.31 ±0.01 | 6.76 ±0.01 | 7.30 ±0.01 | 6.31 ±0.01 |
| PN3-25°C | 7.28 ±0.00 | 6.61 ±0.01 | 7.25 ±0.00 | 6.21 ±0.01 |
| PN3-40°C | 7.28 ±0.00 | 6.24 ±0.00 | 6.96 ±0.00 | 6.25 ±0.02 |
| PN3-4°C | 7.28 ±0.00 | 6.46 ±0.00 | 6.80 ±0.01 | 6.48 ±0.00 |
| PN3* | 7.28 ±0.00 | 7.52 ±0.01 | 7.10 ±0.00 | 6.43 ±0.01 |
| PN4-25°C | 7.09 ±0.00 | 6.31 ±0.01 | 6.89 ±0.00 | 5.95 ±0.01 |
| PN4-40°C | 7.09 ±0.00 | 6.12 ±0.02 | 6.90 ±0.02 | 5.72 ±0.02 |
| PN4-4°C | 7.09 ±0.00 | 6.09 ±0.01 | 6.53 ±0.01 | 6.22 ±0.00 |
| PN4* | 7.09 ±0.00 | 6.93 ±0.01 | 6.98 ±0.00 | 6.29 ±0.01 |

*: Sterilizasyon işlemine tabi tutulmamıştır, n=3, SH: Standart hata

En düşük pH değeri 5.72 olarak tespit edilmiştir ve 6 aylık kararlılık süresince, değerler gözün tolere edebileceği aralığın (Worth ve Cronin, 2001) dışına çıkmamıştır. pH değerlerindeki düşmenin nedeni SLN'lerde tartışıldığı gibi somut olarak tespit edilememiştir.

Polimerlerin yapısından ve oluştuğu monomerlerden bağımsız olarak, vücutta parçalanabilen poliesterlerin hidrolizindeki farklılıkları ortaya çıkaran en önemli parametre pH'dır. Degradasyon ve degradasyona bağlı olarak oluşan EM salımı, düşük ve yüksek pH değerleri ile artırılabilirken, nötral pH da ise genellikle hidrolitik degradasyon sınırlanmıştır. Polimerler kimyasal degradasyonun yanı sıra enzimatik degradasyona da uğrayabilmektedir. Enzimlerin aktivitelerini etkileyen önemli parametrelerden biri de pH olduğu için, polimerlerin hem enzimatik hem de kimyasal degradasyonunda pH dikkate alınmalıdır (Malmsten, 2002b).

Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde Miktar Tayini

PN formülasyonlarında EM Miktar Tayini bölümünde (Sayfa 46) açıklanan şekilde, HPLC yöntemi ile yapılan tayinlerden elde edilen sonuçlara göre, PN1 % 0.101 ±0.003 (SH), PN2 % 0.097 ±0.003 (SH), PN3 % 0.214 ±0.010 (SH), PN4 % 0.191 ±0.008 (SH) oranında EM taşımaktadırlar (n=3). 8. ayın sonunda gerçekleştirilen analizlerde ise, PN1'in % 0.107 ±0.006 (SH), PN2'nin % 0.116 ±0.008 (SH), PN3'ün % 0.229 ±0.020 (SH), PN4'ün % 0.235 ±0.013 (SH) (25°C ±1°C'de saklanan formülasyonlar) oranında EM taşıdıkları belirlenmiştir (n=3).

PN'lerin kararlılık çalışmaları süresince yapılan analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm PN formülasyonlarının parçacık boyutları nanometre aralığında kalmış ve formülasyonlar arasında bir seçime olanak sağlamamıştır. pH

değerleri 6 ay süresince azalmış, ancak yine de fizyolojik pH aralığında kalmıştır. Bu nedenle, zeta potansiyel değerleri göz önünde tutularak en yüksek elektriksel iletkenliğe sahip olan PN4 formülasyonu *in vivo* çalışmalar için seçilmiştir.

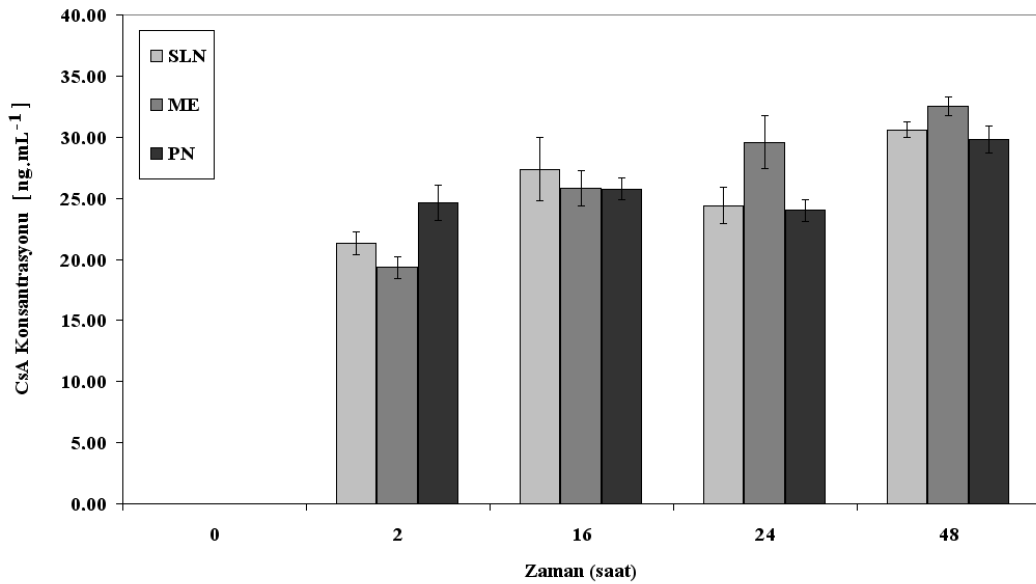
***In Vivo* Çalışmalar**

İrritasyonun Belirlenmesi

Hayvanlara formülasyonların uygulanmasının ardından gözde oluşabilecek irritasyon, uygulama yapılmayan göz referans alınarak kontrol edilmiştir. Uygulama sırasında ve sonrasında irritasyonla ilgili olarak herhangi bir kızarıklık veya başka bir rahatsızlık belirlenmemiştir.

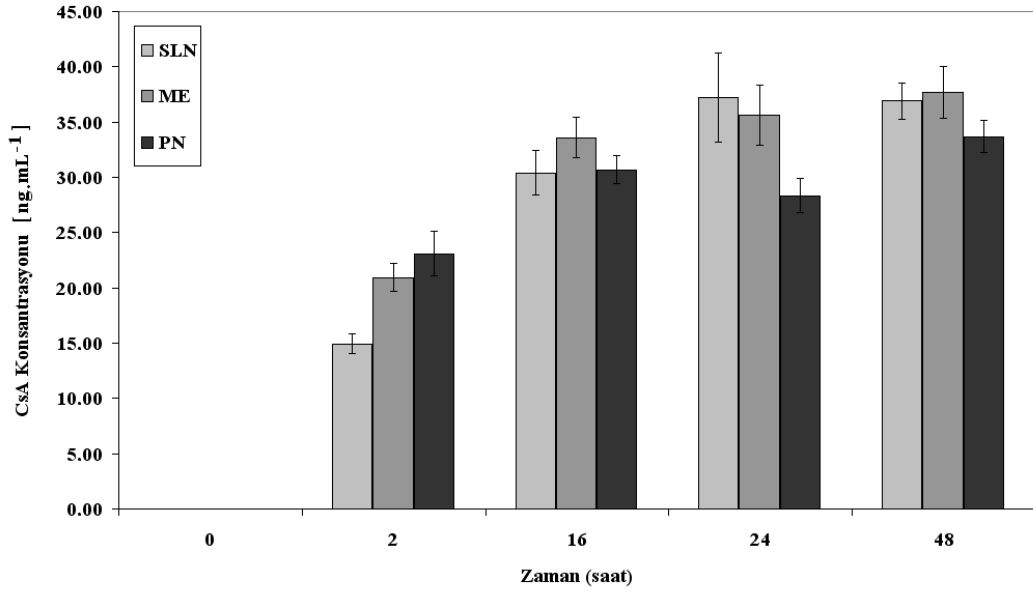
Hümör Aköz ve Hümör Vitröz Sıvı Örneklerinde Siklosporin A Miktar Tayini

Formülasyonların Göze Uygulanışı ve Örneklerin Alınması konusunda (Sayfa 46) anlatılan şekilde alınan ve analize kadar buzdolabında ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) saklanan hümör aköz ve hümör vitröz sıvı örneklerindeki CsA miktarları EIA cihazı ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerde, 2., 16., 24. ve 48. saatlerde hümör aközde belirlenen CsA miktarları Şekil 56'da, hümör vitrözde belirlenen CsA miktarları ise Şekil 57'de sunulmuştur.



Şekil 56. Hümör Aközde Belirlenen Siklosporin A Miktarları (n=6) [Dikey bar: SH]

In vivo çalışmalar için yaklaşık olarak 30-35 kg ağırlığındaki koyunlar kullanılmıştır. Sistemlerin etkinlikleri açısından değerlendirilebilmeleri için, formülasyonlar hayvanların gözüne yaklaşık olarak aynı konsantrasyonda uygulanmıştır.



Şekil 57. Hümör Vitrözde Belirlenen Siklosporin A Miktarları (n=6) [Dikey bar: SH]

Hümör aköz'de belirlenen EM konsantrasyonları değerlendirildiğinde, SLN formülasyonu uygulanan deneklerden alınan örneklerde, 2. saatte 21.300 ± 0.945 ng.mL⁻¹, 16. saatte 27.383 ± 2.582 ng.mL⁻¹, 24. saatte 24.400 ± 1.475 ng.mL⁻¹, 48. saatte 30.600 ± 0.663 ng.mL⁻¹ konsantrasyonda EM bulunurken, ME formülasyonu uygulanan deneklerde 2. saatte 19.340 ± 0.899 ng.mL⁻¹, 16. saatte 25.833 ± 1.460 ng.mL⁻¹, 24. saatte 29.583 ± 2.138 ng.mL⁻¹, 48. saatte 32.500 ± 0.763 ng.mL⁻¹, PN formülasyonu uygulanan deneklerde ise 2. saatte 24.617 ± 1.464 ng.mL⁻¹, 16. saatte 25.750 ± 0.886 ng.mL⁻¹, 24. saatte 24.000 ± 0.905 ng.mL⁻¹, 48. saatte 29.833 ± 1.107 ng.mL⁻¹ oranında EM belirlenmiştir.

Hümör vitröz'de belirlenen EM konsantrasyonları değerlendirildiğinde de, SLN formülasyonu uygulanan deneklerden alınan örneklerde 2. saatte 14.940 ± 0.923 ng.mL⁻¹, 16. saatte 30.420 ± 1.992 ng.mL⁻¹, 24. saatte 37.250 ± 4.034 ng.mL⁻¹, 48. saatte 36.917 ± 1.654 ng.mL⁻¹, ME formülasyonu uygulanan deneklerde 2. saatte 20.950 ± 1.306 ng.mL⁻¹, 16. saatte 33.600 ± 1.849 ng.mL⁻¹, 24. saatte 35.600 ± 2.700 ng.mL⁻¹, 48. saatte 37.650 ± 2.337 ng.mL⁻¹ konsantrasyonda EM bulunurken, PN formülasyonu uygulanan deneklerde ise 2. saatte 23.080 ± 2.021 ng.mL⁻¹, 16. saatte 30.700 ± 1.298 ng.mL⁻¹, 24. saatte 28.333 ± 1.559 ng.mL⁻¹, 48. saatte 33.667 ± 1.452 ng.mL⁻¹ oranında EM saptanmıştır.

Gözlerden alınan sıvı örneklerinde belirlenen CsA miktarlarının, kitlerin etkinliklerinin belirlendiği $4-47$ ng.mL⁻¹ aralığında değerler almış olması ve bu aralıktaki kitin geri kazanım yüzdesinin % 99.7-100 olması nedeniyle kitlerin güvenilirlik çalışmasına gerek duyulmamıştır (Cyclosporine PLUS Assay, 2006).

Hümör aköz ve hümör vitrözdeki CsA miktarlarında belirtilen standart hata değerlerinin çok yüksek olmaması, sistemlerin bireylerarasındaki farkı oldukça azalttığını göstermektedir. 48. saatin sonunda, özellikle hümör vitröz'de artan konsantrasyonda EM saptanmış, bu sayede formülasyonların tekrarlanan uygulamalarına gerek olmaksızın sistemlerden EM'nin kontrollü salım gösterdiği belirlenmiştir.

Oküler uygulanan EM'lerin yaklaşık olarak yalnızca % 5'lik kısmı istenilen bölgelere lokalize olabilmektedir. Kalan kısım gözyaşı sıvısı ile taşınarak nazolakrimal kanala ve oradan da burun boşluğuna geçmekte ve buradan sistemik dolaşıma karışarak istenmeyen yan etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir (Gulsen ve Chauhan, 2005).

CsA'nın eliminasyon yarı ömrü 8 saat olarak belirtilmektedir (Chock, 2000). Oral uygulamanın ardından dozun % 90'ı safra ile (<% 1 değişmeden) ve % 6'sı idrarla (< % 0.1 değişmeden) atılmaktadır (Inoue ve ark., 2000). Dar terapötik pencereye sahip olduğu ve EM absorpsiyonunda, dağılımında, metabolizasyonunda ve eliminasyonunda bireylerarası çeşitlilik olduğu için başarılı bir tedavi için EM kan düzeylerinin takip edilmesi gerekmektedir (Stettin ve ark., 2006).

Çok seçici, ancak zaman gerektiren analiz yöntemi olan HPLC (Gulbis ve ark., 1997), kandaki CsA miktarlarının analizinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. CsA'nın kromatografik yöntemlerinde karşılaşılan en büyük sorun, maddenin düşük dalga boyunda (210 nm) UV dedektör ile gerçekleştirilen analizlerinde kullanılacak kromoforların bulunamamasıdır. Pek çok madde bu dalga boyunda ışığı absorplamakta ve maddelerin uzaklaştırılması da çok karmaşık işlemler gerektirmektedir. Çalışmalarda, genellikle, asetonitril ile proteinlerin çöktürülmesini takip eden ve çok zaman gerektiren katı faz ekstraksiyonu kullanılmaktadır. Ekstraksiyonun ardından örnekteki bazı kalıntılar nedeniyle, uygulamanın ardından uzun yıkama prosedürleri HPLC ile kan örneklerinin çalışılmasını güçleştirmekte ve bu nedenle immün yöntemler analizlerde tercih edilmektedir (Amini ve Ahmadiani, 2003).

FPIA (Abbot Diagnostics) EMIT[®] (Syva), RIA (INCSTAR) monoklonal antijenlerin kullanıldığı, HPLC yerine tercih edilebilecek yöntemler olarak tanımlanmıştır (Gulbis ve ark., 1997).

% 2 oranında CsA'nın zeytinyağı içinde çözündürülmesi ile hazırlanan göz damlası, hastaların gözlerine, katarakt ameliyatından 72 saat önce başlanarak, her 6 saatte 2'şer damla olmak üzere damlatılmış, hümör aköz örnekleri belli zaman aralıkları ile alınmıştır. Örneklerdeki CsA miktarı polarize immünofloresans yöntemi (Abbott) ile analiz edilmiştir (Diaz-Llopis ve Menezo, 1989).

Kornea naklinde doku reddini önlemek amacıyla farelerle yapılan bir başka çalışmada, kas içine 400 µL olarak gün içinde farklı sayıda uygulanan CsA, farklı maddeler ile kıyaslanmış ve farelerden alınan kan örneklerinin ELISA ile analizi sonrasında kandaki CsA miktarı belirlenmiştir (Zhang E.P. ve ark., 2000).

CsA'nın oküler penetrasyonunun araştırıldığı çalışmada, zeytin yağı ile hazırlanan formülasyon, oral ve topik olarak uygulanmış ve bir hafta uygulamalara devam edilmiştir. Tavşanlar 1 mL.kg⁻¹ oranında sodyum Pentobarbital[®] enjeksiyonu ile öldürülmüş, kan ve gözyaşı sıvıları alınarak madde miktarı RIA ile nonapesifik poliklonal antijenler veya monoklonal antijenler kullanılarak analiz edilmiştir (BenEzra ve Maftzir, 1990).

HPLC yöntemi ile, FPIA, ekstraksiyon gerektirmeyen CEDIA yöntemi, TDx monoklonal FPIA yöntemi, EMIT ve poliklonal FPIA yöntemleri, karaciğer doku nakli gerçekleşen hastalardan alınan kanlar kullanılarak karşılaştırılmış ve FPIA,

CEDIA ve EMIT yöntemleri ile HPLC'den elde edilen sonuçlara çok yakın değerlere ulaşılmıştır (Tredger ve ark., 2000).

Çalışmada elde edilen *in vivo* analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SLN formülasyonu 2. saatte yüksek EM konsantrasyonu oluşturmuş ve 48 saat süresince hümör aköz ve hümör vitröz de oluşan konsantrasyonu devam ettirmiştir. ME formülasyonu her iki göz sıvısında da artan oranda EM konsantrasyonu oluştururken, PN formülasyonu 2. saatte her iki sistemden de daha yüksek EM konsantrasyonuna ulaşmış ve konsantrasyonu belli bir düzeyde 48 saat süresince korumuştur.

PN formülasyonunun hümör vitröz'de 2. saatteki en yüksek EM konsantrasyonunu oluşturması sistemin oküler penetrasyonunun diğer sistemlerden daha yüksek olduğunu ve gözün iç tabakalarına kadar EM'nin kolayca taşınabildiğini göstermiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde ise, sistemler arasında bir fark görülmemiştir ($p>0.05$, SPSS-Bağımsız Örneklerde T Testi).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Kararlılık çalışmaları süresince yapılan *in vitro* analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SLN, ME ve PN formülasyonlarının tümünün parçacık büyüklükleri nanometre aralığında kalmış ve oküler kullanıma engel olacak agregatlar oluşmamıştır. Zeta potansiyel değerlerindeki en büyük azalma ME formülasyonunda görülmüş, ancak azalan potansiyeller negatif aralığa düşmemiştir. SLN ve PN formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri yüksek değerler olarak sistemlerin kararlılığını gösteren bir başka parametre olmuştur. DSC, XRD, IR ve NMR analiz sonuçları SLN formülasyonlarının kararlılıklarını gösterebilir de, pH değerlerinin 2. aydan itibaren düşmesi, SLN formülasyonlarının oküler kullanımını güçleştirmektedir.

In vivo çalışma sonuçları değerlendirildiğinde ise, SLN ve PN formülasyonları aköz hümör ve vitröz hümörün her ikisinde de yüksek EM konsantrasyonuna 2. saatte ulaşmış ve EM konsantrasyonunu 48 saat süresince korumuşlardır. PN formülasyonları 2. saatte aköz hümörde ve vitröz hümörde daha yüksek EM konsantrasyonu oluşturarak gözdeki penetrasyonu en iyi olan formülasyon olmuştur. ME formülasyonu analiz zamanlarında artan oranda EM konsantrasyonunu oküler sıvılarda oluşturmuş ve en yüksek konsantrasyona 48. saatte ulaşabilmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen *in vitro-in vivo* analiz sonuçları değerlendirildiğinde hazırlanan sistemler arasında PN formülasyonu CsA'nın oküler formülasyonunda umut vaat eden formülasyon olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, Allergan® firmasının Restasis® oküler emülsiyonu ile çalışmada belirlenen PN formülasyonu karşılaştırılarak, hümör aköz, hümör vitröz, kornea, iris ve retina örnekleri ile oküler biyoyararlanım çalışması yapılacaktır.

KAYNAKLAR

Abdulrazik, M., Tamilvanan, S., Khoury, K., Benita, S., Ocular delivery of cyclosporin A II. Effect of submicron emulsion's surface charge on ocular distribution of topical cyclosporin A, *S.T.P. Pharm. Sci.*, 11 (6), 427-432 (2001).

Ahlin, P., Kristl, J., Smid-Korbar, J., Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions, *Acta Pharm.*, 48, 259-267 (1998).

Alany, R.G., Rades, T., Nicoll, J., Tucker, I.G., Davies, N.M., W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention, *J. Contr. Rel.*, 111 (1-2), 145-152 (2006).

Allison, A. C., Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward, *Immunopharmacology*, 47 (2-3), 63-83, (2000).

Almeida, A.J., Runge, S., Müller, R.H., Investigations on solid lipid nanoparticles (SLN) as colloidal carriers for protein antigens, *Proceedings of International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*, 15-19 June, Stockholm, 837-838 (1997).

Amini, H., Ahmadiani, A., Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 795, 209-214 (2003).

Apaydın, C., Anatomi, In: *Temel göz hastalıkları*, P. Aydın, Y.A. Akova (Eds), Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 3-25 (2001).

Ayannides, C.A., Ktistis, G., A rheological study on microemulsions gels of isopropyl myristate, polysorbate 80, glycerol and water, *J Cosmet Sci.*, 50, 1-7, (1999).

Bachhav, Y.G., Date A.A., Patravale, V.B., Exploring the potential of N-methyl pyrrolidone as a cosurfactant in the microemulsion systems, *Int. J. Pharm.*, 326 (1-2), 186-189 (2006).

BenEzra, D., Maftzir, G., Ocular penetration of cyclosporin A, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31(7), 1362-1366 (1990).

Bhargava, H.N., Narurkar, A., Lieb, L.M., Using microemulsions for drug delivery, *Pharm. Tech.*, 46-52 (1987).

Binks, B.P., Fletcher, P.D.I., Taylor, D.J.F., Temperature intensive microemulsions, *Langmuir*, 13 (26), 7030-7038 (1997).

Biruss, B., Kahlig, H., Valenta, C., Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones, *Int. J. Pharm.*, 328 (2), 142-151 (2007).

Brandl, M., High-pressure homogenization techniques for the production of liposome dispersions: potential and limitations, emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs, In: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, R.H. Müller, S. Benita, B. Böhm (Eds), Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 267-294 (1998).

Brannon-Peppas, L., Peppas, N., Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy, (Ed), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj.San. Tic Ltd. Şti., İstanbul, 21-40 (2002).

British Pharmacopoeia, CD version, 1754-1755 (1993).

Calvo, P., Sánchez, A., Martínez, J., López, M.I., Calonge, M., Pastor, J.C., Alonso, M.J., Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporin A, *Pharm. Res.*, 13(2), 311-315 (1996).

Casale, F., Lupo, F., Passera, R., Liddo, G., Moscato, D., Mosso, R., Zara, G.P., Eandi, M., Salizzoni, M., Pharmacokinetics of cyclosporine in recipients of marginal versus standart liver transplants, *Pharm. Res.*, 54, 287-292 (2006).

Cavallari, C., Rodriguez, L., Albertini, B., Passerini, N., Rosetti, F., Fini, A., Thermal and fractal analysis of diclofenac/Gelucire 50/13 microparticles obtained by ultrasound-assisted atomization, *J. Pharm. Sci.*, 94(5), 1124-1134 (2005).

Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., Sterilization and freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 148, 47-54 (1997).

CEDIA[®] Cyclosporine PLUS Assay Specification Sheet, Microgenics Corporation Fremont, Amerika, (2006).

Cengiz, E., Titanyum Dioksit İçeren Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2003)

Cengiz, E., Wissing, S.A., Müller, R.H., Yazan Y., Sunblocking efficiency of various TiO₂-loaded solid lipid nanoparticle formulations, *J. Cosmet. Sci.*, 28, 371–378 (2006).

Chambers, E., Mitragotri, S., Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes, *J. Control. Release*, 100 (1), 111-119 (2004).

Chan, J., El Maghraby, G.M.M., Craig, J.P., Alany, R.G., Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.*, 328, 65–71 (2007).

Châteauvert, N., Côté, H., Circadian variations in the pharmacokinetics of a new microemulsion formulation of cyclosporine in cardiac transplant recipients, *Pharmacotherapy*, 18 (2), 364-370 (1998).

Chen, H., Chang. X., Du, D., Li, J., Xu, H., Yang, X., Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery, *Int. J. Pharm.*, 315, 52-58 (2006).

Chimalakonda, A., Shah, R.B., Mehvar, R., High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine A in rat blood and liver using a commercially available internal Standard, *J. Chromatogr. B*, 772, 107-114 (2002).

Chock, G., Cyclosporine: Pharmacology, In: Cyclosporine; Clinical Application in Autoimmune Diseases, D. E. Yocum, (Ed), Harcourt Health Communications, Philadelphia, 15-29 (2000).

Cooney G.F., Jeevanandam, V., Choudry, S., Feutren, G., Mueller, E.A., Eisen, H.J., Comparative bioavailability of neoral and sandimmune in cardiac transplant recipients over 1 year, *Transplantation Proceed.*, Elsevier science Inc, New York, 30, 1892-1894 (1998).

Corswant, C., Thoren E.G., Solubilization of sparingly soluble active compounds in lecithin-based microemulsions: Influence on phase behavior and microstructure, *Langmuir*, 15, 3710-3717 (1999).

Corswant, C., Thoren, P., Engström, S., Triglyceride-based microemulsions for intravenous administration of sparingly soluble substances, *J. Pharm. Sci.*, 87 (2), 200-208 (1998).

Curren, R.D., Harbell, J.W., *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, R. Osborne, J.K. Maurer, A.O. Barel, (Eds), Marcel Dekker Incorporated, New York, 119-145, 2001.

(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051199&ppg=136>)

Dai, J., Nagai, T., Wang, X., Zhang, T., Meng, M., Zhang, Q., PH-sensitive nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine A, *Int. J. Pharm.*, 280, 229-240 (2004).

Dangé, C., Maincent P., Ubrich, N., Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats, *J. Control. Release*, 117 (2), 163-170 (2006)

Demirel, M., Pribedil Katı Lipit Nanopartiküllerinin Formülasyonu ve *In Vitro-In Vivo* Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1999).

Demirel, M., Yazan, Y., Katı lipit nanopartiküller (SLN), *FABAD*, 25, 167-179 (2000).

Diane, T.L., Acheampong, A., Chien, D.S., Usansky, J., Pharmacokinetic and pharmacodynamic correlations of ophthalmic drugs, In: *Ocular Therapeutics and Drug Delivery A Multi-Disciplinary Approach*, I.K. Reddy (Ed), Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 133-148 (1996).

Diaz-Llopis, M., Menezo, J.L., Penetration of % 2 cyclosporin eyedrops into human aqueous humour, *Br. J. Ophthalmol.*, 73, 600-603 (1989).

Dingler, A., Hildebrand, G., Keilholz, J., Pfeiffer, S., Debus, N., Müller, R.H., Gohla, S., Electron and fluorescence micrographical characterisation of LipopearlsTM (SLMTM), *Proceedings of International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*, 15-19 June, Stockholm, 24, 925-926 (1997).

Dingler, A., Hildebrand, G., Niehus, H., Müller, R.H., Cosmetic anti-aging formulation based on vitamin E-loaded solid lipid nanoparticles, Proceedings of International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials, 15-19 June, Stockholm, 25, 433-434 (1998a).

Dingler, A., Müller, R.H., Gohla, S., Incorporation of hydrophilic active ingredients in solid lipid nanoparticles for the topical application, Proceeding 2nd World Meeting APGI/APV, 25-28 May, Paris, 625-626 (1998b).

Dingler, A., Blum, R.P., Niehus, H., Müller, R.H., Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLNTM/ LipopearlsTM)- a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, J. Microencapsul., 16 (6), 751-767 (1999).

Freitas, C., Müller, R.H., Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN^(TM)) dispersions, Int. J. Pharm., 168 (2), 221-229 (1998a).

Freitas, C., Müller, R.H., Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM), Eur. J. Pharm. Biopharm., 46, 145-151 (1998b).

Galindo-Rodríguez, S.A., Puel, F., Briancon, S., Allémann, E., Doelker, E., Fessi, H., Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles, Eur. J. Pharm. Sci., 25 (4-5), 357-367 (2005).

Gangrade, N.K., Gaddipati, N.B., Ganesan, M., Reddy, I.K., Topical ophthalmic formulations: Basic consideration, In: Ocular Therapeutics and Drug Delivery, A Multi-Disciplinary Approach, I.K. Reddy (Ed), Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 377-405 (1996).

Goddeeris C., Cuppob, F., Reynaers, H., Bouwmanc, W.G , Van den Mooter, G., Light scattering measurements on microemulsions: estimation of droplet sizes, Int. J. Pharm., 312, 187-195 (2006).

Gohla, S.H., Dingler, A., Scaling up feasibility of production of solid lipid nanoparticles (SLNTM), Pharmazie, 56 (1), 61-63 (2001).

Gómez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., Fattal, E., Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles, Int. J. Pharm., 331, 153-159 (2007).

Grassi, M., Coceani, N., Magarotto, L., Mathematical modeling of drug release from microemulsions: theory in comparison with experiments, *J. Colloid. Interface. Sci.*, 228, 141-150 (2000).

Gref, R., Quellec, P., Sanchez, A., Calvo, P., Dellacherie, E., Alonso, M., Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 51, 111-118 (2001).

Gualbert, J., Shahgaldian P., Coleman, A.W., Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin, *Int. J. Pharm.*, 257, 69-73 (2003).

Guerrero, D.Q., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allemann, E., Doelker, E., Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26 (2), 211-218 (2005).

Gulbis, B., Heijden, J. V., As, H., Thiry, P., Whole blood cyclosporin monitoring in liver and heart transplant patients: avaluation of the specificity of a fluorescence polarization immunoassay and an enzyme-multiplied immunoassay technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 957-963 (1997).

Gulsen, D., Chauhan, A., Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophthalmic drug delivery vehicle, *Int. J. Pharm.*, 292, 95-117 (2005).

Gürsoy, A.Z., Oküler sistemler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy, (Ed), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj.San. Tic Ltd. Şti., İstanbul, 197-217 (2002).

Gürsoy, A.Z., Kontrollü salım sistemleri, In: *Farmasötik Teknoloji- Temel konular ve Dozaj Şekilleri*, A.Z. Gürsoy, (Ed), Pıksel Bilişim Matbaacılık, Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., İstanbul, 409-422 (2004).

Hasse, A., Keipert, S., Development and characterization of microemulsions for ocular application, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 43, 179-183 (1997).

He, Y., Johnson, J.L., Yalkowsky, S.H., Oral formulation of a novel antiviral agent, PG301029, in a mixture of Gelucire 44/14 and DMA (2:1, wt/wt), *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 06 (01), E1-E5 (2005).

Hecht, G., Roehrs, R.E., Lang, J.C., Rodeheaver, D.P., Chowhan, M.A., Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products, In: Modern Pharmaceutics, G.S. Banker, C.T. Rhodes (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, 489-547 (1996).

Heiati H., Tawashi, R., Phillips, N.C., Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization, J. Microencapsul., 15(2), 173-184 (1998).

Henderson, D.R., Methods for protein binding enzyme complementation assays, Amerika, Patent No: 4708929 (1987).

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, Biomaterials, 24, 4283-4300 (2003).

(http-1) Gross anatomy of the eye, <http://webvision.med.utah.edu/anatomy.html>, (18.12.2006)

(http-2) Gözün basit anatomisi, <http://www2.bayar.edu.tr/baristoprak/anatomi.htm>, (18.12.2006)

(http-3) Anatomy of an eye, <http://www.lasersite.com/Anatomy>, (18.12.2006).

(http-4) ISTOLOGIA – Prof. Pezzetti-cornea20he.jpg
www.webmed.unibo.it/.../cornea20he.jpg

(http-5) Eye anatomy, <http://www.stlukeseye.com/anatomy/Cornea.asp>, (18.12.2006)

(http-6) Anatomi <http://www.gozenur.com.anatomi.asp>, (18.12.2006)

(http-7) Anatomy of the eye, <http://www.discoveryfund.com/anatomyoftheeye.html>, (18.12.2006)

(http-8) Sandimmun Neoral® Ürün Bilgisi, Novartis. http://www.novartis.com.tr/pharma/01_html/neoral.asp, (18.12.2006)

([http-9](http://www.restasis.com/_learn_about/default.htm)) Learn about restasis, http://www.restasis.com/_learn_about/default.htm, (18.12.2006).

Husek, A., High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine A and its oral solutions, *J. Chromatogr.*, 759, 217-224 (1997).

Hwang, S.R., Lim, S.J., Park, J-S., Kim, C.K., Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans- retinoic acid for parenteral administration, *Int. J., Pharm.*, 276, 175-183 (2004).

ICH Topic Q2B, Validation of analytical procedures: Methodology, The European Agency for the evaluation of medicinal products, CPMP/ICH/281/95, Step 4, Consensus guideline, 6 November 1996.

Igartua, M., Saulnier, P., Heurtault, B., Pech, B., Proust, J.E., Pedraz, J.L., Benoit, J.P., Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite, *Int. J. Pharm.*, 233 (1-2), 149-157 (2002).

Inoue, K., Amano, S., Kimura, C., Sato, T., Fujita, N., Kagaya, F., Kaji, Y., Oshika, T., Tsuru, T., Araie, M., Long-term effects of topical cyclosporine A treatment after penetrating keratoplasty, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 44 (3), 302-305 (2000).

İnfrared spektroskopisi, In: *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, A. Yıldız, Ö. Genç, S. Bektaş (Eds), Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, 177-201, 1997.

Jani R., Rhone, E., Ion exchange resin technology for ophthalmic applications, In: *Modified-Release Drug Delivery Technology*, M. Rathbone, (Eds) Marcel Dekker Incorporated, New York, 315-328 (2002). (<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051052&ppg=340>)

Jenning, V., Gohla, S., Müller, R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN), effect of homogenization parameters on drug stability, *Proceeding 2nd World Meeting APGI/APV*, 25-28 May, Paris, 619-620 (1998).

Jenning, V., Thünemann, A.F., Gohla S.H., Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.*, 199, 167-177 (2000a).

Jenning, V., Mäder, K., Gohla S.H., Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study, *Int. J. Pharm.*, 205, 15-21 (2000b).

Jores, K., Mehnert W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K., Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *J. Control. Release*, 95, 217-227 (2004).

Kachi, S., Hirano, K., Takesue, Y., Miura, M., Usual corneal deposit after the topical use of cyclosporine as eyedrops, *Am. J. Ophthalmol.*, 130 (5), 667-669 (2000).

Kaş, H.S., İlaç taşıyıcı partiküler sistemler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy (Ed), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj.San. Tic Ltd. Şti., İstanbul, 65-103 (2002).

Kaur, I.P., Kanwar, M., Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide, *Int. J. Pharm.*, 199, 119-127 (2000).

Kawakami, K., Yoshikawa, T., Moroto, Y., Kanaoka, E., Takashi, K., Nishihara, Y., Masuda, K., Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs I. Prescription design, *J. Control. Release*, 81, 65-74 (2002a).

Klang, S.H., Parnas, M., Benita, S., Emulsions as drug carriers-possibilities, limitations and future perspectives, In: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, R.H. Müller, S. Benita, B. Böhm (Eds), Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 31-65 (1998).

Kogan, A., Garti, N., Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, 123–126, 369–385, (2006).

Kompella U.B. and Lee, V.H.L., Barriers to drug transport in ocular epithelia, In: *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, L. Gordon (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 317-377 (1999)
(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051460&ppg=334>).

Kristl, J., Volk, B., Ahlin, P., Gomba, K., Sentjurc, M., Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR, *Int. J. Pharm.*, 256, 133-140 (2003).

Kumar, M., Singhal, S.K., Singh, A., Development and validation of a stability indicating HPLC assay method for cyclosporine in cyclosporine oral solution USP, *J Pharm. Biomed. Anal.*, 25(1), 9-14 (2001).

Lallemand, F., Felt-Baeyens, O., Besseghir, K., Behar-Cohen, F., Gurny, R., Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 56, 307-318 (2003).

Lallemand, F., Furrer, P., Felt-Baeyens, O., Gex-Fabry, M., Dumont, J.M., Besseghir, K., Gurny, R., A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: Ocular tolerance and in vivo kinetics, *Int. J. Pharm.*, 295, 7-14 (2005a).

Lallemand, F., Perottet, P., Felt-Baeyens, O., Kloeti, W., Philippoz, F., Marfurt, J., Besseghir, K., Gurny, R., A water-soluble prodrug of cyclosporine A for ocular application: A stability study, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26, 124-129 (2005b).

Law, S.L., Huang, K.J., Chiang, C.H., Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery corneal penetration and absorption, *J. Control. Release*, 63, 135-140 (2000).

Lawrence, M.J., Rees, G.D., Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 45, 89-121 (2000).

Lee, Y.C., Simamora, P., Pinsuwan, S., Yalkowsky, H., Review on the systemic delivery of insulin via the ocular route, *Int. J. Pharm.*, 233, 1-18 (2002).

Lee, Y.J., Chung, S.J., Shim, C.K., The potential replacement of HPLC by ¹²⁵I-RIA for the characterization of cyclosporin A: a bioavailability study after oral administration in healthy human subjects, *J Pharm. Biomed. Anal.*, 22(1), 183-188 (2000).

Lee, E.J., Lee, S.W., Choi, H.G., Kim, C.K., Bioavailability of cyclosporin A dispersed in sodium lauryl sulfate-dextrin based solid microspheres, *Int. J. Pharm.*, 218, 125-131 (2001).

Lippacher, A., Müller, R.H., Mader, K., Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 214 (1-2), 9-12 (2001).

Lloyd, A.W., Faragher R.G.A., Denyer, S.P., Ocular biomaterials and implants, *Biomaterials*, 22 (8), 769-785 (2001).

Lv, F.F., Zheng, L.Q., Tung, C.H., Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, 301, 1-2, 237-246 (2005).

Lv, F.F., Li, N., Zheng, L.Q., Tung, C.H., Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 62, 288-294 (2006).

Malmsten, M., Microemulsions, In: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery* M., Martin (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 133-161 (2002a). (<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051405&ppg=153>)

Malmsten, M., Polymer particles, In: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, M. Martin (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 261-291 (2002b) (<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051405&ppg=270>)

Malmsten, M., Degradation of surfactants and polymers in drug delivery, In: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, M., Martin (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 293-317 (2002c) (<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051405&ppg=306>)

Manjunath, K., Reddy, J.S., Venkateswarlu, V., Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27 (2), 127-144 (2005).

Mehnert, W., Mäder, K., Solid lipid nanoparticles; production, characterization and application, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47(2-3), 165-196 (2001).

Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y., Yang, X., Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* 56, 189-196 (2003).

Moulik, S.P., Paul, B.K., Structure, dynamics and transport properties of microemulsions, *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, 78, 99-195 (1998).

Mühlen, A.Z., Schwarz, C., Mehnert, W., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- drug release and release mechanism, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 45, 149-155 (1998).

Müller, R.H., Heinemann, S., Fat emulsions for parenteral nutrition. I: evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of physical stability, *Clin. Nutr.*, 11, 223-236 (1992).

Müller, R.H., Heinemann, S., Fat emulsions for parenteral nutrition II: characterisation and physical long-term stability of lipofundin MCT/LCT, *Clin. Nutr.*, 12, 298-309 (1993).

Müller, R.H., Mehnert, W., Lucks, J.S., Schwarz, C., Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C., Rühl, D., Solid lipid nanoparticles (SLN)-an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 41(1), 62-69 (1995).

Müller, R.H., Mehnert, W., Dingler, A., Runge, S.A., Mühlen, A zur, Freitas, C., Solid lipid nanoparticles (SLNTM, LipopearlsTM)-Present state of development, *Proceedings of International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*, 15-19 June, Stockholm, 24, 923-924 (1997).

Müller, R.H., Particulate systems for the controlled delivery of active compounds in pharmaceuticals and cosmetics, In: *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, J.E. Diederichs, R.H. Müller (Eds.), Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 5(1), 75-90 (1998).

Müller, R.H., Böhm, B.H.L., Nanosuspensions, In: *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*, R.H. Müller, S. Benita, B. Böhm (Eds), Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 149-176 (1998).

Müller, R.H., Lippacher A., Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) as a carrier system for the controlled release of drugs, In: *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, D. Wise, (Ed), Marcel Dekker Inc, New York, 377-391 (2000a).

Müller, R.H., Mader, K., Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 50, 161-177 (2000b).

Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.* 242 (1-2), 121-128 (2002).

Najib, N.M., Idkaidek, N., Adel, A., Mohammed, B., AL-Masri, S., Admour, I., Alam, S.M., Dham, R., Qumaruzaman, Comparison of two cyclosporine formulations in healthy Middle Eastern volunteers: bioequivalence of the new Sigmasporin Microoral and Sandimmun Neoral, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 55(1), 67-70 (2003).

Nimesh, S., Manchanda, R., Kumar, R., Saxena, A., Chaudhary, P., Yadav, V., Mozumdar, S., Chandra, R., Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 323 (1-2), 146-152 (2006).

Olbrich, C., Kayser, O., Müller, R.H., Lipase degradation of dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)- Effect of surfactants, storage time and crystallinity, *Int. J. Pharm.*, 237, 119-128 (2002).

Ortiz, J.A., Postoperative care in liver transplantation, In: *Practical Manual of Abdominal Organ Transplantation*, M. Cosme (Ed), Kluwer Academic Publishers, Hingham, 169-170 (2002).

(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10053399&ppg=18>)

Öner, F., Süspansiyonlar, In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A. Z. Gürsoy (Ed), Pıksel Bilişim Matbaacılık, Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., İstanbul, 257-272 (2004).

Özsoy, Y., Göz, kulak ve buruna uygulanan dozaj şekilleri, In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A. Z. Gürsoy (Ed), Pıksel Bilişim Matbaacılık, Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., İstanbul, 233-244 (2004).

Pignatello, R., Bucolo, C., Spedalieri, G., Maltese, A., Puglisi, G., Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application, *Biomaterials*, 23, 3247-3255 (2002a).

Pignatello, R., Bucolo, C., Ferrara, P., Maltese, A., Puelo, A., Puglisi, G., Eudragit® RS 100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 16, 53-61 (2002b).

Plazonnet, P., Ophthalmic drug delivery, In: Modified-Release Drug Delivery Technology M. Rathbone (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, USA 289-313, (2002)
(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051052&ppg=314>)

Polizelli, M.A., Telis, V.R.N., Amaral, L.Q., Feitosa, E., Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions, *Colloids Surf A: Physicochem. Eng. Aspects*, 281, 230–236 (2006).

Radomska, A., Dobrucki, R., The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters, *Int. J. Pharm.*, 196, 131-134 (2000).

Rao, S., New ophthalmic delivery system (NODS), In: Modified-Release Drug Delivery Technology, M. Rathbone, (Ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 329-339 (2002).
(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10051052&ppg=354>)

Reddy, I.K., Ganesan, M.G., Ocular therapeutics and drug delivery: an overview, In: *Ocular Therapeutics and Drug Delivery, A Multi-Disciplinary Approach*, I.K. Reddy (Ed), Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 3-31 (1996).

Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2 (1), 8-21 (2006).

Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Pr at, V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *J. Control. Release*, 116 (1),1-27 (2006).

Richter T., Keipert, S., In vitro permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione in microemulsions and other components, *Eur. Pharm. and Biopharm.*, 58, 137-143 (2004).

Runge, S.A., Müller, R.H., Solid lipid nanoparticles (SLNTM) for oral administration-drug incorporation and degradation, future strategies for drug delivery with particulate systems, In: *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, J.E. Diederichs, R.H. Müller (Eds.), Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 91-100, (1998).

Saettone, M.F., Giannaccini, B., Monti, D., Ophthalmic emulsions and suspensions, In: *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, F. Nielloud, G. Marti-Mestres (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, 303-322 (2000).

Sanna, V., Kirschvink, N., Gustin, P., Gavini, E., Roland, I., Delattre, L., Evrard, B., Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5 (2), Article: 27 (2004).

Schubert., M.A., Müller-Goymann, C.C., Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles- Evaluation of the method and process parameters, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 55 (1), 125-131 (2003).

Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Müller, R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, *J. Control. Release*, 30, 83-96 (1994).

Schwarz, C., Mehnert, W., Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 157, 171-179 (1997).

Siekman, B., Westesen, K., Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 3, 159-175 (1994).

Siekman, B., Westesen, K., Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 43 (2), 104-109 (1996).

Sterilization and sterility assurance of compendial articles, In: *USP 24-NF 19*, National Publishing, Philadelphia, Amerika, 2143-2148 (2000).

Stettin, M., Halwachs-Baumann, G., Genser, B., Frühwirth, F., März, W., Khoschorur, G.A., Determination of cyclosporine A in whole blood: Comparison of a chromatographic method with three different immunological methods, *Talanta*, 69, 1100–1105 (2006).

Sultana, Y., Aqil, M., Ali, A., Ocular inserts for controlled drug delivery of pefloxacin metylate: Preparation and evaluation, *Acta. Pharm.*, 55, 305-314 (2005).

Sun, W., Wang, H., Xie, C., Hu, Y., Yang X., Xu, H., An attempt to directly trace polymeric nanoparticles in vivo with electron microscopy, *J. Control. Release*, 115 (3), 259-265 (2006).

Swafford, S.K., Bergmann, R.W., Migliorese, K.G., Lichtin, J.L., Characterization of swollen micelles containing linoleic acid in a microemulsion system, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 235-247 (1991).

Tamilvanan, S., Khoury, K., Gilhar, D., Benita, S., Ocular delivery of cyclosporin A I. Design and characterization of cyclosporin A-loaded positively-charged submicron emulsion, *S.T.P Pharm. Sci.*, 11 (6), 421-426 (2001).

Tamilvanan, S., Benita, S., The Potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 58, 357-368 (2004).

Tammara, V.K., Crider, M.A., Prodrugs: a chemical approach to ocular drug delivery, In: *Ocular Therapeutics and Drug Delivery A Multi-Disciplinary Approach*, I.K. Reddy (Ed), Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 285-335 (1996).

The Merck Index, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, 431, 1989.

Tomšič, M., Podlogar, F., Gašperlin, M., Bešter-Rogača, M., Jamnik, A., Water-Tween 40[®]/Imwitor 308[®]-isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: Small-angle X-ray scattering study, *Int. J. Pharm.*, 327, 170-177 (2006).

Toshida, H., Nakayasu, K., Kanai, A., Effect of cyclosporin A eyedrops on tear secretion in rabbit, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 42, 168-173 (1998).

Tran, H., Mali, D., Chrzanowski, A., Puc, M.M., Matthews, M.S., Hewitt, C.W., Site-specific immunosuppression using a new formulation of topical cyclosporine A with polyethylene glycol-8 glyceryl caprylate/caprate, *J. Surg. Res.*, 83, 136-140 (1999).

Tredger J.M., Roberts, N., Sherwood, R., Higgins G., Keating, J., Comparison of five cyclosporin immunoassays with HPLC, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38 (11), 1205-1207 (2000).

Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O., Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, 257(1-2), 153-160 (2003).

Türk, G., Ateşşahin, A., Sönmez, M., Yüce, A., Çeribaşı, A. O., Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats, *Theriogenology*, 67 (4), 778-785 (2007).

Ubrich, N., Schmidt, C., Bodmeier, R., Hoffman, M., Maincent, P., Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 288 (1), 169-175 (2005).

Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M.R., Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 241, 341-344 (2002).

Urata, T., Arimori, K., Nakano, M., Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty acid esters and in-vivo evaluation of microspheres, *J. Control. Release*, 58, 133-141 (1999).

Vandamme, T.F., Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges, *Prog. Retin. Eye Res.*, 21, 15–34 (2002).

Venkateswarlu, V., Manjunath, K., Preparation characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles, *J. Control. Release*, 95 (3), 627-638 (2004).

Wang, X.Q., Huang, J., Dai, J.D., Zhang, T., Lü W.L., Zhang, H., Zhang, X., Wang, J.C., Zhang, Q., Long-term studies on the stability and oral bioavailability of cyclosporine A nanoparticle colloid, *Int. J. Pharm.*, 322, 146-153 (2006).

Warisnoicharoen, W., Lansley, A.B., Lawrence, M.J., Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour, *Int. J. Pharm.*, 198, 7-27 (2000).

Washington, N., Ocular drug delivery, In: *Physiological Pharmaceutics : Barriers to Drug Absorption* N. Washington, C. Washington, C.G Wilson. (Eds), CRC Press, London, 249-270 (2000).
(<http://site.ebrary.com/lib/anadolu/Doc?id=10053757&ppg=284>)

Watarai, H., Review: Microemulsions in separation sciences, *J. Chromatogr. A*, 780, 93-102 (1997).

Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J., Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Control. Release*, 48, 223-236 (1997).

Westesen, K., Siekmann, B., Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 151, 35-45 (1997).

Wissing, S.A., Lippacher A., Müller, R.H., Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN), *J. Cosmet. Sci.*, 52, 313-324 (2001a).

Wissing, S.A., Müller, R.H., A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 23 (4), 233-244 (2001b).

Wissing S.A., Kayser, O., Müller, R.H., Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 1257-1272 (2004).

Worth, A.P., Cronin, M.T.D., The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity, *Toxicology*, 169, 119-131 (2001).

You, J., Cui, F., Li, Q., Han, X., Yu, Y., Yang, M., A novel formulation design about water-insoluble oily drug: preparation of zedoary turmeric oil microspheres with self-emulsifying ability and evaluation in rabbits, *Int. J. Pharm.*, 288, 315-323 (2005).

Yazan, Y., Emülsiyon sistemler, In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A. Z. Gürsoy (Ed), Pıksel Bilişim Matbaacılık, Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., İstanbul, 273-286 (2004).

Yazan, Y., Emülsiyon sistemler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy, (Ed), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj.San. Tic Ltd. Şti., İstanbul, 133-150 (2002).

Yazıksız-İşcan, Y., Deriye Uygulanan Katı Lipit Partiküllerin Formülasyonu ve *In Vitro/In Vivo* Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2003).

Yocum, D.E., Allard, S., Cohen, S.B., Emery, P., Flipo, R.M., Goobar, J., Microemulsion formulation of cyclosporin (Sandimmun Neoral®) vs Sandimmun®: comparative safety, tolerability and efficacy in severe active rheumatoid arthritis, *Rheumatology*, 39, 156-164 (2000).

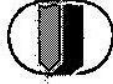
Zaghloul, A.A., Hussain, A., Khan, M.A., Ahsan, F., Development of a HPLC method for the determination of cyclosporin-A in rat blood and plasma using naproxen as an internal standard, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31 (6), 1101-1107 (2003).

Zhang, Q., Yie, G., Li, Y., Yang, Q., Nagai, T., Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 200 (2), 153-159 (2000).

Zhang, E.P., Schulte, F., Bulfone-Paus, S., Hoffmann, F., The effect of corticosteroid and cyclosporin A on murine corneal allograft rejection, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 238, 525-530 (2000).

Zimmermann, E., Müller, R.H., Electrolyte and pH stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 52, 203-210 (2001).

EK 1



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Etik Kurul Kararları

Sayı: 2006/646

Konu: Toplantı

Ref: MSW-Etik-Toplantı/2006-12-04

07 Aralık 2006

ETİK KURUL

Prof. Dr. Erol GÖKTÜRK

Tıp Fakültesi Dekanı (Başkan)
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
E-Mail: aaksit@ogu.edu.tr

Prof. Dr. M. Arif AKŞİT

Klinisyen Doktor (Başkan Yardımcısı)
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Neonatoloji Bilim Dalı Başkanı
Tel: +90. 222. 239 29 79 / 1380 - 2709
Tel & Faks: +90. 222. 229 00 64
E-Mail: aaksit@ogu.edu.tr
E-Mail: maaksit@hotmail.com

Prof. Dr. Bekir YAŞAR

Klinisyen Doktor
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
E-Mail: byasar@ogu.edu.tr

Prof. Dr. Ömer COLAK

Biyokimya Uzmanı
Biyokimya Anabilim Dalı
E-Mail: ocolak@ogu.edu.tr

Prof. Dr. Demet ÖZBATALIK

Klinisyen Doktor
Nöroloji Anabilim Dalı
E-Mail: demetg@ogu.edu.tr

Doç. Dr. Serap İŞIKSOY

Patoloji Uzmanı
Patoloji Anabilim Dalı
E-Mail: bdesi@superonline.com

Doç. Dr. Fatma Sultan KILIÇ

Farmakoloji Uzmanı (Raportör)
Farmakoloji Anabilim Dalı
E-Mail: fskilic@ogu.edu.tr

Doç. Dr. Ömür ELCİOĞLU

Deontoloji Uzmanı
Deontoloji Anabilim Dalı
E-Mail: elcioğlu@ogu.edu.tr

Ecz. Ömer ALTUĞER

Eczacı
Eğitim, Uygulama ve Araştırma Hastanesi
E-Mail: eczeltug@yahoo.com

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ, KOZMETOLOJİ BİLİM DALI BAŞKANLIĞINA,

Anabilim Dalınız Öğretim Üyesi Prof.Dr.Yasemin YAZAN, Arş.Gör.Ebru CENGİZ, Prof.Dr.Nilgün YILDIRIM, Yrd.Doç.Dr.Başar SIRMAGÜL tarafından yürütülmekte olan "Siklosporin A içeren katı lipit nanopartikül ve mikrosünger hazırlanması ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi" başlıklı proje hakkında alınan görüşler ve Etik Kurul Kararı ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Saygılarımla,



Prof. Dr. M. Arif AKŞİT

Etik Kurul Başkan Yardımcısı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

EK: Deney Hayvanları Alt Kom. Başgörsü
ve Etik Kurul Kararı

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tel: +222. 239 37 70- 239 29 79 / 4405- 4406




**Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Etik Kurulu
Deney Hayvanları Alt Komisyonu**


20 Kasım 2006


**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI'NA**

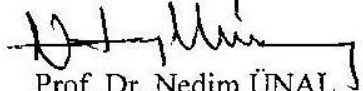
Alt Komisyonumuza gönderilen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Kozmetoloji Bilim Dalı'nın yürütmekte olduğu "Siklosporin A içeren katı lipid nanopartikül ve mikrosünger hazırlanması ve in vitro in vivo değerlendirilmesi" başlıklı projesi tarafımızdan değerlendirilmiştir. Çalışmada hazırlanan siklosporin formülasyonları mezbahada kesilecek olan koyunların gözlerine uygulandıktan sonra kesilen koyunların gözleri çıkarılacak ve alınan gözlerin aköz humor, vitreusi sıvısı, kornea iris ve retina örnekleri alınarak bu dokulardaki siklosporin A düzeyi saptanacaktır. Çalışmanın amacı ve kapsamı belirtilmiş, gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Alt Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.


Gereğini bilgilerinize saygı ile sunarız.

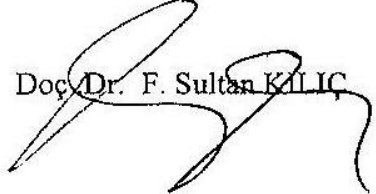

Prof. Dr. Kevser EROL


Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ


Prof. Dr. Tarık ÇAĞA


Prof. Dr. Nedim ÜNAL


Prof. Dr. Sinan ERGİNEL


Doç. Dr. F. Sultan KILIÇ

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL KARARI**

| | |
|--|--|
| <p>04 Aralık 2006 14) KONU BAŞLIK</p> | <p>GELEN GÖRÜŞ: Proje (PR-06-10-31-3): Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kozmetoloji Bilim Dalı-Prof.Dr.Yasemin YAZAN (proje yöneticisi) , Arş.Gör.Ebru CENGİZ, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı-Prof.Dr.Nilgün YILDIRIM, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı-Yrd.Doç.Dr.Başar SIRMAGÜL "Siklosporin A içeren katı lipit nanopartikül ve mikrosünger hazırlanması ve <u>in vitro-in vivo</u> değerlendirilmesi" (Deney Hayvanları Alt Komi. 20 Kasım 2006 tarihli görüşü)</p> |
| <p>04 Aralık 2006 GÖRÜŞLER: 14</p> | <p>Deney Hayvanları Alt Komi. 20 Kasım 2006 tarihli görüşü: Çalışmada hazırlanan siklosporin formülasyonların gözleri çıkarılacak ve alınan gözler aköz humor, vitreusi sıvısı, kornea iris ve retina örnekleri alınarak bu dokulardaki siklosporin A düzeyi saptanacaktır. Çalışmanın amacı ve kapsamı belirtilmiş, gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Alt Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.</p> |
| <p>04 Aralık 2006 KARAR: 14</p> | <p>BAŞVURU BİLGİLERİ: PROTOKOL KODU: ESOGU Etik Kurul, 31 Ekim 2006, No: (PR-06-10-31-3) PROJENİN ADI: "Siklosporin A içeren katı lipit nanopartikül ve mikrosünger hazırlanması ve <u>in vitro-in vivo</u> değerlendirilmesi" BAŞVURULAR: Anabilim/Bilim Dalı 10/10/2006, Bölüm Başkanlığı Dalı / /2006, Dekanlık: / /2006, Etik Kurul Başkanlığına Müracaatı 17/10/2006, Etik Kurul Üyelerine 17/10/2006. SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kozmetoloji Bilim Dalı-Prof.Dr.Yasemin YAZAN (proje yöneticisi) SORUMLU KOORDİNATÖR/Proje Yürütücüsü ÜNVANI/ADI: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kozmetoloji Bilim Dalı-Prof.Dr.Yasemin YAZAN (proje yöneticisi), Arş.Gör.Ebru CENGİZ, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı-Prof.Dr.Nilgün YILDIRIM, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı-Yrd.Doç.Dr.Başar SIRMAGÜL ARAŞTIRMA MERKEZİ: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kozmetoloji Bilim Dalı ESOGÜ ARAŞTIRMA MERKEZİ: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ESOGÜ ARAŞTIRMA MERKEZİ: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı DESTEKLEYİCİ FİRMA: Belirtilmemiştir.</p> |
| <p>ARAŞTIRMA NİTELİĞİ:</p> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ AMAÇLARI AÇISINDAN: a) <i>Tanıtıcı (Descriptive):</i> Örnekte dağılım, frekans dağılımları, b) <i>Analitik (Inferential):</i> ilişkilerin bulunması ▪ YAPILIŞ AMACINA GÖRE: b) <i>Uygulamalı</i> ▪ UYGULAMA BİÇİMLERİ: a) <i>Kaynak tarama (review), b) ileriye yönelik (prospective), c) Kesitsel (cross sectional), d) izleme dayalı, uzamsal (follow up-longitudinal), e) olgu kontrol (case control), f) Grup izleme (cohort, randomize controlled trials), 1) Biyolojik deneyler (bioassay)</i> ▪ ARAŞTIRMA DÜZENLERİ (tanımlanmalıdır): 1) Tek örnek düzeni (one sample design), 2) Bağımsız iki grup düzeni (independent randomized two group design), 3) Bağımlı, eşleştirilmiş iki örnek düzeni (paring design, change over, pre-post dependent two group design), 4) Bağımlı K grup düzeni (randomized K group design), 5) Bağımsız birimlerde tekrarlı deneyler düzeni (randomized block design), 6) Eksik blok düzeni (incomplete block design), 7) Latin kare düzeni (Latin square design), 8) Greko-Latin kare düzeni, 9) Faktöriyel düzenler, 10) Youden kare düzeni, 11) Bölünmüş parseller/bloklar düzeni (split plot/block design), 12) Rasgele kontrollü düzenlemeler, grup izleme, kohort düzeni, 13) Olgu kontrol düzeni, 14) Çapraz tekrarlı düzenler (cross over design), 15) Paralel deneme düzenleri, 16) Ardışık deneme düzenleri (sequential design): açık, kapalı, çarpık ardışık düzenler. ▪ İLAC ARAŞTIRMALARI: (A) 1) Bakanlıkça Ruhsatlandırılmış ilaçlarla çalışma, (B) ÖZEL: 5) Biyoyararlanım /biyoçeğerlilik, 6) Farmakokinetik çalışma-belirtin, 9) İlacın klinik etkinlik, 10) Diğer <p align="center">Deney Hayvan çalışmasıdır.</p> |
| <p>DEĞERLENDİRİLEN ve/veya GEREKLİ DİĞER İLGİLİ BELGELER:</p> | <p>İNCELENEN DOSYA TANIMLAMASI</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: "Siklosporin A içeren katı lipit nanopartikül ve mikrosünger hazırlanması ve <u>in vitro-in vivo</u> değerlendirilmesi", ESOGU Etik Kurul tarihi 31 Ekim 2006, Türkçe.</p> <p>GÖRÜŞE GÖNDERİLEN YERLER ve GÖRÜŞLER</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: Deney Hayvanları Alt Komi. 20 Kasım 2006 tarihli görüşü: Çalışmada hazırlanan siklosporin formülasyonların gözleri çıkarılacak ve alınan gözler aköz humor, vitreusi sıvısı, kornea iris ve retina örnekleri alınarak bu dokulardaki siklosporin A düzeyi saptanacaktır. Çalışmanın amacı ve kapsamı belirtilmiş, gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Alt Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.</p> |

| | | |
|--|--|--|
| | | <p>DOSYADA BULUNAN EVRAKLAR</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: Gerekli literatürler mevcuttur.</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: Deneysel Hayvanlar Yönergesi çalışmacılar tarafından 17.10.2006 tarihinde imzalanmıştır. Proje yöneticisi Deneysel Hayvanlar Yönergesini 10.10.2006 tarihinde imzalamıştır.</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: Çalışmacıların özgeçmişleri mevcuttur.</p> <p>ALINAN KARARLAR</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: 31 Ekim 2006: Deneysel Hayvanlar Alt Komisyonu'na görüşe gönderilmiştir.</p> <p>BELGE ADI/PROTOKOL: 04 Aralık 2006: Deneysel Hayvanlar Alt Komisyonu'nun 20 Kasım 2006 tarihli görüşü: Olumludur.</p> |
| | <p>ÇALIŞMA ESASLARI:</p> | <p>HELSİNKİ DEKLARASYONU (2000 Edinburg versiyonu ve 2002 yılı Washington'da 29. maddeye ve 2004 Tokyo'da 30 Madde eklemeleri ile birlikte) araştırmacılar tarafından uyulacağı kabul edilmiştir.</p> <p>TCK 90 MADDESİNE UYULMASI YASA GEREĞİDİR.</p> <p>İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZUNA UYULMALIDIR.</p> <p>Çalışmacılar tarafından Helsinki deklarasyonunun son revizyonu (Ekim 2000, Edinburg, 52. Dünya Tıp Kurultayı ve 2002 yılı Washington ve 2004 Tokyo Genel Kurul eklemesi) okunup, bu metni kabul ettiklerini ve uygulayacaklarını belirtir imzaları. Ayrıca İyi Klinik Uygulamalar (GCP) metoduna (Sağlık Bakanlığının 29.12.1995 gün ve 51748 sayılı kılavuzu) sadık kalmaları gerekmektedir. (Etik Kurulumuzun istediği 10. Madde)</p> <p><i>Psikiyatri/epidemiolojik/toplumsal konulardaki araştırmalarda Madrid (1996) Bildirgesi göz önüne alınır.</i></p> <p><i>Deneysel Hayvan Çalışmaları için "Deneysel Hayvanlarının araştırma ve eğitiminde kullanılmasında uyulması istenen etik kurallar ve ilkeler (Deneysel Hayvanlarında OGU Deneysel Hayvanlar Yönergesi)" çalışmacılar tarafından imzalanmalı ve eklenmelidir. 5199 Hayvanları Koruma Kanunu (özellikle 9. Maddesi) benimsene zorunludur.</i></p> <p><i>NOT: Hukukumuzda Avrupa Konseyi ve diğer ülkelerle Avrupa Birliği'nin imzaladığı/onayladığı diğer konu ile ilgili etiksel deklarasyon/bildirgelere uyulması gerekmektedir.</i></p> <p>SORUMLULUK KABULÜ: Çalışmacılar dosyaya ekledikleri imza ile sorumluluğu kabul ettiklerini beyan etmektedirler. İmzanın hukuksal olması için; el ile yazılmış ad ve soyad olmalıdır. Paraf/simge niteliğinde çizimler veya mühürler imza yerine geçmemektedir.</p> |
| | <p>ETİK KURULUMUZUN ALDIĞI KARARLARIN ÇERÇEVESİ</p> | <p>Etik Kurul kararları hukuksal açıdan önemli birer uzman görüşü kararı niteliğindedir. Gerektiğinde mahkemelerde de kullanılacağı dikkate alınarak, 5237 Sayılı TCK ve 5271 Sayılı CMK kanunları çerçevelerine uyum sağlanması, insan üzerinde deneylerin TCK kapsamına alınması ile de yasal zorunluluk olmuştur. Etik Kurulumuzun aldığı kararların hukuksal çerçevesinin açıklaması aşağıda yapılmaktadır.</p> <p>ETİK KURUL KURULUŞ GEREKÇESİ: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi birimlerinde yapılacak olan: Bilimsel araştırma, yayın, sağlık hizmetleri uygulaması, eğitim-öğretim, insan üzerinde yapılacak biyomedikal araştırmaları ve deney hayvanı kullanılarak yapılacak bilimsel araştırma ve eğitim-öğretim etkinliklerinde, hasta ve denek haklarını (tüm canlılar için) ve benzeri diğer etkinliklerde deontolojik standartlar ve etik kurallara uyulup uyulmadığını belirlemek, görüş bildirmek, izlemek amacıyla Etik Kurul oluşturulmuştur.</p> <p>ETİK KURUL GÖREV KAPSAMI: Hastalar üzerinde uygulanacak tanı ve tedavi amaçlı "klinik araştırmalar" yanında, hasta veya sağlıklı kişiler üzerinde yapılacak olan ve temel hedefi tanı ve tedavi olmayan tamamen bilimsel nitelikteki "klinik olmayan biyomedikal araştırmalar" da bu kapsam içerisindedir. İnsanlar üzerinde araştırma, klinik deney ve yeni uygulamaların yapılabilmesi ve deney hayvanı kullanılarak yapılacak bilimsel araştırma ve eğitim-öğretim etkinlikleri için önceden etik kuruldan onay alınması gerekir. Kurul bu uygulamaların protokolünü inceler, onaylanan çalışmaların gidişini izler. Başvuru durumunda başka kuruluşlara da görüş bildirilebilir.</p> <p>ETİK KURUL İŞLEVLERİ: Etik Kurullar temel olarak danışma niteliğindeki kurullardır. Etik; doğru nedir ve ne yapmalıyım konusunda felsefe geliştirmeyen, Etik kurullar zarar oluşmadan önce uyarı ve yol gösterici işlevlerini yüklenen kurullardır. Etik kurullar amir mercii olamaz, ancak aldıkları kararlar hukuksal olarak değerlendirilmesi gerekir.</p> <p>ETİK KURUL İNCELEME SİSTEMATIĞI: Her başvuru için ayrı bir dosya açılır. Dosyaların renkleri faz çalışmasına göre farklı renklerde. FAZ I için kırmızı dosya, FAZ II için Sarı dosya, FAZ III için mavi, FAZ IV için siyah, BY/BE dosyaları için turuncu, diğer çalışmalar için beyaz dosya rengi önerilmektedir. Danışılan ve kararı istenen konu Etik Kurulumuz tarafından 2577 İdari Yargılama Usulü Kanunu 1 ve 2. maddeleri ve TCK'nın 61. Maddesine göre irdelenmektedir. BAŞVURU BİLGİLERİ: Proje ile ilgili bilgiler; İstem sahibinin adı, sevk yazısının tarih ve numarası, Etik Kurul incelemeye başlama tarihi, araştırmacılar ve araştırma merkezleri ile çalışmayı destekleyenler sunulmaktadır.</p> <p>ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ: A) Bakanlıkça Ruhsatlandırılmış ilaçlarla çalışma, B) Bakanlıkça Ruhsatlandırılmamış ilaçlarla çalışma olup olmadığı ve ayrıca özel çalışma parametreleri: 1) Faz çalışması (I, II, III), 2) Yeni endikasyon çalışması, 3) Çalışılmamış yeni bir hasta grubunda çalışma, 4) Yüksek doz çalışması, 5) Biyoyararlanım/biyoeşdeğerlilik, 6) Farmakokinetik çalışma-belirtin, 7) Tanı testi geliştirmeye yönelik çalışma, 8) profilaksiye</p> |

yönelik çalışma,8) Faz IV, 9) İlacın klinik etkinlik, 10) Diğer (klinik, Prospektif, retrospektif, tek merkezli, çok merkezli, rasgele örnekleme, kontrollü, Plasebo kontrollü, çift kör, anket, epidemiyolojik, prevalans ve insidans çalışması gibi) Diğer çalışmalar belirtilmektedir.

İNCELEME SAFHALARI: Değerlendirilen veya ilgili belgeler sunulmaktadır. **ÇALIŞMA ESASLARI/ETİKSEL YÖNLER/HUKUKSAL DAYANAKLAR:** Helsinki Deklarasyonu, TCK 90. Maddesi, İyi Klinik Uygulamaları kabul etmeleri ve İlaç Araştırmaları Alt Komisyonun olumlu görüşü gereklidir. Psikiyatri/toplumsal/epidemiyolojik konularındaki araştırmalarda Madrid (1996) Bildirgesi (eski Hawaii, 1977) göz önüne alınır. Deney Hayvanlarında OGÜ Deney Hayvanları Yönergesi,5199 Hayvanları Koruma Kanunu (özellikle 9. Maddesi) benimseme zorunludur ve Deney Hayvanları Alt Komisyon olumlu karar gerekir. Sorunun etiksel yönleri öncelikle ele alınarak açıklığa kavuşturulacaktır. Yasal uygunluk ve aykırılıklar belirtilecek, mevzuatla ilgili hükümler zikredilecektir. Etik Kurul onay için başvurusu yapılan protokollerin yalnızca Etik kurullara (Yürürlükte bulunan Sağlık Yasaları, Tüzükleri, Yönetmelikleri, Tıbbi Deontoloji Kuralları, Konvansiyon veya Deklarasyonlar, Bildirgeler, Dünya Sağlık Örgütü Kuralları, Avrupa Topluluğu Kararları) uygunluğunu araştırır, bilimsel değerlendirme yapmaz. Bilimsel değerlendirme için bilim dallarından görüş alabilir. AYDINLATMA ve RIZA FORM KURALLARI, YAN TESİR/ETKİ BİLDİRİM FORMU ile SONUÇ KARAR e ÖNERİLER çalışmacılara sonuç gerekçeli ve yazılı olarak iletilmektedir. Etik Kurulun aldığı kararların çerçevesi yurtdışı yayınlarda özellikle istendiği dikkate alınarak, ayrıca kararlarda eklenerek çalışmacılara iletilerek bilgilendirilmektedir. Etik Kurul görüşüne dayanarak oluşturulan konvansiyon veya deklarasyonda yeri olan hükümlere varsa yer verilecektir.

HASTA BİLGİLENDİRME ve ONAM: Tıbbi müdahaleye hukuk düzenince izin verilebilmesi için, hekimin davranışını haklı gösterecek bir hukuka uygunluk nedeninin varlığı gerekir. Genel olarak hukuka uygunluk nedeni, hastanın müdahaleye aydınlatılmasından sonra rıza göstermesidir. Bu konudaki Anayasa, Kanun ve Yönetmelikler çalışmacılara iletilmektedir. Çalışmanın amacı, çalışmadan beklenen sonuç ve potansiyel tehlike, araştırmaya katılan kimsenin araştırma öncesinde bu uygulamayı isteği ile kabul ettiğine ait imzalı belge, araştırmaya katılmakta özgür olduğu ve istediği zaman çalışmadan çıkabileceği, bu durumda kendisi ile hekimi arasındaki ilişkilerde bir değişiklik olmayacağı hususlarını içermelidir. Araştırmaya konu olan şahsın "imzalı Rıza Formu" ve bu formu öncelikle şahıs kendisi, gerektiğinde birinci derecede yakını, sorumlu bir kişi veya veli-vasisi imzalar. Bu formda şahsın açık kimliği, protokol numarası, bilgilendirme formunda belirtilen hususlardan haberdar olduğunu gösteren ifadesi yanında kendisine bu belgeleri veren ve imzalatan şahsın ismi ve imzası bulunur. Araştırmanın bitiminde sonuçlar müspet veya menfi, doğru olarak verilmelidir.

ETİK KURUL KARARLARI ve HUKUKSAL YAPI: Karşılıklı iletişim ve işbirliğinin sözleşme şeklinde olması, onun hukuk denetimine alınması anlamındadır. Hasta, hekim ve hastane ilişkileri de bu kapsamdadır. 5237 Sayılı TCK amaçları, "*kişi hak ve özgürlüklerini, kamu düzen ve güvenliğini, hukuk devletini, kamu sağlığını ve çevreyi, toplum başını korumak, suç işlenmesini önlemektir*" şeklindedir. Ortada zarar oluşmadan önce etik kurullar karşılıklı hakları, kısaca dengeyi koruyarak, hukuksal dengeyi korumalıdır. Zarar oluştuğunda ise hukuk sistemi kaçınılmaz devreye girer. Hukuk kelime anlamı olarak zaten haklar demektir. Hukukun üstünlüğü prensibi de hakların üstünlüğünü temel almayı gerektirir.

Hukukumuzda Avrupa Konseyi ve diğer ülkelerle Avrupa Birliğinin imzaladığı/onayladığı diğer konu ile ilgili etiksel deklarasyon/bildirgelere uyulması gerekmektedir. Bilimsel çalışmalarda uyulması gereken başlıcaları şunlardır.

- o 10 Aralık 1948 WHO İnsan Hakları Genel Deklarasyonu
- o 4 Kasım 1950 İnsan Hakları ve Özgürlüklerin Esaslarının Korunması İlkeleri
- o 18 Ekim 1961 Avrupa Sosyal Sözleşmesi
- o 16 Aralık 1966 Uluslar arası Sivil ve Politik Haklar Sözleşmesi ve Uluslar arası Ekonomik, Sosyal ve Kültürel Haklar Sözleşmesi
- o 29/5/1979 tarih, 2238 Sayılı Organ Ve Doku Alınması, Saklanması, Aşılması Ve Nakli Hakkında Kanun
- o 28 Ocak 1981 Kişisel Verilerin Otomatik İşlenmesine dayanarak Bireylerin Korunması Sözleşmesi
- o 20 Kasım 1989 Çocuk Hakları Sözleşmesi'ne atıfta bulunmaktadır. Burada hedef insan hakları ve bireysel temel hürriyetlerin daha geniş gerçekleştirilmesidir.
 - o Biyoloji ve Tıp konusunda gelişmenin hızlandırılması bilincinde olunduğu,
 - o İnsana kendi türünde bireysel hakları, insan olmanın şerefi hatırlanarak vurgulanmaktadır.
 - o Biyoloji ve Tıp Biliminin yanlış kullanımının insanın şerefi ile bağdaşmadığı, gelişmelerin şimdiki ve gelecek nesillere fayda için kullanılmasının şart olduğu belirtilmektedir.
 - o Uluslar arası ilişkilerin gerekli olduğu ve tüm insanlığın bu faydadan yararlanmasının gerektiği,
 - o Toplumsal görüşlere dikkat edilmesinin gerektiği,
 - o Toplumdaki tüm bireylerin hakları ve sorumluluklarının hatırlanmasının arzulandığı,

- o 1160 (1991) Parlamento Önerilerinin dahil olmak üzere biyoetik tanımlamalarının hazırlanmasını, Biyoloji ve Tıp Uygulamalarında bireylerin insan şerefi, temel hak ve hürriyetlerini emniyete almayı gerektiren önlemleri kapsadığı vurgusu ile
- o 25.I.2005, Strasbourg, Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Biomedical Research
- o 4. IV. 1997, Oviedo, Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Biomedical Research

TEZLERİN SON AŞAMADAKİ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bir çalışma sonlandığında, ilk planlanandan farklı olabilmektedir. Bu açıdan özellikle ilaç araştırmalarında 6 aylık ve yıllık raporlarla protokola eklemeler ve/veya bilgilendirme veya prospektus verilerinde değişiklikler gündeme gelmektedir. Bu açıdan çalışmaların ilk başvuru ile sonlanması farklı olabilmektedir. Etik Kurulumuz bu açıdan aradaki farklılığın önem durumunu irdeleyebilmesi için son tezin gözden geçirilmesini gerekli kılmaktadır. Başlıca dikkat edilmesi gerekenler

- o Temel kural olarak özellikle sorun olması durumunda, 6 veya 12 aylık dönemler şeklinde ara raporların Etik Kurula iletilmesi
- o Tez oluştuktan sonra Etik Kurula başvurulduğunda izlenecek yöntemler;
 - o İlk başvurudaki yapı temelde aynı olmalıdır.
 - o Çalışmacılar aynı olmalıdır. Ekleme veya çıkma not edilmelidir.
 - o Sonlanan şekil, ilk yapının içinde olmalıdır. Bazı çıkarılmaların çalışmayı bozmayacak boyutta olması gerekir.
 - o Tezin ayrıca iletilerek incelenmesi yapılmalıdır.

Hukuksal Dayanaklar: Etik kurul kararları farklı hukuksal dayanakları vardır. Bunlar; a) Emredici Kurallar (Mecburi, amir kaideler), b) Tamamlayıcı Kurallar (İhtiyari, yedek kaideler), c) Yorumlayıcı Kurallar (Tefsir edici kaideler), d) Tanımlayıcı Kuralları (Tarif edici kaideler) kapsamaktadır. Zorunlu olanların yapılma gereği vardır.

İnsan Üzerinde Deney TCK 90. Maddesi kapsamına alınması, olayın ve konu ile ilgili tüm diğer kanun, yönetmelik ve tebliğlerin Ceza Kanunları açısından (cürüm/kasit, ihmal, taksir-dikkat ve özen eksikliği, bilinçli taksir ve hata tanımlamaları altında) ele alınmasını TCK 5. Maddesi gereği zorunlu kılmaktadır. Buna göre insan hiçbir şekilde meta olarak ele alınmayacaktır ve ayrıca; gerekli izin alınmalı, daha önce hayvan deneyinin yapılmış olması, insan üzerinde yapılmasını gerekli kılması, zararlı ve kalıcı etki bırakmaması, acı verici yöntemlerin uygulanmaması, külfet ve sağlığını tehlikeye atılmasının üzerinde çalışmanın amaçları olmalı, bilgilendirmeye dayalı yazılı rızasının olması, menfaat teminine bağlı bulunmamasıdır. Çocuklarda ayrıca çalışmanın bu yaş grubunda yapılmasını gerekli kılması, vasisinin rızası alınmalı, yetkili çocuk hekimi bulunması belirtilmektedir. **Komplikasyon:** Tıbbi girişimin kabul edilebilir sapma ve risklerini, tıp bilimi açısından öngörülen ve istenmeyen etki kapsamında nitelendirilen durumları veya tıbbın kabul ettiği normal risk ve sapmalar çerçevesinde hareketleri dolayısıyla, kötü sonuçlar meydana gelse bile hekime sorumluluk yükletilmeyen olumsuzlukları kapsar. Görülmesi istenmemesine karşın, önenebilir bir durum var ve önlenemiyorsa bu bilinçli taksir, dikkat ve özen eksikliğinden oluşuyorsa taksir oluşur. Komplikasyonların gelişmesi durumunda bilinçli taksir oluşmaması için, komplikasyon gelişiminde gerekli yaklaşımı yapacak olan bilim dallarının daha önceden sorumluluğu paylaşması gerekir.

GENEL ETİK KURUL İLKELERİ: Etik Kurulumuz bir çalışmayı 25.5.2004 tarihli ve 5176 sayılı Kanun uyarınca oluşturulan Kamu Görevlileri Etik Kurulunu ve Kamu Görevlilerinin Etik Davranış İlkeleri Yönergesi/taslağı çerçevesi dikkate almaktadır. Bir çalışma/sözleşmenin geçerli olması için BK 19. Maddesine göre tanımlanan, çalışmaların; *"Kanunun gösterdiği sınır dairesinde, serbestçe tayin olunabilir. Kanunun kati surette emreylediği hukuki kaidelere veya kanuna muhalefet, ahlaka (adaba) veya umumi intizama yahut şahsî hükümlere müteallik haklara mugayir bulunmadıkça iki tarafın yaptıkları mukaveleler muteberdir"*.

Kamu Görevlileri Etik Davranış İlkeleri ile Başvuru Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik (13.4.2005 tarih ve 25785 Sayılı Resmî Gazete) Amaç: Madde 1 — *Bu Yönetmeliğin amacı; kamuda etik kültürünü yerleştirmek, kamu görevlilerinin görevlerini yürütürken uymaları gereken etik davranış ilkelerini belirlemek, bu ilkelere uygun davranış göstermeleri açısından onlara yardımcı olmak ve görevlerin yerine getirilmesinde adalet, dürüstlük, saydamlık ve tarafsızlık ilkelerine zarar veren ve toplumda güvensizlik yaratan durumları ortadan kaldırmak suretiyle kamu yönetimine halkın güvenini artırmak, toplumu kamu görevlilerinden bekleme hakkı olduğu davranışlar konusunda bilgilendirmek ve Kurula başvuru usul ve esaslarını düzenlemektir"* yaklaşımı esas alınmaktadır. Kamu Görevlileri Etik Kurulu Kurulması Ve Bazı Kanunlarda Değişiklik Yapılması Hakkında 5176 Sayılı Kanunda etik kurulun görevi olarak "Madde 3- Kurul, kamu görevlilerinin görevlerini yürütürken uymaları gereken etik davranış ilkelerini hazırlayacağı yönetmeliklerle belirlemek, etik davranış ilkelerinin ihlâl edildiği iddiasıyla re'sen veya yapılacak başvurular üzerine gerekli inceleme ve araştırmayı yaparak sonucu ilgili makamlara bildirmek, kamuda etik kültürünü yerleştirmek üzere çalışmalar yapmak veya yaptırmak ve bu konuda yapılacak çalışmalara destek olmakla görevli ve yetkilidir" şeklinde ifadesini bulmaktadır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde de "Kuralı mevcut olmayan, açık uçlu sorunlar karşısında "içtihat koyma" durumu ile karşılaşırsa; hazırlanacak raporda ayrıntılı geçerler tartışılacak ve kıyas metoduna başvurulacaktır. Kurulca içtihat olarak belirtilen etik yargılar, geçerli oldukları süre içinde, ancak kurul için bağlayıcıdır. Etik kurul, gerektiğinde, bunları yeniden gözden geçirmek ve değiştirmek yetkisine sahiptir" demektedir.

| | | |
|--|---|--|
| | | <p>UYULMASI GEREKEN KURAL ve İLKELER: Ayrıca diğer Etik Kurallara uyulacağı, örneğin, Edinburg Deklarasyonu, İyi Klinik Uygulamalar gibi, çalışmacılar tarafından yazılı olarak belirtilmekte ve yapılması TCK kapsamında olup, zorunluluk kapsamındadır. Bilimsel konularda olduğu gibi, uygulamalarda da Hukuksal sorumluluğun çalışmacılara ait olduğu unutulmamalıdır. Bilimsel görüş istenen bilim dalları da çalışma konusunda en azından bilimsel açıdan sorumluluğu paylaşmış olmaktadır. Bilimsel olmayan bir araştırma, etiksel nitelik taşıyamaz. Etik Kurulların çalışmayı onaylaması, çalışma hakkında Etik Kurul üyeleri ve görüş istenen Alt Komisyon ve bilim dallarının olumsuz görüşün olmadığı ve dolayısıyla olumlu nitelikte bulunduğunu, çalışmayı onayladıklarını göstermektedir. Bu açıdan, Alt Komisyon ve Bilim Dallarından gelecek katılardan sonra çalışma hakkında Etik Kurul görüşü tamamlanmış olacaktır. Görüşler gelmese bile, ANAYASANIN 137, TCK 24-30. Maddesinde ve 657 Sayılı Devlet Memurluğu Kanununda (Madde 11) açıkça belirtildiği gibi konusu suç teşkil eden bir durumda susma bile bireyi sorumluluktan kurtaramaz. Çünkü hukuk düzeninin izin vermediği ve hoş karşılanmayan, zarar verici eylemin hiçbir şekilde izin verilmesi kabul edilemez ve bilgisinin de bulunduğu bir durumda Yasal ve Anayasal açıdan sessiz kalmamaz ve gecikme söz konusu olamaz. Görüşlerin gelmemesi, iletilen konu hakkında ek görüş iletilmeyeceği anlamını taşımaktadır. Görüşlerin bilim dalları veya komisyonlardan gelmemesi durumunda, en geç bir ay içinde Etik Kurulun oluru kesinleşmiş olacaktır. Ayrıca, projenin gelişimi ve sonlanmasından sonra da Etik Kurulun son görüşü gerekmektedir.</p> <p>Bilimsel yayınların hazırlanmasında dürüstlüğe ve ahlak kurallarına uyulması gereklidir. Buna uyulmaması halinde yayını yapanların uyarılması yazılı olarak Dekan tarafından yapılır. Başkan Dekan değilse gereği için ayrıca durum Dekana yazılı olarak bildirilir. Etik Kurul'un olumlu veya olumsuz görüşüne rağmen yasal sorumluluk araştırma yapan çalışmacılara aittir. Kurul onay vermediği durumlarda gerekçesini yazılı olarak açıklar. Kurul kararları danışma niteliğindedir (İstisnadedir). Hiçbir zaman yasal bağlayıcılık gücü yoktur. Kurul vermiş olduğu kararlardan dolayı herhangi bir ceza, hukuki ve tıbbi sorumluluk altına girmez. Ancak araştırma ve makalelerin yayınlanmasında ve görevlerin yürütülmesinde Etik Kurulun onayı ilgili konuda Fakültenin "resmi görüşü"nü yansıtır.</p> <p>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Etik Kurulu yukarıdaki tanımlamalarda belirlenen görevi gereği, gerekçeli karar oluşturma yanında, tüm ulusal ve uluslar arası görüşleri dikkate alarak ilkeler geliştirmeye çalışmakta, görüşlerin etkinliğini sağlamak için raporlar düzenlenmektedir.</p> |
| <p>DENEY HAYVAN ÇALIŞMALARINDA UYULMASI GEREKEN PRENSİPLER</p> | | |
| <p>Hayvanları Koruma Kanunu: 24.06.2004 gün ve 5199 Sayılı, özellikle 9. Madde çerçevesinde yaklaşım yapılmalıdır. 31 Ekim 2006 gün ve 04 sayılı kararla bildirilmiştir.</p> | | |
| <p>İSTATİSTİKSEL (BİYOİSTATİSTİK) ANALİZ</p> | <p style="text-align: center;">PROJE HAZIRLANIRKEN DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN BİYOİSTATİSTİKSEL PRENSİPLER (Prof. Dr. K. ÖZDAMAR)</p> <p>31 Ekim 2006 gün ve 04 sayılı kararla bildirilmiştir.</p> | |
| <p>YAZIM İLKELERİ</p> | <p>MAKALE YAZIM OLGUSUNDA ETİK KURUL KARARLARI Etik Kurulumuz yayınlarda temel olarak ele aldığı ilkeler: Etik Kurul Yönergesininin 32. Maddesi temelinde ele alınan ilkeler gelecek öneri, tenkit ve itirazlara göre yeniden yapılandırılacağı vurgulanarak aşağıda sunulmaktadır.</p> <p>Yazarlar tüm bu ilkeleri benimseyerek yayın yapmak zorundadırlar.</p> <p>31 Ekim 2006 gün ve 04 sayılı kararla bildirilmiştir.</p> | |
| <p>ÇALIŞMANIN ONAY GEREKÇESİ ve SÜRECİ</p> | <p style="text-align: center;">DENEY HAYVANLARI ÇALIŞMALARI</p> <p>Yurtdışı Yayınlarında çalışmanın Yerel Etik Kurulunca kabul gerekçesi istenmektedir. CMK 34. Maddesi de dikkate alınarak, aşağıdaki Bölüm eklenmiştir.</p> <p>A) Çalışmanın yapıma gerekçesi B) Etik Kurulun onay gerekçesi C) Hastayı/deneğin bilgilendirilmesinde ve onamındaki temel noktalar</p> <p>A) Deneysel Hayvan Modelinin Gerekçesi (Çalışmanın amacı/hipotezi) Siklosporin A maddenin, katı lipit nanopartikül mikrosünger ve mikroemülsiyon taşıyıcı sistemler ile oküler kullanıma yönelik formülasyonların hazırlanması ve bu formülasyonların etkinliklerinin ve penetrasyon yeteneklerinin in vitro-in vivo deneylerle araştırılması.</p> <p>B) Klinik Çalışma için Etik Kurul Onayı Gerekçesi:</p> <p>1. Yasa ve Etik Kurallara/Çalışma esaslarına uyma taahhüdü: Çalışmacılar tarafından Deney Hayvan Çalışmaları için "Deney Hayvanlarının araştırma ve eğitiminde kullanılmasında uyulması istenen etik kurallar ve ilkeler (Deney Hayvanlarında OGU Deney Hayvanları Yönergesi)" çalışmacılar tarafından imzalanmalı ve eklenmelidir. 5199 Hayvanları Koruma Kanunu (özellikle 9. Maddesi) benimsemeye zorunludur. (Etik Kurulumuzun istediği 10. Madde)</p> <p>2. CMK 34. Maddesinde belirtilen kararların gerekçeli olması hükmü uyarınca Etik Kurulumuz projeleri Etik Kurulumuz projelerin genel irdelenmesini ve kararlarını; A) 2577 İdari Yargılama Usulü Kanunu 1 ve 2. maddesine göre işlemler; yetki,</p> | |

| | | |
|---|--|---|
| | | <p>şekil, sebep, konu ve maksat yönleri, eylem ve işlemler, sözleşmelere ilişkin olarak, başvuruları karşılıklı haklar temelinde incelemekte, öneriler sunmakta, B) TCK'nın 61. Maddesi gereği; "somut olay olmalı ve uygulama biçimi, kullanılan araçlar, zaman ve yer, konunun önem ve değeri, zarar oluşma durumu ve tehlikenin ağırlığı, kusur olasılığı, amaç ve saiki, göz önünde" bulundurarak almaktadır. C) Deney Hayvanları Alt Komisyon görüşleri ile ilgili bilim dallarının olumlu görüşleri gerekir.</p> <p>3. Hukuksal olarak tanımlanan yaklaşımların yerine getirilmesi gereklidir. Bunlar; a) Emredici Kurallar (Mecburi, amir kaideler), b) Tamamlayıcı Kurallar (İhtiyari, yedek kaideler), c) Yorumlayıcı Kurallar (Tefsir edici kaideler), d) Tanımlayıcı Kurallar (Tarif edici kaideler) kapsamaktadır.</p> <p>4. Deney Hayvan Çalışma Gruplarında denek olarak çalışmaya alınma ve çıkarılma gerekçelerinin net tanımlanması gereklidir. Hayvanlar için herhangi bir eziyet niteliğinde bir şey uygulanmayacaktır.</p> <p>5. Çalışmanın özelliği: Bir ilacın penetrasyonunu konu eden/deneysel çalışma niteliğindedir. İlacın etkisinin araştırıldığı bir çalışmadır.</p> <p>C) BİLGİLENDİRME ve RIZA Deney hayvanları Alt Komisyonu Hayvan Haklarını da dikkate alarak, çalışma hakkında bilgilendirilmesi ve onamlarının alınması gerekmektedir.</p> <p>ETİK KURUL ONAYI: Etik Kurulumuz CMK ilgili Maddelerine (33 ve 34) göre tüm üyeler, alt komisyonlar ve bilim dallarının bilimsel görüşlerinden oluşan gerekçeler geldikten sonra verdiği onay tarihi ayrıca belirtilecektir.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 31 Ekim 2006: Projenin ilk kabulü: Olumludur. Deney Hayvanları Alt Kom. görüşe gönderilmiştir. • 04 Aralık 2006: Deney Hayvanları Alt Komisyonu'nun 20 Kasım 2006 tarihli görüşü: Olumludur. <p>YAN TESİR BİLDİRİMİ: 28.04.2005: (Sağlık Bakanlığı) İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü 45085 Sayılı Yazısı uyarınca yeniden düzenlenmiştir) 31 Ekim 2006 gün ve 04 sayılı kararla bildirilmiştir.</p> |
| Gelen görüşün çalışmacıya iletilmesine karar verilmiştir. | | |

Prof. Dr. M. A. AKŞİT
Pediatri Uzmanı

Prof. Dr. B. YAŞAR
Genel Cerrahi Uzmanı

Prof. Dr. Ö. ÇOLAK
Biyokimya Uzmanı

Prof. Dr. D. ÖZBABALIK
Nöroloji Uzmanı

Doç. Dr. S. İŞIKSOY
Patoloji Uzmanı

Doç. Dr. F. S. KILIÇ
Farmakoloji Uzmanı

Doç. Dr. Ö. ELÇİOĞLU
Deontoloji Uzmanı

Ecz. Ö. ALTUĞER
Eczacı





*EUROPEAN FEDERATION
FOR PHARMACEUTICAL
SCIENCES*

EUFEPS Conference on

**When Poor Solubility Becomes an Issue:
From Early Stage to Proof of Principles**

Final Programme and Abstracts

Centro Congressi GSK • Verona • Italy • April 26-27, 2006

Cyclosporine A-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Ocular Drug Delivery

E. Cengiz, M. Demirel and Y. Yazan

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Turkey

e-mail address of presenting author: ebcengiz@anadolu.edu.tr

ABSTRACT SUMMARY

Cyclosporine A has become an important agent in treating the severe ocular disorders and corneal allograft rejections. The aim of our study is to incorporate the Cyclosporine A with the cationic solid lipid nanoparticle carrier systems for creating safer formulations with reduced side effects while having prolonged therapeutic effect by controlled release of the active drug.

Keywords: Cyclosporine A, Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

INTRODUCTION

Cyclosporine A is a powerful immunosuppressive active agent mainly used for the treatment of organ transplant rejections and severe autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, active Crohn disease, endogenous uveitis, plaque psoriasis, systemic lupus erythematosus, scleroderma, and Behçet's disease [1]. Cyclosporine A also has been found to be effective in treating the ocular diseases such as dry eye syndrome, corneal graft rejections, Sjögren's syndrome and intraocular inflammatory diseases [2-5]. However, its administration systemically may result in severe side effects, and for some diseases local application is an alternative [6].

Solid lipid nanoparticles (SLN) have been introduced as alternative carrier systems for the controlled release of pharmaceutical and cosmetic active compounds to the colloidal systems. Particles of the system remain in the solid state at room temperature and therefore the mobility of incorporated drug is reduced which is a prerequisite for controlled drug release [7]. Possibility of controlled drug release and drug targeting; increased drug stability; high drug payload; incorporation of both lipophilic and hydrophilic drugs; avoidance of organic solvents and no problem with respect to large scale production and sterilization were the proposed advantages of SLNs [8].

EXPERIMENTAL METHODS

Production and physicochemical characterization of the formulations

Dynasan 116 and Compritol 888 ATO were used as solid lipids at the concentration of 6%. As cationic agent, 1.5% stearylamine was used for both formulations. The Cyclosporine A concentration in the formulations was 0.1%. All formulations are stabilized with 4% Tween 80 as a surfactant. Benzalconium chloride was used as an antimicrobial agent with 0.01% constant rate. Distilled water was used as the water phase.

The production of SLN formulations was carried out according to the hot homogenization technique [7] but instead of the homogenization step formulations were stirred with Ultraturrax (T25, IKA) at 13500 rpm for 5 minutes.

As the sterility of the ocular formulations is necessary, the formulations were sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 minutes.

Particle size and zeta potential measurements were carried out by Malvern Nano ZS and the structure of the solid lipid was analyzed using the differential scanning calorimetry (DSC-60, Shimadzu).

RESULTS AND DISCUSSION

According to the particle size and zeta potential analyzes, formulations prepared were found to be stable during the storage time. DSC analyzes showed no change in the lipid structure, indicating the stability of the formulations.

CONCLUSION

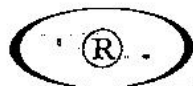
In our study, cationic SLN formulations for ocular delivery remained stable during the storage time. The formulations that will be used in animal studies have been chosen and the study protocol has been planned and hopefully will be presented as soon as possible.

REFERENCES

1. LEE, Y-J., CHUNG, S-J., SHIM, C-K., *The potential replacement of HPLC by ¹²⁵I-RIA for the characterization of cyclosporin A: a bioavailability study after oral administration in healthy human subjects*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **22**(1), s.183-188, (2000).
2. TAMILVANAN, S., KHOURY, K., GILHAR, D., BENITA, S., *Ocular Delivery of Cyclosporin A I. Design and Characterization of Cyclosporin A-Loaded Positively-Charged Submicron Emulsion*, S.T.P Pharmaceutical Sciences, **11**(6), 421-426, (2001).
3. STEVENSON, D., TAUBER, J., REIS, B-L., *The cyclosporine A Phase study group, Efficacy and safety of cyclosporin a ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease[†]*, Ophthalmology, **107**(5), 967-974, (2000).
4. LALLEMAND, f., FURRER, P., FELT-BAEYENS, O., GEX-FABRY, M., DUMONT, J-M., BESSEGHIR, K., GURNY, R., *A novel water soluble cyclosporine A prodrug: Ocular tolerance and in vivo kinetics*, Int. J. Pharm., **295**, 7-14, (2005).
5. NNUSSENBLATT, R.B., *Cyclosporine: Indications in Ocular Disease*, (David E. YOCUM, Editor), s.139-1153, Graph Cems, Spain
6. KNAGENHJELM, S.K.H., FROYLAND, K., RINGVOLD, A., BJERKAS, E., KJONNIKSEN, I., *Toxicological evaluation of cyclosporine eye drops*, Acta Ophthalmologica Scandinavica, 20-203, (1999).
7. MANJUNATH, K., REDDY, J.S., VENKATESWARLU, V., *Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems*, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol, **27**(2), 127-144, (2005).
8. MULLER R. H., RADTKE M., WISSING S. A., *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*, Advanced Drug Delivery Reviews, **54**(1), pp. 131-155, (2002).

IPTS

**HACETTEPE UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY**



IPTS
BEST M.Sc.
THESIS
AWARD

IPTS
BEST PH.D.
THESIS
AWARD

IPTS
BEST
POSTER
AWARD

**OPPORTUNITIES AND
CHALLENGES FOR
NANOTECHNOLOGY
PRODUCTS**

Applications in Drug
Delivery, Cosmetics,
Molecular Imaging and
Nanotechnology



13TH INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY SYMPOSIUM

10 - 13 September 2006 Antalya/Turkey

UNDER THE AUSPICES OF



IN VITRO CHARACTERIZATION OF EUDRAGIT RS 100 NANOSUSPENSIONS FOR OCULAR DRUG DELIVERY OF CYCLOSPORIN A

E. Cengiz, M. Demirel and Y. Yazan

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Turkey

INTRODUCTION

Cyclosporin A is a neutral, lipophilic, cyclic undecapeptide used as a first line immunosuppressive drug to prevent allograft rejection in organ transplantation and severe autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, active Crohn disease, endogenous uveitis, plaque psoriasis, systemic lupus erythematosus, scleroderma and Behçet's disease [1]. Cyclosporin A has also been found to be effective in treating the ocular diseases such as dry eye syndrome, corneal graft rejections, Sjögren's syndrome and intraocular inflammatory diseases [2]. However, its administration systemically may result in severe side effects, and for some diseases local application is an alternative [3].

The conventional drug delivery systems for ophthalmic administration are affected by heavy drawbacks: the precorneal drug loss due to the lachrymal flow and the palpebral blinking. The standard treatments consist of frequent installation of the formulation, which can create toxicity due to the nasolachrymal drainage, problems correlated to the poor patient compliance and sometimes incorrect therapy management [4].

Since the ocular efficacy of topically applied drugs is influenced by corneal contact time, the most common method to improve ocular availability is to increase the precorneal residence time [5].

The aim of our study was to increase the corneal contact time of Cyclosporin A by formulating positively charged Eudragit RS 100 polymeric suspensions with enhanced penetration by benzalkonium chloride.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cyclosporin A was a kind gift from Novartis (Novartis, Switzerland). Eudragit[®] RS 100

(Röhm Pharma Polymers, Germany) benzalkonium chloride (Fluka, Denmark), Tween[®] 80 (Merck, Germany), ethanol (Carlo Erba Rodano, Italy) were used as received.

Production and physicochemical characterization of the formulations

Eudragit RS 100 was used as the polymer at the concentrations of 0.025 (PS1), 0.05 (PS3), 0.075 (PS2) and 0.15 (PS4) %. As a penetration enhancer, 0.025 % Benzalkonium chloride was used in both formulations. Cyclosporin A concentration in the formulations was 0.025 % and 0.05 %. All formulations contained 0.005 % Tween[®] 80 as the surfactant. Benzalkonium chloride was also used as the antimicrobial agent at 0.025 % constant concentration. Distilled water was used as the polar phase.

The polymeric nanosuspensions were prepared according to the adopted quasi-emulsion solvent evaporation technique [6]. Briefly, the polymer and the active agent were dissolved in ethanol (2 mL) at room temperature. The solution was injected slowly (0.5 mL min^{-1}) into water containing Tween[®] 80 (0.02 % w/v) and benzalkonium chloride (0.1 % w/v) in an ice-water bath. The mixture was agitated at 20500 rpm by Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) for 5 minutes during the injection. For the evaporation of ethanol, the solution was stirred for 18 hours with a magnetic stirrer at room temperature.

As the sterility of the ocular formulations is required, the formulations were sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes.

Particle size and zeta potential measurements were carried out by Malvern Nano ZS (Malvern, UK) and pH measurements were performed by Profi-Lab pH 597 (WTW, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

According to the particle size (Table 1), zeta potential analyses (Table 2) and pH values (Table 3), formulations prepared were found to be stable during the storage time of 3 months.

Table 1. Results of particle size analyses of the formulations during the storage time of 3 months (Mean±SE)

| Code | Day 0 [nm] | Day 30 [nm] | Day 90 [nm] |
|----------|------------|-------------|-------------|
| PS1-25°C | 332.0±29.9 | 277.0±9.3 | 298.0±12.4 |
| PS1-4°C | 332.0±29.9 | 282.0±29.4 | 435.0±12.8 |
| PS1-40°C | 332.0±29.9 | 320.0±47.1 | 480.0±6.4 |
| PS2-25°C | 424.0±44.7 | 466.0±9.8 | 413.0±28.0 |
| PS2-4°C | 424.0±44.7 | 444.0±7.2 | 351.0±6.0 |
| PS2-40°C | 424.0±44.7 | 471.0±30.6 | 261.0±16.2 |
| PS3-25°C | 343.0±5.9 | 214.0±61.4 | 125.0±4.9 |
| PS3-4°C | 343.0±5.9 | 288.0±45.9 | 279.0±56.7 |
| PS3-40°C | 343.0±5.9 | 327.0±20.8 | 222.0±15.6 |
| PS4-25°C | 484.0±4.3 | 472.0±2.0 | 533.0±6.2 |
| PS4-4°C | 484.0±4.3 | 555.0±17.7 | 498.0±5.0 |
| PS4-40°C | 484.0±4.3 | 524.0±10.2 | 356.0±13.9 |

Table 2. Results of zeta potential analyses of the formulations during the storage time of 3 months (Mean±SE)

| Code | Day 0 [mV] | Day 30 [mV] | Day 90 [mV] |
|----------|------------|-------------|-------------|
| PS1-25°C | 54.3±0.3 | 57.6±0.1 | 69.5±1.3 |
| PS1-4°C | 54.3±0.3 | 58.5±0.6 | 70.2±0.1 |
| PS1-40°C | 54.3±0.3 | 48.4±0.2 | 50.9±0.1 |
| PS2-25°C | 57.9±1.0 | 57.0±0.8 | 67.7±4.5 |
| PS2-4°C | 57.9±1.0 | 59.6±1.8 | 62.6±0.5 |
| PS2-40°C | 57.9±1.0 | 49.5±0.6 | 64.0±5.0 |
| PS3-25°C | 65.6±0.6 | 60.1±1.6 | 74.7±0.6 |
| PS3-4°C | 65.6±0.6 | 57.7±2.7 | 70.2±1.9 |
| PS3-40°C | 65.6±0.6 | 64.8±0.7 | 65.3±0.5 |
| PS4-25°C | 67.1±1.5 | 63.1±1.6 | 68.0±0.5 |
| PS4-4°C | 67.1±1.5 | 60.5±0.3 | 73.7±0.7 |
| PS4-40°C | 67.1±1.5 | 62.9±0.3 | 73.4±3.0 |

Table 3. pH values of the formulations during the storage time of 3 months

| Code | Day 0 | Day 30 | Day 90 |
|----------|-------|--------|--------|
| PS1-25°C | 7.39 | 6.77 | 7.60 |
| PS1-40°C | 7.39 | 6.19 | 7.36 |
| PS1-4°C | 7.39 | 6.30 | 6.83 |
| PS2-25°C | 7.31 | 6.54 | 7.80 |
| PS2-40°C | 7.31 | 6.22 | 6.79 |
| PS2-4°C | 7.31 | 6.54 | 6.76 |
| PS3-25°C | 7.28 | 6.61 | 7.25 |
| PS3-40°C | 7.28 | 6.24 | 6.96 |
| PS3-4°C | 7.28 | 6.46 | 6.80 |
| PS4-25°C | 7.09 | 6.31 | 6.89 |
| PS4-40°C | 7.28 | 6.12 | 6.90 |
| PS4-4°C | 7.28 | 6.09 | 6.53 |

CONCLUSION

In our study, stable polymeric suspension formulations for ocular delivery were prepared. The formulations that will be used in animal studies were selected and the study protocol was planned. In vivo results will be presented as soon as possible.

References

- Lee, Y.J., Chung, S.J., Shim, C-K, The Potential Replacement Of Hplc By ¹²⁵I-Ria For The Characterization Of Cyclosporin A: A Bioavailability Study After Oral Administration In Healthy Human Subjects, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 22(1), P.183-188, (2000).
- Tamilvanan, S., Khoury, K., Gilhar, D., Benita, S., Ocular Delivery Of Cyclosporin A I. Design And Characterization Of Cyclosporin A-Loaded Positively-Charged Submicron Emulsion, *S.T.P. Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 421-426, (2001).
- Knagenhjelm, S.K.H., Froyland, K., Ringvold, A., Bjerkas, E., Kjønniksen, I., Toxicological Evaluation Of Cyclosporine Eye Drops, *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 20-203, (1999).
- Sandri, G., Bonferoni, C., Chetoni, P., Rossi, S., Ferrari, F., Ronchi, C., Caramella, C., Ophthalmic Delivery Systems Based On Drug-Polymer-Polymer Ionic Ternary Interaction: In Vitro And In Vivo Characterization, *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 62, 59-69, (2006).
- Muller R. H., Radtke M., Wissing S. A., Solid Lipid Nanoparticles (SLN) And Nanostructured Lipid Carriers (NLC) In Cosmetic And Dermatological Preparations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), Pp. 131-155, (2002).
- Pignatello, R., Bucolo, C., Ferrara, P., Maltese, A., Pulco A And Puglisi G. Eudragit Rs100[®] Nanosuspensions For The Ophthalmic Controlled Delivery Of Ibuprofen *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 16 (1-2), 53-61, (2002)