

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİTÜMÖRAL İLAÇ İÇEREN MİKROEMÜLSİYON**  
**FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ANTİTÜMÖRAL**  
**ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Farmasötik Teknoloji Programı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı**  
**Volkan ARMAĞAN**

**Danışman**  
**Doç. Dr. H.Yeşim KARASULU**

**İZMİR**  
**2006**



**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİTÜMÖRAL İLAÇ İÇEREN MİKROEMÜLSİYON**  
**FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ANTİTÜMÖRAL**  
**ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı**

**Volkan ARMAĞAN**

**Danışman**

**Doç. Dr. H.Yeşim KARASULU**

**İZMİR**

**2006**



**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** :

(Danışman)

.....

**Üye** :

.....

**Üye** :

.....

**Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:** .....

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım esnasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her zaman bana olan desteğini esirgemeyen başta tez danışmanım sayın Doç. Dr. H. Yeşim Karasulu'ya,

Bu çalışmayı gerçekleştirme olanağını sağlayan ve her konuda anlayışla yaklaşan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Tamer Güneri'ye,

Hücre kültürü çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana her türlü imkanı sağlayan yardımcı danışman hocam Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Erdem Göker'e,

Değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Bülent Karabulut'a,

Çalışmalarım süresince yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma yardımları için en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan sevgili eşime ve canım aileme çok teşekkür ederim.

**İzmir, 2006**

**Ecz.Volkan ARMAĞAN**

## İÇİNDEKİLER

<b>BÖLÜM I</b> .....	1
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
1.1 EMÜLSİYONLAR.....	3
1.1.1 Tanımı.....	3
1.1.2 Emülsiyon Tipleri.....	3
1.1.3 Yüzey Etkin Maddeler (Emülgatörler = Surfaktanlar).....	4
1.1.4 Hidrofilik Lipofilik Balans (HLB) Değeri.....	4
1.1.5 Emülsiyon Çeşitleri.....	6
1.1.5.1 Mikroemülsiyonlar.....	6
1.1.5.1.1 Mikroemülsiyonların Tanımı.....	6
1.1.5.1.2 Mikroemülsiyonların Avantajları.....	7
1.1.5.1.3 Mikroemülsiyonların Yapısı.....	8
1.1.5.1.4 Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri.....	10
1.1.5.1.4.1 Karışım Film Teorisi.....	10
1.1.5.1.4.2 Çözünürlük Teorisi.....	10
1.1.5.1.4.3 Termodinamik Teori.....	11
1.1.5.1.5 Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi.....	12
1.2 KANSER.....	12
1.2.1 Metastaz.....	14
1.2.2 Kanserin Tanısı.....	16
1.2.2.1 Görüntüleme.....	16
1.2.2.2 Tümör Belirticileri.....	16
1.2.2.3 Paraneoplastik Sendromlar.....	16
1.2.2.4 Biopsi.....	17
1.2.3 Tümörlerin Histolojik Olarak Sınıflandırılması.....	17
1.2.3.1 Epitel Dokusundan Kaynaklananlar.....	17

1.2.3.2 Mezodermden Kaynaklananlar (Mezenşimal Tümörler).....	18
1.2.4 Kanser Hastalığında Tedavi Yöntemleri.....	18
1.2.4.1 Kemoterapide Hücre Siklusunun Önemi.....	19
1.3 Model Etkin Madde Metotreksat (Mtx) Hakkında Genel Bilgiler.....	20
1.3.1 Farmakolojisi ve Farmakokinetiği.....	21
1.3.2 Mtx'in Etki Mekanizması.....	23
1.3.3 Mtx Etkinliğinin Bağlı Olduğu Bileşenler.....	24
1.3.4 Kemoterapötik Ajanlar İçin Hedef Olan Timidilat Döngüsü Enzimleri....	25
1.3.5 Dozlama.....	26
1.3.6 Toksik Etki.....	27
1.3.7 Mtx-İlaç Etkileşimi.....	28
1.3.8 Endikasyonları.....	28
1.3.9 Kontrendikasyonları.....	29
1.3.10 Yan Etkiler.....	29
1.4 Hücre Kültürü.....	30
1.4.1 Hücre Kültüründen Nerelerde Yararlanılır.....	31
1.4.2 Hücre Kültürü Çalışmalarının İlgi Alanları.....	31
1.4.3 Hücre Kültürü Laboratuvarında Bulunması Gereken Cihazlar.....	32
1.4.4 Tek Kullanımlık Malzemeler.....	32
1.4.5 Sterilizasyon.....	32
<b>BÖLÜM II.....</b>	<b>34</b>
<b>DENEYSEL BÖLÜM.....</b>	<b>34</b>
<b>ÇALIŞMANIN GENEL PLANI.....</b>	<b>34</b>
<b>2 GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
2.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler.....	36
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler.....	36



2.2 Yöntem ve Deneyleer.....	37
2.2.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Mtx'ın Özelliklerinin Belirlenmesi	37
2.2.1.1 Mtx'ın Infrared ( IR ) Analizi.....	37
2.2.1.2 Mtx'ın Ultraviyole ( UV ) Analizi.....	37
2.2.1.3 Mtx'ın UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimleri.....	37
2.2.2 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmaları.....	38
2.2.3 Mtx ile Formülasyon Çalışmaları.....	41
2.2.3.1 0.1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması.....	42
2.3 Mtx Yüklü Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun ve Piyasa Preparatının İnsan Periton Zarından Difüzyon Çalışmaları.....	42
2.3.1 Çalışılacak Dalga Boyunun Saptanması.....	42
2.3.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışması.....	42
2.3.3 Piyasa Preparatının İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışması.....	43
2.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerinin Belirlenmesi...	43
2.4.1 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Refraktif İndisinin Ölçümü.....	43
2.4.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümü....	44
2.4.3 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun pH'nın Ölçümü.....	44
2.4.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması.....	44
2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	44
2.5.1 Tümör Hücre Hatları.....	44
2.5.2 Besiyeri ve Diğer Yardımcı Kimyasallar (Reaginler).....	45
2.5.3 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi.....	45
2.5.4 MCF-7 Hücrelerinin İkilenme Zamanının Belirlenmesi.....	46

2.5.5 Sitotoksisite Deneyi.....	46
2.5.6 Mısır Yağının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması.....	47
2.5.7 İlaçsız Mikroemülsiyonun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması.....	47
2.5.8 Mtx Yüklendiğimiz Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	47
2.5.9 Piyasa Preparatının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	48
<b>BÖLÜM III.....</b>	<b>49</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>49</b>
3.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Mtx'ın Özelliklerine Ait Bulgular.....	49
3.1.1 Mtx'ın Infrared (IR) Analizi Bulguları.....	49
3.1.2 Mtx'ın UV Analizi Bulguları.....	49
3.1.3 Mtx'ın UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimi Bulguları.....	50
3.2 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	51
3.2.1 Üçgen Faz Diyagramlarına Ait Bulgular.....	51
3.2.2 Mtx Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmasına ait Bulgular.....	52
3.3 Mtx Yüklü Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun ve Piyasa Preparatının İnsan Periton Zarından Difüzyon Çalışmalarına ait Bulgular.....	52
3.3.1 Çalışılacak Dalga Boyunun Saptanması.....	52
3.3.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışmasının Bulguları.....	53
3.3.3 Piyasa Preparatının İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışmasının Bulguları.....	54
3.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Bulgular.....	56
3.4.1 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Refraktif İndisinin Ölçümü.....	56
3.4.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümü....	56
3.4.3 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun pH'nın Ölçümü.....	56

3.4.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğü Ölçümü.....	56
3.5 Hücre Kültürü Çalışmalarına ait Bulgular.....	57
3.5.1 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesine İlişkin Bulgular.....	57
3.5.2 MCF-7 Hücrelerinin İkilenme Zamanına ait Bulgular.....	58
3.5.3 Mısır Yağının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular.....	58
3.5.4 İlaçsız Mikroemülsiyonun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular.....	59
3.5.5 Mtx Yüklediğimiz Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular.....	60
3.5.6 Piyasa Preparatının MCF-7 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisine ait Bulgular.....	61
<b>BÖLÜM IV.....</b>	<b>63</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>63</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>67</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>68</b>
<b>YARARLANILAN KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>76</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	S/Y ve Y/S mikroemülsiyonları.....	8
Şekil 2.	Mtx'in kimyasal yapısı.....	20
Şekil 3.	Mtx'in Infrared spektrumu.....	49
Şekil 4.	Mtx'in UV spektrumu.....	50
Şekil 5.	Optimum mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı.....	51
Şekil 6.	Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun insan peritonundan difüzyon profili.....	54
Şekil 7.	Piyasa preparatının insan peritonundan difüzyon profili.....	55
Şekil 8.	Damlacık büyüklüğü profili.....	57
Şekil 9.	MCF-7 meme kanseri hücre dizisi ikilenme zamanı.....	58
Şekil 10.	Mısır yağının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	59
Şekil 11.	İlaçsız mikroemülsiyonun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	60
Şekil 12.	Mtx yüklü mikroemülsiyonun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	61
Şekil 13.	Piyasa preparatının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	62

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1	HLB değeri ile yüzey etkin madde kullanımı arasındaki ilişki....	5
Tablo 2	Organlara ve cinse göre kanser ensidansı.....	15
Tablo 3	Yüzey etkin madde olarak Span 85 ve Tween 20, mısır yağı ve değişik yardımcı yüzey etkin maddeler kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları.....	39
Tablo 4	Yüzey etkin madde olarak Span 80 ve Tween 80, yardımcı yüzey etkin madde olarak isopropanol ve soya yağı kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları.....	40
Tablo 5	Yüzey etkin madde olarak Span 80 ve Cr EL, yardımcı yüzey etkin madde olarak isopropanol ve mısır yağı kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları.....	41
Tablo 6	0.1 N NaOH kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi.....	50
Tablo 7	Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun üçgen faz diyagramına göre elde edilen değerleri.....	52
Tablo 8	Mtx yüklü optimum mikroemülsiyon formülasyonunun insan peritonundan zamana karşı difüzyon sonuçları.....	53
Tablo 9	Piyasa preparatının insan peritonundan zamana karşı difüzyon sonuçları.....	55
Tablo 10	Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ölçümüne ait veriler.....	57

## BÖLÜM I

### GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde tıp alanında yaşanan gelişmeler birçok hastalığı korkulu rüya olmaktan çıkarmış ve tedavisini mümkün kılmıştır. Ancak halen tam anlamıyla tedavisi mümkün olmayan ve üzerinde yoğun şekilde çalışılan hastalıklar da mevcuttur. Bu hastalıkların başında hiç şüphesiz kanser gelmektedir. Kanser günümüzde kalp hastalıklarından sonra ölümlere en çok yol açan ikinci hastalıktır (1, 44).

Yapılan çalışmalar sonucunda kanser tedavisinde oldukça yol alınmıştır. Ancak bu anlamda yapılan çalışmaların büyük bölümü hastanın ömrünü uzatmaya ve tedavi sürecinin daha az sıkıntılı geçirmesini sağlamaya yöneliktir. Çünkü kanserde tedavi süreci, tedaviye bağlı olarak ortaya çıkan yan etkiler sonucu sıkıntılı geçmektedir. Gerek tıp gerekse eczacılık alanındaki bu araştırmalar iki ana başlıkta yoğunlaşmaktadır:

- Etkili yeni tedavi yöntemlerine ulaşmak,
- Mevcut tedavi yöntemlerinde yan etkileri en aza indirmektir.

Biz de bu düşünceden hareketle mevcut bir ticari antitümöral ilacı yeni bir farmasötik şekille hastaya sunmayı amaçladık. Eğer etkin maddeyi piyasadaki mevcut formundan farklı olarak daha düşük dozda aynı sitotoksik etkiyi sağlayacak yeni bir dozaj formuyla hazırlayabilirsek ilacın yan etkileri de azaltılabilir.

Çalışmamızda model etkin madde olarak metotreksatı (Mtx) seçtik. Mtx günümüzde kanser kemoterapisinde en çok tercih edilen etkin maddelerden biridir (44). Mtx'ın piyasada mevcut enjektabl preparatı ile Mtx içeren yeni bir mikroemülsiyon formülasyonu oluşturarak ikisinin sitotoksik etkinliğini karşılaştırdık. Formülasyon olarak mikroemülsiyonu tercih etmemizin nedeni; mikroemülsiyonlar sistemik ve lokal uygulamanın yanı sıra ilaç hedeflenmesinde de kullanılmaktadır. Ayrıca bu sistemler termodinamik olarak dayanıklı, kendiliğinden oluşan, düşük viskoziteli, etkin madde çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttıran, saydam (transparan), izotropik dispers sistemlerdir (10, 11, 17, 33, 35, 42). Bu açıdan mikroemülsiyonlar önemli ilaç taşıyıcı sistemlerden biridir. Böylece biz de Mtx'ı mikroemülsiyona daha düşük dozda yükleyerek, ticari preparatla aynı sitotoksik etkiyi elde etmeyi amaçladık.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz ve Mtx yüklediğimiz optimum mikroemülsiyon formülasyonu ile ticari preparatının difüzyonu in vitro olarak insan periton mukozası kullanılarak incelendi. Ex vivo olarak da insan meme kanseri hücre hatları üzerinde doğrudan sitotoksitesite araştırmaları yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda Mtx içeren mikroemülsiyon formülasyonunun sitotoksitesitesi açısından uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu ve daha ileri çalışmalar için ümit verici olduğunu düşünüyoruz.

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1 EMÜLSİYONLAR**

#### **1.1.1 Tanımı**

Emülsiyonlar birbirleriyle karışmayan iki farklı sıvı faz içeren dispers sistemlerdir (17, 19, 40, 48). Sıvılardan biri diğerinin içerisinde damlacıklar halinde dağılmıştır ve bu faza dağılmış (iç) faz, diğerine ise sürekli (dış) faz denir. Burada iki sıvının birbiri içerisinde dağılması uygun bir yüzey etkin madde yardımıyla olur ve oluşan emülsiyon homojen görünüşlü, heterojen bir sistemdir. Yüzey etkin maddeler iki sıvı faz arasında adsorbe olarak yüzeyler arası gerilimi azaltmak suretiyle etkili olurlar. Emülsiyonlarda iç fazın damlacık çapı 0.1-100 µm arasındadır (1, 17, 19, 30, 31, 40, 45).

Emülsiyonların başlıca avantajları (27, 39);

- Hastalarda ilaç biyoyararlanımını artırması
- Kimyasal ve fiziksel yönden stabil olması
- Kolay tatbik edilmesi
- Görünümünün güzel olması
- Tadı kötü olan ilaçların lezzetinin düzeltilebilmesidir.

#### **1.1.2 Emülsiyon Tipleri**

Emülsiyonların oluşumunda yağlı faz sulu fazda dağılıyorsa bu emülsiyona su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu denir. Bunun tersi durumunda yani sulu fazın yağlı ortamda dağılmasıyla oluşan emülsiyona ise yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu denir (30). Burada emülsiyonun tipinin belirlenmesinde yüzey etkin maddenin rolü büyüktür. Yüzey etkin madde suda çözünüyorsa Y/S, yağda çözünüyorsa S/Y tipinde emülsiyon oluşur (27, 30, 32, 38).



### **1.1.3 Yüzey Etkin Maddeler ( Emülgatörler = Sürfaktanlar )**

Yüzey etkin maddeler, sulu ve yağlı fazlar arasındaki iç yüzey gerilimini düşürerek emülsiyon oluşumunu sağlayan maddelerdir (17, 27, 34, 45). Önceleri yüzey etkin madde olarak sadece bazı sabunlar ve doğal maddeler kullanılmışsa da daha sonra birçok sentetik ajan da üretilmiştir (40).

Yüzey etkin maddelerin sınıflandırılması (27):

1. Sentetik maddeler
2. Yarı sentetik maddeler
3. Doğal maddeler

Yüzey etkin maddeler iyonik yapılarına göre de sınıflandırılabilirler (27):

1. Anyonik Yüzey Etkin Maddeler
2. Katyonik Yüzey Etkin Maddeler
3. Noniyonik Yüzey Etkin Maddeler
4. Amfoterik Yüzey Etkin Maddeler

### **1.1.4 Hidrofilik Lipofilik Balans (HLB) Değeri**

Yüzey etkin madde seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli unsur Hidrofilik Lipofilik Denge değeridir. 1950'li yıllara kadar emülsiyon hazırlanmasında kullanılan yüzey etkin maddenin seçimi deneme yanılma yöntemiyle yapılmıştır. Daha sonra bu seçim Griffin tarafından geliştirilen HLB sistemine göre yapılmıştır (27). Oluşan emülsiyonun tipi HLB değerine bağlıdır.

Yüzey etkin maddelerin sahip olduğu HLB değerleri 0-20 arasında değişmektedir ve bu değer deneysel olarak hesaplanmaktadır. HLB değeri 20'ye yaklaştıkça yüzey etkin madde hidrofilik özellik kazanır. HLB değeri

10'dan küçük olan yüzey etkin maddeler lipofilik, büyük olanlar ise hidrofilik olarak nitelendirilir (17, 27, 51).

Yüzey etkin maddelerin HLB değerlerine göre sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir (27):

**Tablo 1.** HLB değeri ile yüzey etkin madde kullanımı arasındaki ilişki

HLB Değeri	Kullanımı
0-3	Antiköpük Ajanlar
4-6	S/Y Yüzey etkin maddesi
7-9	Islatıcı Ajanlar
8-18	Y/S Yüzey etkin maddesi
13-15	Deterjanlar
10-18	Çözücü Ajanlar

İstenilen HLB değeri iki farklı yüzey etkin maddenin karıştırılması ile de elde edilebilir. Karışım emülgatörlerinin HLB değerini Eşitlik 1 ile hesaplamak mümkündür (14):

$$HLB = [ HLB_A \times ( W_A / W_A + W_B ) ] + [ HLB_B \times ( W_B / W_A + W_B ) ] \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Burada;

$HLB_A$  : Birinci yüzey etkin maddenin HLB değeri

$HLB_B$  : İkinci yüzey etkin maddenin HLB değeri

$W_A$  : Birinci yüzey etkin maddenin emülsiyondaki miktarı

$W_B$  : İkinci yüzey etkin maddenin emülsiyondaki miktarı

### 1.1.5 Emülsiyon Çeşitleri

Emülsiyonlar sahip oldukları damlacık büyüklüklerine göre şu şekilde sınıflandırılabilirler (17):

1. Çoklu Emülsiyonlar
2. Miseller Emülsiyonlar ( 10 nm > )
3. Mikroemülsiyonlar ( 10-100 nm )
4. Makroemülsiyonlar ( 100 nm < )

#### 1.1.5.1 MİKROEMÜLSİYONLAR

##### 1.1.5.1.1 Mikroemülsiyonların Tanımı

Mikroemülsiyonlar, termodinamik olarak dayanıklı, kendiliğinden oluşan, düşük viskoziteli, saydam (transparan), izotropik dispers sistemlerdir (10, 11, 17, 33, 35, 42, 54). Saydam yani berrak olmaları çok küçük damlacık çapına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Dispers fazın damlacık büyüklüğü 5-100 nm arasında değişir (33). Damlacık çapının küçük olması nedeniyle su ile yağ arasında çok geniş arayüzeye sahiptirler. Bu küçük damlacıklar görünür ışığı geçirirler ya da zayıf bir şekilde dağıtırlar. Böylece sistem saydam bir özellik gösterir (6, 7, 9, 18, 56).

Mikroemülsiyon terimi ilk kez Hoar ve Schulman tarafından 1943 yılında "Nature" dergisinde yayınlanan makalelerinde kullanılmıştır. Yazarlar makalelerinde bu terimi normal emülsiyonların orta zincir uzunluğunda alkollerle titre edilmesiyle elde edilen transparan sistemleri tanımlamak amacıyla kullanmışlardır (25).

Bu sistemlerin kendiliğinden oluşabilmesi yağ-su arayüzeyindeki gerilimin sıfır olmasına bağlıdır. Bu durum, birim yüzeye yüksek miktarda yüzey etkin maddenin (% 20) kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir (17, 50).

Mikroemülsiyonlar yağ, su, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeden (ko-surfaktan) oluşan dört bileşenli sistemlerdir. Ara yüzeydeki gerilimin düşük olmasını sağlamak için yüzey etkin madde ile yardımcı yüzey etkin madde sisteme birlikte eklenir. Ko-surfaktan kullanılmadan oluşan mikroemülsiyonlar da bulunmaktadır ve bunlara kendiliğinden emülsifiye olabilen (self-emulsifying) mikroemülsiyonlar denilmektedir (10, 24, 26, 43).

Mikroemülsiyon sistemlerinde etkin madde sahip olduğu lipofilik özelliğe bağlı olarak sulu ve yağlı faz arasında dağılmaktadır. Etkin maddenin dağılım katsayısı salım hızına etki etmektedir. Salım hızını etkileyen diğer faktörler; dispers fazın damlacık boyutu, faz hacimlerinin oranı, etkin madde ile taşıyıcı sistemin etkileşmesi ve etkin maddenin sulu ve yağlı fazdaki difüzyonudur (2, 17, 22, 23).

Mikroemülsiyonlar ile emülsiyonlar arasındaki en belirgin fark mikroemülsiyonların spontan olarak oluşması yani hazırlanmaları esnasında mekanik işlem gerektirmemeleridir (25, 41, 46, 55).

#### **1.1.5.1.2 Mikroemülsiyonların Avantajları**

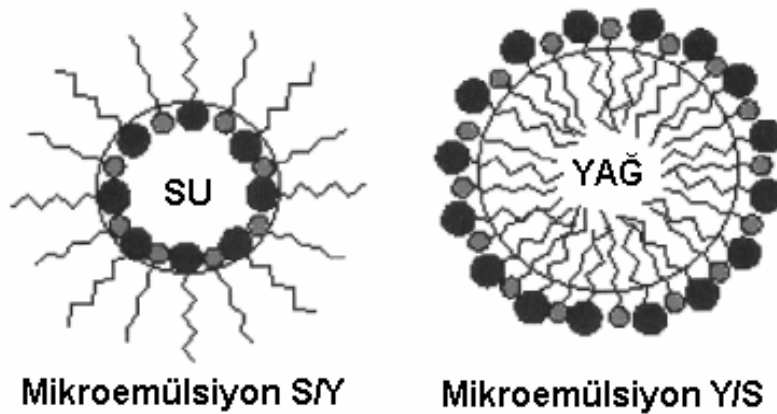
Mikroemülsiyonların sahip olduğu bazı avantajlar onları diğer ilaç taşıyıcı formülasyonlarına göre üstün kılmaktadır. Bunlar (20, 21, 42, 47, 52):

1. İlaçlar için yüksek çözünürlük kapasitesine sahiptirler.
2. Penetrasyon artırıcı özellikleri vardır ve mikroemülsiyonlardan ilaç absorpsiyonu hızlıdır.

3. Etken maddenin çevre koşullarından (yiyecekler, safra salgısı ve pH gibi) etkilenmesini azaltarak dayanıklılığını arttırlar.
4. Yüksek stabiliteye sahiptirler.
5. Hazırlanma yöntemleri kolaydır.
6. Yutulması güç olan katı ilaç şekillerinin yerine kullanılabilirler.

### 1.1.5.1.3 Mikroemülsiyonların Yapısı

Mikroemülsiyonlar yapı olarak üç farklı tipte olabilirler. Bunlar Y/S, S/Y (Şekil 1) ve geçişli (bicontinuous) yapılarıdır. Amfifil molekülün arayüzeydeki konumu sistemin Y/S veya S/Y tipinde olmasına etki eder. Y/S mikroemülsiyon sisteminde dış faz sudan oluşur ve amfifil moleküllerin hidrofilik kısımları dış faza, hidrofobik kısımları ise iç faza (yağ fazına) yönelmiş durumdadır. Geçişli (bicontinuous) yapıdaki mikroemülsiyonlarda su ve yağ oranları yüksektir. Bu tip mikroemülsiyonlarda yağ ve su fazları amfifilce zengin bir tabaka ile ayrılmış durumdadır (10, 27, 35, 36, 41, 53).



**Şekil 1.** S/Y ve Y/S mikroemülsiyonları

Mikroemülsiyonların yapısı için Schulman damlacık modelini geliştirmiş ve bunu yüzey gerilimine dayandırmıştır (27). Buna göre yüzey etkin madde molekülleri yağ ve su fazlarının ara yüzeyinde birikme eğilimindedir. Böylece iki fazdan birini damlacıklar haline getirip etrafını sarar. Damlacıklarla sürekli faz arasındaki yüzey gerilimi ( $\gamma$ ) Eşitlik 2 ile hesaplanabilir:

$$\gamma = \gamma_0 - \pi \quad ( \text{Eşitlik 2} )$$

Burada;

$\gamma_0$  = Yüzey etkin madde bulunmadığı zamanki yüzey gerilimi

$\pi$  = Karışım filminin genişleme basıncı

Stabilite için en uygun durum  $\gamma = 0$  olduğu durumdur. Bu durum için yüksek miktarda yüzey etkin madde / yardımcı yüzey etkin madde karışımına ihtiyaç olduğunu daha önce de belirtmiştik.

Hazırlanan mikroemülsiyonun Y/S veya S/Y tipinde olması yüzey etkin maddenin yapısına bağlıdır. Burada kritik topaklanma parametresi (critical packing parameter, CPP) önemlidir ve Eşitlik 3 ile hesaplanır (10, 25).

$$\text{CPP} = V / ( a \times l ) \quad ( \text{Eşitlik 3} )$$

$V$  = Yüzey etkin madde molekülünün hacmi

$a$  = Yüzey etkin maddenin baş kısmının alanı

$l$  = Yüzey etkin maddenin uzunluğu

CPP değeri 0-1 arasında ise Y/S tipinde, 1'den büyük olduğunda ise S/Y tipinde mikroemülsiyon oluşmaktadır. CPP değeri 1 ve su ile yağ

fazlarının hacimleri yaklaşık eşit ise geçişli mikroemülsiyonlar oluşmaktadır (10, 25).

#### **1.1.5.1.4 Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri (10, 35, 37)**

Mikroemülsiyonların oluşum teorilerini üç ana kategoride sınıflandırmak mümkündür. Bunlar:

1. Karışım Film Teorisi
2. Çözünürlük Teorisi
3. Termodinamik Teori

##### **1.1.5.1.4.1 Karışım Film Teorisi**

Bu teori ilk olarak Schulman ve arkadaşları ile Prince tarafından ortaya atılmıştır (27). Bu teoride arayüzey filminin, su ve yağ fazlarına dönük kısımlarında farklı özelliklere sahip çift tabakalı bir film olduğu düşünülmektedir. Burada yüzeyler arası gerilimi daha önce de bahsettiğimiz gibi Eşitlik 2 ile hesaplamak mümkündür.

##### **1.1.5.1.4.2 Çözünürlük Teorisi**

Bu teoriyi ilk geliştiren Gillberg ve arkadaşları ile Shinoda ve arkadaşları olmuştur (27). Burada mikroemülsiyonlar su ve yağın misel yapılar içerisinde çözüldüğü şişmiş miseller sistemler olarak kabul edilmiştir. Çalışmalarda üç ve dört bileşenli faz diyagramları kullanılmıştır.

### 1.1.5.1.4.3 Termodinamik Teori

Bu teori Ruckenstein ve arkadaşları ile Overbeck tarafından öne sürülmüştür (27). Buna göre bir mikroemülsiyonun termodinamik olarak stabil olması için serbest enerjinin negatif olması gerekmektedir. Burada serbest enerji ( $\Delta G$ ) Eşitlik 4 ile hesaplanabilir:

$$- \Delta G = V \times \Delta A \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Eşitlik 4'te  $V$  iki faz arasındaki yüzeyler arası gerilimi,  $\Delta A$  ise yüzey alanındaki değişimi göstermektedir. Yüzey alanı sıfır olamayacağı için, serbest enerjinin azalmasına karşı, yüzeyler arası gerilim azalmaktadır.

Mikroemülsiyon oluşumunda serbest enerjiyi belirten üç bileşen bulunmaktadır. Bunlar:

- Yüzeyler arası serbest enerji
- Damlacıklar arasındaki etkileşmenin enerjisi
- Ortamdaki damlacıkların entropisi

Bu bileşenleri Eşitlik 5'te gösterecek olursak:

$$\Delta G_m(r) = \Delta G_1 + \Delta G_2 - T \Delta S_m \quad (\text{Eşitlik 5})$$

$\Delta G_m$  = Serbest enerjideki değişim

$(r)$  = Damlacıkların çapı

$\Delta G_1$  ve  $\Delta G_2$  = Yüzeyler arası serbest enerji ve damlacıklar arasındaki etkileşmenin enerjisi

$T$  = Sıcaklık

$\Delta S_m$  = Karışımın entropisi



Yüzeylearası gerilimin, yüzeyleler arasındaki yardımcı yüzey etkin madde yardımıyla düşürülmesiyle negatif  $\Delta G$  değeri elde edilir. Böylece serbest enerjinin negatif olması sonucu mikroemülsiyonlar termodinamik açıdan stabil olarak kendiliğinden oluşurlar (10).

#### **1.1.5.1.5 Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi**

Mikroemülsiyonların damlacık büyüklüklerinin çok geniş bir aralıkta olması ve bazı mikroemülsiyonların dilüe edilememesi damlacık büyüklüğünün saptanmasını güçleştirmektedir. Damlacık boyutunun saptanmasında kullanılan birçok teknik mevcuttur. Bunlara örnek olarak NMR spektroskopisi, dondurulmuş örneklerde elektron mikroskopisi, nötronların difüzyonu ve ışık saçılımı gibi yöntemler verilebilir (17). Ancak ölçümlerdeki kısıtlamalardan dolayı, en ideali bu tekniklerin kombine halde kullanılmasıdır (25).

## **1.2 KANSER (1, 12, 44, 49)**

Kanser ya da tümör normal bir hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla giderek büyüyen anormal hücreler topluluğudur. Çevresindeki normal dokuları işgal edip klonal bir yayılma olur ve lenf ya da kan yoluyla organizmaya yayılır.

Yirminci asrın başlangıcında ölüm sebeplerinin başında enfeksiyon hastalıkları, tüberküloz ve akciğer hastalıkları gelmekte idi. Yine bu asrın baş ve ortasında çocuk ölümleri büyük bir sayı teşkil etmekteydi. Günümüzde ise insan ölümlerinde kalp hastalıklarından sonra kanser ikinci sırayı teşkil etmektedir.

Yaşlılarda, özellikle 75 yaşın üstündekilerde kanserden ölüm riski oldukça yüksektir. Bunun başlıca sebeplerinden birisi, bu kişilerin kanserojen maddelere direkt veya indirekt olarak uzun süre maruz kalmalarıdır. Çocuklar ve gençlerde kanser oldukça seyrek görülür. Bu durum, bu kişilerin karsinogenlere göreceli olarak az maruz kalmalarıyla ve ayrıca aktif olarak üreme dönemindeki insanlarda kanser insidansının düşük olmasıyla ilişkilidir.

Tümörler davranış şekillerine göre iki şekilde sınıflandırılır. Benign (iyi huylu) tümörler buldukları yerden yayılıp metastaz oluşturmazlar. Malign (kötü huylu) tümörler ya da kanser diye adlandırılanlar buldukları yerden bitişik dokularla, lenf sistemiyle ya da kan yoluyla diğer dokulara yayılırlar ya da metastaz yaparlar.

Kanserli hücrelerin başlıca özellikleri, artmış bir proliferasyon, düzenleyici proteinlerin kaybolmuş olması, genomik bir değişkenlik ve ölümsüzlüktür.

Tanı koyulduktan sonra kanserli hastanın ya küratif (iyileştirici) ya da iyileştirme olanağı yoksa palyatif (geçitirici) tedavisi amaçlanır. Kanserlerin çoğu lokalize tümöral kütle şeklinde bulunmalarına rağmen cerrahi ya da radyoterapi gibi lokal tedaviler hastalığı ortadan kaldıramamaktadır. Bu nedenle lokal tedaviyle birlikte veya tek başına sistemik kemoterapi uygulanır

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar hücre proliferasyon mekanizmalarını inhibe ettiklerinden hem tümör hücrelerine hem de proliferasyon gösteren normal hücrelere, özellikle kemik iliği, gastro-intestinal epitel ve kıl folikül hücreleri üzerine toksik etki gösterebilmektedir. Malign tümör hücrelerinde hücre bölünmesi, proliferasyondaki normal hücrelere göre çok daha fazla olduğundan antikanser ilaçların selektif sitotoksik etkileri

malign hücrelerde fazladır. Ancak antikanser ilaçların selektivitesi genellikle fazla değildir. İlaç uygulandıktan sonra yararlı etkileri, tümör hücrelerinin çoğalmasıyla orantılı olarak daha çok kemik iliği hücrelerinin çoğalma hızına bağlıdır. Kemik iliği hücreleri çoğalıp normale döndükten sonra daha fazla miktarda ilaç enjekte edilebilmektedir. İlacın her uygulama periyodunda (kür) belirli oranda tümör hücresi öldüğünden, tekrarlanan kürlerle tümörün eradike edilme (yok edilme) olasılığı artar.

### **1.2.1 Metastaz (44)**

Kanserin en korkunç yönü olan metastaz, vücudun bir yerindeki hastalığın başka bir yerine de sıçramasıdır. Kanserin yayılma yolları oldukça iyi bilinse de yayılma koşulları o kadar iyi bilinmemektedir. Aynı histopatolojik iki kanserden biri çabuk yayılırken öteki yayılmadan yıllarca kalabilmektedir. Çok seyrek görülen ilginç bir durumda da primer kanser hiçbir belirti vermemekte ancak bunun metastazı iyice büyümüş olmaktadır. Böyle kanserlere gizli (occult) kanser denir. Bu kanserlerin primeri gizli metastazı ise çok bellidir. Örneğin, bir bronş kanserinin beyindeki metastazını primer beyin tümörü sanabiliriz. Gizli bir meme kanserinin koltuk altı lenf bezlerindeki metastazları hastalığın ilk belirtisi olabilir. Bunun memeden kaynaklandığını kanıtlamak veya nereden kaynaklandığını bulmak da her zaman kolay değildir.

Metastazlar belirli bir büyüklüğe varınca, bunlar da yeni metastazlara kaynak olabilirler, yani “metastazların metastazları” da olabilmektedir. Kanser hücreleri bir yerde tutunduktan sonra bile bu tutunmanın dereceleri vardır. Orada sürekli büyüyebilirler, nekroza uğrayabilirler ya da pek çoğalmaksızın

uyur durumda kalabilirler. Bu durum hastanın kendi savunma gücüne de bağlıdır. Metastazlar direkt yayılma, lenf yolu ve kan yoluyla olur.

Deri kanserlerinin %4 kadarı malign melanomadır (bütün kanserlerin %1'i). Erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda meme ve uterus kanserleri sıklıkla görülür ve yüksek oranda ölüm sebebi olurlar. Kolon ve rektum kanserleri iki cinste de yakın oranlarda görülür.

Tablo 2'de de görüldüğü üzere bazı kanser türlerinin görülme sıklığı cinsiyete göre oldukça farklılık göstermektedir. Örneğin meme kanserinin erkeklerde görülme olasılığı 100.000 de 1'den daha azdır ve erkeklerde görülen tüm kanserlerin % 0.5'ini oluşturur. Buna karşın bu kanser türünün kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre 100 kat daha fazladır (49).

**Tablo 2.** Organlara ve cinse göre kanser ensidansı

	<b>ERKEK %</b>	<b>KADIN%</b>
Deri	23	13
Ağız	3	2
Akciğer	19	5
Kolon ve Rektum	11	13
Diğer Hazım Organları	9	7
Prostat	11	-
Üriner Sistem	6	3
Meme	-	23
Uterus	-	14
Lösemi ve Lenfoma	7	6
Bütün Diğerleri	11	14

### **1.2.2 Kanserin Tanısı (44)**

Kanser hastalığının tanısının konması tedavi açısından çok önemlidir. Özellikle erken dönemde teşhis hayatta kalım oranını arttırmaktadır. Son yıllarda gelişen teknolojiye paralel olarak tanı yöntemlerinde de ilerleme kaydedilmiştir.

#### **1.2.2.1 Görüntüleme (44)**

Ultrasonografi (US) ve bilgisayarlı tomografi (BT) nin yanında son yıllarda büyük tıp merkezlerinde MRI (magnetic resonance imaging) de kullanılmaktadır. Bu yöntemler tanıda ve tedaviyi planlamada oldukça yararlıdır.

#### **1.2.2.2 Tümör Belirtileri (44)**

Vücut sıvılarında tümörler için spesifik olabilecek bazı maddeler arayışı öteden beri vardır. Tümörün varlığını belirten böyle maddelere tümör belirtileri (marker) denir. Bu maddeler tümörün kendi ürünü olabilir; yani bunları tümör hücreleri yapar ve kana verir. Öte yandan, bu maddeler hastanın tümöre karşı reaksiyonu sonucu da ortaya çıkabilirler.

#### **1.2.2.3 Paraneoplastik Sendromlar (44)**

Paraneoplastik sendromlar kanser tanısında önemlidir. Tümörlerin neden olduğu direkt ve indirekt etkilerinden bahsedilebilir. Direkt etkilerine örnek olarak beyin tümörlerinin kafa içi basıncını arttırması, gastrointestinal tümörlerin yemek borusu, mide ya da barsak tıkanmalarına yol açması, safra tümörlerinin sarılığa neden olması gösterilebilir.

Kanserin indirekt etkileri ise tümörün yaptığı biyolojik olarak aktif hormonlara, büyüme faktörlerine, bir takım hümorale maddelere bağlıdır. Bazı durumlarda antijen-antikor reaksiyonu sonucu da ortaya çıkabilir.

Endirekt etkilere bağlı klinik sendromlara paraneoplastik sendromlar denir.

#### **1.2.2.4 Biopsi (44)**

Kanserin esas tanısı biopsi ile konur. Lezyonun kanser olup olmadığı, kanserse hangi çeşit kanser olduğu ancak böyle anlaşılır. Tedavi de buna göre planlanır.

#### **1.2.3 Tümörlerin Histolojik Olarak Sınıflandırılması (1)**

Hangi dokudan kaynaklanırsa kaynaklansın, kötü huylu tümörlerin hepsi kanser deyimi altında toplanır. Epitel dokusundan (ektoderm, endoderm) kaynaklanan kanserlere karsinoma, bağ dokusundan (mezoderm) kaynaklanana da sarkoma diyoruz.

##### **1.2.3.1 Epitel Dokusundan Kaynaklananlar (1)**

Yassı epitelden (deri, ağız mukozası, larinks, üriner sistem, akciğer, uterus serviksi vb.) kaynaklanan iyi huylu tümörlere papilloma, kötü huylulara epidermoid karsinoma (squamous, yassı epitel kanseri) denir.

Gland (bez) epitelinden (meme, kolon, pankreas, karaciğer vb.) kaynaklanan iyi huylu tümörlere adenoma, kötü huylulara adenokarsinoma denir.

Epitel dokusunun kötü huylu tümörlerinin, kaynaklandıkları dokulara benzerlikleri çok azsa, bunlara anaplastik (ya da iyi diferansiye olmayan) karsinoma denir.

### **1.2.3.2 Mezodermden Kaynaklananlar (Mezenşimal Tümörler) (1)**

Fibroma ve fibrosarkoma bağ dokusundan; rabdamiyoma ve rabdomiyosarkoma çizgili kastan; leiomiyoma ve leiomiyosarkoma çizgisiz kastan; lipoma ve liposarkoma yağ dokusundan; anjioma ve anjiosarkoma damarlardan; osteoma ve osteojenik sarkoma (osteosarkoma) kemik dokusundan; kondroma ve kondrosarkoma kıkırdak dokusundan kaynaklanan iyi ve kötü huylu tümörlerdir.

Lösemiler, multipl miyeloma ve lenfomalar hemopoitik dokudan kaynaklanır ve hepsi kötü huyludur.

Melanositlerden (bunlar deride ve gözde vardır) kaynaklanan iyi huylu tümörlere nevus, kötü huylulara melanoma denir.

### **1.2.4 Kanser Hastalığında Tedavi Yöntemleri**

Kanser hastalığının tedavisi zor ve kompleks bir süreçtir. Genelde tedavide bir yerine birkaç yöntem birlikte kullanılır. Tedavi sırasında büyük oranda yan etkiler görülür.

Başlıca tedavi yöntemleri (44):

- Cerrahi Tedavi
- Radyoterapi
- Kemoterapi
- İmmünoterapi

- Bilimsel Olmayan Tedaviler
- Kanserli Hastalarda Komplikasyonların Tedavisi

#### **1.2.4.1 Kemoterapide Hücre Siklusunun Önemi (44)**

Son yıllarda antikanser ilaçların etki mekanizmasının bilinmesi ve kanser hücre kinetiğinin öğrenilmesi kemoterapötik ajanların daha bilinçli bir tarzda kullanılmasını sağlamıştır.

Kanser kemoterapisinde kullanılan ajanlar ya tek tek ya da 3-5'i bir arada kullanılırlar. Bu uygulamada farklı etkileri olan ilaçlar birleştirilerek daha çok tümör hücresi öldürülür. Farklı toksisite gösteren ilaçlar birleştirilir. Böylece daha kuvvetli bir etki sağlanır ve bu etki daha az toksisite gösterir. Birleşik kemoterapi ile dirençli hücrelerin üremesine fırsat verilmemiş olur. Uygulama aralıklı olduğundan aradaki dinlendirme süresinde organizmanın normal hücreleri toparlanma fırsatını bulur.

Hücrede bir mitozun tamamlanmasından sonra ikinci mitozun başlamasına kadar geçen döneme hücre siklusu denir. İlaçların hücre siklusu ile ilgili etkilerinin bilinmesi birleşik kemoterapi seçiminde ve ilaçların toksik etkilerinden korunmada önemli rol oynar.

Hücre siklusunu birbirini takip eden 5 evresi vardır;

**G<sub>0</sub> Evresi :** Mitozdan sonra hücrelerin istirahata çekildiği dönemdir. G<sub>0</sub> evresindeki hücrelerin bölünme yeteneği vardır. Bu dönemde hücreler uyku halinde ve sessizdir. Bu dönemde antineoplastik ajanlar hücrelere etkisizdirler. Bu dönem 5.5 saat sürer.

**G<sub>1</sub> Evresi :** Mitozun bitiminden DNA sentezinin başlangıcına kadar sürer. Bu döneme post mitoz evresi denir. Bu dönem 4 saat sürer.



S Evresi : Bu dönemde hücre DNA sentezi yapar. Hücre metabolizması en aktif döneminde olup antimetabolik ilaçlara çok duyarlıdır. Bu dönem 12 saat sürer.

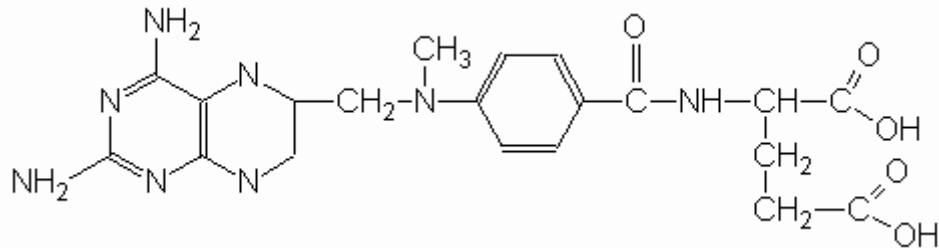
G<sub>2</sub> Evresi : DNA sentezinin tamamlanmasından mitozun başlamasına kadar geçen evredir. Hücre bölünmeye hazırdır. Metabolik aktivitesi azalmıştır. Bu döneme pre-mitoz evresi de denir. Bu dönem 2 saat sürer.

M Evresi : Bu evre mitoz evresidir. Hücre bölünmektedir. Metabolik aktivitesi son derece azalmıştır. Mitozun profaz, anafaz ve telefaz olmak üzere 4 dönemi vardır. Bu dönem yarım saat sürmektedir.

Kemoterapide kullanılan ilaçların bir kısmı hücre siklusunun belirli bir evresine etki gösterirler. Bunlara siklus spesifik sitostatikler denir.

### 1.3 Model Etkin Madde Metotreksat (Mtx) Hakkında Genel Bilgiler

Mtx, 4-amino-10-metil folik asit, 4-amino-10-metilpteroil-L-glutamik asit, 4-amino-4-deoksi-10-metilpteroil-L-glutamik asit veya  $\alpha$ -methopterin ya da amethopterin (Şekil 2) kanser tedavisinde kullanılan antimetabolit aktiviteye sahip bir ilaçtır (5, 31, 48).



**Şekil 2.** Mtx'in kimyasal yapısı

Mtx, sarıdan turuncu-kahverengiye kadar değişen renkte kristalize tozdur. USP'ye göre genel formülü  $C_{20}H_{22}N_8O_5$  olan bileşikte 4-amino-10-metil folik asit miktarı % 94'ten az olmamalıdır. Madde %12'den fazla su içermez (31, 48).

Pratik olarak suda, alkolde, kloroformda ve eterde znmez. Mineral asit zeltelerinde ve alkali hidroksit ve karbonatlarının dilüe zeltelerinde znr. Erime derecesi 182–189°C'dir. Enjeksiyonluk preparatları filtrasyon yöntemiyle sterilize edilir. USP'ye göre enjeksiyonluk preparatlarının pH'ı 8 -9 olmalıdır. Hava ile temas etmeyecek Şekilde ve ıŐıktan koruyarak saklanmalıdır (31, 48).

Mtx ilk kez 1948'de çocukların lsemilerini tedavi etmek amacıyla tedaviye sokulmuŐtur (12). Mtx iritan olduğu için cilt ve mukoz membranlarla temasından kaçınmak gerekir (31).

### **1.3.1 Farmakolojisi ve Farmakokinetiği**

Mtx sodyum tuzu halinde kullanılır ve folik asit antagonisti bir antimetabolittir. Yapısal olarak folik asit analogudur. Dihidrofolat redüktaz enzimi ve NADPH ile inaktif l (turner) bir kompleks oluşturur. Bakteri ve kanser hücresinin yanında, normal hücrelerdeki dihidrofolat redüktaz enziminin de non-spesifik inhibitörüdür. Mtx, dihidrofolat redüktazın inhibisyonu ile inaktif bir prekürsör olan folik asidin önce tetrahidrofolik aside daha sonra da biyolojik olarak aktif olan folinik aside indirgenmesini engeller. Bunun sonucunda purin bazlarının (adenin ve guanin) ve bir pirimidin bazının (timidin) sentezi bozulur. Böylece DNA ve kısmen RNA sentezi engellenmiŐ olur (5, 12, 44). Mtx hücre siklusunun S fazında etkilidir (44).

Mtx DHFR inhibisyonundan ayrı olarak fosforibozil pirofosfat'ı 5-fosforibozilamine dönüştüren amidofosforil-transferaz enzimini de (IMP sentezi) inhibe eder (12).

Mtx aktif transportla hücreler içine girer ancak yüksek konsantrasyonlara eriştiğinde pasif difüzyonla da geçiş olmaktadır. Hücre içinde, folik asit gibi Mtx da folat-poliglutamil sentaz etkisiyle bir ya da daha çok glutamat rezidüsüne bağlanır ve poliglutamat şeklinde hücre içinde uzun süre kalır (5, 12).

İlaç fazla selektif bir etki göstermez, özellikle hızlı bölünme gösteren kanser hücreleri, sindirim sistemi epitelyumu ve kemik iliğinin normal hücreleri üzerine etkili olur (12).

Mtx'ın yaptığı dihidrofolat redüktaz blokajı Citrovorum Faktör (Leucovorin Calcium) ile ortadan kalkar. Tedavide toksik semptomlar görüldüğü zaman Leucovorin Calcium (Citrovorum faktör, folinik asit) günde 15-30 mg IV ya da IM olarak kullanılır (44).

Mtx ağızdan verildiğinde 1-4 saat sonra plazmada en yüksek düzeye ulaşır. IV ya da IM kullanıldığında ise yarım ila iki saat süresinde kanda maksimal yükselme gösterir. İlacın %50'si serum proteinlerine bağlanır. Mtx geniş bir tarzda böbrek, safra kesesi, karaciğer, dalak ve deriye dağılır. Standart doz uygulamalarında, ilaç sinir sistemi ve BOS'a girmemektedir. Uzun süre kullanıldığında ise plasenta ve anne sütüne geçer, kan - beyin engelini aşabilir. İlacın % 75'i 8 saat sonra idrarda değişmemiş olarak bulunur (44).

Renal fonksiyon bozukluklarında ilacın dozu düşürülür. Salisilatlar ve diğer zayıf organik asitler tubüler aktif transportu engelleyerek ilacın atılımını

geciktirirler. Ağızdan ve parenteral verildiğinde ilaç serebrospinal sıvıya yeteri kadar geçmez. İlacın tubüler sekresyonu penisilin, probenesid, sefalotin ve sülfonamidler tarafından geciktirilir. Öte yandan Mtx ile aynı farmakolojik aktiviteyi gösteren primetamin (Daraprim) aynı anda verilirse ilaç-ilaç etkileşimi gözlenir (44).

İlacın oral kullanımında absorpsiyonu hızlıdır ve serum düzeyleri istenen yüksekliğe kısa sürede ulaşır ( $< 30 \text{ mg/m}^2$ ). Ancak biyoyararlanımı besinlerle ve sütle azalmaktadır. Aynı zamanda uygulanan allopurinol akut hiperürisemi episodlarını önler (44).

İlacın atılımı %80 böbrekler ve %10 safra ile olur (16).

### **1.3.2 Mtx'in Etki Mekanizması (5, 44)**

Günümüzde Mtx etkisi ile ilgili yeterince bilgiye sahip olmamıza rağmen bu ilaç ve folat metabolizmasıyla ilgili birçok şeyi öğrenmeye devam etmekteyiz. Örneğin Mtx birçok hücreye, indirgenmiş folatları kullanarak aktif taşıyıcılı transport mekanizmaları ile girmektedir. Hücre içerisinde Mtx öncelikle 5 veya daha fazla glutamatın eklenmesi ile poliglutamilize olur. Mtx ve Mtx poliglutamatları dihidrofolat redüktaza sıkıca bağlanır ve böylece timidilat ve pürin sentezi için gerekli olan tetrahidrofolatın oluşumu inhibe olur. Mtx tedavisinden sonra dihidrofolat poliglutamatları da Mtx poliglutamatları gibi artmakta ve pürin biyosentezini inhibe etmektedir.

Günümüzde folatların ve Mtx'in indirgenmiş taşıyıcılarla taşınmasından farklı olarak ikinci bir transport yolağı daha tanımlanmıştır. Folik asit ve 5-metil tetrahidrofolat bu sisteme Mtx'dan daha fazla afinite göstermektedir. Bu sistem ilacın potositozis denilen bir yöntemle hücre içerisine alındığı endositik

tipte bir yolaktır. Folat reseptör proteinlerinin genleri klonlanmış ve bu proteinin antikoru bağ yapan bu proteinlerin normal ve malinant dokulara dağıtılmasını engellememişlerdir. Bu proteinlerin dağılımı böbrek tübülüsleri ve koriyoid pleksusu gibi bazı az sayıdaki normal dokularda ise sınırlıdır. Özellikle ovaryum kanseri gibi önemli tümörlerde bu proteinin yüksek miktarları bulunmaktadır. Bu durum bu tümörlerin hücre içerisine bu transport mekanizmaları ile giren antikolar veya antifolatlar için hedef olduklarını göstermektedir.

Mtx etki mekanizmasının anlaşılması Mtx'a karşı sonradan direnç kazanan hücrelerin çeşitli mekanizmalarının anlaşılmasına da olanak sağlamaktadır. Mtx direncinin bilinen 4 mekanizması; ilacın hücre içine alımının azalması, kusurlu poliglutamilasyona bağlı olarak hücre içerisinde tutulmasının azalması, enzim aktivitesindeki azalma veya Mtx'ın dihidrofolat redüktaza bağlanmasındaki azalmadır. Bu mekanizmaların temel genetik prensipleri Mtx'a dirençli hücre hatları, özellikle gen amplifikasyonu ve dihidrofolat redüktazda aminoasit değişikliği ile sonuçlanan nokta mutasyonları ile izah edilmektedir. Transporttaki azalmanın veya poliglutamilasyon hatalarının prensipleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Folil poligluamat sentaz geninin ve indirgenmiş folat taşıyıcı genlerinin klonlanması bu rezistan fenotiplerin moleküler prensiplerinin tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

### **1.3.3 Mtx Etkinliğinin Bağlı Olduğu Bileşenler**

1. Konsantrasyonu ve kararlılığı
2. Hücre içerisine geçme oranı

3. Poliglutamilasyon derecesi
4. Poliglutamatların Mtx'a hidroliz oranı ve bu suretle hücreden dışarıya çıkma oranı (15).

### **1.3.4 Kemoterapötik Ajanlar İçin Hedef Olan Timidilat Döngüsü Enzimleri (5)**

Antimetabolitler kanser hastalıklarının tedavisinde önemli ilaçlar olmaya devam etmektedir. Bu ilaçların antimetabolit aktivitelerinin spektrumu şu şekildedir:

1. Fluoropirimidinler: Gastrointestinal bölge, göğüs, mesane, baş ve boyun kanserleri
2. Tiyopürinler: Akut lösemi
3. Sitosin arabinosid: Akut lösemi, lenfoma
4. Mtx: Akut lenfositik lösemi, meme kanserleri, baş ve boyun, karsiyokarsinoma, lenfoma

Bu ilaçlar kanser tedavisinde, özellikle uzun dönemdeki toksisiteleri bakımından önemli avantajlara sahiptirler. Bunlar:

1. Genellikle karsinojenik değildirler.
2. Genellikle steril üretilmezler.
3. Genellikle uzun dönem toksisiteleri (kardiyak, pulmoner) yoktur.
4. Hızlı iyileşme sağlarlar.
5. Artan etkinlikle modüle edilebilirler.

Bu nedenle bu sınıfın klinik olarak yararlı ilaçları nükleik asit sentez inhibitörleri ve DNA ve/veya RNA sentezini etkileyerek hücrenin büyümesine engel olanlardır. Kontrol edilemeyen hücre büyümesine neden olan başlıca

mekanizmalar bilinmektedir ve bu yolları hedef alan inhibitörler daha yararlı ve selektif ajanlar olmaktadır. Antimetabolit tanımı ilaca veya kimyasal maddeye göre değişiklik gösterebilir. Bunlar metabolitler için enzim veya reseptör kısımları ile yarışır ancak klasik anlamda bunlara benzemezler. Bazı antimetabolit ilaçların etki mekanizmalarıyla ilgili bilinenler bunların transport, aktivasyon, alıkoyma ve katabolizma yolları hakkındaki bilgilerdir ve bunlar tümör hücrelerinin bu tip ilaçlara karşı intrinsik olarak ve sonradan kazanılan tipte direnç göstermelerinin anlaşılması için önemli fırsatlar sunmaktadır. Sitozin arabinosid gibi bazı antimetabolitler antikanser aktivite açısından dar bir spektrum gösterirken antifolatlar ve floropirimidinler gibi bazıları ise kanser tedavisinde geniş spektrumlu kullanıma sahiptir. Deneysel tümörlerdeki intrinsik dirençle ilgili geniş bilgi olmasına rağmen insan kanserlerinin bu ilaçlara karşı intrinsik dirençlerinin veya hassasiyetlerinin prensipleri tam olarak anlaşılammıştır.

### 1.3.5 Dozlama (15)

Mtx ile yapılan tedavilerde asıl olan hastaya özgü doz kullanımıdır. Hastanın genel durumu ve tedaviye verdiği cevap göz önüne alınmalıdır. Bunla birlikte genel olarak etkili doz aralıkları yetişkinlerde;

Intravenöz		30 – 40 mg/m <sup>2</sup>
Oral	Günlük	2.5 – 10 mg/gün
	5 günlük	15 – 30 mg/gün
	Haftalık	40 – 50 mg/m <sup>2</sup>
	2 haftalık	15 – 20 mg/m <sup>2</sup>

### 1.3.6 Toksik Etki (12, 44)

İlacın kusma, bulantı, abdominal sıkıntı, döküntü, iştahsızlık, diyare, gastroentestinal ülserasyonlar, alopesi, stomatitis, vaskülit, megaloblastik anemi, solunum yolu hastalıkları (ateş, öksürük, eozinofili, pöral ağrı ve pulmoner fibrozis) ve hepatotoksisite (enzimlerin ileri derecede yükselişi ve siroz gelişimi ile) gibi yan etkileri görülebilir. Mtx tek başına uzun süre kullanıldığında tedavi edilen hastaların %5-15'inde sitoliz belirtileriyle karaciğerde kronik toksisite belirtilerine neden olmaktadır.

Dermatolojik olarak perifolikülit pigmentasyon ve döküntü belirgindir. Amenore, parastezi, derin tendon refleksi azalması, ensefalitis görülebilir. İntratekal verildiğinde parapleji meydana çıkabilir.

Mtx ve sisplatin nefrotoksisitesi en fazla olan sitotoksik antikanser ilaçlardır.

Mtx'in böbrek toksisitesi kendisinin ve metabolitlerinin (7-hidroksimetotreksat) tubülüslerde presipite olmalarından kaynaklanmaktadır. Tubülopati ilacın idrardan eliminasyonunu geciktirmekte ve dolayısıyla böbrek dokusuna olan zararlı etkisini artırmaktadır. İdrar pH'ının uzun süreli alkali yapılması (  $pH > 8$  ) bu toksisiteyi azaltmaktadır.

Mtx'in kemik iliği toksisitesi ağızdan küçük dozlarda ve IV yüksek dozlarda alındığında görülebilir. İlacın (etkileri uzun süren diğer antimetabolit ilaçlarda olduğu gibi) kemik iliği depresyonu etkisi yüksektir ve hızlı gelişen lökopeniye yol açar. Ancak bunun düzeltilmesi de hızlı olur. İdrarın pH'sının alkalileştirilmesi ilacın atılımını hızlandırır. Bunun için sodyum bikarbonat tabletleri kullanılabilir. Ayrıca uygun hidrasyon gereklidir.



İlacın özellikle çocukların lenfoblastik akut lösemilerinin tedavisinde uygulanması sırasında kronik nörotoksisite belirtilerine yol açtığı bildirilmiştir. Radyolojide ventriküler dilatasyon ve minimal düzeyde kortikal atrofi görüntüsü ortaya çıkmaktadır. Bu toksik etki ilacın radyoterapi ile birlikte uygulanması durumunda belirgin bir şekilde artmaktadır. Meningeal irritasyon (ateş, baş ağrısı, bulantı ve kusma semptomları ile) görülür. Ancak bu bulgular önceden santral sinir sistemi patolojisi olanlarda daha sık ve erken çıkar.

Meningoensefalitis yan etkisi haftalar ve aylar sonrası ortaya çıkar. Koagülasyon nekrozu ve subependimal bozukluk gelişebilir. Transfer miyelitis görülebilir.

### **1.3.7 Mtx-ilaç Etkileşmesi (12, 44)**

Mtx yüksek oranlarda plazma proteinlerine bağlandığından asit yapılı ilaçlar Mtx-protein bağına bozarlar.

Mtx; salisilatlar, sülfonamidler, fenitoin, tetrasiklin, kloramfenikol ve para-aminobenzoik asit ile birlikte kullanıldığında daha çabuk toksik etki gösterir. Alkol kullanılması karaciğer toksisitesini hızlandırır.

Mtx'in sellüler alınımını vinka alkaloidleri artırır, buna karşın penisilin, kanamisin, kortikosteroidler ve hidroksiüre, bleomisin ve L-asparaginaz hücrel alınımını azaltır.

### **1.3.8 Endikasyonları (15, 44)**

1. Akut lenfositik lösemilerde idame tedavisinde
2. Koriokarsinomalarda

3. Meme kanseri, testiküler karsinom, over karsinoma ve yulaf hücreli bronkojenik karsinomlarda kombine kemoterapötik olarak
4. Yüksek doz tedavi denemesi yapılan hastalıklar: Pankreas kanserleri, rezistan lenfoma, osteojenik sarkoma, yulaf hücreli karsinom, serviks, baş ve boyun squamous hücre karsinomları.
5. Mtx kanser tedavisi dışında romatoid artrit, psöriazis ve otoimmün hastalıkların tedavisinde ve doku transplantasyonlarından sonra görülen enfeksiyöz hastalıkların önlenmesinde çok düşük dozlarda kullanılır. Ayrıca abortifasyent olarak kullanılabileceği de bildirilmiştir.

### **1.3.9 Kontrendikasyonları**

Ağır renal ve hepatik bozukluklar ve ilerlemiş kemik iliği depresyonu durumlarında kontrendikedir. Ayrıca Mtx tedavisi sırasında canlı virüs aşısı yapılması uygun değildir (44).

İlacın teratojen etkisi vardır ve gebelik başlıca kontrendikasyondur (12).

### **1.3.10 Yan Etkiler**

Mtx ile tedavide görülen başlıca yan etkiler bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare, iştahsızlık, kaşıntı, kızarıklık, alopesi, baş dönmesi, baş ağrısı, konjonktivit, hiperürisemi ve immunosupresyondur (4, 12, 16, 44).

#### 1.4 HÜCRE KÜLTÜRÜ (8, 13)

Hücre kültürü, hücrelerin in vitro ortamlarda (canlı organizma dışında) çoğaltılmasıdır. Bu işlem için gerekli teknolojiye de hücre kültürü teknolojisi denir.

İlk olarak 20. yüzyılın başlarında doku kültürü çalışmaları yapılmış, daha sonra 1950'lerde disperse olmuş hücre kültürü çalışmaları başlamıştır.

Hücre kültüründe kullanılan hücreler dokulardan enzimatik, mekanik veya kimyasal yollarla ayrılıp elde edilen hücrelerdir. Bu şekilde dokudan doğrudan izole edilen ve ilk hazırlanan kültüre primer kültür denir.

Doku normal yani sağlıklı bir dokuysa hücreler genellikle üremek için bir yüzeye tutunma eğilimindedirler (bazı kan ve kanser hücreleri hariç). Bu şekilde, yüzeye tutunarak üreyen hücre kültürüne monolayer denir.

Hücreler üreme ortamında farklı şekillerde çoğalabilirler:

- Primer izolatlar: Tek tabaka halinde ürerler
- Transforme izolatlar: Çok tabaka üretebilirler
- Monolayer: Yüzeye tutunarak ürerler
- Süspande olanlar: Sıvı ortamda süspande halde karıştırma ile veya karıştırmaksızın hücre çoğalmasıdır.

Hücreler primer izolatların arkasından, istenirse mekanik ve enzimatik yöntemlerle birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden uygun ortamlarda dilüe edilerek başka bir kaba aktarılırlar (daha büyük veya daha fazla sayıda kap). Buna pasaj = subkültür denir.

### 1.4.1 Hücre Kültüründen Nerelerde Yararlanılır (8, 13)

**Virüslerin Üretilmesi:** Virüsler üremek için canlıya ihtiyaç duyarlar. Virüs izolasyonlarında hücre kültürlerinden yararlanılır. Virüslerin en önemli ürünü olan aşı üretiminde kullanılır. Ayrıca gen teknolojisinde ihtiyaç duyulur. Dolaylı olarak rekombinant aşı üretiminde kullanılır.

**Hormon Üretimi:** Bu amaçla ilk üretilen hormon insülin hormonudur

#### **Enzim Üretimi**

**Antikor Üretimi (Monoklonal antikor teknolojisi):** Poliklonal antikor üretilmesi kolaydır. Ancak monoklonal antikor üretimi için hücre kültürü gerekir.

**Histiyotipik Kültürler:** Doku benzeri kültürlerin oluşturulmasıdır. Etik şartlar bu çalışmaları sınırlandırmaktadır. Hücre kültüründen farklı sonuçlar alınabilir ama benzer doku oluşturulursa canlı organizmaya yakın sonuçlar alınır. Bu da histiyotipik kültürler ile yapılır.

Ayrıca **organ kültürlerinde, yapay organların oluşturulmasında, ilaç etkileşmesinin incelenmesinde ve ilaç yönlendirme çalışmalarında** hücre kültürlerinden yararlanılır.

### 1.4.2 Hücre Kültürü Çalışmalarının İlgili Alanları (8, 13)

1. İntraselüler aktivite
2. Hücrelerin çevre ile ilişkileri
3. Hücre-hücre etkileşimi çalışmaları
4. Hücre ürünleri ve sekresyon
5. Genetik çalışmalar

### 1.4.3 Hücre Kültürü Laboratuvarında Bulunması Gereken Cihazlar

(8, 13)

- Laminar akışlı kabin (Laminar flow cabin)
- CO<sub>2</sub> 'li etüv
- Santrifüj
- İverted faz kontrast mikroskop
- 4 – 8°C buzdolabı
- ( -20 ) – ( -30 )°C derin dondurucu
- -86°C ve sıvı azot konteynırları
- Vakum hattı

### 1.4.4 Tek Kullanımlık Malzemeler (8, 13)

- Flasklar (Kültür üreme kabı)
- Petri kapları
- Çok gözlü kaplar (plate)
- Kreo tüpler (Hücre dondurma ampulleri)
- Steril veya nonsteril konteynırlar (plastik)
- Santrifüj tüpleri (Değişik çaplı)
- Pipetler
- Filtreler

### 1.4.5 Sterilizasyon (8, 13)

Solüsyonların ve cam malzemelerin sterilizasyonu için otoklav olmalıdır. Disposable malzemeler (plastik malzemeler) otoklavda sterilize edilemez. Bu işlem için ya  $\gamma$ -radyasyon ile ya da etilenoksit ile otoklavda, sadece yüzey

sterilizasyonu isteniyorsa UV kabinlerinde sterillenirler. Cam malzemeler genelde kuru sterilizatörde (Pasteur fırını) sterilize edilirler. Yıkanan malzemeyi kurutmak için 100 °C'de kurutma fırını vardır.

## BÖLÜM II

### DENEYSEL BÖLÜM

#### ÇALIŞMANIN GENEL PLANI

Çalışmaya başlarken amacımız giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi, model etkin madde olarak seçilen Mtx'in intramusküler yolla kullanılabilen bir S/Y mikroemülsiyon formülasyonunu hazırlamaktı.

Çalışmada esas olarak, kanser tedavisinde halen tercih edilen bir kemoterapötik ajan olan Mtx'in mikroemülsiyon şeklinde hastaya sunulabilmesi hedeflendi. Böylelikle halen kullanılmakta olan ilaç doz miktarlarından daha az dozda Mtx ile aynı sitotoksik etkinin elde edilmesi amaçlandı. Bunun sonucunda düşen Mtx dozuna bağlı olarak toksik yan etkilerin azaltılabileceğini düşündük.

Tüm bu hedeflerden hareketle, ilk olarak farklı yüzey etkin maddeler kullanılarak S/Y tipi mikroemülsiyon formülasyonları hazırlandı. Bu çalışmalar sırasında elde edilecek optimum mikroemülsiyon formülasyonunun içerdiği su fazı miktarının en yüksek düzeyde olması amaçlandı. Çünkü etkin madde Mtx belli dozda bu faza yüklenecekti. Formülasyon çalışmaları sırasında yüzey etkin madde : yardımcı yüzey etkin madde oranlarını belirlerken yüzey etkin madde miktarını olabildiğince düşük tutmaya çalıştık. Çünkü artan yüzey etkin madde miktarı formülasyondaki su miktarını da arttırmasına rağmen toksisiteyi de arttırmaktaydı (17). Bu durum işimizi oldukça zorlaştırdı. Ancak değişik miktarlarda ve farklı yüzey etkin madde karışımlarıyla çok sayıda deneme yapılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonu elde edildi.

Daha sonraki aşamada seçilen ideal mikroemülsiyon formülasyonundaki Mtx'ın difüzyonu in vitro olarak insan periton mukozası kullanılarak incelendi.

En son aşamada ise bu ideal formülasyona yüklenmiş Mtx'ın hücre kültürü çalışmasıyla sitotoksisite deneyleri yapıldı. Burada meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde çalışıldı. Hazırladığımız formülasyonun ticari preparata kıyasla etkisi araştırıldı.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metotreksat	E. Merck
Soya Yağı	Morsa
Mısırözü Yağı	E. Merck
Span 80	E. Merck
Tween 80	Orva Fischer Chemicals
Etanol	E. Merck
Isopropanol	Atabay
Brij 58	E. Merck
Cremophore EL	Sigma
MCF-7 Hücre Hattı	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
Dimetilsülfoksit	Sigma
Trypan blue	Sigma
RPMI-1640 besiyeri	Sigma

#### 2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Manyetik karıştırıcı	Velp - Scientifica
Hassas Terazî	Sartorius Basic
UV Visible spektrofotometre	Schmadzu
Sonikatör	Elma Transsonic 660/H
Viskozite ölçümü	Brookfield DV-III Rheometer
Partikül boyutu ölçüm aleti	Malvern Zeta Sizer 3000HS <sub>A</sub>

pH metre	Inolab
Etüv	Nüve EN 400
Buzdolabı	Arçelik
Dissolüsyon aleti	Pharma Test
Franz difüzyon hücresi	PermaGear
Santrifüj	Janetzki
Su banyosu	Buchi 461
İnkübatör	Jouan
Refraktometre	Atago Illuminator

## **2.2 Yöntem ve Deneyler**

### **2.2.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Mtx'in Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.2.1.1 Mtx'in Infrared ( IR ) Analizi**

Mtx'in %1 oranında potasyum bromür içerisinde homojenize edilerek çok ince şeffaf tabletleri basılarak, IR spektrofotometrede  $4000-0 \text{ cm}^{-1}$  arasında taranıp pik verdiği dalga boyları tespit edildi.

#### **2.2.1.2 Mtx'in Ultraviyole ( UV ) Analizi**

Mtx'in UV spektrumu 0.1 N NaOH çözeltisinde 200-400 nm arasında alındı. Maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları tespit edildi.

#### **2.2.1.3 Mtx'in UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimleri**

Mtx'in serum fizyolojik ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisi için belirli bir konsantrasyonda Mtx'in stok çözeltisi 0.1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı (10 mg/10 ml). Hazırlanan bu çözeltiden de uygun seyreltmeler

yapılarak konsantrasyonları farklı (1-10 µg/ml) olan bir seri çözelti elde edilmiş oldu. Daha sonra absorbans değerleri 303 nm'de okundu. Elde edilen değerler derişime karşı konularak, en küçük kareler yöntemi ile regresyon analizine uygulandı. Buradan absorbans (x) ile derişim (y) arasındaki ilişkiyi veren kalibrasyon eğrileri oluşturuldu.

### **2.2.2 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmaları**

Formülasyon çalışmaları sırasında değişik yüzey etkin maddeler (YEM) ve yardımcı yüzey etkin maddeler (YYEM) kullanılarak formülasyon çalışmaları yapıldı. Bu formülasyonlarda yüzey etkin madde olarak Span 80, Span 85, Tween 20, Tween 80 ve Cremophore EL (Cr EL), yardımcı yüzey etkin madde olarak ise etanol ve 1-propanol (isopropanol) kullanıldı. Etkin madde su fazına yükleneceği için su tutma kapasitesi en yüksek olan mikroemülsiyon formülasyonu elde edilmeye çalışıldı ve sonuçta optimum formülasyona ulaşılması amaçlandı. Çalışmalar sırasında yüzey etkin maddeler ile yardımcı yüzey etkin maddeler belli oranlarda karıştırıldı. YEM : YYEM (a/a) oranları 1/1, 2/1, 3/1, 4/1, 5/1 ve 7/1 olarak çalışıldı. Yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde karışımı bir beher içerisinde manyetik karıştırıcıda 150 devir/dk dönme hızıyla karıştırılırken su (0.1 N NaOH çözeltisi) ile titre edildi ve formülasyonun bulandığı noktalar tespit edildi. Tüm formülasyon çalışmaları 25°C oda sıcaklığında yapıldı (Tablo 3, 4, 5).

**Tablo 3.** Yüzey etkin madde olarak Span 85 ve Tween 20, mısır yağı ve değişik yardımcı yüzey etkin maddeler kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formül Kodu	YEM : YYEM Oranı	Yağ	YEM / YYEM	Su
		Mısır Yağı	Span 85 + Tween 20 / Etanol	0.1 N NaOH Çözeltisi
F1	3 : 1	2	8	0.00 - 1.60
F2		3	7	0.00 - 0.94
F3		4	6	0.00 - 0.32
F4		5	5	Bulandı
F5	4 : 1	2	8	0.00 - 0.83
F6		3	7	0.00 - 0.64
F7		4	6	0.00 - 0.22
F8		5	5	0.00 - 0.05
F9		6	4	Bulandı
F10	5 : 1	2	8	0.00 - 0.36
F11		3	7	0.00 - 0.61
F12		4	6	0.00 - 0.84
F13		5	5	0.00 - 0.60
F14		6	4	0.00 - 0.11
F15		7	3	0.00 - 0.06
F16	7 : 1	2	8	Bulandı
F17		3	7	Bulandı
F18		4	6	Bulandı
F19		5	5	Bulandı
		<b>Mısır Yağı</b>	<b>Span 85 + Tween 20 / İsoopropanol</b>	<b>0.1 N NaOH Çözeltisi</b>
F20	3 : 1	2	8	0.00 - 0.94
F21		3	7	0.00 - 0.76
F22		4	6	0.00 - 0.46
F23		5	5	0.00 - 0.47
F24		6	4	Bulandı

F1 – F24 için HLB = 3.66

**Tablo 4.** Yüzey etkin madde olarak Span 80 ve Tween 80, yardımcı yüzey etkin madde olarak isopropanol ve soya yağı kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formül Kodu	YEM /YYEM Oranı	Yağ	YEM / YYEM	Su
		Soya Yağı	Span 80+Tween 80 / İsoopropanol	0.1 N NaOH Çözeltisi
F25	3 : 1	2	8	0.00 - 0.52
F26		3	7	0.00 - 0.19
F27		4	6	0.00 - 0.04
F28		5	5	Bulandı
F29	4 : 1	2	8	0.00 - 0.90
F30		3	7	0.00 - 0.63
F31		4	6	0.00 - 0.24
F32		5	5	0.00 - 0.06
F33		6	4	0.00 - 0.03
F34	5 : 1	2	8	0.00 - 0.89
F35		3	7	0.00 - 0.70
F36		4	6	0.00 - 0.57
F37		5	5	0.00 - 0.61
F38		6	4	0.00 - 0.35
F39		7	3	Bulandı

F25 – F39 için HLB = 5.63

**Tablo 5.** Yüzey etkin madde olarak Span 80 ve Cr EL, yardımcı yüzey etkin madde olarak isopropanol ve mısır yağı kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formül Kodu	YEM / YYEM Oranı	Yağ	YEM / YYEM	Su
		Mısır Yağı	Span 80 + Cr EL / İsoopropanol	0.1 N NaOH Çözeltisi
F40	1 : 1	2	8	Bulandı
F41		3	7	Bulandı
F42		4	6	Bulandı
F43	2 : 1	2	8	0.00 - 2.10
F44		3	7	0.00 - 1.08
F45		4	6	0.00 - 0.77
F46		5	5	0.00 - 0.23
F47		6	4	0.00 - 0.43
F48	3 : 1	2	8	0.00 - 0.26
F49		3	7	0.00 - 0.10
F50		4	6	Bulandı
F51		5	8	Bulandı

F40 – F51 için HLB = 5.37

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek oranda su alan formülasyonlarının (F43 - F47) üçgen faz diyagramı çizildi ve bu üçgen faz diyagramının ağırlık noktası hesaplanarak optimum s/y mikroemülsiyon formülasyonu hesaplandı.

### 2.2.3 Mtx ile Formülasyon Çalışmaları

Bu çalışmada toz haldeki Mtx 0.1 M NaOH çözeltisinde çözüldürülerek, optimum mikroemülsiyon formülasyonuna titre edilerek eklendi. Hazırlanan formülasyondaki Mtx miktar tayini spektrofotometre ile yapılmıştır.

### **2.2.3.1 0.1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması**

0.4 g katı haldeki NaOH tartılıp 100 ml distile suda çözündürülerek hazırlandı.

## **2.3 Mtx Yüklü Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun ve Piyasa Preparatının İnsan Periton Zarından Difüzyon Çalışmaları**

### **2.3.1 Çalışılacak Dalga Boyunun Saptanması**

10 mg Mtx + 10 ml 0.1 N NaOH karışımından 40 µl çekip serum fizyolojik ile 10 ml'ye tamamlandı. UV spektrofotometrede 295 – 310 nm aralığı taranarak çalışıldı.

### **2.3.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışması**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonumuza 25 mg/ml olacak şekilde Mtx yükleyip insan periton zarından difüzyonunu inceledik. Periton zarları Ege Üniversitesi Hastanesi Cerrahi Ana Bilim Dalı'nda yapılan karın ve batin ameliyatlarından elde edilmiştir.

Bu çalışmada donör ve reseptör kompartıman olmak üzere iki kısımdan oluşan sistem kullanılmıştır. İnsan periton mukozası (1 cm<sup>2</sup>) gergin olarak donör ve reseptör kompartımanlar arasına yerleştirildi ve iki kompartıman ortam sıvısını sızdırmaması için birbirine sızdırmaz bir kelepçe ile tutturuldu. Reseptör faza 10 ml serum fizyolojik ve donör faza 1 ml mikroemülsiyon konuldu (25 mg/ml Mtx içerecek şekilde). Tüm sistem 37±1°C'de manyetik karıştırıcılı su banyosuna yerleştirilerek, Mtx'in membrandan geçiş hızı kontrol edildi. Deney boyunca sıcaklığın sabit kalması sağlandı. Kullanılan

periton zarları deneye başlamadan önce 30 dk boyunca reseptör faz ile ıslatıldı ve buharlaşma kaybını minimuma indirmek için Franz difüzyon hücresinin ağzı parafilm ile kapatıldı. Reseptör faz deney boyunca bir manyetik karıştırıcı ile 600 devir/dakika hızla dipten karıştırıldı. 8 saat boyunca devam ettirilen deneyde, 0.25, 0.5, 1, 2-8'nci saatlerde reseptör fazdan direk numune alınarak absorbanlar spektrofotometrede okundu. Her örnek alım zamanında, reseptör faz serum fizyolojik ile yenilendi. Spektrofotometrede okunan absorbanlar, kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konarak, emülsiyondan difüze olan etkin madde miktarı saptandı. Membrandan geçiş hızı çalışmaları 3'er paralel numune alınarak yapıldı.

### **2.3.3 Piyasa Preparatının İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışması**

Mtx içeren piyasa preparatının (100 mg/ml) insan peritonundan difüzyonu deneysel bölüm 2.3.2'de anlatıldığı gibi incelendi.

## **2.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Refraktif İndisinin Ölçümü**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonumuzun refraktif indisi ölçümü Atago Illuminator marka refraktometre ile yapıldı. Damlacık büyüklüğü tayininde bu değerden yararlanıldı.



## **2.4.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümü**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun viskozitesi 37°C'de Brookfield DV III rheometer kullanılarak ölçüldü.

## **2.4.3 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun pH'nın Ölçümü**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun pH'ı Inolab marka pH metrede ölçüldü.

## **2.4.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması**

Mikroemülsiyonların damlacık büyüklükleri Malvern Zetasizer ile ölçüldü.

## **2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları**

### **2.5.1 Tümör Hücre Hatları**

Meme kanseri hücre hattı MCF-7 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center' dan temin edildi.

Hücre hatları, %1 nonesansiyel aminoasid, %1 L-glutamine, 10 000 unite / ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal calf serum eklenen RPMI-1640 besiyeri ortamında, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltılarak kullanıldı. Hücre kültürü için kullanılan besiyeri ve eklenen maddeler Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) firmasından satın alındı.

### **2.5.2 Besiyeri ve Diğer Yardımcı Kimyasallar (Reaginler)**

Dimetilsülfoksit (DMSO) ve trypan blue Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) firmasından satın alındı. Besi yeri çözeltilerinin stok solüsyonları uygun şekilde DMSO ile hazırlandı.

RPMI 1640 besiyeri, değişik miktarlarda çeşitli esansiyel aminoasitler, B grubu vitaminler, ekstra metabolitler (nükleozid, pirüvat gibi) glukoz ve minerallerce zengindir. Bu ortama nonesansiyel aminoasitler ve enfeksiyonu önlemek için penisilin-streptomisin ile, enerji ve karbon kaynağı olarak L-glutamin eklendi. L-glutamin ışıkta ve beklemekle degrade olduğu için kullanım süresince her onbeş günde bir mediuma eklendi.

### **2.5.3 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi**

Hücre kültür işlemleri Juoan marka Hood ve inkübatörde gerçekleştirildi. Sıvı nitrojen (-180°C) de saklanmış olan MCF-7 hücre örnekleri 37°C'de eritildi ve 75 cm<sup>2</sup> flasklara steril şartlarda aktarıldı. Üzerine 10 ml besiyeri eklendi ve hücreler, nemlendirilmiş, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında çoğaltıldı. Her pasaj sırasında ortalama 2 milyon hücre, 10 ml besiyeri konmuş flasklara alındı ve hücreler trypan blue dye exclusion test ile boyanarak hem canlılık hem de enfeksiyon açısından değerlendirildi. İşleme devam etmek için %90'ın üzerinde canlı hücre varlığı gerekmektedir. Ayrıca flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirildi.

### 2.5.4 MCF-7 Hücrelerinin İkilene Zamanının Belirlenmesi

Altı well içeren plate, her well içine  $5 \times 10^5$  hücre, çift kontrollü olarak eklendi ve toplam hacim 2 ml'ye besiyeri ile tamamlandı. Nemlendirilmiş,  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübe edildi. Sırasıyla 24, 48, 72 ve 96. saatte trypan blue dye exclusion test ile değerlendirildi. Sayım işlemi için her aşamada 100  $\mu\text{l}$  hücre ve aynı miktarda trypan blue karıştırıldı.  $5 \times 10^5$  hücre temel alınarak MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı hesaplandı.

### 2.5.5 Sitotoksosite Deneyi

Birim hacimdeki hücre Thoma camında sayılarak ayarlandı. Altı well içeren plate her well içine 2 ml hücre ( $5 \times 10^5$  hücre), 2 ml farklı konsantrasyonlarda hesaplanan miktarda etkin madde içeren besi yeri çözeltisi eklendi. Negatif kontrol olarak etkin madde içermeyen 2 ml besiyeri ve 2 ml hücre karışımı kullanıldı. Nemlendirilmiş,  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübe edildi. Sitotoksosite 72. saatte trypan blue dye exclusion test ile değerlendirildi. Sayım işlemi için her aşamada 100  $\mu\text{l}$  hücre süspansiyonu ve aynı miktarda trypan blue karıştırıldı.

% sitotoksosite, Eşitlik 6'ya göre hesaplandı. Çalışmada deneyler, her aşamada en az üç kez tekrarlandı.

% sitotoksosite =  $100 - [ 100 \times ( \text{denek well'deki toplam hücre sayısı} / \text{kontrol well'deki toplam hücre sayısı} ) ]$  (Eşitlik 6)

### **2.5.6 Mısır Yağının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması**

Formülasyonda kullandığımız mısır yağının MCF-7 hücre hattı üzerinde doğrudan toksik etkisi olup olmadığı incelendi. Bunun için mısır yağının farklı dilüsyonlardaki konsantrasyonları (1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000) kullanıldı.

### **2.5.7 İlaçsız Mikroemülsiyonun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması**

Formülasyon olarak belirlediğimiz ve çalışmamızda kullandığımız optimum mikroemülsiyonun MCF-7 hücre hattı üzerinde doğrudan toksik etkisi olup olmadığı incelendi. Bunun için de formülasyonun farklı dilüsyonlardaki konsantrasyonları kullanıldı.

### **2.5.8 Mtx Yüklediğimiz Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

Mtx yüklediğimiz optimum mikroemülsiyon formülasyonu ile konsantrasyon 1 µg olacak şekilde stok hazırlandı. Bundan sonra stoktan hareketle dilüsyonlar yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda Trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksikite belirlendi. IC<sub>50</sub> (hücrelerin %50'sinin ölmesi için gereken ilaç konsantrasyonu) değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. Çalışma 3 kez tekrarlandı.

### **2.5.9 Piyasa Preparatının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

Piyasa preparatı ile konsantrasyon 1 µg olacak şekilde stok hazırlandı. Bundan sonra stoktan hareketle dilüsyonlar yapılarak her bir konsantrasyon için 72 saatlik inkübasyon sonucunda Trypan blue dye exclusion testi kullanılarak sitotoksosite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi. Çalışma 3 kez tekrarlandı.

## BÖLÜM III

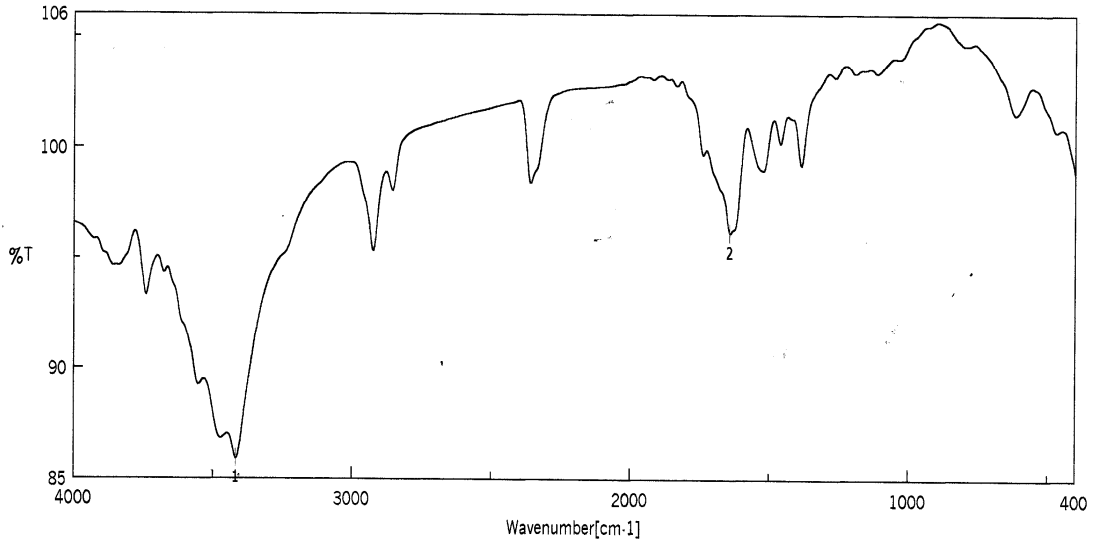
### BULGULAR

#### 3.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Mtx'in Özelliklerine Ait

#### Bulgular

##### 3.1.1 Mtx'in Infrared (IR) Analizi Bulguları

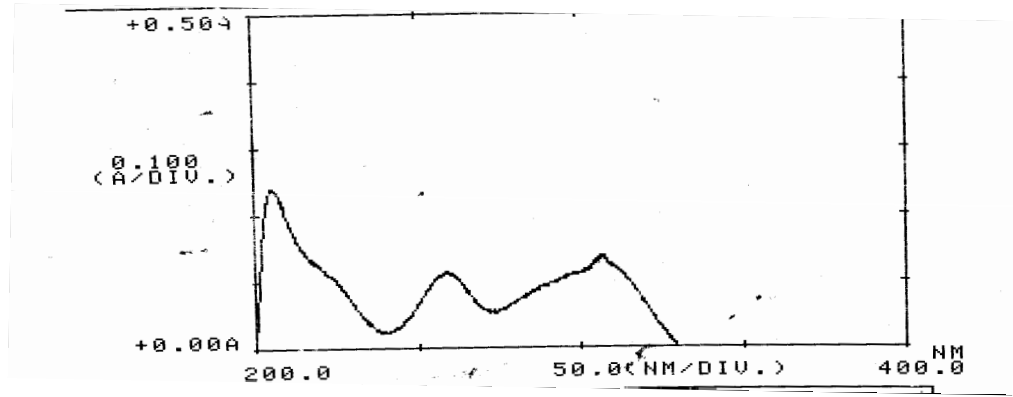
Deneysel bölüm 2.2.1.1'de anlatılan şekilde çalışıldı ve Mtx'in IR spektrumunun gösterdiği absorpsiyon bantları 3417, 2919, 2857, 2341, 1643, 1527, 1465, 1369  $\text{cm}^{-1}$  olarak bulundu. IR spektrumu Şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. Mtx'in Infrared Spektrumu

##### 3.1.2 Mtx'in UV Analizi Bulguları

Mtx'in UV spektrumu deneysel bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı gibi 0.1 N NaOH'te tarandı ve etken maddenin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 303 nm olarak bulundu. Bulunan bu değer literatürde belirtilen dalga boyuna uygun olduğu görüldü (48). Mtx'in elde edilen UV spektrumu Şekil 4'te görülmektedir.



**Şekil 4.** Mtx'in UV spektrumu

### 3.1.3 Mtx'in UV ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

#### Bulguları

Model etkin madde Mtx'in, in vitro difüzyon çalışmaları, ticari preparatlarının salım hızı çalışmaları ve etkin madde miktar tayini için, deneysel bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak, Mtx'in kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinin çiziminde 0.1 N NaOH kullanıldı. Kalibrasyon eğrisine ait denklem Tablo 6'da görülmektedir.

**Tablo 6.** 0.1 N NaOH kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi

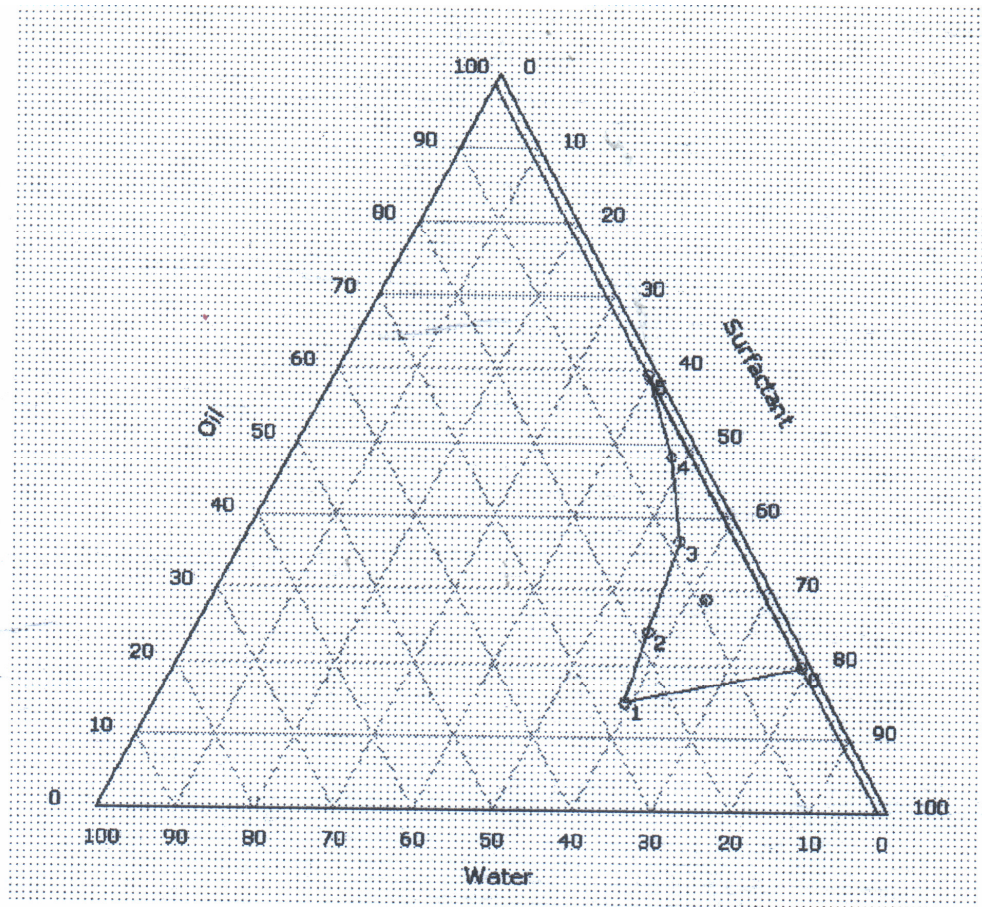
Kullanılan Çözelti	Eğri Denklemi	Determinasyon Katsayısı
0.1 N NaOH	$y = 19.939 x - 0.233$	0.998 ( $r^2$ )

y : Konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ ) x : Absorbans

### 3.2 Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına ait Bulgular

#### 3.2.1 Üçgen Faz Diyagramlarına ait Bulgular

Deneysel bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılan formülasyon çalışmalarında, en yüksek mikroemülsiyon bölgesi veren formülasyon F43 – F47 olarak bulundu. Bu formülasyonda YEM / YYEM oranı 2 : 1 olarak çalışılarak, Span 80, Cremophore EL, isopropanol ve mısır yağı kullanıldı. Bu formülasyona ait üçgen faz diyagramı Şekil 5'te görülmektedir.



**Şekil 5.** Optimum mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun üçgen faz diyagramına göre elde edilen bileşenlerin miktarları Tablo 7'deki gibidir.



**Tablo 7.** Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun üçgen faz diyagramına göre elde edilen değerleri

YEM/YYEM oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
2 : 1	2.885	6.232	0.883

Yağ: Mısır yağı

YEM: Span 80 + Cr EL (8 : 1)

YYEM: İsoopropanol

Su: 0.1 N NaOH

HLB: 5.37

### 3.2.2 Mtx Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmasına ait

#### Bulgular

Bu çalışmada toz haldeki Mtx 0.1 N NaOH çözeltisinde çözündürülerek, optimum formülasyona titre edilerek ve konsantrasyon 25 mg/ml olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında ve 150 rpm devirde karıştırılarak çalışıldı. Mtx yüklediğimiz bu formülasyon ile stabil bir mikroemülsiyon görüntüsü elde edildi.

### 3.3 Mtx Yüklü Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonun ve Piyasa Preparatının İnsan Periton Zarından Difüzyon Çalışmalarına ait Bulgular

#### 3.3.1 Çalışılacak Dalga Boyunun Saptanması

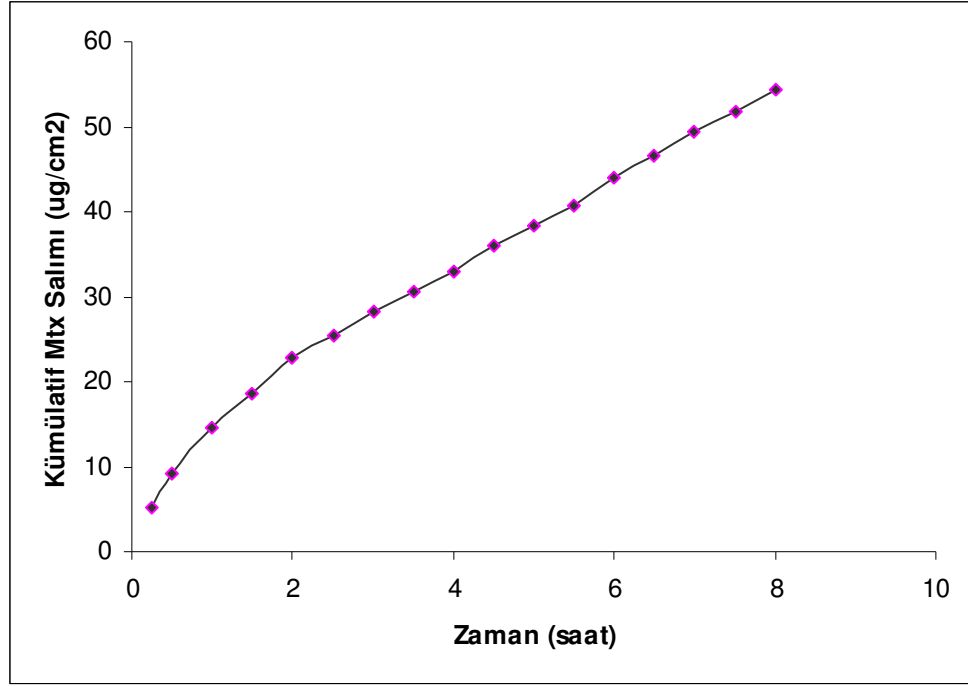
DeneySEL bölüm 2.4'te anlatıldığı şekilde yapılan spektrofotometrik tarama sonucunda çalışılacak dalga boyu 303 nm olarak bulundu.

### 3.3.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışmasının Bulguları

Optimum mikroemülsiyon formülasyonuna Mtx yüklendi ve insan peritonundan difüzyonu deneysel bölüm 2.3.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Elde edilen değerler Tablo 8'de, bu değerlere göre oluşturulan profil ise Şekil 6'da görülmektedir.

**Tablo 8.** Mtx yüklü optimum mikroemülsiyon formülasyonunun insan peritonundan zamana karşı difüzyon sonuçları

Zaman (saat)	Difüze olan Ortalama Mtx $\pm$ SH	Difüze olan kümülatif Mtx ( $\mu$ g)
0.25	5.274 $\pm$ 0.753	5.274
0.5	4.001 $\pm$ 0.736	9.275
1	5.292 $\pm$ 0.604	14.567
1.5	4.001 $\pm$ 0.253	18.568
2	4.163 $\pm$ 0.190	22.731
2.5	2.665 $\pm$ 0.130	25.396
3	2.758 $\pm$ 0.209	28.154
3.5	2.406 $\pm$ 0.083	30.560
4	2.388 $\pm$ 0.129	32.948
4.5	3.057 $\pm$ 0.259	36.005
5	2.313 $\pm$ 0.064	38.318
5.5	2.502 $\pm$ 0.250	40.820
6	3.179 $\pm$ 0.688	43.999
6.5	2.559 $\pm$ 0.212	46.558
7	2.904 $\pm$ 0.651	49.462
7.5	2.384 $\pm$ 0.085	51.846
8	2.609 $\pm$ 0.125	54.455



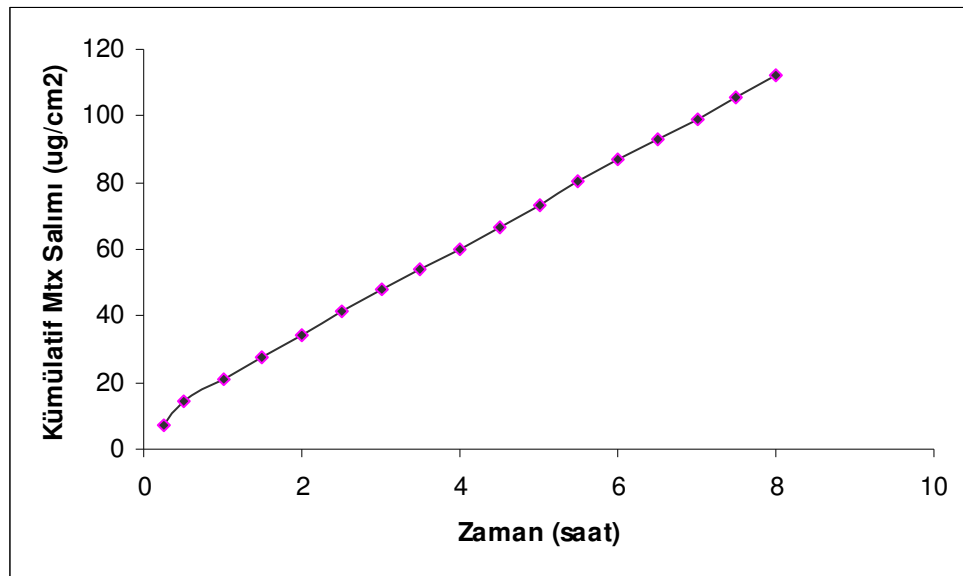
**Şekil 6.** Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun insan peritonundan difüzyon profili

### 3.3.3 Piyasa Preparatının İnsan Peritonundan Difüzyon Çalışmasının Bulguları

Piyasa preparatının insan peritonundan difüzyonu deneysel bölüm 2.3.2'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Elde edilen değerler Tablo 9'da, bu değerlere göre oluşturulan profil ise Şekil 7'de görülmektedir.

**Tablo 9.** Piyasa preparatının insan peritonundan zamana karşı difüzyon sonuçları

Zaman (saat)	Difüze olan Ortalama Mtx $\pm$ SH	Difüze olan kümülatif Mtx ( $\mu\text{g}$ )
0.25	7.378 $\pm$ 0.400	7.378
0.5	7.172 $\pm$ 0.452	14.550
1	6.651 $\pm$ 0.264	21.201
1.5	6.396 $\pm$ 0.009	27.597
2	6.651 $\pm$ 0.264	34.248
2.5	7.228 $\pm$ 0.501	41.476
3	6.553 $\pm$ 0.324	48.029
3.5	6.171 $\pm$ 0.412	54.200
4	5.918 $\pm$ 0.091	60.118
4.5	6.760 $\pm$ 0.229	66.878
5	6.472 $\pm$ 0.209	73.350
5.5	6.820 $\pm$ 0.194	80.170
6	6.708 $\pm$ 0.216	86.878
6.5	6.102 $\pm$ 0.142	92.980
7	6.120 $\pm$ 0.147	99.100
7.5	6.461 $\pm$ 0.165	105.561
8	6.414 $\pm$ 0.147	111.975



**Şekil 7.** Piyasa preparatının insan peritonundan difüzyon profili

### **3.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Özelliklerine ait Bulgular**

#### **3.4.1 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Refraktif İndisinin Ölçümü**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonumuzun refraktif indisi deneysel bölüm 2.3.3'te anlatıldığı şekilde ölçüldü. Refraktif indis 1.400 olarak bulundu.

#### **3.4.2 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümü**

Viskozite ölçümü deneysel bölüm 2.3.4'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Formülasyonun viskozitesi 60 cP olarak ölçüldü.

#### **3.4.3 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun pH'nın Ölçümü**

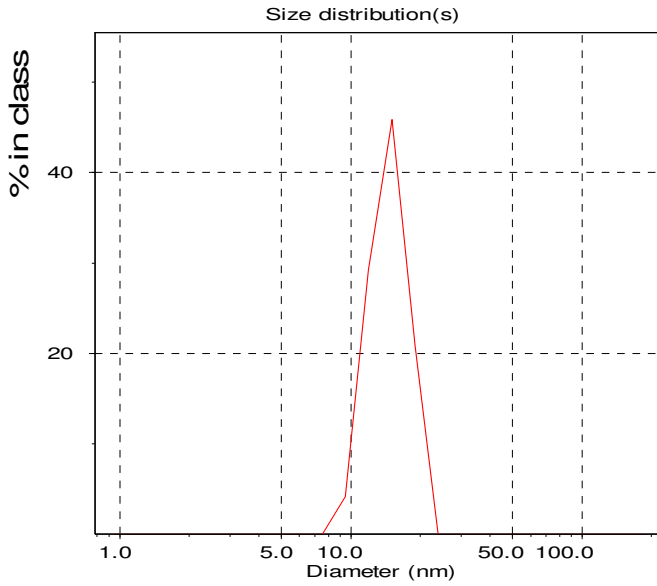
Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun pH'ı deneysel bölüm 2.3.5'te anlatıldığı şekilde yapıldı. pH ölçüm sonucunda 6.7 olarak bulundu.

#### **3.4.4 Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğü Ölçümü**

Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü deneysel bölüm 2.4.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Elde edilen veri ve çalışılan şartlar Tablo 10'da, grafik ise Şekil 8'de görülmektedir.

**Tablo 10.** Optimum mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ölçümüne ait veriler

	Refraktif indis	Viskozite	Sıcaklık	Ortalama Damlacık Büyüklüğü
Optimum Formülasyon	1.400	60 cP	25°C	13.3 nm



**Şekil 8.** Damlacık büyüklüğü profili

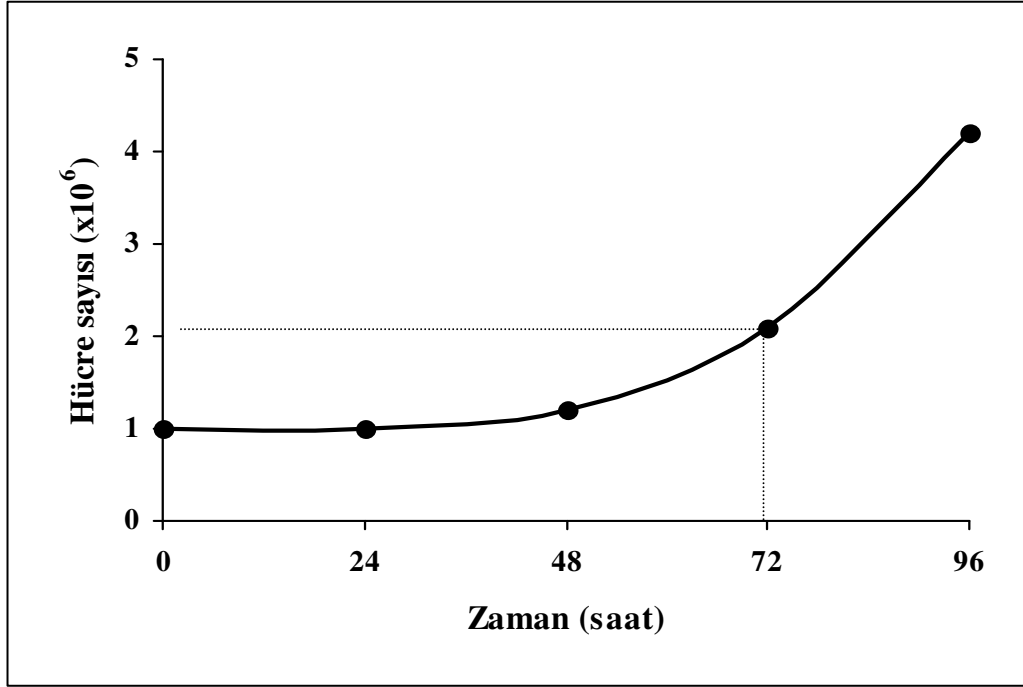
### 3.5 Hücre Kültürü Çalışmalarına ait Bulgular

#### 3.5.1 Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesine İlişkin Bulgular

Sitotoksite deneyinde kullanılan MCF-7 hücre hatları deneysel bölüm 2.5.3'te anlatıldığı şekilde çoğaltıldı. Hücrelerin büyük bölümünün, kullanılan besiyeri ve diğer yardımcı kimyasallar varlığında canlılığını koruduğu görüldü. Steril ortamda ve steril maddelerle çalışıldı ve deney düzeneklerinde enfeksiyon görülmedi.

### 3.5.2 MCF-7 Hücrelerinin İkilenme Zamanına ait Bulgular

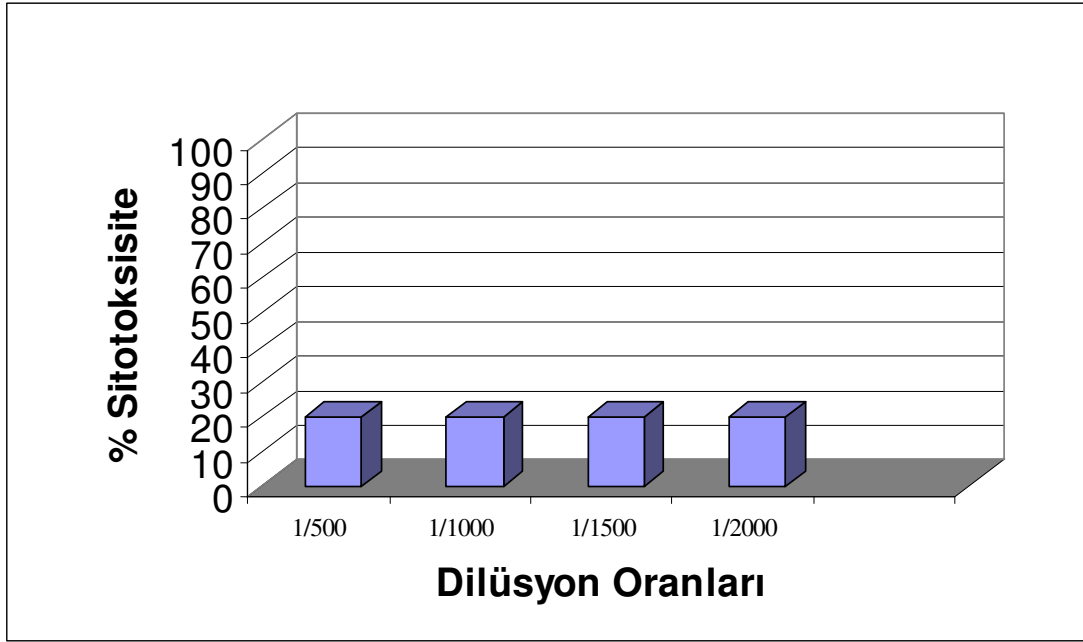
MCF-7 hücre hatlarının ikilenme zamanlarının belirlenmesi deneysel bölüm 2.5.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Hücrelerin ikilenme zamanı 72 saat olarak bulundu. Bu çalışmaya ait grafik Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9. MCF-7 meme kanseri hücre dizisi ikilenme zamanı

### 3.5.3 Mısır Yağının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular

Mısır yağının hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı deneysel bölüm 2.5.6'da anlatıldığı şekilde incelendi. Mısır yağının hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisi saptanmadı. Bu çalışmaya ait grafik Şekil 10'da görülmektedir.

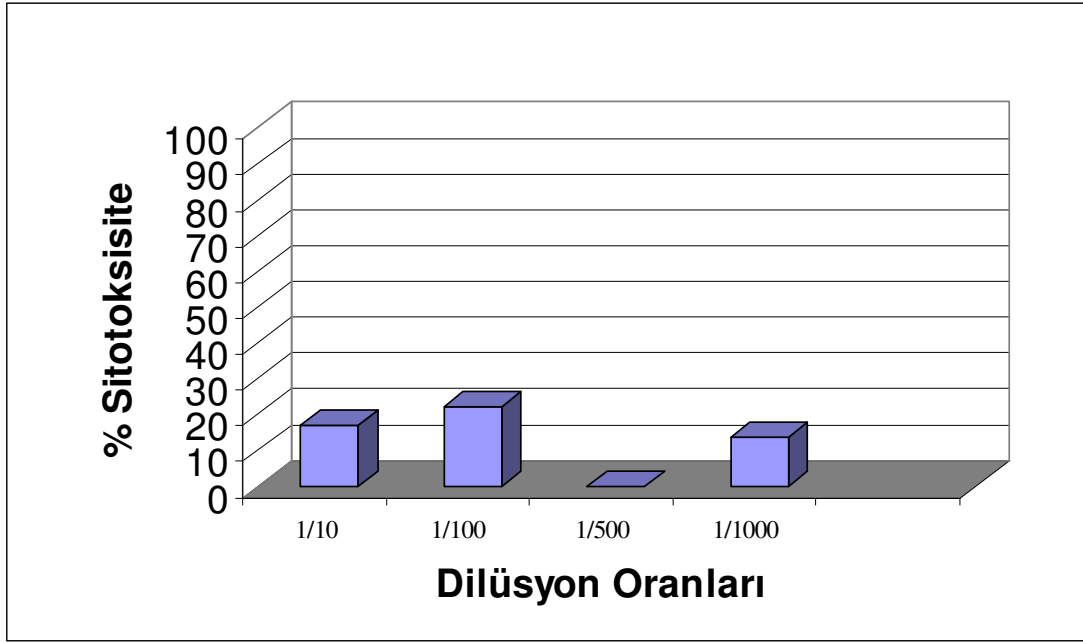


**Şekil 10.** Mısır yağının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

### 3.5.4 İlaçsız Mikroemülsiyonun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular

Geliştirdiğimiz mikroemülsiyon formülasyonumuzun hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı deneysel bölüm 2.5.7’de anlatıldığı şekilde incelendi. Boş mikroemülsiyonun hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisi saptanmadı. Bu çalışmaya ait grafik Şekil 11’de görülmektedir.

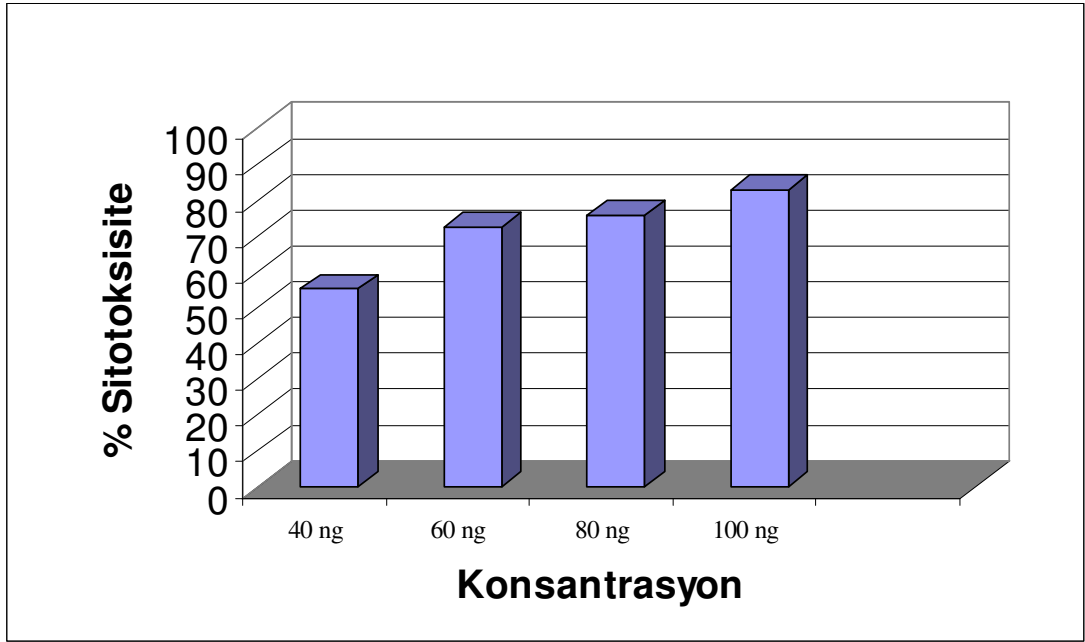




**Şekil 11.** İlaçsız mikroemülsiyonun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

### 3.5.5 Mtx Yüklediğimiz Optimum Mikroemülsiyon Formülasyonunun MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisine ait Bulgular

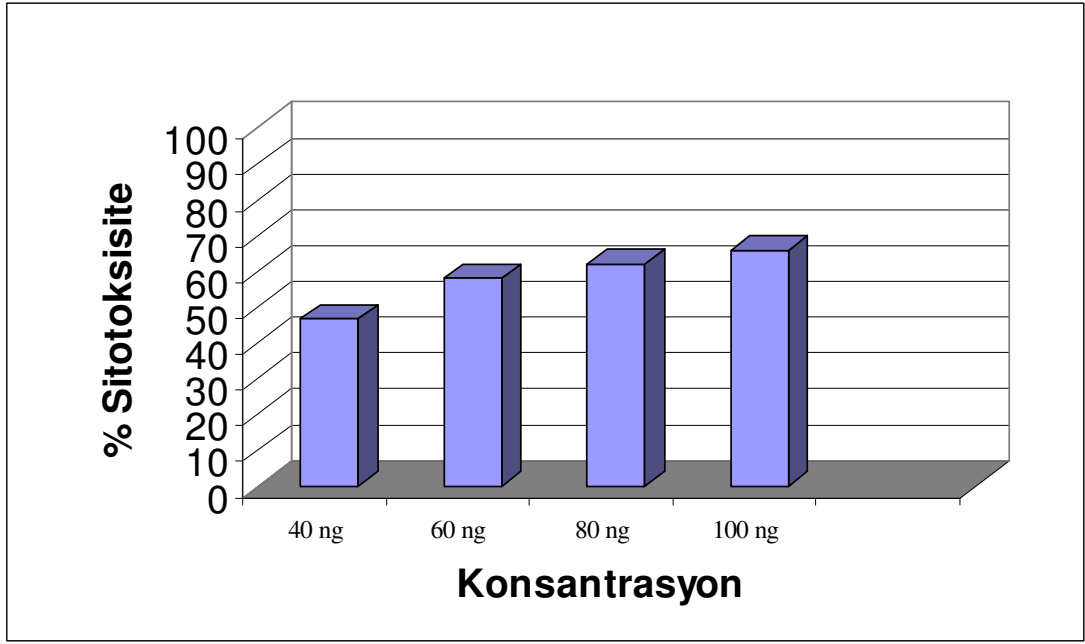
Mtx yüklediğimiz optimum formülasyonun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve  $IC_{50}$  değerinin saptanması için deneysel bölüm 2.5.9'da anlatıldığı şekilde çalışıldı.  $IC_{50}$  değeri yaklaşık 42 ng olarak bulundu. Bu çalışmaya ait grafik Şekil 12'de görülmektedir.



**Şekil 12.** Mtx yüklü mikroemülsiyonun MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

### 3.5.6 Piyasa Preparatının MCF-7 Hücre Hattında Sitotoksik Etkisine ait Bulgular

Piyasa preparatının hücreler üzerinde toksik etkisinin belirlenmesi ve  $IC_{50}$  değerinin saptanması için deneysel bölüm 2.5.8'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Piyasa preparatının  $IC_{50}$  değeri yaklaşık 55 ng olarak bulundu. Bu çalışmaya ait grafik Şekil 13'te görülmektedir.



**Şekil 13.** Piyasa preparatının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

## BÖLÜM IV

### TARTIŞMA

Genel bir değerlendirme yapacak olursak, çalışmaya başlarken amacımız model etkin madde olarak seçtiğimiz Mtx'ın IM yoldan kullanılan bir mikroemülsiyon formülasyonunu geliştirmektir. Mtx'ı mikroemülsiyon formülasyonu şeklinde sunmayı düşünmemizin nedeni, mikroemülsiyonların transparan, termodinamik olarak dayanıklı, ilaç hedeflemesine uygun, kendiliğinden oluşan sistemler olmaları ve çözünürlüğü az olan maddelerin çözünürlüğünü arttırmalarıydı (9, 10, 11, 18, 35, 42). Ayrıca yaptığımız literatür taramasında bu alanda yapılan çalışmaların az olması da bir diğer nedendir.

Mtx günümüzde kanser tedavisinde tercih edilen antimetabolit ilaçlardan biridir. Ancak Mtx'ın kemoterapide kullanımına bağlı olarak diğer antineoplastik ajanlarda olduğu gibi birçok yan etkisi mevcuttur. Bunlara örnek olarak kusma, bulantı, döküntü, iştahsızlık, diyare, megaloblastik anemi, ateş, öksürük ve siroz verilebilir (12, 16, 44). Bu yan etkilerin çoğu yüksek doza bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Çünkü Mtx düşük dozlarda artrit ve psoriasis tedavisinde kullanılmaktadır ve bu yan etkiler oldukça azdır (29). Bizim burada amacımız dozu azaltarak hücre kültürü çalışmalarımızda aynı sitotoksik etkiyi elde edebileceğimiz ve Mtx'ın çözünürlüğünü arttırabileceğimiz mikroemülsiyon formülasyonunu geliştirmektir. Burada geliştirdiğimiz formülasyonun etkinliğini incelerken hücre kültüründen yararlandık. Hücre kültürü çalışmaları antitümöral ilaçların geliştirilmesinde anahtar rol üstlenmektedir. Bu yolla ilaçların hücrelerin proliferasyonlarını engelleyici sitotoksik dozları tespit edilebilir (3).

Bu bölümde, deneysel kısımda belirttiğimiz çalışmaları ve bulgular kısmında tespit ettiğimiz sonuçları akış sırasına göre irdeleyeceğiz.

İlk olarak model etkin madde Mtx'ın özelliklerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla IR ve UV spektrumları alınmış, elde edilen verilerin literatür kayıtlarına uygun olduğu görülmüştür (48). İkinci adımda Mtx'ın hem bizim geliştirdiğimiz mikroemülsiyon formülasyonundan hem de ticari preparatından miktar tayinini yapabilmek için 0.1 N NaOH kullanarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Çizilen kalibrasyon eğrisine ait denklem etkin madde miktar tayininde güvenle kullanılabileceğini ( $r^2 = 0.998$ ) göstermiştir.

Mikroemülsiyon formülasyonu aşamasında ise, birden fazla formülasyon geliştirildi. Değişik yüzey etkin maddelerle farklı oranlarda çalışıldı. Burada amacımız en fazla su alan mikroemülsiyon formülasyonunu geliştirebilmektir. Çünkü Mtx'ın çözünürlüğü az olduğu için belli oranda sulu faza yüklenecektir. Yapılan çalışmalarda YEM/YYEM oranı 2:1 olan ve mısır yağı, isopropanol, Tween 80, Cr EL ve 0.1 N NaOH kullanılan F43-F47 formülasyonlarının uygun olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda çizilen üçgen faz diyagramının ağırlık merkezi hesaplanarak optimum mikroemülsiyon değerlerine ulaşılmıştır.

Bir sonraki aşamada elde ettiğimiz optimum mikroemülsiyona etkin madde Mtx'ı 25 mg/ml olacak şekilde yükledik. Yükleme sonunda formülasyonun stabil halinin devam ettiğini gözlemledik. Mikroemülsiyon üzerinde yapılan incelemelerde refraktif indis 1.400, pH 6.7 ve viskozite de 60 cP olarak bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda damlacık büyüklüğü incelendi. Damlacık büyüklüğü 13.3 nm olarak saptandı (Tablo 10).

Hali hazırda ticari preparat olarak kullanılan (100 mg/ml, IM) preparat ile bizim geliştirdiğimiz mikroemülsiyon formülasyonu in vitro olarak insan periton membranı kullanılarak Franz difüzyon hücresinde karşılaştırmalı olarak incelendi. Bunun için her iki formülasyonun salım verileri değerlendirildi. Ticari preparat bizim formülasyonumuza göre 4 kat fazla etkin madde içermesine rağmen % salıma göre formülasyonları karşılaştırırsak, bizim geliştirdiğimiz mikroemülsiyon formülasyonunun salım miktarı yaklaşık 2 kat fazladır. Bu durum bizim geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun daha iyi bir salım profili ortaya koyduğunu göstermekteydi. Her iki formülasyonun salım verileri incelendiğinde ticari preparatın 8. saat sonunda içerdiği etkin maddenin yaklaşık %0.1'ni, geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun ise içerdiği etkin maddenin yaklaşık %0.2'ni verdiği görülmektedir (Tablo 8-9).

Son aşamada geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun ticari preparata kıyasla hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinliği araştırıldı. Bunu için meme kanseri hücre hatları (MCF-7) kullanıldı. Bu çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı ve tamamen steril şartlarda çalışıldı. Öncelikle MCF-7 hücre hatlarının ikilenme zamanları incelendi ve 72 saat olarak tespit edildi (Şekil 9). Daha sonra bu hücreler üzerinde formülasyonumuzda kullandığımız mısır yağının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı incelendi ve belirgin bir sitotoksosite saptanmadı (Şekil 10). Aynı şekilde, hazırladığımız ancak Mtx yüklediğimiz mikroemülsiyonun (boş mikroemülsiyon) hücreler üzerindeki sitotoksitesitesi de incelendi ve belirgin bir sitotoksosite saptanmadı (Şekil 11). Böylece geliştirdiğimiz ve Mtx yüklediğimiz formülasyonun sitotoksitesitesinin ticari preparatla sağlıklı bir şekilde karşılaştırılabileceği kanaatine vardık.

Bunun üzerine yapılan sitotoksisite çalışmalarında, geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun  $IC_{50}$  değeri yaklaşık 42 ng, ticari preparatın  $IC_{50}$  değeri ise yaklaşık 55 ng olarak tespit edildi (Şekil 12-13). Burada edilen değerler bizi, geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun ticari preparatla aynı sitotoksik etkiyi daha düşük etkin madde dozuyla sağladığı sonucuna götürdü.

Tüm bu veriler ışığında geliştirdiğimiz Mtx içeren optimum mikroemülsiyon formülasyonu tezimizin, ex vivo olarak diğer hücre hatlarındaki çalışmalarda ve daha ileri aşama in vivo çalışmalarda güvenle kullanılacak bir formülasyon olduğunu göstermektedir.

## ÖZET

### **ANTİTÜMÖRAL İLAÇ İÇEREN MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE ANTİTÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Bu çalışmanın amacı, model etkin madde olarak seçilen antitümöral etkili metotreksatın intramusküler yolla kullanılabilen bir s/y mikroemülsiyon formülasyonunu geliştirmektir.

Bu amaçla, metotreksatın farklı yüzey etkin maddeler kullanılarak intramusküler mikroemülsiyon formülasyonları hazırlandı ve üçgen faz diyagramı kullanılarak optimum formülasyon belirlendi.

Mtx yüklediğimiz optimum formülasyondan ve ticari preparattan metotreksat difüzyonu Franz difüzyon hücresi yöntemi kullanılarak, in vitro olarak insan periton mukozasından incelendi.

Geliştirdiğimiz mikroemülsiyonun refraktif indis ölçümü, pH ölçümü, viskozite tayini ve damlacık büyüklüğü tayini yapıldı.

En son olarak, geliştirdiğimiz ve Mtx yüklediğimiz mikroemülsiyon formülasyonumuz ile ticari preparatın sitotoksik etkinliği incelendi. Bunun için MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının kullanıldığı hücre kültürü çalışması yapıldı.



## **ABSTRACT**

### **STUDIES ON DEVELOPMENT OF ANTITUMORAL DRUG LOADED MICROEMULSION FORMULATION AND INVESTIGATION OF ITS ANTITUMORAL EFFICIENCY**

The aim of this study is to develop an w/o microemulsion formulation of the antitumoral agent methotrexate chosen as model active substance, which can be used via intramuscular route.

For this purpose, the intramuscular microemulsions of methotrexate using different surfactants were prepared, and optimum formulation was determined by using triangle phase diagram.

The diffusion of methotrexate from the methotrexate-loaded optimum formulation and commercial preparation was investigated from human periton mucosa as in vitro using Franz diffusion cell method.

Refractive index, pH, viscosity and droplet size of optimum formulation were measured.

Finally, the cytotoxic effects of methotrexate loaded optimum formulation of microemulsion and commercial preparation were studied on MCF-7 mammary cell lines.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Alican, F. (1993). Kanser, AFA Matbaacılık, İzmir, s10-33.
2. Attwood, D. (1994). Microemulsions in Colloidal Drug Delivery Systems, J.Kreuter Ed., Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, p31-71.
3. Baguley, B.C., Kerr, D.J. (2002). Anticancer Drug Development, Academic Press, USA, p269-280.
4. Bagwe, R.P., Kanicky, J.R., Palla, B.J., Patanjali, P.K., Shah, D.O. (2001). Improved Drug Delivery Using Microemulsions: Rationale, Recent Progress, and New Horizons, *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 18(1): 77 – 140.
5. Bertino, J.R., Li, W.W., Lin, J., Trippett, T., Göker, E., Schweitzer, B., Banerjee, D. (1992). Enzymes of the Thymidylate Cycle as Targets of Chemotherapeutic Agents: Mechanisms of Resistance, *Mt Sinai J Med*, 59(5): 391-395.
6. Buszello, K., Harnisch, S., Müller, R.H., Müller, B.W. (2000). The Influence of Alkali Fatty Acids on the Properties and the Stability of Parenteral O/W Emulsions Modified with Solutol HS 15, *European Journal of Biopharmaceutics*, 49:143-149.
7. Capek, I. (2001). Microemulsion Polimerization of Styrene in the Presence of a Cationic Emulsifier, *Advances in Colloid and Interface Science*, 92: 195-233.
8. Celis, J.E. (1998). Cell Biology: a Laboratory Handbook, 2nd Edition Volume 1, Academic Press, San Diego, p313-321.

9. Constantinides, P.P., Scalart, J. (1997). Formulation and Physical Characterization of Water-in-oil Microemulsions Containing Long-versus Medium-chain Glycerides, *International Journal of Pharmaceutics*, 158:57-68.
- 10.Çilek, A., Türkyılmaz, A., Çelebi, N. (2002). Mikroemülsiyonlar: Genel Özellikleri ve Farmasötik Amaçla Kullanımları, *FABAD J Pharm Sci, Scientific Reviews*, 27: 27-41.
- 11.Çomoğlu, T., Gönül, N. (1997). Microemulsions, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 26(2): 95-108.
- 12.Dökmeci, İ. (2000). Farmakoloji Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s946-958.
- 13.Freshney, R.I. (2000). Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique, 3rd Edition, Wiley-Liss Inc, Canada, p19-62.
- 14.Geçgil, Ş. (1991). Farmasötik Teknolojiye Başlangıç, İstanbul, s269-278.
- 15.Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Waltham, M., Banerjee, D., Bertino, J.R. (1996). Intrinsic And Acquired Resistance To Methotrexate In Acute Leukemia, *N Engl J Med*, 335(14): 1041-1048.
- 16.Grim, J., Chlade, J., Martinkova, J. (2003). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Non-neoplastic Diseases. *Clin Pharmacokinet*, 42: 139 – 151.
- 17.Gürsoy, A.Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:1, İstanbul, s134-146.
- 18.Güven, K. C. (1981). İlaç Endüstrisi Teknolojisi 3-4, İstanbul, s183-216.
- 19.Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ders Notları, Farmasötik Teknoloji, Emülsiyonlar.

20. Immordino, M.L., Brusa, P., Rocco, F., Arpicco, S., Ceruti, M., Cattel, L. (2004). Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Pharmacokinetics of Liposomes Containing Lipophilic Gemcitabine Prodrugs, *Journal of Controlled Release*, 100(3):331-346.
21. Jack, D.B. (1992). Handbook of Clinical Pharmacokinetic Data, Macmillan Publishers Ltd, Basingstoke, p44-47.
22. Kan, P., Chen, Z., Kung, R., Lee, C., Chu, I. (1999). Study on the Formulation of O/W Emulsion as Carriers for Lipophilic Drugs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15:117-125.
23. Kan, P., Chen, Z., Lee, C., Chu, I. (1999). Development of Nonionic Surfactants/phospholipid O/W Emulsion as a Paclitaxel Delivery System, *Journal of Controlled Release*, 58:271-278.
24. Kobayashi, I., Nakajima, M., Mukataka, S. (2003). Preparation Characteristics of Oil-in-water Emulsions Using Differently Charged Surfactants in Straight-through Microchannel Emulsification, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 229: 33-41.
25. Kreuter, J. (1994). Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, p154-178.
26. Lagaly, G., Reese, M., Abend, S. (1999). Smectites as Colloidal Stabilizers of Emulsions I. Preparation and Properties of Emulsions with Smectites and Nonionic Surfactants, *Applied Clay Science*, 14:83-103.
27. Lieberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S. (1988). Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Volume 1, Marcel Dekker Inc, New York, p263-269.

28. Lundberg, B.B., Risovic, V., Ramaswamy, M., Wasan, K.M. (2003). A Lipophilic Paclitaxel Derivative Incorporated in a Lipid Emulsion for Parenteral Administration, *Journal of Controlled Release*, 86:93-100.
29. Marin, M.G. (1997). Low-Dose Methotrexate Spares Steroid Usage in Steroid-Dependent Asthmatic Patients: A Meta-Analysis, *Chest*, 112: 29-33.
30. Martin, A.N., Swarbrick, J., Cammarata, A. (1969). Physical Pharmacy, Lea & Febiger, Philadelphia, p527-546.
31. Martindale The Extra Pharmacopoeia, (1989). 29th Edition, The Pharmaceutical Press, p636-641.
32. Midmore, B.R. (1998). Synergy Between Silica and Polyoxyethylene Surfactants in the Formation of O/W Emulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 145:133-143.
33. Moulik, S.P., Paul, B.K. (1998). Structure, Dynamics and Transport Properties Of Microemulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 78(2): 99-195.
34. Nakano, M. (2000). Places of Emulsions in Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1,6): 1-4.
35. Paul, B.K., Moulik, S.P. (1997). Microemulsions: an Overview, *J Dispersion Science and Technology*, 18(4): 301-367.
36. Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T.M., Urtti, A. (2003). Microemulsions for Topical Delivery of Estradiol, *International Journal of Pharmaceutics*, 254:99-107.
37. Petsev, D.N. (1998). Structure and Film Formation in Charged Emulsions and Microemulsions, *Physica A*, 250:115-132.

38. Prinderre, P., Piccerelle, P., Cature, E., Kalantzis, G., Reynier, J.P., Joachim, J. (1998). Formulation and Evaluation of O/W Emulsions Using Experimental Design, *International Journal of Pharmaceutics*, 163:73-79.
39. Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990). 18<sup>th</sup> Edition, Mack Printing Company, Pennsylvania, p1536.
40. Sandell, E. (1982). Pharmaceutics, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, p97-105.
41. Schulman, J.H., Stoeckenius, W., Prince, L.M. (1959). Mechanism of Formation and Structure of Microemulsions by Electron Microscopy, *J Phys Chem*, 63; 1677-1680.
42. Shukla, A., Janich, M., Jahn, K., Krause, A., Kiselev, M.A., Neubert, R.H. (2002). Investigation of Pharmaceutical oil/water Microemulsions by Small-angle Scattering, *Pharm Res*, 19(6):881-836.
43. Sintov, A.C., Shapiro, L. (2004). New Microemulsion Vehicle Facilitates Percutaneous Penetration in vitro and Cutaneous Drug Bioavailability in vivo, *Journal of Controlled Release*, 95: 173-183.
44. Sipahioğlu, H. (1981). Medikal Onkolojide Tedavi Prensipleri ve Protokoller, Hacettepe-TAŞ Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, s85-106.
45. Şanal, Z. E. (2002). Nazal Sistemlerde Aktif Maddenin Difüzyonuna Emülgatör Tipinin Etkisi Üzerinde Çalışmalar, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
46. Teixeira, H., Dubernet, C., Chacun, H., Rabinovich, L., Boutet, V., Deverre, J.R., Benita, S., Couvreur, P. (2003). Cationic Emulsions Improves the Delivery of Oligonucleotides to Leukemic P388/ADR Cells in Ascite, *Journal of Controlled Release*, 89:473-482.

47. Terek, M.C., Karabulut, B., Selvi, N., Akman, L., Karasulu, Y., Ozguney, I., Sanli, A.U., Uslu, R., Ozsaran, A. (2006). Arsenic Trioxide-Loaded, Microemulsion-Enhanced Cytotoxicity on MDAH 2774 Ovarian Carcinoma Cell Line, *Int J Gynecol Cancer*, 16(2):532-537.
48. The United States Pharmacopeia National Formulary Supplement, (1990). USP XXIII, NF XVII, p855.
49. Tomatis, L. (1990). Cancer: Causes, Occurrence and Control, IARC Scientific Publications No. 100, Lyon, p15-121.
50. Türkyılmaz, A. (1998). Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün Gastrointestinal Sistem Ülserlerindeki Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
51. Van Aken, G.A. (2003). Competitive Adsorption of Protein and Surfactants in Highly Concentrated Emulsions: Effects on Coalescence Mechanisms, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213:209-219.
52. Vandemme, T.F. Conception and Physico-Chemical Characterization of w/o Microemulsions Intended for the Oral Administration of Ranitidine Hydrochloride, Proc, 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence, 1487-1489.
53. Wang, J., Takayama, K., Nagai, T., Maitani, Y. (2003). Pharmacokinetics and Antitumor Effects of Vincristine Carried by Microemulsions Composed of PEG-lipid, Oleic acid, Vitamin E and Cholesterol, *International Journal of Pharmaceutics*, 251(1-2):13-21.
54. Watarai, H. (1997). Microemulsions in Separation Sciences, *Journal of Chromatography A*, 780(1-2):93-102.

55. Wennerström, H., Söderman, O., Olsson, U., Lindman, B. (1997). Macroemulsions versus Microemulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123-124:13-26.
56. Yazan, Y. (2002). Emülsiyon Sistemler; Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları No.1, İstanbul, s137–141.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında İzmir'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi tamamladıktan sonra 1998 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne girdim. 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. 2004 yılından beri kendi eczanemde meslek hayatıma devam etmekteyim. Evliyim.