



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

**DOKTORA
TEZİ**

**AKTİİK KERATOZ TEDAVİSİ İÇİN DİKLOFENAK
SODYUM İÇEREN MİKROİĞNE VE KESECİK
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

EMRE TUNÇEL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

OCAK 2025



**AKTİNİK KERATOZ TEDAVİSİ İÇİN DİKLOFENAK SODYUM İÇEREN
MİKROİĞNE VE KESECİK SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Emre TUNÇEL

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Emre TUNÇEL
06/01/2025

AKTİNİK KERATOZ TEDAVİSİ İÇİN DİKLOFENAK SODYUM İÇEREN MİKROİĞNE VE KESECİK SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Emre TUNÇEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2025

ÖZET

Aktinik keratoz, premalign tümör olarak kabul edilen bir deri hastalığıdır. Bir deri kanseri türü skuamöz hücreli karsinoma dönüşme riski taşır. Bu nedenle tedavi edilmesi gerekir. Aktinik keratoz tedavisinde kullanılan etkin maddelerden biri siklooksijenaz inhibitörü olan diklofenak sodyumdur. Tez çalışması kapsamında, diklofenak sodyumun, hastalığın gerçekleştiği doku olan derideki birikiminin artırılması amacıyla mikroigne ve esnek veziküler sistem formülasyonları geliştirilmiştir. Mikroigne formülasyonlarının eldesi için 3 boyutlu yazıcı yardımı ile mikroigne kalıpları üretilmiştir. Bu kalıplar kullanılarak geliştirilen mikroigne formülasyonları şişme indeksi, mekanik dayanıklılık, morfoloji ve deri delme çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonları film hidrasyon yöntemi ile üretilmiştir. Esnek veziküler sistemlerin karakterizasyonu için kesecik boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği, viskozite, morfoloji ve deformeabilite analizleri gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre belirlenen optimum formülasyonlar üzerinde sitotoksosite ve ex vivo deriden geçiş/deride birikim çalışmaları yapılmıştır. HaCaT hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarında tüm formülasyonların %70'ten fazla hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir. Ex vivo çalışmalarda, deride en fazla etkin madde birikimi sağlayan mikroigne (F24) ve esnek veziküler sistem (V4) formülasyonları in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. İn vivo çalışmalar kapsamında, Sprague-Dawley ırkı sıçanlar üzerinde ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modeli oluşturulmuştur. F24, V4, aktinik keratoz tedavisinde klinik kullanımı olan ticari jel preparatı ve boş formülasyonların ödem azaltma kapasiteleri çeşitli parametreler ile değerlendirilmiştir. V4 formülasyonunun eğri altında kalan alan (EAA) ve kulak ağırlığı parametrelerinde, F24 formülasyonunun ise EAA, kulak ağırlığı ve ödem inhibisyonu parametrelerinde ticari ürüne göre üstünlüklerinin olduğu gözlenmiştir. F24 ve V4 formülasyonlarının ticari jel preparatına alternatif formülasyonlar olabileceği belirlenmiştir.

Bilim Kodu	:	1020
Anahtar Kelimeler	:	Aktinik keratoz, mikroigne, dermal ilaç taşınımı, sodyum diklofenak, kesecik sistemler
Sayfa Adedi	:	278
Danışman	:	Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ
2. Danışman	:	Doç. Dr. Serdar TORT

DEVELOPMENT OF MICRONEEDLE AND VESICULAR SYSTEMS CONTAINING
DICLOFENAC SODIUM FOR THE TREATMENT OF ACTINIC KERATOSIS

(Ph. D. Thesis)

Emre TUNÇEL

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2025

ABSTRACT

Actinic keratosis is a skin disease that is considered a premalignant tumor. It carries the risk of progressing to squamous cell carcinoma, a type of skin cancer. Therefore, it requires treatment. One of the active substances used in the treatment of actinic keratosis is diclofenac sodium, a cyclooxygenase inhibitor. Within the scope of this thesis, microneedle and elastic vesicle system formulations were developed to enhance the accumulation of diclofenac sodium in the skin tissue where the disease occurs. For the preparation of microneedle formulations, microneedle molds were produced using a 3D printer. The microneedle formulations developed using these molds were characterized by swelling index, mechanical strength, morphology, and skin penetration studies. Elastic vesicle system formulations were produced using the film hydration method. To characterize the elastic vesicle systems, vesicle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, viscosity, morphology, and deformability analyses were conducted. Based on the characterization results, cytotoxicity and ex vivo skin permeation/accumulation studies were performed on the optimal formulations. In cytotoxicity studies conducted on the HaCaT cell line, all formulations demonstrated over 70% cell viability. In ex vivo studies, the microneedle formulation (F24) and elastic vesicle system formulation (V4), which provided the highest active substance accumulation in the skin, were selected for in vivo studies. In vivo studies, xylene-induced ear edema model was established on Sprague-Dawley rats. The edema-reduction capacities of F24, V4, commercial gel product clinically used for actinic keratosis treatment, and placebo formulations were evaluated using various parameters. It was observed that the V4 formulation showed superiority in the area under the curve (AUC) and ear weight parameters, while the F24 formulation demonstrated advantages over the commercial product in AUC, ear weight, and edema inhibition parameters. It was concluded that the F24 and V4 formulations could be alternative formulations to the commercial gel preparation.

Science Code	:	1020
Key Words	:	Actinic keratosis, microneedle, dermal drug delivery, sodium diclofenac, vesicle systems
Page Number	:	278
Supervisor	:	Prof. Figen TIRNAKSIZ
Co-Supervisor	:	Assoc. Prof. Serdar TORT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her konuda yol gösteren, her zaman yanımda olan, bilgisi, tecrübesi, ilgisi ve desteğini esirgemeyen, bilimsel yaklaşımını her zaman örnek alacağım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ'a, tez çalışmalarım ve doktora eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, kendisini bir rol model olarak kabul ettiğim değerli ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Serdar TORT'a, tez izleme komitemde yer alan, yol göstericiliği, şevkati ve bana olan güveni ile beni her zaman destekleyen Sayın Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e ve tezime olan değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a, doktora tezimin in vivo çalışmalarına katkılarından dolayı Doç Dr. Sevtap HAN'a ve hücre kültürü çalışmalarını yürüten Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL'e, doktora ders dönemimde bilgi ve tecrübelerini, tez dönemimde ise desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ, Sayın Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK, Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA, Sayın Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN, Sayın Prof. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ, Sayın Prof. Dr. Tuba İNCEÇAYIR ve Sayın Doç. Dr. Başaran MUTLU AĞARDAN'a, araştırma görevlisi olarak çalıştığım süreçte bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan asla çekinmeyen, bir abi/abla olarak gördüğüm Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre YALÇIN, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu YILMAZ USTA ve Dr. Ecz. Mehmet BİRER'e, doktora eğitimimin başından itibaren her süreci birlikte yaşadığımız değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Adnan Altuğ KARA, Arş. Gör. Eylül Su SARAL ACARCA, Arş. Gör. Dr. Sinem SAAR, Arş. Gör. Dr. Ayşegül YILDIZ, Arş. Gör. Seval OLĞAÇ, Ecz. Aysel YILMAZ, Ecz. Ceren YETGİN, Arş. Gör. Tuğçe ÖZAKSUN, Arş. Gör. İlayda BİÇİCİ, Arş. Gör. Gözde BEBEK ve tüm çalışma arkadaşlarıma, bölüm sekreterimiz Fatma ÇELİK'e, doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bu zorlu süreçte ilgi ve sevgisi ile bana güç veren, bilgi ve zekasıyla bana her konuda destek olan sevgili Arş. Gör. Dr. Burcu TİMUR'a, başta annem Nuray TUNÇEL ve babam Serhat TUNÇEL olmak üzere beni büyütüp bugünlere getiren sevgili aileme, TGA-2022-7487 proje kodu ile tez çalışmalarımı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xviii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Deri	5
2.1.1. Derinin yapısı ve özellikleri	5
2.1.2. Deride görülen kanserler ve öncülleri	9
2.2. Aktinik Keratoz	10
2.2.1. Aktinik keratozun tedavi yaklaşımları	12
2.2.2. Aktinik keratoza yönelik formülasyon geliştirme çalışmaları	14
2.2.3. Aktinik keratozun in vivo modellenmesi	16
2.3. Diklofenak Sodyum	17
2.3.1. Diklofenak sodyumun farmakodinamik özellikleri.....	17
2.3.2. Diklofenak sodyumun farmakokinetik özellikleri.....	19
2.3.3. Diklofenak sodyumun fizikokimyasal özellikleri	19
2.4. Dermal İlaç Uygulanması	20
2.4.1. Deriden geçişi artırma yöntemleri.....	22
2.5. Mikroığneler	28

	Sayfa
2.5.1. Mikroİğnelerin türleri	28
2.5.2. Mikroİğnelerin üretim yöntemleri	31
2.5.3. Üç boyutlu baskı teknolojisi ile mikroİğnelerin üretilmesi	33
2.5.4. Mikroİğnelerin karakterizasyon çalışmaları	35
2.6. Veziküler Sistemler	37
2.6.1. Veziküler sistemlerin türleri	38
2.6.2. Veziküler sistemlerin üretim yöntemleri	41
2.6.3. Veziküler sistemlerin karakterizasyonu	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Gereç	47
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	47
3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar	48
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Diklofenak sodyumun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi	49
3.2.2. Diklofenak sodyumun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi	51
3.2.3. Diklofenak sodyumun analiz yöntemleri ve validasyonları	52
3.2.4. Mikroİğne formülasyonlarının geliştirilmesi	56
3.2.5. Mikroİğne formülasyonlarının karakterizasyonları	65
3.2.6. Mikroİğne formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları	70
3.2.7. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının geliştirilmesi	73
3.2.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının karakterizasyonu	76
3.2.9. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları	79
3.2.10. Hücre kültürü çalışmaları	80
3.2.11. Ex vivo deriden geçiş ve deride birikim çalışmaları	81
3.2.12. İn vivo çalışmalar	82
3.2.13. İstatistiksel değerlendirme	87

Sayfa

4. BULGULAR	89
4.1. Diklofenak Sodyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	89
4.1.1.Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışmaları.....	89
4.1.2.Diklofenak sodyumun FTIR analizi	89
4.1.3.Diklofenak sodyumun DSC analizi.....	90
4.2. Diklofenak Sodyumun Kısa Süreli Stabilesinin Belirlenmesi.....	91
4.3. Diklofenak Sodyumun Analiz Yöntemleri ve Validasyonları.....	92
4.3.1.Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki dalga boyu absorbands taraması	92
4.3.2.UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu.....	94
4.3.3.Kromatografik yöntem kullanılarak analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu.....	102
4.4. Mikroigne Formülasyonlarının Geliştirilmesi	113
4.4.1.Mikroigne formülasyonlarının 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak üretim yönteminin geliştirilmesi	113
4.4.2.Mikroigne formülasyonlarının hazırlanması	115
4.5. Mikroigne Formülasyonlarının Karakterizasyonları	121
4.5.1.Polimer karışımlarının reolojik özellikleri	121
4.5.2.Polimer karışımlarının PDMS ile temas açısı tayini	130
4.5.3.DSC analizi	131
4.5.4.FTIR analizi.....	134
4.5.5.Şişme indeksi.....	136
4.5.6.Mekanik dayanıklılık.....	138
4.5.7.Etkin madde miktar tayini	140
4.5.8.Optik mikroskop ile morfolojik inceleme	140
4.5.9.SEM ile morfolojik inceleme	141

Sayfa

4.5.10. Ex vivo deri delme çalışmaları	144
4.5.11. Stabilite çalışmaları.....	146
4.6. Mikroigne Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları	149
4.6.1. Beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları	149
4.6.2. Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları	151
4.7. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Geliştirilmesi.....	155
4.7.1. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi	155
4.7.2. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması	158
4.8. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Karakterizasyonu	158
4.8.1. DSC analizi	158
4.8.2. FTIR analizi.....	159
4.8.3. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının kesecik boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçümü.....	160
4.8.4. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi	162
4.8.5. Karakterizasyon verilerine göre optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi.....	163
4.8.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri.....	164
4.8.7. Morfolojik analiz.....	166
4.8.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon (esneklik) katsayılarının belirlenmesi	168
4.8.9. Stabilite çalışmaları	168
4.9. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları.....	171
4.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	173
4.11. Ex Vivo Deriden Geçiş ve Deride Birikim Çalışmaları	175
4.12. İn Vivo Çalışmalar.....	181

5. TARTIŞMA	191
5.1. Diklofenak Sodyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	191
5.1.1.Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışmaları.....	191
5.1.2.Diklofenak sodyumun FTIR analizi	191
5.1.3.Diklofenak sodyumun DSC analizi.....	192
5.2. Diklofenak Sodyumun Kısa Süreli Stabilitésinin Belirlenmesi.....	192
5.3. Diklofenak Sodyumun Analiz Yöntemleri ve Validasyonları	192
5.3.1.Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki dalga boyu absorbands taraması	192
5.3.2.UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu.....	193
5.3.3.Kromatografik yöntem kullanılarak analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu.....	195
5.4. Mikroigne Formülasyonlarının Geliştirilmesi	196
5.4.1.Mikroigne formülasyonlarının 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak üretim yönteminin geliştirilmesi	196
5.4.2.Mikroigne formülasyonlarının hazırlanması	198
5.5. Mikroigne Formülasyonlarının Karakterizasyonları	201
5.5.1.Polimer karışımlarının reolojik özellikleri	201
5.5.2.Polimer karışımlarının PDMS ile temas açısı tayini	202
5.5.3.DSC analizi	203
5.5.4.FTIR analizi.....	204
5.5.5.Şişme indeksi.....	205
5.5.6.Mekanik dayanıklılık.....	206
5.5.7.Etkin madde miktar tayini	206
5.5.8.Optik mikroskop ile morfolojik inceleme	207
5.5.9.SEM ile morfolojik inceleme	207

Sayfa

5.5.10. Ex vivo deri delme çalışmaları	207
5.5.11. Stabilite çalışmaları.....	208
5.6. Mikroigne Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları	209
5.6.1. Beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları	209
5.6.2. Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları	210
5.7. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Geliştirilmesi.....	212
5.7.1. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi	212
5.7.2. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması	213
5.8. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Karakterizasyonu	214
5.8.1. DSC analizi	214
5.8.2. FTIR analizi.....	215
5.8.3. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının kesecik boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçümü.....	215
5.8.4. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi	217
5.8.5. Karakterizasyon verilerine göre optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi.....	218
5.8.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri.....	220
5.8.7. Morfolojik analiz.....	220
5.8.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon (esneklik) katsayılarının belirlenmesi	221
5.8.9. Stabilite çalışmaları	222
5.9. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları.....	223
5.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	226
5.11. Ex Vivo Deriden Geçiş ve Deride Birikim Çalışmaları	226
5.12. İn Vivo Çalışmalar.....	229

Sayfa

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	237
KAYNAKLAR	243
EKLER.....	273
ÖZGEÇMİŞ	276



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Deri kanseri tedavisine yönelik formülasyon geliştirme çalışmaları	15
Çizelge 2.2. Lipid yapılı taşıyıcı sistemler	26
Çizelge 2.3. Polimerik ve inorganik yapılı taşıyıcı sistemler	27
Çizelge 2.4. Diğer özelleştirilmiş veziküler sistemler	40
Çizelge 3.1. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin ticari isimleri, kimyasal yapıları, kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve kullanım amaçları	61
Çizelge 3.2. Farklı PEG molekül ağırlıkları ve farklı polimerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin incelemesi amacıyla üretilen mikroigne formülasyonlarının içerikleri	63
Çizelge 3.3. Box-Behnken Tasarımı kapsamında üretilen mikroignelerin içerikleri ..	64
Çizelge 3.4. Box-Behnken Tasarımı sonucunda, Design Expert® 13.0 yazılımı tarafından önerilen optimum mikroigne formülasyonlarının bileşenleri ve oranları	65
Çizelge 3.5. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretiminin geliştirilmesi sırasında yapılan işlemler (Kullanılan formülasyon: V1)	74
Çizelge 3.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının içerikleri	75
Çizelge 3.7. İn vivo çalışma grupları	84
Çizelge 4.1. Diklofenak sodyumun farklı ortam ve sıcaklıklardaki çözünürlük değerleri	89
Çizelge 4.2. Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki maksimum dalga boyları	94
Çizelge 4.3. Distile su ortamı için UV-Visible spektrofotometrede yapılan lineer regresyonun istatistikleri	95
Çizelge 4.4. pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için UV-Visible spektrofotometrede için yapılan lineer regresyonun istatistikleri	95
Çizelge 4.5. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin doğruluk çalışmaları kapsamında elde edilen %geri elde değerleri	99
Çizelge 4.6. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri	100

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin deneyler arası kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri.....	100
Çizelge 4.8. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri.....	101
Çizelge 4.9. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin stabilite testi sonuçları.....	101
Çizelge 4.10. Distile su ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı.....	103
Çizelge 4.11. pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı.....	104
Çizelge 4.12. Metanol ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı.....	105
Çizelge 4.13. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin doğruluk çalışmaları kapsamında elde edilen %geri elde değerleri	109
Çizelge 4.14. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri	110
Çizelge 4.15. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin deneyler arası kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri.....	111
Çizelge 4.16. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleriGeliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri.....	111
Çizelge 4.17. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin stabilite testi sonuçları.....	112
Çizelge 4.18. Geliştirilen HPLC analiz yönteminin sağlamlık testi sonuçları	112
Çizelge 4.19. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilen F1-F6 formülasyonlarının şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık sonuçları	116
Çizelge 4.20. Box-Behnken Tasarımı kapsamında üretilen mikroigne formülasyonlarının şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık sonuçları	117
Çizelge 4.21. BBD’ye göre bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında oluşturulan matematiksel modelin ANOVA sonuçları, uyumluluk parametreleri ve eşitlikleri.....	118

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.22. Optimum formülasyonların içerikleri, istenebilirlik katsayıları, tahmin edilen bağımsız değişken verileri ve bu bağımsız değişkenlerin deneysel verileri	121
Çizelge 4.23. F1-F6 formülasyonlarının polimer karışımlarının bileşenleri ve oranları	122
Çizelge 4.24. F7-F24 formülasyonlarının polimer karışımlarının bileşenleri ve oranları	123
Çizelge 4.25. F1-F6 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r^2 değerleri	129
Çizelge 4.26. F7-F21 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r^2 değerleri.....	129
Çizelge 4.27. F22-F24 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r^2 değerleri.....	130
Çizelge 4.28. Polimer karışımlarının PDMS ile yaptığı temas açısı	131
Çizelge 4.29. Optimum formülasyonların şişme hızı parametreleri.....	137
Çizelge 4.30. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılık verileri.....	139
Çizelge 4.31. Optimum formülasyonların etkin madde miktar tayinleri.....	140
Çizelge 4.32. Optik mikroskop ile morfolojik inceleme sonuçları.....	140
Çizelge 4.33. Optimum formülasyonların beher yöntemine göre salım hızı parametreleri.....	150
Çizelge 4.34. Optimum formülasyonların Franz difüzyon hücresi yöntemine göre salım hızı parametreleri.....	153
Çizelge 4.35. Optimum mikroiğne formülasyonlarının salım kinetiği modelleri ile uyumlulukları	155
Çizelge 4.36. Esnek veziküler sistem formülasyonlarına uygulanan işlemler sonucunda elde edilen KB ve PDI değerleri	156
Çizelge 4.37. Hazırlanan esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB, PDI, ZP ve EE% değerleri.....	161
Çizelge 4.38. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K ve n değerleri.....	166
Çizelge 4.39. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon katsayıları	168

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.40. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının salım kinetiği modelleri ile uyumlulukları.....	173
Çizelge 4.41. Optimum mikroigne formülasyonlarının, optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının, ticari ürünün ve çözeltinin permeabilite katsayıları	180
Çizelge 4.42. Tüm grupların Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman verileri	185
Çizelge 4.43. Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman grafiğinin lineer regresyon sonuçları	185
Çizelge 4.44. Kulak kalınlığı-zaman grafiklerinin EAA'sı, ödem kalınlığı inhibisyon yüzdeleri, kulak ağırlıkları ve PGE2 seviyeleri	190

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Derinin yapısı	6
Şekil 2.2. Aktinik keratozun gelişimi.....	11
Şekil 2.3. Diklofenak sodyumun kimyasal yapısı	17
Şekil 2.4. Mikroigne türleri	29
Şekil 2.5. Çeşitli veziküler sistemlerin yapılarının şematik gösterimi.....	38
Şekil 3.1. 800, 900, 1000, 1100, 1200 µm boy ve 200, 250, 300 µm taban çapı kombinasyonlarından oluşan 10x10 mikroigne dizilerine ait CAD tasarımı.....	57
Şekil 3.2. Anakalıbı oluşturan solid mikroignelerin şematik gösterimi.....	58
Şekil 3.3. PDMS mikroigne kalıplarının üretimi	59
Şekil 3.4. Gantrez S97 ile PEG arasında gerçekleşen termal çapraz bağlama reaksiyonu	62
Şekil 3.5. 5x5 iğne içeren mikroigne formülasyonlarının alüminyum folyo ve adhezif bant arasına yerleştirilmesi ile hazırlanan in vitro salım örnekleri	72
Şekil 3.6. Santrifüj filtrasyon tüplerinin çalışma prensibi.....	77
Şekil 4.1. Diklofenak sodyumun karakteristik piklerinin görüldüğü FTIR spektrumu.....	90
Şekil 4.2. Diklofenak sodyumun endotermik erime piki gösteren DSC termogramı ..	90
Şekil 4.3. 80°C’de 24 saat boyunca tutulan diklofenak sodyumun miktarındaki değişim (Ortalama ± SS, n=3).....	92
Şekil 4.4. 80°C’de 24 saat boyunca tutulan diklofenak sodyumun DSC termogramı .	92
Şekil 4.5. Diklofenak sodyumun a) distile sudaki, b) pH 7,4 fosfat tamponundaki ve c) metanoldeki 10 µg/mL’lik çözeltilerinin 200-400 nm aralığında UV spektrumları	93
Şekil 4.6. Diklofenak sodyumun distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu.....	94
Şekil 4.7. Diklofenak sodyumun pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu.....	95

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. Distile su ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil, e) HPMC ve f) PVA çözeltilerinin UV spektrumları	97
Şekil 4.9. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil çözeltilerinin ve e) adhezif bant, f) alüminyum folyo ile karıştırılmış pH 7,4 fosfat tamponlarının UV spektrumları	98
Şekil 4.10. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemlerine ait a) distile su, b) pH 7,4 fosfat tamponu ve c) metanol ortamlarındaki kromatogramları.....	102
Şekil 4.11. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu	103
Şekil 4.12. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu.....	104
Şekil 4.13. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusu.....	105
Şekil 4.14. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil ve e) Transcutol CG çözeltilerinin kromatogramları.....	106
Şekil 4.15. Metanol ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil çözeltilerinin kromatogramları.....	107
Şekil 4.16. Metanol ortamında 100 µg/mL'lik a) Lipoid S100, b) kolesterol, c) Transcutol CG, d) oleik asit çözeltilerinin ve e) sadece sıçan derisiyle yapılan metanol ekstraksiyonunun kromatogramları.....	108
Şekil 4.17. 3 boyutlu baskı ile üretilen solid mikroıgnelerin ölçülen a) yükseklik, b) taban çapı ve c) uç çapı parametrelerinin tasarlanan yükseklik ve taban çapına göre değişimi	114
Şekil 4.18. Şişme indeksi üzerindeki (a) hyaluronik asit, (b) polikarbofil, (c) Gantrez S97-PEG1500 yüzdelerinin etkisi ve mekanik dayanıklılık üzerindeki (d) hyaluronik asit, (e) polikarbofil, (f) Gantrez S97-PEG1500 yüzdelerinin etkisi	119
Şekil 4.19. (a) F1, F2, F3, (b) F4, F5, F6, (c) F7, F8, F9, (d) F10, F11, F12 polimer karışımlarının Kayma Gerilim-Kayma Hızı ve Viskozite-Kayma Hızı grafikleri.....	125
Şekil 4.20. (a) F13, F14, F15, (b) F16, F17, F18, (c) F19, F20, F21, (d) F22, F23, F24 polimer karışımlarının Kayma Gerilim-Kayma Hızı ve Viskozite-Kayma Hızı grafikleri.....	126

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. (a) F1, F2, F3, (b) F4, F5, F6, (c) F7, F8, F9, (d) F10, F11, F12 polimer karışımlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri	127
Şekil 4.22. (a) F13, F14, F15, (b) F16, F17, F18, (c) F19, F20, F21, (d) F22, F23, F24 polimer karışımlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri.....	128
Şekil 4.23. Optimum formülasyonların K değerleri ile hyaluronik asit yüzdeleri arasındaki ilişki	130
Şekil 4.24. Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve diklofenak sodyumun DSC termogramları	133
Şekil 4.25. Mikroiğne formülasyonlarının DSC termogramları	134
Şekil 4.26. Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve diklofenak sodyumun FTIR spektrumları	135
Şekil 4.27. Mikroiğne formülasyonlarının FTIR spektrumları	135
Şekil 4.28. Optimum formülasyonların (a) Şişme İndeksi-Zaman, (b) Şişme İndeksi-Ln(zaman) grafikleri	137
Şekil 4.29. Optimum formülasyonların şişme hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki	138
Şekil 4.30. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılıkları.....	139
Şekil 4.31. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılık ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki.....	139
Şekil 4.32. (a) Optimum formülasyonların ve ana kalıbın ölçülerinin kıyaslandığı bar grafiği, optimum formülasyonların (b) optik mikroskop görüntüleri ve (c) dijital kamera ile çekilmiş görüntüleri	141
Şekil 4.33. Mikroiğne formülasyonlarının deride oluşturduğu teorik penetrasyon derinliği	146
Şekil 4.34. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen etkin madde yüzdesi verileri	147
Şekil 4.35. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen şişme indeksi verileri	147
Şekil 4.36. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen mekanik dayanıklılık verileri	148
Şekil 4.37. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen ağırlık verileri.....	148

Şekil	Sayfa
Şekil 4.38. Optimum mikroiğne formülasyonlarının beher yöntemine göre (a) %Salım-Zaman ve (b) %Salım-Ln(Zaman) grafikleri	150
Şekil 4.39. Optimum formülasyonların salım hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki	151
Şekil 4.40. Optimum mikroiğne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemine göre %Salım-Zaman grafiği	152
Şekil 4.41. Optimum mikroiğne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemine göre %Salım-Ln(Zaman) grafikleri.....	153
Şekil 4.42. Optimum formülasyonların 2. saate kadar olan salım hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki	154
Şekil 4.43. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında işlem parametrelerinin (a) KB ve (b) PDI'ya etkisi	157
Şekil 4.44. Veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan katı yardımcı maddeler ve diklofenak sodyumun DSC termogramları	159
Şekil 4.45. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler ve diklofenak sodyumun FTIR spektrumları	160
Şekil 4.46. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB değerleri	161
Şekil 4.47. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının PDI değerleri	162
Şekil 4.48. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının ZP değerleri	162
Şekil 4.49. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE% değerleri.....	163
Şekil 4.50. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının (a) Kayma Gerilimi-Kayma Hızı, (b) Viskozite-Kayma Hızı grafikleri.....	165
Şekil 4.51. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri	166
Şekil 4.52. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen etkin madde yüzdesi verileri	169
Şekil 4.53. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen kesecik boyutu verileri	170
Şekil 4.54. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen PDI verileri.....	170
Şekil 4.55. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen zeta potansiyel verileri	171

Şekil	Sayfa
Şekil 4.56. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen enkapsülasyon etkinliği verileri	171
Şekil 4.57. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının %Salım-Zaman grafiği	172
Şekil 4.58. Optimum mikroiğne formülasyonlarının MTT sitotoksosite test sonuçları .	174
Şekil 4.59. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının MTT sitotoksosite test sonuçları	175
Şekil 4. 60. Optimum mikroiğne formülasyonlarının %Permeasyon-Zaman grafiği	176
Şekil 4.61. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının %Permeasyon-Zaman grafiği	176
Şekil 4.62. Ticari ürün ve etkin madde çözeltisinin %Permeasyon-Zaman grafiği	176
Şekil 4.63. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroiğne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün, 24. saatin sonunda alıcı faza geçen etkin madde yüzdeleri	178
Şekil 4.64. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroiğne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün, 24. saatin sonunda dokuda kalan etkin madde yüzdeleri	179
Şekil 4.65. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroiğne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün permeabilite katsayıları	179
Şekil 4.66. Tüm grupların Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman grafikleri	184
Şekil 4.67. Tüm grupların Kulak Kalınlığı-Zaman grafiklerinin EAA değerleri	186
Şekil 4.68. Tüm grupların ödem kalınlığı inhibisyon yüzdeleri	186
Şekil 4.69. Tüm grupların sakrifikasyon sonrası alınan kulak dokularının ağırlıkları...	187
Şekil 4.70. Tüm grupların sakrifikasyon sonrası alınan dokulardaki PGE2 düzeyleri ..	187
Şekil 4.71. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası mononükleer hücre infiltrasyonu skorları	189
Şekil 4.72. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası ödem skorları	189
Şekil 4.73. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası damar konjesyonu skorları	190
Şekil 5.1. Şişme hızı sabiti ile salım hızı sabitleri arasındaki lineer ilişki	209

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. 5x5 iğne içeren mikroiğne formülasyonlarının şişme testlerinin gerçekleştirilebilmesi için hazırlanan örnekler	68
Resim 3.2. Mikroiğne formülasyonlarının ex vivo çalışmalar sonrasında, deri dokusu ile beraber Franz difüzyon hücresinden çıkartılırken çekilmiş görüntüsü ...	81
Resim 3.3. (a) Mikroiğne formülasyonlarının sıçan kulaklarına uygulanıp, ipek flaster ile sarıldıktan 24 saat sonra çıkartılırken çekilmiş fotoğraf, (b) Ksilen uygulanan ve uygulanmayan kulakların farkını gösteren fotoğraf	85
Resim 4.1. (a) SLA 3 boyutlu yazıcıdan elde edilmiş ana kalıp, (b) ana kalıptan eşlenmiş PDMS kalıp, (c) PDMS kalıp ile üretilmiş Gantrez S97 mikroiğne	115
Resim 4.2. Optimum formülasyonlara ait SEM görüntüleri	143
Resim 4.3. Optimum formülasyonlara sıçan derisinde oluşturduğu porların SEM görüntüleri.....	145
Resim 4.4. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında morfoloji inceleme amacıyla çekilen dijital kamera görüntüleri	149
Resim 4.5. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarından (a) V4, (b) etkin maddesiz V4, (c) V7, (d) V8, (e) etkin maddesiz V8'in TEM görüntüleri..	167
Resim 4. 6. (a) negatif kontrol, (b) pozitif kontrol, (c) MN kontrol, (d) ticari ürün, (e) F24 Boş, (f) F24, (g) V4 Boş ve (h) V4 gruplarına ait doku kesiti mikrografları	188
Resim 5.1. Franz yöntemi ile in vitro salım çalışmaları sonunda (a) F22, (b) F23 ve (c) F24 formülasyonlarının görüntüsü	211

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°	Derece
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
dk	Dakika
dyn	Dyne
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mPa	Milipascal
mV	Milivolt
N	Newton
ng	Nanogram
nm	Nanometre
r ²	Determinasyon katsayısı
r ² _{adj}	Ayarlanmış determinasyon katsayısı
SH	Standart hata
sn	Saniye
SS	Standart sapma

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AIC	Akaike bilgi ölçütü
ALA	Aminolevulinik asit
BBD	Box-Behnken tasarımı
BCC	Bazal hücreli karsinom
CLIP	Sürekli sıvı arayüz üretimi
COX	Siklooksijenaz
cSCC	Kutanoz skuamöz hücreli karsinom
DLP	Dijital ışık işleme
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle's besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
DoE	DeneySEL Tasarım
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EE %	Enkapsülasyon etkinliği
EAA	Eğri altında kalan alan
ELISA	Enzim bağımlı immünosorbent analiz
FDM	Eriyik yığıma modelleme
FTIR	Foriuer dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
H&E	Hematoksilen-eozin
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksipropil metilselüloz
IFN- α	İnterferon-alfa
KB	Kesecik boyutu
KÜB	Kısa ürün bilgisi
LOD	Saptama sınırı
MAL	Metil aminolevulinat
MEMS	Mikroelektromekanik sistemler
MJF	Multi jet füzyon
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromür
MSC	Model seçim kriteri

NMSC	Melanom olmayan cilt kanseri
NF-κB	Nükleer faktör kappa
ns	İstatistiksel olarak anlamsız
NSAİİ	Non-steroidal antienflamatuvar ilaç
PDI	Polidispersite indeksi
PDMS	Polidimetil siloksan
PEG	Polietilen glikol
PG	Prostaglandin
PLGA	Polilaktik-glikolik asit
PPARγ	Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama
PVA	Polivinil alkol
PVME-MA	Polivinil metileter-maleik asit kopolimeri
PVP	Polivinilpirolidon
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
SLA	Stereolitografi
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi
TLR	Toll-benzeri reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktörü-alfa
UV	Ultraviyole
ZP	Zeta potansiyel

1. GİRİŞ

Aktinik keratoz, genellikle yoğun güneş ışığı maruziyeti sonucu eritomatöz plak oluşumunun gözlemlendiği bir deri hastalığıdır. Epidermiste yer alan keratinosit hücrelerinin farklılaşması ile karakterizedir. Aktinik keratoz lezyonları premalign epitel tümörler olarak kabul edilmiştir. Skuamöz hücreli karsinoma dönüşme olasılığı nedeniyle mutlak olarak tedavi edilmesi gerekmektedir. Aktinik keratoz hastalığının tedavisi lezyona yönelik ve dermal (alansal) tedaviler olmak üzere iki farklı yaklaşım üzerine kuruludur. Lezyona yönelik tedaviler genellikle fokal ablatif işlemlerden oluşurken, alansal tedaviler ilaç tedavisi ve kimyasal soyma yöntemleridir. Bu yöntemler çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahipken genellikle lezyonların sayısı, dağılımı, hasta karakteristiği gibi değişkenler göz önünde bulundurularak tedavi seçimi gerçekleştirilmektedir. Dermal tedavide ise ilaç uygulaması gerçekleştirilir. Aktinik keratozda, keratinizasyonun artışına bağlı olarak derinin bariyer fonksiyonu güçlenmektedir. Bu durum dermal tedavilerin başarı oranını olumsuz etkilemektedir. Dermal tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar 5-florourasil, imikimod, ingenol mebutat, 5-aminolevulinik asit, retinoitler ve diklofenak sodyumdur. Bu etkin maddeler arasında, düşük yan etki profili ile ön plana çıkan diklofenak sodyum uzun yıllardır güvenle kullanılması, kolay ulaşılabilirliği, aktinik keratoz tedavisi üzerine çok az sayıda formülasyon geliştirme çalışması bulunması nedeniyle tez çalışması kapsamında kullanılmıştır.

Diklofenak sodyum, propionik asit yapısındaki non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler) sınıfında yer alır. NSAİİ'lerin temel etki mekanizması siklooksijenaz (COX) enziminin inhibisyonuna bağlı olarak araşidonik asitten hareketle tromboksanlar, prostaglandinler ve prostasiklinlerin oluşumunu engellemektir. Diklofenak sodyum, non-spesifik olarak siklooksijenaz-1 ve siklooksijenaz-2 (COX-1 ve COX-2) enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak etki gösterir. Oral, intramüsküler, rektal ve topikal kullanılan birçok müstahzarı mevcuttur. Diklofenak sodyumun, aktinik keratoz tedavisindeki etkisinin, hem COX-2 inhibisyonuna bağlı olarak anjiogenez ve hücre proliferasyonunu azaltması hem displastik keratinositlerde ligand bağımlı apoptozu tetiklemesi olduğu düşünülmektedir. Diklofenak sodyum deriden emilimi olan sınırlı sayıda etkin maddelerden biri olmasına karşın, emilen miktarının sınırlı olması ve yüksek değişkenlik göstermesi, tedavi etkinliğini olumsuz etkilemektedir.

Mikroiğneler fiziksel penetrasyon artırma yöntemleri arasında, uygulanabilirliği ile ön plana çıkan bir formülasyon türüdür. Mikroiğneler ölçek büyötmeye yatkınlıkları, modifikasyona açık olmaları, etkin maddenin özelliklerinden minimum düzeyde etkilenmeleri ve üretim maliyetlerinin düşük olması nedenleriyle, son yıllarda hem araştırma grupları hem endüstri için dikkat çekici hale gelmiştir. Dünyada, mikroiğneler ile ilgili 1998 ve 2018 yılları arasında binden fazla makale yayınlanmış ve iki binden fazla patent alınmıştır. Bu süreçte, mikroiğne formülasyonlarıyla ilgili 79 klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Günümüz itibarı ile mikroiğne teknolojisi ile hazırlanmış çeşitli aşılar piyasada bulunmaktadır. Ülkemizde de bu konuda yapılan araştırmalar mevcuttur.

Nano taşıyıcı sistemler bir diğer penetrasyon artırma yöntemi olup, uzun yıllardır çalışılmaktadır. Polimerik, inorganik veya lipit temelli olabilen nanotaşıyıcılar arasında, düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluk göstermeleri nedeniyle lipit temelli taşıyıcılar ön plana çıkmaktadır. Lipit temelli taşıyıcılar katı lipit nanopartiköl, lipit yapılı nano taşıyıcı, veziköler sistem ya da emülsiyon yapısında olabilmektedir. Veziköler sistemler biyolojik membranlar ile benzer yapıya sahiptir. Lipozom, etozom, transferzom olarak adlandırılan veziköler sistem formülasyonlarıyla ilgili birçok akademik çalışma gerçekleştirilmiş ve ticarileşmiş ürün bulunmaktadır. Veziköler sistemler yüksek deri penetrasyonu, esneklik, düşük toksisite, yüksek enkapsülasyon, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip etkin maddelerin yüklenebilmesi gibi avantajları nedeniyle en kullanışlı taşıyıcı sistemlerden biri olma özelliğini korumaktadır.

Bu tez çalışmasında amaç, aktinik keratoz tedavisi için farklı penetrasyon artırma stratejileri olan mikroiğne ve veziköler sistem formülasyonları ile derinin epidermis tabakasına ulaşan diklofenak sodyum miktarı artırılarak, piyasada bulunan ticari jel formülasyonunun eksikliklerinin elimine edilip edilemeyeceği ve daha etkin bir tedavinin sağlanıp sağlanamayacağının belirlenmesidir. İn vitro karakterizasyon çalışmaları ile optimum mikroiğne ve veziköler sistem formülasyonları belirlenmiştir. İn vitro salım çalışmalarında, formülasyonlardan etkin madde çıkışı incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında formülasyonların insan keratinosit hücreleri üzerindeki toksisitesi değerlendirilmiştir. Ex vivo çalışmalar ile sıçan derisinden alıcı faza geçen ve deride biriken etkin madde miktarı belirlenmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda seçilen V4 (veziköler sistem) ve F24 (mikroiğne) formülasyonlarının, sıçanlarda oluşturulmuş ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modelindeki tedavi edici etkinliği değerlendirilmiştir. Dermal ilaç taşınmasında, iki farklı

penetrasyon artırma stratejisinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Tez çalışmaları kapsamında elde edilen verilerden hareketle üretilen yayın ile literatüre katkıda bulunulmuştur. Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TGA-2022-7487 kodlu proje ile desteklenmiştir.





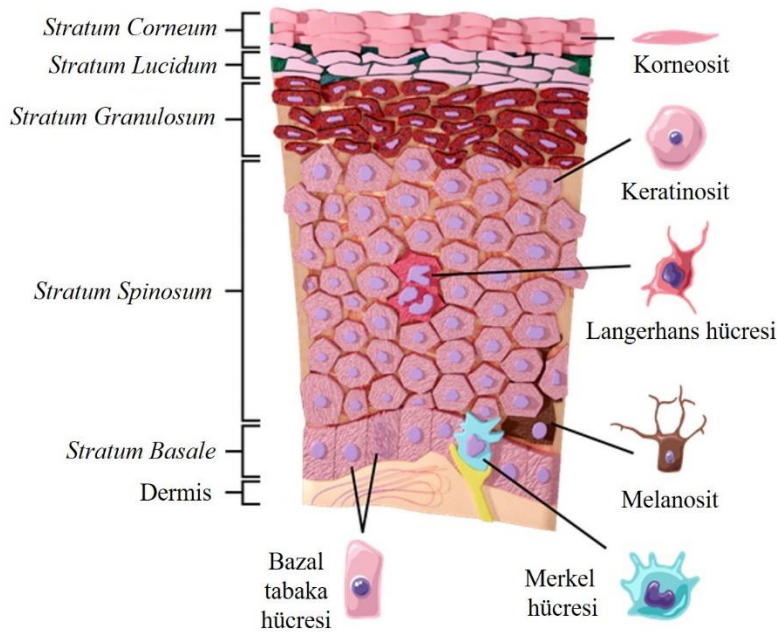
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, insan vücudunun en dışında yer alan ve yaklaşık olarak 2 m² alana sahip en büyük organdır. Derinin birçok önemli görevi vardır. Fiziksel, kimyasal veya mikrobiyolojik birçok etkene karşı koruyucu bir bariyer olmasının yanı sıra, vücut sıcaklığının düzenlenmesi, basınç ve sıcaklık hissinin algılanması ve D vitamini başta olmak üzere bazı yaşamsal bileşiklerin sentezi gibi fonksiyonlara sahiptir (Walters ve Roberts, 2002). Deri, kozmetik açıdan da önemsenen bir organdır. Aynı zamanda, geniş yüzey alanıyla önemli bir ilaç uygulama veya hedefleme bölgesidir. Hem topikal hem de sistemik hastalıklar için “dermal” ve “transdermal” olarak deriye ilaç uygulanması söz konusudur (Benson, Grice, Mohammed, Namjoshi ve Roberts, 2019).

2.1.1. Derinin yapısı ve özellikleri

Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç ana katmandan oluşur. Her katmanın farklı görevleri ve özellikleri vardır. Epidermis, sürekli olarak yenilenen çok sayıda hücre katmanından oluşan en dıştaki koruyucu dokudur. Epidermisin altında, vücut ısısının düzenlenmesinde ve basınç/sıcaklık algılanmasında önemli rol oynayan; kan damarlarını, sinir uçlarını ve çeşitli bezleri içeren dermis bulunur. En altta yer alan hipodermis ise yüksek oranda yağ hücresi içerir ve vücut için yalıtkan bir tabaka görevi görür (Şekil 2.1) (Lai-Cheong ve McGrath, 2013).



Şekil 2.1. Derinin yapısı (P. Kolarsick, M. Kolarsick ve Goodwin, 2011)

Hipodermis

Subkutan doku olarak da bilinen hipodermis derinin en derin tabakasıdır (Feng, Li, Ramier, Eltony ve Yun, 2022). Temelde yağ hücrelerinden oluşan hipodermis, vücut fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli görevler üstlenir. Bu katman, mekanik hasara karşı koruma ve yalıtım fonksiyonunun yanında, yağ depolayarak vücut için gerekli enerjinin sağlanmasında görev alır (Baroni, Buommino, De Gregorio, Ruocco, Ruocco ve Wolf, 2012; Richter ve Jacobsen, 2014).

Dermis

Deriye destek ve esneklik sağlayan dermis, epidermis ile hipodermis arasında yer alır. Temel bileşeni, deriye dayanıklılık ve elastikiyetini veren kolajen ve elastin liflerini içeren bağ dokusudur (Silver, Seehra, Freeman ve DeVore, 2002). Dermis ayrıca kan damarlarını, lenfatik damarları ve sinir uçlarını barındırır. Dermisin ana işlevlerinden biri deri yapısının korunmasını sağlamaktır. Vücut ısısının düzenlenmesinden ve basınç-sıcaklık duyusundan sorumludur. Dermisteki kan damarları, çevre sıcaklığındaki değişikliklere yanıt olarak dilate veya kontrakte olabilir. Bu durum ısının gerektiği gibi dağıtılmasına veya korunmasına yardımcı olur. Dermisteki sinir uçları dokunma, basınç, sıcaklık ve ağrının algılanmasını sağlar. Ayrıca dermis, ter ve sebum salgılayan ter bezleri ve yağ bezleri gibi özel bezleri

barındırır (McKnight, Shah ve Hargest, 2022). Dermiste ayrıca immün cevabı oluşturan makrofajlar ve dermal dentritik hücreler bulunur (Ng ve Lau, 2015).

Epidermis

Derinin en dış tabakası olan epidermis, vücudun dış tehditlerden korunmasında ve genel homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynayan çok sayıda katmandan oluşan karmaşık bir yapıdır. Epidermis beş katmandan oluşur: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* ve *stratum basale* (Baroni ve diğerleri, 2012).

Epiderminin en derin tabakası *stratum basale* veya bazal tabakadır. Bu katmanda yer alan tek sıra halindeki bazal hücreler (kök hücreler), olgunlaştıkça yavaş yavaş yüzeye doğru göç ederek diğer katmanlara ilerler. Bazal hücrelerin ilerlemesi ve farklılaşması ve keratinositlere dönüşmesi ile epiderminin diğer katmanları meydana gelir. Bazal tabakada ayrıca melanosit hücreleri yer alır. Melanosit hücreleri melanin salımından sorumludur. Bu katmanda yer alan bir diğer hücre grubu ise Merkel hücreleridir. Merkel hücreleri basıncın algılanmasında görev alır (Lai-Cheong ve McGrath, 2013).

Stratum basale'nin üstünde *stratum spinosum* yer alır. Desmozomlarla birbirine bağlanan 8-10 hücre katmanından meydana gelir. En önemli rollerinden biri deriye mekanik dayanıklılık ve esneklik sağlamaktır (Jiao, Yue, Zhi, Qi, Yang ve diğerleri, 2022). Dikenli yapıdaki hücreler, küçük deri yaralanmalarında patojenlere karşı savunma sağlar. Yabancı antijenlerin girişi sırasında T lenfositlerini aktive ederek ilk bağışıklık tepkisini oluşturur. Ayrıca keratin sentezi bu katmanda gerçekleşip, aşırı nem ve elektrolit kaybını engeller (McLafferty, Hendry ve Farley, 2012).

Stratum granulosum katmanı 3-5 hücre dizisinden meydana gelir. Bu katmandaki keratinositler, farklılaşma sürecinden geçerek, deri bariyerinin önemli bir parçasını oluşturan, aşırı su kaybını ve mikroorganizma girişini önleyen lipid içerikli ekzositotik kesecikleri üretirler. Ek olarak, keratin liflerini birbirine bağlayan bir protein olan filagrin üretimi *stratum granulosum*'da meydana gelir. *Stratum lucidum*, vücudun yalnızca avuç içi ve ayak tabanı gibi tüysüz bölgelerinde bulunan yarı saydam bir katmandır. Temel işlevlerinden biri, sürekli sürtünme ve basınca maruz kalan bölgelerde deriye ek güç ve esneklik sağlamaktır. Bu katmandaki hücreler, dış fiziksel stres etkenlerine karşı koruma

sağlayan eleidin içerir. Bunun yanında *stratum lucidum*, avuç içi ve ayak tabanındaki ter üretiminin düzenlenmesinde de rol oynar. Bu katmanda fazla sayıda ekrin ter bezleri yer alır (Yousef, Alhajj ve Sharma, 2017).

Epiderminin en dış tabakası olan *stratum corneum*, cildin bariyer fonksiyonları ve genel koruması açısından kritik öneme sahiptir. *Stratum corneum*'daki korneositlerin düzeni, tuğla örgüsüne benzeyen bir yapıdadır. Bu yapı, yabancı maddelerin deriden geçmesini ve deriden su ve elektrolitlerin kaybını engeller. *Stratum corneum*, fiziksel bariyer fonksiyonunun yanında ölü deri hücrelerinin uzaklaştırıldığı katmandır. Ayrıca, derinin nemini ve esnekliğini korumaya yardımcı olan doğal faktörler ve lipidler için bir depo görevi görür. Bu bileşenler, aynı zamanda cildin doğal savunma mekanizmasına katkıda bulunarak cildin kendini onarma ve dış etkenlerin neden olduğu hasarlardan korumasını sağlar (Menon, Cleary ve Lane, 2012).

Derinin özellikleri

Derinin başlıca işlevlerinden biri patojenlerin ve zararlı maddelerin vücuda girmesini önlemektir. Derinin farklı görevlere sahip birden fazla katmandan oluşan karmaşık yapısı, koruma fonksiyonu için önemlidir (Proksch, Brandner ve Jensen, 2008). Başta *stratum corneum* tabakası olmak üzere, deri fiziksel bir bariyer özelliği göstererek vücudun ilk savunma hattını oluşturur. Birçok maddenin deriden difüze olmasını ve mikroorganizmaların vücuda girmesini engeller (Elias, 2005). Deri immünolojik olarak da önemli bir göreve sahiptir. Epidermiste bulunan Langerhans hücreleri, yabancı antijenlerin tanınması ve potansiyel tehditlerle karşı immünolojik reaksiyonlarının başlatılmasını sağlar. Ayrıca, deri üzerinde yer alan antimikrobiyal peptit ve proteinler, enfeksiyonların önlenmesini ve sağlıklı bir mikrobiyolojik flora oluşmasını sağlar (Kabashima, Honda, Ginhoux ve Egawa, 2019). Derinin bir başka önemli görevi UV radyasyonun zararlı etkilerini minimize etmektir. Melanosit hücreleri, UV radyasyonu absorbe eden, bu sayede, deriyi DNA hasarından ve olası mutajenezden koruyan melanin pigmentini üretir (Solano, 2014).

Deri, çeşitli mekanizmalarla termoregülasyonun sağlanmasında görev alır (Romanovsky, 2014). Dokunma, basınç, sıcaklık ve ağrının algılanması bir diğer önemli görevidir (Lumpkin ve Caterina, 2007).

Deri, ilaç absorpsiyonu için önemli bir organdır. *Stratum corneum*'un sıkı yapısı, lipid bileşimi ve düşük su içeriğine sahip olması, büyük ve hidrofilik moleküllerin geçişini sınırlarken, küçük ve lipofilik yapıdaki bileşiklerin difüze olmasına olanak tanır. Derideki yoğun damar ağı yüksek perfüzyon sağladığından, absorbe olabilen ilaçların sistemik dolaşıma geçişi için iyi bir alternatiftir. Oral uygulamada karşılaşılan gastrointestinal sistem ve sindirim enzimlerinin neden olduğu potansiyel bozunma, ilk geçiş etkisi gibi biyoyararlanım azaltıcı faktörler, transdermal yol ile elimine edilebilir. Bazı ilaçların transdermal yol ile verilmesi, kontrollü salım ve azaltılmış sistemik yan etkiler gibi avantajlar sağlar (Benfeldt, 2012).

2.1.2. Deride görülen kanserler ve öncülleri

Deri kanseri en yaygın malignitelerden biridir. Kanser geliştiği hücre tipine göre melanom ya da melanom olmayan cilt kanserleri (NMSC) olarak sınıflandırılır. Melanomlar, melanosit hücrelerinde gelişen kanserlerin genel ismidir. Melanomlara yüzeysel yayılan melanom, lentigo maligna melanom, nodüler melanom ve akral lentiginöz melanom gibi kanser türleri örnek verilebilir (McCourt, Dolan ve Gormley, 2014). NMSC'ler ise bazal hücreler, skuamöz hücreler veya Merkel hücrelerinde gelişen kanser türleridir. Bazal hücreli karsinom (BCC) ve kutanöz skuamöz hücreli karsinom (cSCC) NMSC'lere örnektir. Her iki kanser türü (melanom ve NMSC) için kronik güneş maruziyeti ve kümülatif UV radyasyon en önemli risk faktörüdür. Özellikle NMSC'ler UV radyasyon hasarı sonucunda ortaya çıkan öncül lezyonlardan köken alırlar. Bu öncüller, daha invaziv malignitelerin erken teşhisi ve önlenmesinde önemlidir (Simoës, Sousa ve Pais, 2015).

Melanom ve öncülleri

Melanom, derinin pigment üreten hücreleri olan melanositlerden köken alan agresif, ölümcül ve metastaz yapma potansiyeli yüksek bir deri kanseri türüdür. Displastik nevüsler olarak isimlendirilen atipik benler melanom öncülü olarak değerlendirilir. Atipik benlerin melanoma dönüşümünde çeşitli genetik mutasyonlar rol oynar. Özellikle açık ten rengine sahip kişilerde yoğun ve aralıklı UV radyasyona maruz kalma, melanom gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (Sober ve Burstein, 1995).

Bazal hücreli karsinom ve öncülleri

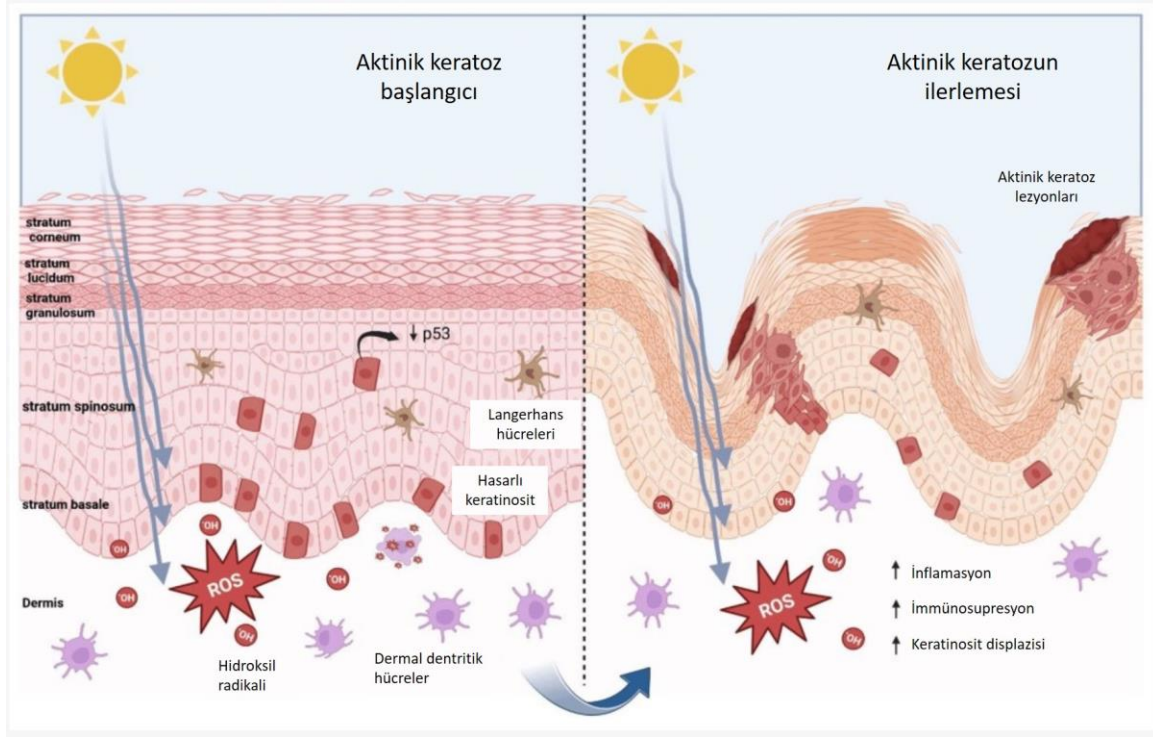
BCC, epidermisin bazal hücrelerinden kaynaklanan en yaygın deri kanseri türüdür. BCC yavaş büyüyen ve düşük metastatik potansiyele sahip olmasına rağmen tedavi edilmediği takdirde lokal olarak ciddi seviyede doku yıkımına yol açabilir (Netscher ve Spira, 2004). BCC'nin en önemli öncülü, BCC'ye duyarlılığı artıran genetik bir bozukluk olan Gorlin Sendromu (Nevoid bazal hücreli karsinom sendromu)'dur (Simoes ve diğerleri, 2015).

Kutanöz skuamöz hücreli karsinom (cSCC) ve öncülleri

Kutanöz skuamöz hücreli karsinom (cSCC), ikinci en yaygın cilt kanseri türü olup, BCC'den daha fazla metastaz potansiyeline sahiptir. Epidermisteki keratinosit hücrelerinden köken alan cSCC için en önemli risk faktörü uzun süreli UV ışık maruziyetidir. cSCC'nin temel öncülleri aktinik keratoz ve Bowen hastalığıdır. Bowen hastalığı (in situ skuamöz hücreli karsinom), atipik keratinositlerin epidermisle sınırlı olduğu cSCC öncülü bir hastalıktır. cSCC'ye dönüşme riski düşük olmakla birlikte tedavi edilmesi önemlidir (Neubert ve Lehmann, 2008). Aktinik keratoz, deride sert eritematöz plaklar ile karakterize, yoğun güneş ışığı maruziyetinde görülen yaygın bir lezyondur. Tedavi edilmemesi durumunda cSCC'ye dönüşme riski taşır (Vilcea, Stoica, Andreiana, Mirea, Tenea Cojan ve diğerleri, 2024).

2.2. Aktinik Keratoz

Aktinik keratoz, (solar keratoz veya senil keratoz), genellikle yoğun güneş ışığına maruz kalmış deride meydana gelen sert eritematöz plakların gözlendiği hastalık olarak tanımlanır. Farklılaşmış yapıya sahip epidermal keratinositlerin proliferasyonu ile karakterizedir (de Oliveira, da Motta, Pantoja, Ilha, Magalhaes ve diğerleri, 2019; Ekiz, 2016). İlk olarak 1896 yılında Dubreuilh tarafından “senil keratoz” olarak tanımlanmış ve öncül bir kanser lezyonu olarak nitelendirilmiştir (Heaphy ve Ackerman, 2000). ABD’de yıllık ortalama olarak dermatolojik hastalıklara ayrılan 2,5 milyar dolarlık bütçenin %14,8’i aktinik keratoz tedavisi için harcanmaktadır. Dermatologlar tarafından en sık tanı konulan ikinci hastalıktır (Uhlenhake, 2013; Yeung, Baranowski, Swerlick, Chen, Hemingway ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.2. Aktinik keratozun gelişimi (Arcuri, Ramchatesingh, Lagace, Iannattone, Netchiporouk ve diğerleri, 2023)

Hastalığın profilasyonu epidermis ile sınırlıdır (Şekil 2.2). Hiperkeratinize pulsu yapıya sahip olan lezyonlar karakteristik olarak yüz, kafa derisi, ense ve ekstremitelerde görülür. (Dodds, Chia ve Shumack, 2014). Atipik keratinositlerin lokalizasyonu *stratum corneum*'dan başlayarak *stratum basale*'ye kadar olabilmektedir. Lokalizasyona bağlı olarak sınıflandırmalar ve farklı isimlendirmeler yapılmıştır (Röwert-Huber, Patel, Forschner, Ulrich, Eberle ve diğerleri, 2007).

Aktinik keratoz lezyonları, premalign epitel tümörler olarak kabul edilir ve skuamöz hücreli karsinoma dönüşme olasılığı taşır. Her iki hastalıkta görülen histolojik ve sitopatolojik bulgular benzerdir ve ayırt edilemez. Hücre polarite kaybı, düzensiz büyüme, nükleer pleomorfizm gibi bulgular her iki hastalıkta da gözlenebilir (Röwert-Huber, Patel, Forschner, Ulrich, Eberle ve diğerleri, 2007).

Aktinik keratoz vakalarının malign dönüşüme uğrama olasılığı %0,025–16 olarak bildirilmiştir (Martin, 2011). Yapılan histolojik ve klinik incelemelerden hareketle aktinik keratoz lezyonlarının invazif skuamöz hücreli karsinoma dönüşme riski tahmin edilemez. Bu nedenle aktinik keratoz lezyonlarının tamamının, hastalığın derecesinden bağımsız olarak tedavi edilmesi önerilmektedir (Fernandez Figueras, 2017)

2.2.1. Aktinik keratozun tedavi yaklaşımları

Aktinik keratozun günümüzdeki tedavi yaklaşımları doğrudan lezyona yönelik tedaviler ve dermal tedaviler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Lezyona yönelik tedaviler fokal ablatif işlemleri içerirken, dermal tedaviler genellikle topikal ilaç tedavilerinden ve kimyasal peeling yöntemlerinden meydana gelmektedir. Lezyona yönelik tedavilere kriyoterapi (sıvı nitorojen), lazer tedavisi (CO₂ lazer, erbiyum itriyum alüminyum garnet lazer, erbiyum cam lazer), cerrahi işlemler ve küretaj (elektrodesikasyon) örnek olarak verilebilir (Dianzani, Conforti, Giuffrida, Corneli, di Meo ve diğerleri, 2020). Dermal tedaviler kapsamındaki ilaç tedavileri (5-Florourasil, retinoidler, imikimot, aminolevulinik asit/metil aminolevulinat, ingenol mebutat, diklofenak sodyum) ve kimyasal peeling yöntemlerinin ayrıntıları aşağıda açıklanmıştır.

Kimyasal peeling

Aktinik keratoz tedavisinde kimyasal peeling işlemi, trikloroasetik asit, alfa hidroksi asit veya fenolik asit gibi keratolitik ajanlar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu ajanlar epidermisi eksfoliye ederek, aktinik keratoz lezyonlarının giderilmesini sağlar (Steeb, Koch, Wessely, Wiest, Schmitz ve diğerleri, 2021). Lezyonların yer aldığı katmanların kontrollü bir şekilde uzaklaştırılmasının ardından dermal dokuların yenilenmesi sağlanır. Aktinik keratoz tedavisinde kimyasal peeling'in başarı oranının %75 civarlarında olduğu bildirilmiştir (Dianzani ve diğerleri, 2020). Yan etkiler arasında eritem, soyulma ve pigmentasyon değişiklikleri yer alır.

İlaç tedavileri

5-Florourasil

Pirimidin analogu olan 5-Florourasil, timidilat sentaz enzimini inhibe ederek DNA ve RNA sentezini bozan bir antineoplastik ajandır. Aktinik keratozda görülen displastik keratinositler gibi hızlı bölünen hücrelerde yüksek seviyede RNA ve DNA sentezi gerçekleşir. 5-Florourasil, bu hücrelerin genetik materyal sentezini bozarak hücrelerin ölümüne neden olur. Topikal olarak uygulama sırasında, normal deri hücrelerinin üreme hızı, displastik keratinositlere göre yavaş olduğundan sağlıklı doku ölümü çok daha yavaştır. %5'lik, %2'lik

ve 0,5'lik ticari krem ve çözelti preparatları piyasada mevcuttur (Dianzani ve diğerleri, 2020). Lezyon tedavisinde %75'e yakın etkinlik sağlandığı bildirilmiştir (Jansen, Kessels, Nelemans, Kouloubis, Arits ve diğerleri, 2019). Ağrı, kaşıntı, yanma, inflamasyon ve kuruluk gibi yan etkiler sıklıkla görülür. Bu durum hasta uyuncunu azaltmaktadır (Maarouf, Kromenacker, Brucks, Hendricks ve Shi, 2020).

Retinoidler

Tretinoin ve adapalen gibi topikal retinoidler, hücrel farklılaşmayı ve çoğalmayı düzenleyen sentetik A vitamini türevleridir. Bu ajanlar keratinositlerin hücrel farklılaşması ve oksidatif stres yolları üzerinde etki gösterir. Retinoidlerin, tedavi etkinliği yüksek değildir. Piyasada bulunan %0,1 ve 0,3'lük adapalen jel formülasyonlarının aktinik keratoz üzerinde etkili olduğu gösterilmekle beraber, tedavi başarısının %20-30 arasında olduğu bildirilmiştir (Dianzani ve diğerleri, 2020; Ianhez, Fleury, Miot ve Bagatin, 2013).

İmikimot

İmikimot, immunoregülatör olarak sınıflandırılan bir toll-benzeri reseptör-7 (TLR-7) agonistidir. Aktinik keratoz tedavisinde, interferon- α (IFN- α) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinlerin üretimini uyararak, farklılaşan keratinositlerin immün sistem tarafından hedeflenmesini sağlayarak etki gösterir (Dianzani ve diğerleri, 2020). %75'e yakın bir tedavi etkinliği elde edildiği bildirilmiştir (Serra-Guillen, Nagore, Llombart, Sanmartin, Requena ve diğerleri, 2018). İmikimot tedavisi sırasında baş ağrısı, miyalji ve influenza-benzeri semptomlar görülebilmektedir (Hadley, Derry ve Moore, 2006).

Aminolevulinik asit ve metil aminolevulinat

Aminolevulinik asit (ALA) ve metil aminolevulinat (MAL), fotodinamik terapi (PDT) için topikal uygulanan ön ilaçlardır. Topikal uygulamanın ardından 635 veya 400 nm ışık ile aktif formları olan protoporfirin IX'a dönüşerek, displastik keratinositlerde hücre ölümünü tetiklerler (Kaliszewski, Kwasny, Juzeniene, Juzenas, Graczyk ve diğerleri, 2007; Masuda, Kimura, Nishioka, Kato ve Morita, 2019). Çeşitli konsantrasyonlarda krem ve solüsyonları bulunan ALA ve MAL'ın, lezyon kalınlığına bağlı olarak %70 ila %90 arasında etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Dianzani ve diğerleri, 2020).

İngenol mebutat

Euphorbia peplus bitkisinden elde edilen ingenol mebutat, hücre ölümünü ve bağışıklık aktivasyonunu indükleyerek etki gösterir. Aktinik keratoz tedavisinde, hem displastik keratinositlerde hızlı hücre nekrozunu hem de immün cevabı tetikler (Dianzani ve diğerleri, 2020; Lebwohl, Swanson, Anderson, Melgaard, Xu ve Berman, 2012). %47-53 oranında etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Pellacani, Peris, Guillen, Clonier, Larsson ve diğerleri, 2015).

Diklofenak sodyum

Tez çalışması kapsamında aktinik keratoz tedavisi için diklofenak sodyum içeren formülasyonlar geliştirilmesi nedeniyle, etkin maddeye ait farmakodinamik, farmakokinetik ve fizikokimyasal özellikler Bölüm 2.3'te ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2.2.2. Aktinik keratoza yönelik formülasyon geliştirme çalışmaları

Literatürde doğrudan aktinik keratoza yönelik formülasyon geliştirme çalışma sayısı oldukça azdır. Bunun nedeni, aktinik keratozun, Bölüm 2.1.2'de aktarıldığı şekilde cSCC öncülü olmasıdır. Aktinik keratoz da dahil olmak üzere, NMSC'ye yönelik formülasyon geliştirme çalışmalarının büyük bir kısmında tedavi hedefi “deri kanseri” olarak genelleştirilmiştir. Aktinik keratoz tedavisine endike olduğu bilinen etkin maddeler kullanılarak yapılmış çalışmalardan bazıları Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Deri kanseri tedavisine yönelik formülasyon geliştirme çalışmaları

Hastalık	Etkin madde	Formülasyon	Sonuç	Kaynak
BCC/Aktinik keratoz	İmikimot	Nanoemülsiyon jel (%2,5 a/a)	Dimetil benzatrasen/Kroton yağı ile oluşturulmuş deri kanseri modelinde ticari ürüne göre daha etkili olduğu bulunmuştur.	(Jadhav, Salunkhe, Bhinge, Honmane ve Jadhav, 2024)
BCC	İmikimot	Çözünebilir mikroiğne	Ex vivo çalışmalarda ticari ürüne göre 6 kat daha az imikimot içeren mikroiğne formülasyonunun, ticari jele benzer seviyede deride birikim sağladığı belirlenmiştir.	(Sabri, Cater, Gurnani, Ogilvie, Segal ve diğerleri, 2020)
Genel deri kanseri ve aktinik keratoz	5-Florourasil	Katı lipid nanopartikül ve nano yapıli lipid taşıyıcı	Katı lipid nanopartiküller, serbest 5-Florourasil'e kıyasla epidermoid karsinom hücreleri üzerinde daha yüksek antikanser etki ve insan keratinosit hücrelerinde daha az sitotoksikite göstermiştir.	(Amasya, Aksu, Badilli, Onay-Besikci ve Tarimci, 2019)
NMSC	5-Florourasil	Lipozom nanokompleks	Hücre kültürü çalışmalarında, 5-Florourasilin sitotoksik etkisi lipozomal nanokompleks ile artırılmıştır. JAK1 siRNA konjugasyonu ile pERK protein ekspresyonu azaltılmıştır.	(Aslan, Ozturk, Shahbazi, Bozdemir, Zeybek ve diğerleri, 2024)
Genel deri kanseri	5-Florourasil	Metoksi-PEG/polikaprolakton yüklü çözünebilir mikroiğne	Mikroiğneler, tümör modeli geliştirilmiş farelere uygulandıktan sonra, nanopartiküller yakın IR ışın ile aktive edilmiş ve fototermal terapi ile kemoterapinin sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir.	(Hao, Chen, He, Yang, Han ve diğerleri, 2020)
Genel deri kanseri	5-Florourasil	Katı lipid nanopartikül jel	Karsinom hücresi inoküle edilmiş farelerde, serbest 5-Florourasil'e göre daha etkili bulunmuştur.	(Khallaf, Salem ve Abdelbary, 2016)
Deri tümörleri/ Aktinik keratoz	5-aminolevulinik asit	Kaplanmış mikroiğne	İn vivo çalışmalarda konvansiyonel jel formülasyonuna göre 3,2 kat daha yüksek protoporfirin düzeyi elde edilmiştir.	(Jain, Lee ve Gill, 2016)
Aktinik keratoz	Diklofenak sodyum ve Diklofenak-glisin	Nanofiber	Diklofenak sodyum yüklü nanofiberlerin, diklofenak-glisin içeren nanofiberlere göre insan dermal fibroblast hücrelerinde daha yüksek sitotoksikiteye neden olduğu belirlenmiştir.	(Piccirillo, Bochicchio, Pepe, Schenke-Layland ve Hinderer, 2017)
Aktinik keratoz	Diklofenak sodyum	Emülsiyon, emüljel, jel ve merhem	İnsan derisinde yapılan çalışmalarda emüljel formülasyonu, deride birikimi en yüksek seviyede sağlamıştır.	(Manian, Jain, Vora ve Banga, 2022)
Melanom	Retinoik asit	D- α -tokoferil-polietilen-glikol-süksinat miseli içeren jel	Misel formülasyonu, saf etkin maddeye göre melanom hücrelerinde daha yüksek antiproliferatif etki göstermiştir.	(Zuccari, Baldassari, Alfei, Marengo, Valenti ve diğerleri, 2021)

2.2.3. Aktinik keratozun in vivo modellenmesi

Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı üzere, aktinik keratoz hastalığı uzun süreli UV ışın maruziyeti sonucunda meydana gelmektedir. Literatürde, aktinik keratoz ile ilgili in vivo çalışmaların yapılabilmesi için uzun süreli UV ışın uygulanması sonucunda model oluşturulması önerilmiş ve bu amaçla tüysüz transgenik SKH-1 fareleri kullanılmıştır. 6-8 haftalık fareler, 14-15 hafta boyunca her gün 10-12 dakikalık, 280-320 nm’lik UV ışığa maruz bırakılmıştır (Pillon, Gomes, Vandenberghe, Cartron, Cebe ve diğerleri, 2017). Transgenik hayvanlar, özel kafes sistemleri ve deney süresi düşünüldüğünde, UV ışık maruziyeti ile model oluşumunun zor ve yüksek maliyetli olduğu görülmektedir.

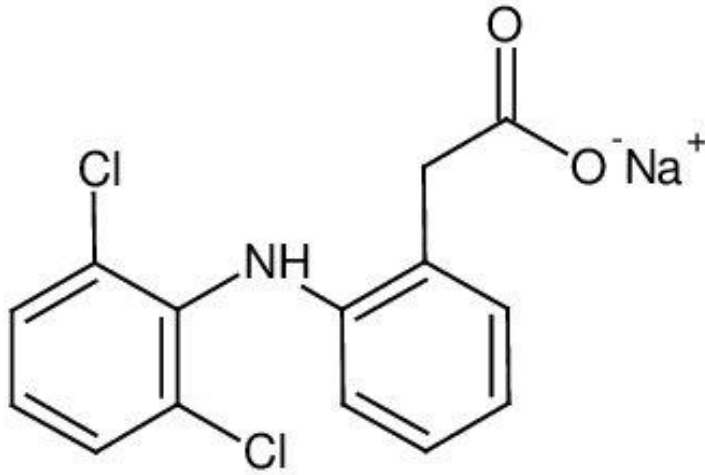
Aktinik keratoza özel olarak başka bir model bulunmamakla birlikte, aktinik keratozun öncülü olduğu cSCC için önerilmiş metotlar mevcuttur. Aktinik keratoz modeli oluşturmak için kullanılan UV ışın uygulanmasının devamında cSCC gelişimi söz konusu olabilir. Bir başka yöntemde, hayvanlara deri hücrelerinin mutasyonunu tetikleyecek karsinojenik maddeleri uygulanır. Ardından mutajenize olmuş hücrelerde benign tümörlerin provakasyonu için promotör ajanları uygulanır. Bu benign tümörler papilloma olarak adlandırılır ve bazıları zamanla malign cSCC’ye dönüşür (Gaviria Agudelo ve Restrepo, 2022). UV ışın maruziyeti ve karsinojenik kimyasalların uygulanması dışında, tümör hücrelerinin aktarılması, in vivo model oluşumu için bir diğer yaklaşımdır. İnsan cSCC hücrelerinin, farklı tür hayvanlara aktarılması (ksenograf) veya modelin oluşturulduğu bir hayvandan aynı türde başka bir hayvana hücre aktarımının yapılması (singeneik) ile bu yöntem gerçekleştirilebilir (Chaves, Garrido, Oliver, Perez-Ruiz, Barragan ve Rueda-Dominguez, 2023).

Bu tez çalışması kapsamında, in vivo aktinik keratoz modelinin oluşturulması için gerekli maliyetin karşılanamaması, gerekli alt yapının üniversite bünyesinde kurulamaması ve model oluşumu/deney süresinin çok uzun olması göz önünde bulundurularak alternatif modeller araştırılmıştır. Diklofenak sodyumun aktinik keratoz tedavisindeki temel etki yolağı olduğu düşünülen siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin inhibisyonunun değerlendirilebileceği, ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modelinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu model, kemirgen kulaklarına ksilen uygulanması sonrası gelişen akut ödem üzerinde, geliştirilen formülasyon veya etkin maddelerin antiinflamatuvar etkinliğinin

(COX-2/PGE2 inhibisyonu) değerlendirilmesinde kullanılır (Soliman, Teaima, Rashwan, Ali, Jasti ve diğerleri, 2023; Stanley, Steiner, Havens ve Tramposch, 1991).

2.3. Diklofenak Sodyum

Diklofenak sodyum, propiyonik asit yapısındaki non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler) sınıfında yer alır (Şekil 2.3). Diklofenak sodyumun temel etki mekanizması, non-spesifik olarak COX-2 enzimlerinin inhibisyonunu sağlamasıdır. Aktinik keratoz tedavisi için, %3 diklofenak sodyum ve %2,5 hyaluronik asit içeren ticari jel formülasyonu kullanılır (Solaraze® Gel, Aklofen® Jel). Yan etki profilinin diğer tedavilere kıyasla daha hafif olduğu bildirilmiştir (Chetty, Choi ve Mitchell, 2015; Dianzani ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.3. Diklofenak sodyumun kimyasal yapısı

2.3.1. Diklofenak sodyumun farmakodinamik özellikleri

Diklofenak sodyum, diğer NSAİİ'ler gibi COX enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak terapötik etkinliğini gösterir. Oral, intramüsküler, rektal ve topikal kullanılan birçok müstahzarı bulunmaktadır (Todd ve Sorkin, 1988).

Diklofenak sodyumun, COX-2 inhibisyon etkisi COX-1 inhibisyonuna göre 4 kat fazladır. COX-2 yolağı ile sentezlenen ve birçok inflamatuvar yanıtta sorumlu olan PGE2 inhibisyonu üzerinde, diğer NSAİİ'lere göre daha fazla etkisi olduğu bildirilmiştir. Diklofenak sodyum ve diğer NSAİİ'lerin PGE2 inhibisyonuna bağlı hücre proliferasyonu

ve anjiyogenezi azaltarak antikanser etki gösterdiği bilinmektedir. Bir diğer antikanser etki hedefi olan peroksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ) aktivasyonu üzerinde, diklofenak sodyumun diğer NSAİİ'lere göre 50 kata kadar daha etkili olduğu bildirilmiştir (Gan, 2010).

Diklofenak sodyumun, aktinik keratoz tedavisindeki etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte; UV ışık maruziyetinde, aktinik keratozda ve cSSC'de COX-2 aktivitesi artmaktadır. Buna bağlı olarak etki mekanizmasının öncelikli olarak COX-2 inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aktinik keratozda sentezi artan PGE2, keratinosit hücre yüzeyinde bulunan EP1-EP4 reseptörlerine (G-protein bağımlı reseptörler) bağlanarak neoplastik dönüşümü artırır. COX-2 inhibisyonuna bağlı PGE2 düzeyindeki azalmanın bu dönüşümü yavaşlatabileceği öne sürülmüştür. Neoplastik dönüşümün engellenmesinde PGE2'ye bağlı olarak, hem hücre çoğalma hızını artıran hem de apoptozu engelleyen yolların inhibisyonunun etkili olduğu bildirilmiştir (Elmets, Ledet ve Athar, 2014). Bunun yanı sıra, diklofenak sodyumun metalloproteinaz aktivitesini artırarak kolajen degradasyonu ve keratolizise neden olduğu öne sürülmüştür (Dianzani ve diğerleri, 2020). Aynı zamanda, diklofenak sodyumun displastik keratinositlerdeki PGE2 kaynaklı VEGF ekspresyonunu azaltarak anjiyogenik faktörleri baskılaması, bir diğer mekanizma olarak önerilmiştir (Fecker, Stockfleth, Nindl, Ulrich, Forschner ve Eberle, 2007). Aktinik keratoz tedavisi için önerilen bir başka etki mekanizması, diklofenak sodyumun kaspaz-8'i aktive etmesine bağlı olarak displastik keratinositlerde ligand bağımlı apoptozu tetiklenmesi ve doğrudan hücre ölümüne neden olmasıdır (Fecker, Stockfleth, Braun, Rodust, Schwarz ve diğerleri, 2010). Bunların dışında, diklofenak sodyumun aktinik keratoz üzerindeki antikanser etkinliğinin nükleer faktör kappa B (NF-kB), aktivatör protein 1 (AP-1), mitojenle aktive edilen kinaz, hücre döngüsü düzenleyici yollar ve PPAR γ yolları üzerinden olabileceği de tahmin edilmektedir (Gan, 2010).

Aktinik keratoz için endikasyona sahip %3 diklofenak sodyum ve %2,5 hyaluronik asit içeren ticari jel preparatının, günde iki kez 60-90 gün boyunca topikal olarak uygulanması önerilmiştir. Ticari jel preparatının %46 oranında etkinliğe sahip olduğu (aktinik keratoz lezyonlarının %100'ünün temizlenmesi durumu) bildirilmiştir (Nelson, 2011).

2.3.2. Diklofenak sodyumun farmakokinetik özellikleri

Diklofenak sodyum, oral kullanımda emilim problemi olmayan BCS Sınıf II bir etkin maddedir. Tez çalışmasında dermal uygulama amaçlandığından, oral kullanıma ait farmakokinetik parametrelerle ilgili bilgi verilmemiştir.

Aktinik keratoz hastalığı için dermal diklofenak sodyum tedavisi uygulanmaktadır. Bunun nedeni, hedef dokunun, doğrudan doğruya aktinik keratoz hastalığının meydana geldiği deri dokusu olmasıdır. Bu kapsamda, deride biriken etkin madde miktarı sistemik biyoyararlanımından daha önemlidir. Diklofenak sodyum içeren dermal preparatlar, çoğunlukla lokal analjezi ve antienflamatuvar etkinlik için kullanılmaları nedeniyle, deriden emilimi ile ilgili çeşitli bilgiler literatür ve müstahzar kısa ürün bilgilerinde (KÜB) mevcuttur. Solaraze® Gel (%3 diklofenak sodyum) ve Voltaren® Gel (%1 diklofenak sodyum) KÜB'üne göre, dermal uygulanan dozun %1-12'si sistemik dolaşıma geçmektedir.

Bir klinik çalışmada, %4 diklofenak sodyum içeren sprey jel preparatı (MIKA® diklofenak sprey jel) ile 48 mg dozda günde 3 kez 3 gün boyunca dermal uygulama gerçekleştirilmiş ve 50 mg'lık oral diklofenak sodyum tableti ile bağlı biyoyararlanımı kıyaslanmıştır. Dermal uygulamanın sistemik bağlı biyoyararlanımı %2,23 olarak bulunmuştur. Subkutan doku ve uygulanan bölgenin iskelet kasındaki etkin madde miktarı ise, oral uygulamaya göre sırasıyla %324 ve %209 bulunmuştur (Brunner, Dehghanyar, Seigfried, Martin, Menke ve Muller, 2005). Bir başka klinik çalışmada diklofenak sodyumun %2'lik çözeltisi (Pennsaid® solution), %1'lik jeli (Voltaren® Gel) ve %3'lük jelinin (Solaraze® Gel) önerilen tedavi dozunda uygulanması sonrası deride birikimi kıyaslanmıştır. Tüm preparatlar için, *stratum corneum*'da biriken madde miktarının %1'den az olduğu ve jel müstahzarların çözeltiye göre daha az birikim sağladığı bildirilmiştir (Cordery, Pensado, Chiu, Shehab, Bunge ve diğerleri, 2017).

2.3.3. Diklofenak sodyumun fizikokimyasal özellikleri

Diklofenak sodyum, kimyasal olarak sodyum 2-[(2,6-diklorofenil)amino]benzenasetat olarak isimlendirilir. Diklofenak asit molekülünün molekül ağırlığı 282,68 g/mol iken, sodyum tuzunun molekül ağırlığı 318,13 g/mol'dür. Oda sıcaklığında, beyaz-sarımsı

higroskopik kristal toz formunda bulunan diklofenak sodyumun erime noktası 283-285°C'dir (Avrupa Farmakopesi 8.0.).

Diklofenak sodyum suda “az çözünür” (10-33,33 mg/mL) olarak tanımlanır. Asetonda çok az çözünür (1-10 mg/mL), etanolde “çözünür” (33,33 - 100 mg/mL) ve metanolde “serbestçe çözünür” (100-1000 mg/mL) olduğu belirlenmiştir (Avrupa Farmakopesi 8.0.). pH değeri 7 olan sulu sistemlerdeki çözünürlüğünün 9,19 mg/mL olduğu bildirilmiştir. Asidik yapısı nedeni ile yüksek pH değerlerinde çözünürlüğü artarken, düşük pH'larda düşmektedir (Pobudkowska ve Domańska, 2014). pKa değeri 4,2'dir. İntrinsik çözünürlüğü yaklaşık olarak 1 µg/mL'dir. Partisyon katsayısının (Log(P)) değerinin 1,27 olduğu bildirilmiştir (Maurya ve Murthy, 2014).

Diklofenak sodyumun katı halde 25°C'de 3 yıldan daha uzun süre stabil olduğu bildirilmiştir (Nouh, Abd El-Gawad ve Guda, 2010). Bunun yanında, sulu süspansiyonlarının oda sıcaklığında en az 3 ay boyunca stabilitelerini koruyabildikleri bilinmektedir (Donnelly, Pascuet, Ma ve Vaillancourt, 2010). Hızlandırılmış stabilite koşullarında da yağlı ve sulu çözeltilerinin 6 ay boyunca raf ömürlerini koruyabildikleri belirlenmiştir (Ahuja, Dhake, Sharma ve Majumdar, 2009). Ayrıca, diklofenak sodyumun yüksek sıcaklıklarda da dayanıklı olduğu bilinmektedir. Sıfırıncı derece kinetik ile bozunan diklofenak sodyumun, katı halde 80°C'de 1 hafta, 60°C'de 2 hafta boyunca dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Cwiernia, Hladon ve Stobiecki, 1999). Ancak diklofenak sodyum, fotostabilitesi düşük bir etkin maddedir. Çözelti formundaki diklofenak sodyumun, 3 saat boyunca 366 nm UV ışık altında bekletilmesi sonucunda, etkin madde miktarının %63'e düştüğü bildirilmiştir (Korodi, Bukowski ve Lachmann, 2012).

2.4. Dermal İlaç Uygulanması

Dermal ilaç uygulanması, antik çağlardan beri bilinen bir yöntemdir. Antik çağlarda sadece deriye özgü hastalıkların tedavisi için topikal olarak basit formülasyonlar kullanılmıştır. Günümüzde ise hem topikal hem de sistemik hastalıklar için “dermal” veya “transdermal” olarak deriye ilaç uygulanması gerçekleştirilebilmektedir.

Topikal uygulama ile hem hastalığın meydana geldiği bölgeye doğrudan ilaç uygulaması yapılarak sistemik yan etkiler azaltılabilmekte hem de sistemik uygulamaya göre bu bölgede

biriken ilaç miktarının daha yüksek düzeyde olması sayesinde tedavi edici etkinlik artırılabilir. Transdermal uygulama ise oral ve parenteral yola alternatif bir uygulama şeklidir. Oral yolda görülen mide bulantısı, ilk geçiş etkisi, etkin maddenin parçalanması gibi problemlerin önüne geçilebilmektedir. Parenteral yolda görülen komplikasyon riski ve acı hissi engellenebilmektedir. Transdermal yol ile etkin maddenin deri altına geçiş hızı kontrol edilerek, sabit kan konsantrasyonu elde edilebilmektedir. Tüm bu avantajların yanında deriye doğrudan uygulanabilen etkin madde sayısı oldukça azdır (Benson ve diğerleri, 2019).

Stratum corneum lipofilik yapıda olup, deriden etkin madde geçişini sınırlayan en önemli fizyolojik bariyerdir (Prausnitz ve Langer, 2008). Etkin maddelerin bu katmandan difüze olup alt dokulara geçerek etki gösterebilmesi için belirli özelliklere sahip olması gereklidir. Öncelikle etkin maddenin belirli oranlarda yağda çözünürlüğe sahip olması gerekir. Etkin maddenin Log(P) değeri bir diğer önemli faktördür. Sudaki çözünürlüğünün lipidteki çözünürlüğünden fazla olması, deri lipidlerine geçişini engelleyerek deriden emilimi olumsuz etkiler. Log(P) değerinin büyük olması durumunda ise *stratum corneum*'daki lipidlerde birikerek daha alt dokulara ulaşım engellenebilir. Bu durum hedef bölgenin deri dokusu olması durumunda avantaj sağlarken, sistemik etki için dezavantaj oluşturur. Bir diğer önemli faktör molekül ağırlığıdır. Molekül ağırlığı küçüldükçe deriden emilim hızı ve oranı artmaktadır. Genellikle 500 Da üzerinde molekül ağırlığına sahip etkin maddelerin deriden emilmediği kabul edilir.

Etkin maddenin iyonizasyon durumu emilimi etkileyen bir başka faktördür. Transselüler yol ile emilim iyonize formda olan etkin madde molekülleri için mümkün olmasına karşın, emilimin ana yolağı olan interselüler yol için etkin maddenin non-iyonize formda olması gerekir. Bu nedenle *stratum corneum* (pH değeri 4,2-5,6) ve epidermisin (pH değeri 7,3-7,4) pH değerlerinde non-iyonize formda olan etkin maddelerin emilimi daha fazladır. Ayrıca etkin maddenin deri dokusu ile yaptığı hidrojen bağ sayısı da emilimi etkileyen bir diğer faktördür. Hidrojen bağ kapasitesi arttıkça deri dokusundaki birikim artarken, sistemik dolaşıma geçen madde miktarı azalır (N'Da, 2014).

Oral ve parenteral yollara kıyasla dermal olarak uygulanabilecek ilaç miktarı formülasyon teknolojisi açısından da kısıtlıdır. Bu durum, aynı zamanda etkin maddenin potent olmasını da gerektirmektedir. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda dermal olarak

uygulanıp, tedavi edici doza ulaşabilecek etkin madde sayısı çok kısıtlıdır (Prausnitz ve Langer, 2008). Bu özelliklere sahip olmayan etkin maddelerin dermal uygulanabilmesi ve lokal veya sistemik etki elde edilebilmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir.

2.4.1. Deriden geçişi artırma yöntemleri

Kimyasal yöntemler

Kimyasal penetrasyon artırıcılar, *stratum corneum*'u oluşturan bileşenler ile etkileşime girerek, geçici ve geri dönüşümlü bir şekilde deri geçirgenliğini artıran maddeler olarak tanımlanır. Kimyasal penetrasyon artırıcılar genellikle doğrudan formülasyonun içerisinde yer alır. Bu durum diğer penetrasyon artırma stratejilerine göre formülasyon üretimini/tasarım esnekliğini, penetrasyon artırıcının miktarının ayarlanmasını, hasta tarafından uygulanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu avantajlarına karşın kimyasal penetrasyon artırıcılar deride iritan özellik gösterebilir. Ayrıca diğer stratejilere göre etkinlikleri daha azdır ve makromoleküllerin geçişini sağlayamazlar. Sinerjistik etki göstermeleri nedeni ile genellikle birden fazla kimyasal penetrasyon artırıcı bir arada kullanılır (Dragicevic, Atkinson ve Maibach, 2015).

Çok farklı kimyasal yapıda penetrasyon artırıcı mevcuttur. Dimetil sülfoksit (DMSO) ve türevleri, hidrojen bağı kapasitesi sayesinde hem etkin maddeyi çözerek hem de deri lipidlerinde çözünerek madde geçişini artırır. Azon, yüksek Log(P) değeri ile *stratum corneum*'a penetre olup lipid yapısını bozarak etki gösterir. Pirolidonlar, azona benzer mekanizma ile penetrasyon artırmalarının yanı sıra, deri membranlarının arasına yerleşerek etkin maddeler için rezervuar görevi de görürler. *Stratum corneum*'daki lipidlerle etkileşen bir diğer penetrasyon artırıcı oleik asittir. Oleik asit, etkin maddenin özelliğine göre deride birikimi artırabilir. Etanol gibi alkoller ve glikoller, etkin maddeyi çözerek, deri lipidleriyle etkileşerek ya da hızla buharlaşıp termodinamik aktiviteyi artırarak penetrasyon artırıcı etki gösterebilirler. Bu kimyasal penetrasyon artırıcıların yanında sürfaktanlar, fosfolipidler ve organik solvanlar da deri lipidleriyle etkileşimleri sayesinde penetrasyon artışı sağlayabilirler. Üre gibi bazı kimyasallar ise derinin hidrasyon seviyesini değiştirerek etki gösterirler (Williams ve Barry, 2012).

Fiziksel yöntemler

Fiziksel penetrasyon artırma yöntemleri, dışarıdan bir kuvvet uygulanarak etkin maddeyi deri veya alt dokulara ulaştırmayı hedefleyen aktif yöntemlerdir. Fiziksel yöntemlerin kimyasal yöntemlere göre en önemli avantajı yüksek molekül ağırlıklı etkin maddelerin bu yöntemlerle topikal/transdermal olarak uygulanabilmesidir. Fiziksel penetrasyon artırma yöntemlerinin geliştirilmesinin nedeni, gelişen biyoteknoloji ile yüksek molekül ağırlıklı etkin madde sayısındaki artış ve bu maddelerin oral uygulama ile sistemik dolaşıma ulaşamamasıdır. Penetrasyon artışı için kullanılan fiziksel etkenler elektriksel, mekanik, sonoforetik, radyasyonel, manyetik veya termal olabilmektedir (Brown, Martin, Jones ve Akomeah, 2006).

Elektriksel yöntemler iyontoforez ve elektroporasyondur. İyontoforez yönteminde düşük elektrik akımı formülasyona ve doğrudan deriye uygulanır. Etkin maddenin yüklü olması durumunda elektriksel itme gücü ile yüklü olmaması durumunda ise elektroosmoz ile penetrasyon artışı sağlanır (Gaikwad, Zanje ve Somwanshi, 2024).

Elektroporasyonda ise yüksek gerilim uygulaması gerçekleştirilir. Yüksek gerilim deri üzerinde pertübasyona yol açarak geçici porların oluşumunu tetikler. Bu durum etkin maddenin deri altına penetre olmasını sağlar (Weaver, Vaughan ve Chizmadzhev, 1999).

Mekanik yöntemler derinin fiziksel abrasyonu (aşındırılması), vakum ile ablasyon, iğne ile enjeksiyon, derinin perforasyonu, mikro iğne-temelli cihazlar ve basınç uygulaması olarak sayılabilir. Derinin fiziksel abrasyonu, doğrudan derinin üst katmanlarının soyulması prensibine dayanır. *Stratum corneum*'un uzaklaştırılması ile derinin bariyer fonksiyonları azaltılarak makromoleküllerin penetrasyonu sağlanabilir (Lee, Shen, Kuo-Hsien, Hu ve Fang, 2003). Vakum ablasyonu yöntemi, deriye vakum veya negatif basınç uygulanması ile epidermisin uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlemin ardından ilgili ilaç formülasyonu uygulanarak sistemik dolaşıma geçmesi sağlanır (Svedman, Lundin, Hoglund, Hammarlund, Malmros ve Pantzar, 1996). Deri içerisine iğne ile enjeksiyon yöntemi bir diğer fiziksel penetrasyon artırma yöntemi olup, hipodermik iğneler her türlü etkin maddenin topikal/sistemik uygulanmasını sağlayabilir. Deri perforasyonu ve mikro iğne-temelli cihazlar benzer prensibe sahiptir. Temel olarak her iki yöntemde de özel cihazlar ile deri üzerinde mikroporlar oluşturularak penetrasyon artırılması amaçlanır (Ciernik, Krayenbuhl

ve Carbone, 1996). Basınç yöntemi ise, formülasyon üzerine basınç uygulanarak etkin maddelerin transselüler yolla geçişini artırma prensibine dayanır (Treffel, Panisset, Humbert, Remoussenard, Bechtel ve Agache, 1993).

Sonoforez yönteminde belirli frekansa sahip ultrason ses dalgalarının, formülasyon üzerine ya da formülasyon tatbiki öncesinde deri üzerine uygulanması ile penetrasyon artışı sağlanır (Mitragotri ve Kost, 2004). Radyasyon yönteminde, lazer ışını kullanılarak *stratum corneum*'un ablasyonu veya lazer ışınının fotomekanik dalgalar oluşturması ile penetrasyon artırılabilir (S. Lee, McAuliffe, Kollias, Flotte ve Doukas, 2001; W. R. Lee, Shen, Lai, Hu ve Fang, 2001). Radyofrekans yönteminde de radyasyon yöntemi ile benzer bir prensip söz konusudur (Sintov, Krymberk, Daniel, Hannan, Sohn ve Levin, 2003). Manyetik yöntemde, diyamanyetik etkin madde çözeltilerinin manyetik alana maruz bırakılarak deriden geçişi artırılabilir. Ayrıca derinin manyetik alana maruz kalması sonucunda bariyer özelliklerinin değişimi de mümkündür (Murthy, 1999). Termal yöntemde ise derinin sıcaklığının artırılması ile deri lipidlerindeki akışkanlığın ve kanlanmanın artması sayesinde penetrasyon artışı meydana gelebilir (Akomeah, Nazir, Martin ve Brown, 2004). Tez çalışması kapsamında geliştirilen ve fiziksel penetrasyon artırma stratejilerinden biri olan mikroığnelerle ilgili ayrıntılı bilgiler Bölüm 2.5.'te sunulmuştur.

Taşıyıcı sistemler

Taşıyıcı sistemler polimerik, inorganik veya lipidik komponentlerden meydana gelen dağılım sistemlerdir. Oral ve parenteral uygulamada çözünürlük, emilim, biyoyararlanım, stabilite artırmak, aktif veya pasif hedeflendirme sağlamak gibi amaçlarla kullanımı olan bu sistemlerin geliştirilmesi uzun yıllardır devam etmektedir (Karewicz, 2014). Nano boyutlu taşıyıcı sistemler, modifikasyona açık yapıları sayesinde çeşitli biyolojik membranları aşabilme, hücresel düzeyde penetrasyon ve kalış süresini artırma, kontrollü ilaç salımı, ulaşması zor dokulara ulaşabilme gibi avantajlara sahiptir (Song, Zhang, Tang ve Du, 2024). Ancak bu sistemlerde, konvansiyonel dozaj formlarına kıyasla ölçek büyütme işlemi çok daha zor ve maliyetlidir. Ayrıca yüklenebilecek ilaç miktarının oldukça sınırlı olması ve detaylı toksikolojik değerlendirme gerektirmesi, bu sistemelerin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Çok çeşitli materyaller ve yöntemlerle elde edilen bu sistemlerin penetrasyon artırıcı olarak dermal ilaç taşınımında kullanımı son yıllarda oldukça popülerdir (Kahraman, Güngör ve Özsoy, 2017).

Lipid bazlı olarak üretilen taşıyıcı sistemlere örnek olarak lipozom, transferzom, etozom gibi veziküler sistem formülasyonları verilebilir. Nanoemülsiyonlar, mikroemülsiyonlar, çoklu emülsiyonlar, katı lipid nanopartiküller, nano lipid taşıyıcılar da lipid temelli taşıyıcı sistemler grubundadır. Polimerik yapıdaki taşıyıcı sistemlere ise polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, nanojeller, mikro ve nano süngerler, nanofiberler ve dendrimerler örnek olarak verilebilir (Khan, Ullah, Saeed, Saleh, Kassem ve diğerleri, 2024).

Çizelge 2.2’de lipid bazlı ve Çizelge 2.3’te polimer ve inorganik bazlı penetrasyon artırma amacıyla dermal kullanım için geliştirilmiş taşıyıcı sistemlerin sınıflandırmaları, yapıları ve potansiyel mekanizmaları özetlenmiştir (Yu, Meng, Zhang, Chen, Zhang ve Zhang, 2021). Tez çalışması kapsamında, penetrasyon ve deride tutulum artırma amacı ile geliştirilen esnek veziküler sistem formülasyonları ile ilgili ayrıntılı bilgi Bölüm 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2.2. Lipid yapılı taşıyıcı sistemler (Yu ve diğerleri)

Sınıflandırma		Tipik Bileşenler	Yapısı	Penetrasyon artırma mekanizması	Kaynak
Lipid bazlı nanoveziküller	Lipozom	Fosfolipid, kolesterol	Bir veya daha fazla lipid çift tabakası ve sulu iç çekirdek içeren küresel veziküller	Fosfolipidler, <i>stratum corneum</i> lipidleriyle etkileşime girer.	(Siler-Marinkovic, Dragicevic ve Maibach, 2016)
	Etozom	Fosfolipid, etanol (%20–50 a/a)		Fosfolipid çift tabakasının akışkanlığını artırır ve SC'nin bariyerini bozar.	(Touitou, Dayan, Bergelson, Godin ve Eliaz, 2000)
	Transferzom	Fosfolipid, kenar aktivatörleri		Kenar aktivatörleri porlardan geçmek için esnekliği artırır.	(Opatha, Titapiwatanakun ve Chutoprapat, 2020)
	Niozom	Noniyonik sürfaktanlar, kolesterol		Transferzoma benzer, noniyonik sürfaktanlar enkapsülasyonu artırır.	(Manca, Zaru, Manconi, Lai, Valenti ve diğerleri, 2013)
Lipid nanopartikülleri	Katı lipid nanopartiküller	Katı lipidler	Su içermeyen çekirdeğe sahip katı partiküller	Lipid nanopartiküller, keratinositler arası boşluğu genişletmek için tek katmanlı bir lipid filmi oluşturur.	(Zhou, Hao, Yuan, Pradhan, Shrestha ve diğerleri, 2018)
	Lipid yapılı nanotaşıyıcılar	Katı ve sıvı lipidler		Lipid bileşenleri ve eklenebilecek sürfaktanlar, cilt yapısını bozarak hücreler arası boşluğu artırabilir.	

Çizelge 2.3. Polimerik ve inorganik yapı taşıyıcı sistemler (Yu ve diğerleri)

Sınıflandırma	Tipik Bileşenler	Yapısı	Penetrasyon artırma mekanizması	Kaynak
İnorganik nanopartiküller	Altın nanopartiküller	Au	Bazı nanopartiküller, <i>stratum corneum</i> 'un lipid matrisinden ve saç foliküllerinden geçebilir.	(Sonavane, Tomoda, Sano, Ohshima, Terada ve Makino, 2008)
	Fe ₃ O ₄ nanopartiküller	Fe ₃ O ₄	Katı ve sert yapıya sahip partiküller	(Rao, Chen, Liang, Huang, Miao ve diğerleri, 2015)
	CuS nanopartikülleri	CuS	Yakın kızılötesi absorpsiyon ile <i>stratum corneum</i> 'un lokalize termal ablasyonunu indükler ve penetrasyonu kolaylaştırır.	(Ramadan, Guo, Li, Yan ve Lu, 2012)
Dendrimler	Poliamidoamin ve diğer polimerler	Yüksek seviyede dallanmış polimerik taşıyıcılar	Deri lipidleriyle etkileşime girerek penetrasyon sağlar.	(Venuganti ve Perumal, 2009)
Misel	Amfifilik polimerler, yüzey aktif maddeler	Küresel veya düzensiz tek katmanlı yapı	İlaçların suda ve lipidteki çözünürlüğünü artırır.	(Sinani, Durgun, Cevher ve Özsoy, 2023)
Nanoemülsiyonlar	Su, yağ, sürfaktanlar	Su/yağ dispersiyonları	Deri lipidleriyle etkileşim ve çözünürlük artışı sağlar.	(Zhou ve diğerleri, 2018)
Nanojeller	Polimerler	Çapraz bağlı polimerik ağ yapısı	Topikal kalış süresini uzatarak lokalize olan etkin madde miktarını artırır. Katyonik yapıda olanlar epidermisle etkileşir.	(Mangalathillam, Rejinold, Nair, Lakshmanan, Nair ve Jayakumar, 2012)

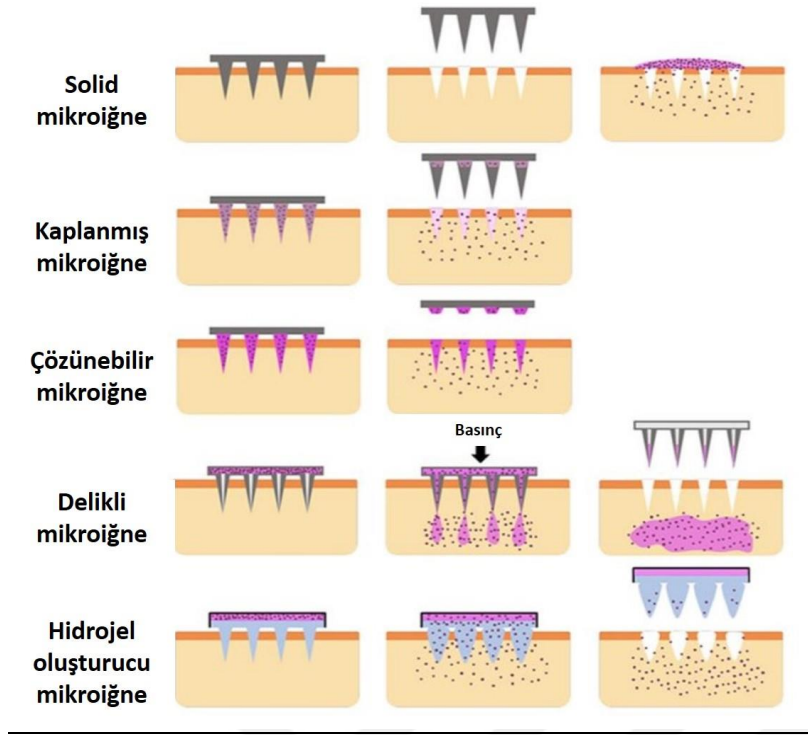
2.5. Mikroigneler

Mikroigneler 10-2000 µm uzunluğunda, deriye acısız şekilde uygulanabilen iğneler olarak tanımlanır. Mikroigneler, spesifik olarak deri veya mukozaya uygulanmak üzere geliştirilmiştir (Y. Hao, Li, Zhou, Yang ve Qian, 2017). Transdermal/transmukozal ilaç uygulamalarına ek olarak, mikroigneler ayrıca deri altındaki biyokimyasal belirteçlerin ekstraksiyonu veya elektrik sinyallerindeki değişikliklerden hareketle tanı amacıyla da kullanılır (Krieger, Bertollo, Dangol, Sheridan, Lowery ve O'Cearbhaill, 2019). Mikroigneler fiziksel penetrasyon artırma yöntemleri arasında, uygulanabilirliği ile ön plana çıkan bir metottur. Konsept olarak ilk defa 1970'li yıllarda önerilmesine karşın, üretim teknolojisinin gelişimi ile beraber deneysel olarak kullanımı 1990'lı yıllarda söz konusu olmuştur (Aldawood, Andar ve Desai, 2021). Ölçek büyötmeye yatkınlıkları, modifikasyona açık olmaları ve etkin maddenin özelliklerinden minimum düzeyde etkilenmeleri, üretim maliyetlerinin düşük olması gibi nedenlerle, uluslararası arenada hem araştırma grupları hem de endüstri için oldukça popülerdir (Ingrole, Azizoglu, Dul, Birchall, Gill ve Prausnitz, 2021). Günümüz itibari ile mikroigne formülasyonları ile hazırlanmış çeşitli aşılar piyasada bulunmaktadır (Fluzone®, Sanofi Pasteur, Fransa; Intanza® Sanofi Pasteur, Fransa) (K. J. Lee, Jeong, Roh, Kim, Choi ve Lee, 2020).

Mikroignelerin birçok türü bulunup, bu formülasyonlar veya cihazlar farklı üretim yöntemleri ile elde edilmektedir (Zhang, Wang, He, Yang, Chen ve Li, 2024). Mikroignelerin türleri, üretim yöntemleri ve karakterizasyon çalışmaları ile ilgili ayrıntılı bilgiler ilerleyen başlıklarda verilmiştir.

2.5.1. Mikroignelerin türleri

Değişik mikroigne yapıları mevcuttur. Sadece deri veya mukozada mikroporlar meydana getirmek amacıyla kullanılan ve tıbbi cihaz olarak sınıflandırılan türlerinin yanında, doğrudan etkin madde yüklenecek ilaç şekli olarak kullanılan türleri de mevcuttur. Biyoparçalanabilme özelliğine, çalışma prensibine ya da kullanılan materyale göre gruplandırılabilen mikroigneler, literatürde genellikle solid, delikli, kaplanmış, çözünebilir ve hidrojel oluşturunca olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.4) (Aldawood ve diğerleri, 2021; Nagarkar, Singh, Nguyen ve Jonnalagadda, 2020).



Şekil 2.4. Mikroigne türleri (Kulkarni, Gadade, Chapaitkar, Shelke, Pekamwar ve diğerleri, 2023)

Solid mikroigneler

Genellikle seramik, silikon, metal veya yüksek mekanik dayanıma ve biyoparçalanmayan polimer kullanılarak elde edilen mikroigneler solid mikroigne olarak isimlendirilir. Bu mikroigneler, genellikle uygulanma sonrası geri çekilerek deride mikroporların oluşturulması amacıyla kullanılır. Mikroigne uygulaması öncesinde veya sonrasında, sıvı veya yarı katı formdaki ilaç şekilleri uygulanarak etkin maddenin deri altına hızla iletilmesi sağlanır (Aldawood ve diğerleri, 2021).

Delikli mikroigneler

Delikli mikroigneler, solid mikroignelere benzer materyaller kullanılarak üretilen mikroignelerdir. Delikli mikroignelerin solid mikroignelerden farkı, iğnelerin arasında delik bulunmasıdır. Temel görevleri deri içersine ilaç çözeltisinin enjekte edilmesini ya da deri içersindeki biyolojik markörlerin ekstraksiyonunu sağlamaktır. Harici bir ilaç çözeltisi ile deri içersine enjeksiyona imkan sağlar. Diğer mikroigne türleriyle karşılaştırıldığında delikli mikroignelerin bu özellikleri çok daha fazla etkin maddenin uygulanabilmesini

mümkün kılar (Carcamo-Martinez, Mallon, Dominguez-Robles, Vora, Anjani ve Donnelly, 2021).

Kaplanmış mikroiğneler

Genellikle solid mikroiğnelerin, etkin madde içeren biyoparçalanabilir polimerik filmler ile kaplanması ile elde edilmiş mikroiğnelerdir. Bu tür mikroiğneler çoğunlukla kısa süreli olarak deri/mukozaya uygulanır ve yüzeyinde bulunan polimerik filmin interstisyel sıvıda çözünmesi ile deri veya doku içerisine etkin madde geçişi sağlanır. Kaplama işlemi kaplanan solid mikroiğnenin materyaline ve etkin madde-polimer çözeltisinin özelliklerine göre değişebilmektedir. Bu mikroiğnelerde etkin madde yükleme dozu çok sınırlıdır. Bu nedenle aşılar, biyoteknolojik ürünler gibi çok potent etkin maddelerin kullanımına imkan verebilir. Bu mikroiğnelerin üretiminde kullanılan materyallere, polivinilpirolidon (PVP), polivinil alkol (PVA), hidroksipropil metilselüloz (HPMC), polilaktik asit (PLA), polilaktik-glikolik asit (PLGA) verilebilir (Aldawood ve diğerleri, 2021).

Çözünebilir mikroiğneler

Çözünebilir mikroiğneler, biyoparçalanır veya çözünebilir polimerler kullanılarak üretilen mikroiğnelerdir. Bu mikroiğneler, doğrudan polimer matrisi içerisine etkin madde yüklenerek hazırlanır. Deriye/mukozaya uygulanmalarının ardından, dokudaki interstisyel sıvıda polimerik iğneler çözünerek etkin maddenin doku içerisine/altına iletilmesi sağlanır. Bu mikroiğnelerin uygulanması sonrasında uzaklaştırma basamağı gerekmez. Çözünebilir mikroiğneler, kaplanmış mikroiğnelere benzer materyaller kullanılarak üretilir (Sartawi, Blackshields ve Faisal, 2022).

Hidrojel oluşturuç mikroiğneler

Hidrojel oluşturuç mikroiğneler, genellikle çapraz bağlı hidrofilik polimerler kullanılarak hazırlanır. Etkin madde yüklü hidrojel oluşturuç mikroiğneler deriye/mukozaya uygulandığında, interstisyel sıvının polimerik matrise difüze olmasıyla şişer ve etkin maddenin dokunun alt tabakalarına geçmesini sağlar. Şişme özelliği, hidrojel oluşturuç mikroiğnelerin taban plakasındaki etkin maddenin de salınmasını sağlar. Bu nedenle, çözünebilir mikroiğnelerden daha yüksek yükleme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca, şişme

özellikleri değiştirilerek etkin madde salım hızı kontrol edilebilir. Bu mikroiğnelerin üretimi için çeşitli polimerik materyaller kullanılabilir. Metakrile edilmiş hyaluronik asit gibi foto-çapraz bağlanabilir polimerler, PVA ve kitosan gibi çeşitli fonksiyonel grupları sayesinde çapraz bağlanabilir yapılar ve ipek fibroini gibi birkaç işlemde sonra çözünürlüğünü kaybeden polimerler bu materyallere örnektir (Turner, White, Estrela ve Leese, 2021).

2.5.2. Mikroiğnelerin üretim yöntemleri

Mikroiğneler yapıldıkları materyal ve mikroiğne tipine göre farklı üretim yöntemleri ile elde edilebilir. Yaygın olarak kullanılan üretim yöntemlerinin ayrıntıları aşağıda verilmiştir. Üç boyutlu yazdırma teknolojileri mikroiğne üretiminde kapsamlı bir yer tutmaktadır. Ayrıca tez çalışması kapsamında mikrokalıplama tekniği ile birlikte stereolitografi temelli üç boyutlu yazdırma teknolojisi kullanılmıştır. Bu konu Bölüm 2.5.3'te ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Mikroelektromekanik sistemler (MEMS)

Genellikle solid ve delikli mikroiğnelerin üretiminde kullanılan MEMS yöntemi, UV ışık ile çapraz bağlanabilir bir reçinenin, substrat materyali üzerine dökülmesi ve mikroiğne paternini oluşturan bir fotomaskenin reçine üzerine kapatılması ve UV ışık uygulanarak fotomaskenin korumadığı bölgelerde katılan reçinenin mikroiğneleri oluşturması prensibine dayanır. Substrat üzerinde katılan mikroiğneler dışındaki reçine yıkanarak uzaklaştırılır. Bu yöntemde elde edilen mikroiğneler silindirik şekilde olup, mikroiğnenin üretildiği materyaller özel olarak hazırlanmış, foto-başlatıcı içeren çeşitli polimerik karışımlar olabilir (Kim, Park ve Prausnitz, 2012).

Lazer yöntemi

Lazer yöntemi solid ve delikli mikroiğnelerin üretiminin yanında, çözünebilir ve hidrojel oluşturuca mikroiğnelerin üretiminde kullanılan kalıpların eldesi için de kullanılmaktadır. Mikroiğne üretimi için lazer yöntemi farklı şekillerde kullanılabilir. Yüksek kesim hassasiyeti sayesinde lazer ışını ile mikrometrik düzeyde şekillendirme yapılabilir. Alüminyum ya da çelik sacların istenilen iğne şeklinde 2 boyutlu olarak kesimi ve sonrasında kesinlen iğnelerin 90° bükülerek dikey konuma getirilmesiyle solid ve delikli mikroiğnelerin

eldesi mümkün olmaktadır (Indermun, Luttge, Choonara, Kumar, du Toit ve diğerleri, 2014). Ayrıca lazer ablasyonu kullanılarak solid mikroiğnelerin üretildiği çeşitli yöntemler mevcuttur (Tucak, Sirbubalo, Hindija, Rahic, Hadziabdic ve diğerleri, 2020).

Lazer ışınının kullanıldığı bir başka metot, akrilik plaka üzerine dikey olarak CO₂ lazer ışını tutularak iğne deliklerinin açılması ve elde edilen bu yapıların çeşitli işlemlerle kalıp haline getirilmesidir (Nejad, Sadeqi, Kiaee ve Sonkusale, 2018).

Mikrokalıplama yöntemi

Çözünebilir ve hidrojel oluşturuıcı mikroiğnelerin kalıpla üretilmesidir. Kalıp üretimi için farklı şekillerde elde edilen bir solid mikroiğnenin polidimetil siloksan (PDMS) veya çeşitli reçineler ile negatif şekli çıkartılır. PDMS, kalıp eldesi için en çok tercih edilen materyal olup, oda sıcaklığında kürlenebilme (çapraz bağlanabilme), yüksek esneklik, esneme sonrası tamamen eski formuna dönebilme, yüksek sıcaklık dayanımı, biyogeçimli olması gibi avantajlara sahiptir. Kalıpların eldesinden sonra hazırlanan polimer/etkin madde karışımları kalıplara aktarılır. Bu işlem doğrudan doldurulma şeklinde ya da atomize spreyleme gibi tekniklerle gerçekleştirilebilir. Polimer/etkin madde karışımlarının kalıp üstündeki iğne deliklerini doldurabilmesi için basınç uygulaması, kalıp altından vakum uygulaması ya da santrifüj uygulaması yapılır (Tucak ve diğerleri, 2020). Bazı çalışmalarda, PDMS kalıba oksijen plazma uygulanarak hidrofilikleştirme işlemi yapıp, sulu polimer/etkin madde karışımlarının kalıp üzerindeki iğne deliklerini doldurması da sağlanmıştır (Nejad ve diğerleri, 2018). Polimer/etkin madde karışımının iğne deliklerini doldurmasının ardından vakum, sıcaklık veya laminar akım altında çözücünün uzaklaştırılması sağlanır. Mikroiğne kalıbının şeklini alan polimerik film kalıptan çıkartılarak çözünebilir ya da hidrojel oluşturuıcı mikroiğneler elde edilmiş olur (Y. C. Kim ve diğerleri, 2012).

Damlacık kaynaklı hava akımı yöntemi

Bu yöntem çözünebilir mikroiğnelerin farklı taban materyalleri üzerinde üretilmesine olanak tanıyan, ışık ve sıcaklık gibi etkin madde inaktivasyonuna neden olacak faktörlerin kullanılmadığı kalıpsız bir üretim metodudur. Özetle, bir dispanser veya pipet yardımı ile taban materyali üzerine damlatılan polimer/etkin madde karışımının, başka bir taban materyali ile sıkıştırılıp çekilerek ve bu sırada hava akımı uygulanarak kurutulması ile

mikroiğnelerin elde edilmesi sağlanır. İğne şeklinin oluşabilmesi için adhezyon ve kohezyon kuvvetlerinin belirli oranlarda olması gerekir (J. D. Kim, Kim, Yang, Lee ve Jung, 2013).

2.5.3. Üç boyutlu baskı teknolojisi ile mikroiğnelerin üretilmesi

Üç boyutlu yazdırma teknolojisi, klasik talaşlı imalata (top-down) bir alternatif olarak, daha kompleks ve özel parçaların yüksek hassasiyetle elde edilmesini sağlayan yeni bir üretim yöntemi yaklaşımıdır. Eklemeli imalatın (bottom-up) klasik bir örneğidir. Son yıllarda, üç boyutlu baskı teknolojisi birçok farklı disiplinde kullanım alanı bulmuştur. Farmasötik alanda çeşitli formülasyon türlerinin üretimi ve kişiselleştirilmiş tedavi için kullanımı mevcuttur (Prasad ve Smyth, 2016).

Mikroiğneler, mikrobeyutlarda mekanik olarak kompleks işlemler gerektiren ilaç şekli veya tıbbi cihazlardır. Bu nedenle farklı prensiplerle çalışan üç boyutlu yazıcılar, mikroiğnelerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Economidou, Lamprou ve Douroumis, 2018). Aşağıda farklı çalışma prensiplerine sahip üç boyutlu yazıcılar ile mikroiğne üretimleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Eriyik yığıma modelleme (FDM)

FDM metodunda termoplastik özellik gösteren materyaller (PLA, PVA, HPMC vb.), etkin madde ile toz halde karıştırılarak filament haline getirilir. Termoplastik filament, üç boyutlu yazıcı tarafından eritilerek, tasarlanan şekli oluşturacak biçimde, X-Y ekseninde 2 boyutlu olarak belirli bir sıcaklıkta olan tabla üzerinde dondurulur. Z eksenindeki her katman için bu işlem tekrarlanır. Böylece üç boyutlu bir cisim ortaya çıkar. FDM yönteminde mikron düzeyinde boyutlara ulaşmak oldukça zordur. Bu nedenle mikroiğne üretimi için çeşitli modifikasyonlar gerekir.

FDM üç boyutlu yazıcı ile, bir taban katmanını üzerinde noktacıklar şeklinde bir cisim elde edilmesi ve korozyon bir çözelti ile noktacıkların mikroiğneye dönüştürülmesi yapılan modifikasyonlara bir örnektir (Li, Zhang, Jiang, Li, Wu ve diğerleri, 2022). Başka bir örnek, FDM üç boyutlu yazıcının G-code'unun değiştirilmesi ile eriyik halde tabana temas eden termoplastiğin farklı eksenlerde sündürülerek dondurulmasıdır. Böylece sünen termoplastik

mikroiğne şeklinde donarak formülasyon üretimi gerçekleştirilebilir (Wu, Park, Kamaki ve Kim, 2021).

Stereolitografi (SLA)

SLA üç boyutlu yazıcılar, ışık prensibiyle çalışması nedeniyle oldukça yüksek hassasiyete sahiptir. UV lazer ışını ile fotoçapraz bağlanabilir reçinelerin üç boyutlu şekiller oluşturacak şekilde katılaştırılması prensibine dayanır. SLA üç boyutlu yazıcıların çözünürlüğünün 25 µm'ye kadar inebilmesi, klasik tasarıma sahip solid ve delikli mikroiğnelerin yanında karmaşık mikroiğne tasarımlarının da üretilmesini sağlar. Aynı zamanda üretilen mikroiğnelerin istenilen şekil ve boyutta olmasına imkan verir. Ancak SLA üç boyutlu yazıcılar diğer yöntemlerden daha yavaş ve daha maliyetlidir. Biyouyumlu reçinelerin kullanımının sınırlı olması, farmasötik kullanımlar için uygulanabilirliğini kısıtlar. SLA 3 boyutlu yazıcı ile elde edilen solid mikroiğneler, çoğunlukla kaplanarak ya da mikrokalıplama tekniğinde kalıp üretimi için kullanılır (Economidou ve diğerleri, 2018; Tunçel, Tort, Han, Yücel ve Tırnaksız, 2024).

Dijital ışık işleme (DLP)

DLP, SLA'ya benzer bir başka fotopolimerizasyon yöntemidir. Temel prensibi dijital bir ışık projektörü kullanılarak tek bir katmandaki bütün piksellerin aynı anda foto-çapraz bağlanmasıdır. Bir katmanı oluşturan tüm piksellerin aynı anda çapraz bağlanarak katılması, SLA üç boyutlu yazıcılara göre daha hızlı üretim yapmasına olanak verir. Aynı zamanda SLA yöntemine yakın bir çözünürlükle üretim gerçekleştirilebilir. DLP üç boyutlu yazıcılar, mikroiğneler gibi yüksek hassasiyet gerektiren tasarımların hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlar. DLP yöntemi ile mikroiğne üretimi, SLA prensibi ile yapılan üretimle biyouyumluluk sorunları ve kullanım alanı açısından benzerlik göstermektedir (El-Sayed, Vaut ve Schneider, 2020; Tucak ve diğerleri, 2020).

İki-foton polimerizasyonu (2PP)

2PP, mikro ve nano boyutlu yapıların üretimini sağlayan yüksek hassasiyetli, lazer tabanlı bir üç boyutlu baskı yöntemidir. Femtosaniye veya pikosaniye lazer kullanan 2PP, reçine üzerinde lazer fotonlarını zamansal ve lokasyonel olarak üst üste bindirerek polimere eder.

Cisim geometrisi üzerinde çok yüksek kontrole sahip 2PP nanometrik düzeyde tasarımların üretiminde kullanılır. Mikro kanallara sahip, değişik şekillerde delikli mikroıǧneler gibi karmaşık ve sivri yapıların üretilebilmesini sağlar. Pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olmasına karşın, bazı tasarımlar için nanometre düzeyindeki çözünürlüğü ile 2PP yöntemi tek alternatif konumundadır. Diğer ışık temelli 3 boyutlu yazıcılarda olduğu gibi kullanılan reçinelerin kısıtlı özellikleri nedeniyle, sadece solid ve delikli mikroıǧnelerin üretimine imkan vermektedir (Cordeiro, Tekko, Jomaa, Vora, McAlister ve diğerleri, 2020; Tucak ve diğerleri, 2020).

2.5.4. Mikroıǧnelerin karakterizasyon çalışmaları

Mikroıǧnelerin, tüm alt türleri için en önemli faktör uygulandığı dokuyu delebilmesidir. Çoğunlukla deriye uygulandığı varsayıldığında mikroıǧnelerin deriyi delebilecek yeterli mekanik dayanıma, geometriye ve sertliğe sahip olması gerekir. Aynı zamanda, çözünebilir, hidrojel oluşturun ve kaplanmış mikroıǧnelerin yeterli miktarda etkin maddeyi salabilmesi gerekir. Deriyi delebilmesi ve etkin maddeyi doku içerisine/altına ulaştırabilmesi gerekliliği nedeniyle, in vivo çalışmalardan önce bir takım in vitro testler gerçekleştirilir. Bu testlerin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

Mekanik dayanıklılık testi

Mekanik dayanıklılık, uygulama sırasında karşılaşılan kuvvet karşısında mikroıǧnelerin yapısal bütünlüğünü ve şeklinin koruyabileceğinin in vitro ortamda değerlendirilmesi amacıyla yapılır. Bu değerlendirmede başarılı olan mikroıǧnelerin, bükülmeden veya kırılmadan deriye nüfuz edebileceği varsayılır. Deri içerisine girdiğinde iğne bütünlüğünün korunması, etkin maddenin dokuya iletilmesi için kritiktir.

Mekanik dayanıklılık testleri kapsamında aksiyal ve enine kuvvet ölçümleri yapılabilir. Aksiyal kuvvet testi, kırılma meydana gelene kadar mikroıǧne tabanına dik bir kuvvet uygulanması ile gerçekleştirilir. Bu test, mikroıǧnenin dayanabileceği maksimum kuvveti ve aksiyal stres-zaman grafiğinden hareketle sertlik, esneklik, Young modülü gibi parametreleri belirler. Enine kuvvet testinde ise, bükülmeye karşı direnci değerlendirmek için mikroıǧne tabanına paralel kuvvet uygulanır. Bu testler, uygulama sırasında mikroıǧnenin

performansını tahmin etmek ve hasta güvenliğini sağlamak için önemlidir (Aldawood ve diğ erleri, 2021; Tunçel ve diğ erleri, 2024).

Penetrasyon testi

Penetrasyon testi, mikro  nelerin deriyi delmesini ve etkin maddelerin doku içerisine iletebilmesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilir.  n vitro ve ex vivo olarak yapılabilen penetrasyon testleri, mekanik dayanıklılık testlerinden farklı olarak deri delme işlemini pratik olarak gösterir. Yapı analiz cihazları kullanılarak mikro  nelerin ex vivo deriye girmesi için gerekli kuvvetin bulunmasını sağlanabilir. Çeşitli in vitro deri modellerine veya ex vivo olarak deriye mikro  ne uygulanması sonrasında, batma derinliği ve tekd zeli i çeşitli görüntüleme yöntemleri ile belirlenebilir. Bu yöntemler Taramalı elektron mikroskobu, optik koherens tomografisi, konfokal lazer mikroskopisi ve histolojik analiz olarak sıralanabilir (Lutton, Moore, Larra eta, Ligett, Woolfson ve Donnelly, 2015; Tunçel ve diğ erleri, 2024)

Morfolojik ve yapısal analiz

Morfolojik analiz ile mikro  nelerin taban çapı, uç çapı ve yükseklik boyutları saptanır; şekilleri ve yüzey özellikleri incelenir. Taramalı elektron mikroskobu veya optik mikroskop ile mikro  ne yapılarının ayrıntılı olarak görüntülenmesi, uç sivrilili i,   nelerin tekd zeli i ve olası üretim kusurlarının değerlendirilmesine olanak tanır. Morfolojik karakterizasyon, mikro  nelerin doğru üretilip  retilmedi inin belirlenmesi ve diğer karakterizasyon parametrelerindeki performansıyla (mekanik dayanıklılık, batma derinliği vb.) ilgili fikir vermesi açısından önemlidir (Umeyor, Shelke, Pol, Kolekar, Jadhav ve diğ erleri, 2023).

 n vitro salım çalışmaları

 n vitro ilaç salım çalışmaları, bir mikro  ne sisteminin etkin maddeyi ne oranda ve hızda saldı ının değerlendirilmesi açısından önemlidir. Çözünebilir ve hidrojel oluşturucu mikro  neler için farklı in vitro salım metotları önerilmiştir. Bu yöntemlerde bir tanesi, mikro  nenin bir polimerik film olarak kabul edildiği ve doğrudan salım ortamı içerisine atılarak etkin madde salımının izlendiği yöntemdir (Dathathri, Lal, Mittal, Thakur ve De, 2020). Bir diğer yöntem ise, yalnızca   ne yapılarının yüzeyinden etkin madde salımının

incelendiği yöntemdir. Bu yöntemin, gerçeğe daha yakın sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Larraneta, Stewart, Fallows, Birkhauer, McCrudden ve diğerleri, 2016). Bu yöntemlerden elde edilen in vitro salım verileri, in vivo çalışmalardan önce mikroigne tasarımının, formülasyon bileşenlerinin ve uygulama tekniklerinin optimizasyonunun sağlanması açısından önemlidir.

Ex vivo permeabilite ve dokuda birikim çalışmaları

Ex vivo permeabilite ve dokuda birikimi değerlendirmek, etkin maddenin dokuya penetrasyonunun ne derece artırıldığına belirlenmesi açısından önemlidir. Genel olarak Franz difüzyon hücrelerine yerleştirilen deri dokusu kullanılarak yapılan permeabilite ve dokuda birikim çalışmalarında, alıcı faza geçen ve çalışma sonunda dokuda biriken etkin madde miktarı belirlenir. Bu çalışmalar, mikroigneler aracılığıyla etkin maddenin potansiyel dermal veya sistemik biyoyararlanımının kestirilmesini sağlar. Deri dokusu olarak fare, sıçan, domuz ya da insan derisinin kullanıldığı literatür örnekleri bulunmaktadır (Birchall, Coulman, Pearton, Allender, Brain ve diğerleri, 2005; Tunçel ve diğerleri, 2024; Umeyor ve diğerleri, 2023)

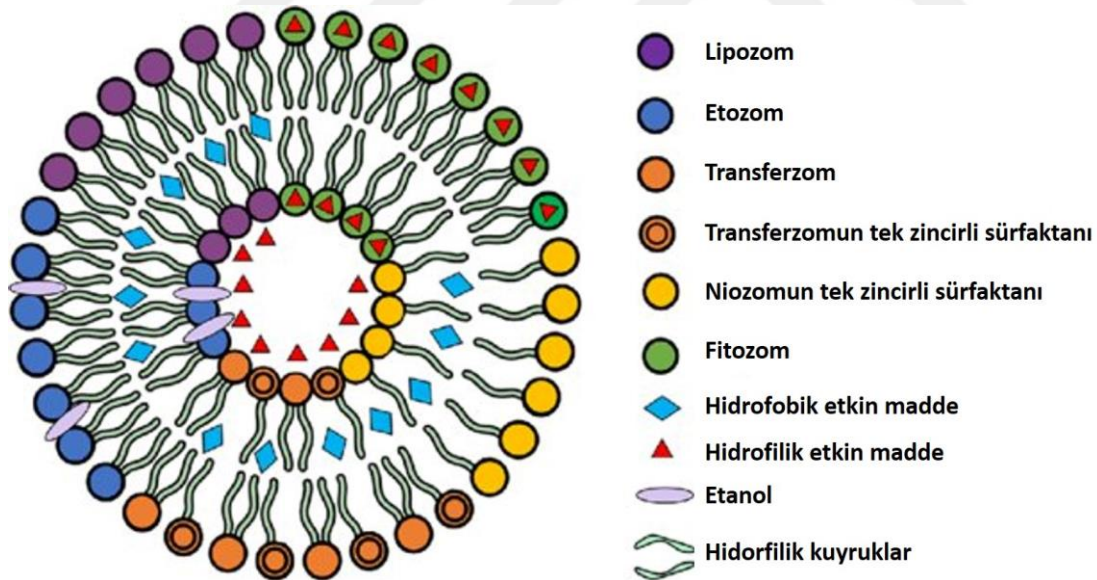
2.6. Veziküler Sistemler

Veziküler sistemler, amfifilik moleküllerin sulu dispersiyon halindeyken bir araya gelerek oluşturdukları, bir veya daha fazla çifte tabakadan meydana gelen düzenli yapılardır. Hem hidrofilik hem lipofilik etkin maddeleri enkapsüle edebilmesi, biyoyararlanım artışı sağlaması, eliminasyonu geciktirebilmesi, sirkülasyon süresini uzatabilmesi, bazı etkin maddelerin stabilitesini artırabilmesi, deri veya çeşitli mukozal dokulardan geçişi artırabilmesi, hedeflendirme sağlayarak daha yüksek etki ve daha düşük toksisite gösterebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Veziküler sistemler, genellikle endojen ve toksik olmayan lipidler kullanılarak üretilmesi nedeniyle, diğer nano yapıli sistemlere göre daha düşük toksisite gösterir. Bu avantajlarına karşın hidrofilik etkin maddeler için düşük enkapsülasyon etkinliği, polimerik nanopartiküler sistemlere göre daha düşük stabilite ve etkin maddenin zamanla kesecik dışına sızması gibi dezavantajları vardır (S. Jain, Jain ve Mahajan, 2014).

Dermal olarak veziküler sistemlerin kullanımı ile hem deriden geçiş hem de deri dokusunda birikim sağlanabilir. Etkin maddenin deride tutulması sağlanarak sistemik absorpsiyon azaltılabilir. Veziküler sistemler, hazırlandıkları materyallere göre çeşitli isimlerle adlandırılmaktadır (Richard, Cassel ve Blanzat, 2021). Bunlara lipozom, transferzom, etozom, niozom ve çeşitli özel adlara sahip veziküler sistemler örnek olarak verilebilir.

2.6.1. Veziküler sistemlerin türleri

Veziküler sistemlerde lipid çift tabakayı meydana getiren temel amfifilik bileşen genellikle fosfolipidlerdir. Fosfolipidlerin yanına eklenen çeşitli yardımcı maddeler, üretilen veziküler sistemin boyut, elektriksel yük, esneklik, viskozite, penetrasyon veya tabaka sayısı gibi parametrelerini etkileyerek, amaca yönelik farklılaştırma sağlar (Şekil 2.5). Bazı durumlarda fosfolipidlerin yerine farklı amfifilik moleküllerin kullanımı ile de veziküler sistemler elde edilebilmektedir. Literatürde, veziküler sistemleri meydana getiren bileşenlere ve oranlarına bağlı olarak özelleştirilmiş isimler verilmiştir (Richard ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.5. Çeşitli veziküler sistemlerin yapılarının şematik gösterimi (Ramadon, McCrudden, Courtenay ve Donnelly, 2022)

Lipozomlar

Lipozomlar fosfolipidler ve kolesterolden meydana gelen veziküler sistemlerdir. Dermal ilaç taşıyıcı sistem olarak yüksek potansiyele sahiptir. Lipozomlar biyolojik membranlara benzer

yapıdadır. Bu özellikleri sayesinde derinin lipid matrisini destabilize ederek deri lipidleri ile karışabilir. Bu durum penetrasyon artışı sağlar. Aynı zamanda deri lipidleri içerisine girip, bu bölgede depo görevi görerek kontrollü şekilde etkin maddenin deri altına geçmesini sağlayabilir. Depo etkisi ile sistemik absorpsiyon azaltılması, hedef bölgenin deri olduğu hastalıklar için önemli bir avantajdır (Pierre ve dos Santos Miranda Costa, 2011).

Etozomlar

Etozomlar, kolesterol ve fosfolipidin yanında yüksek oranda etanol içeren veziküler sistemlerdir. Etozomlar, klasik lipozomlardan farklı olarak etanol içermesi nedeniyle daha fazla penetrasyon artırma potansiyeline sahiptir. Lipid çift tabaka yapısındaki etanol, deri lipidlerini çözerek bariyer fonksiyonunu azaltır. Aynı zamanda çift tabaka akışkanlığını artırması, kesecik yapısının daha esnek olmasını sağlar. Bu durum, *stratum corneum*'dan geçişi artırır (Zhan, Wang, Li, Xiao, Fang ve diğerleri, 2024).

Transferzomlar

Transferzomlar, fosfolipid ve kolesterole ek olarak kenar aktivatörleri içerir. Kenar aktivatörlerinin görevi kesecik membranının esnekliğini artırmaktır. Transferzomlar, klasik lipozomların sahip olduğu avantajların yanında, daha yüksek yükleme kapasitesi, stabilite ve deri penetrasyonu gösterirler. Osmotik gradyan oluşturarak hem intraselüler hem transselüler geçişi artırdıkları bilinmektedir. Lipozomlara göre hidrofilik etkin maddeler için yükleme kapasitesi daha yüksektir. Bunun sebebi, kesecik yapısının daha hidrofilik olmasıdır. Kenar aktivatörü olarak %10-25 oranında stearylamin, setilpiridinyum klorür, sodyum kolat/ sodyum deoksikolat, polisorbatsız ve sorbitan monoleatlar kullanılabilir (Matharoo, Mohd ve Michniak-Kohn, 2024).

Niozomlar

Niozomlar, diğer lipozomal formülasyonlardan farklı olarak, non-iyonik tek zincirli sürfaktanlardan meydana gelir. Çift tabaka yapısının korunabilmesi için kolesterol kullanılır. Non-iyonik sürfaktanların kullanımı, niozomların çok daha stabil formülasyonlar olmasını sağlar. Ancak diğer lipozomal formülasyonlara göre esneme özelliğini ve yükleme kapasitesini azaltır. Niozomların dermal ilaç uygulanmasındaki en önemli avantajı, non-

iyonik yapısı sayesinde yüklü etkin madde moleküllerinin geçişini sağlayabilmesidir. Deri lipitleri ile etkileşim sonucu *stratum corneum*'un direncini azaltır. Ayrıca derinin nem miktarını artırması ve deri ile temas açısının az olması sayesinde, deri dokusu ile daha yüksek etkileşim kurabildiği ve bu şekilde penetrasyon artırdığı ileri sürülmüştür (Abu-Huwaij, Alkarawi, Salman ve Alkarawi, 2023).

Diğer veziküler sistemler

Dermal ilaç uygulanmasında kullanılmak üzere özelleştirilmiş birçok lipozomal formülasyon türü geliştirilmiş ve ilgili literatürlerde farklı şekilde isimlendirilmiştir. Bu veziküler sistemlerin bazılarının isimleri, bileşenleri, yapıları ve penetrasyon artırma mekanizmaları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Diğer özelleştirilmiş veziküler sistemler

İsimlendirme	Tipik Bileşenler	Penetrasyon artırma mekanizması	Kaynak
Gliserozom	Fosfolipid, gliserin, kolesterol	Transferzoma benzer, Gliserin esnekliği artırır.	(Manca ve diğerleri, 2013)
İnvazom	Fosfolipid, etanol (%3 a/a), terpenler	Etanol ve terpenler <i>stratum corneum</i> lipid yapısını bozar ve membran elastikiyetini artırır.	(Babaie, Bakhshayesh, Ha, Hamishehkar ve Kim, 2020)
Transetozom	Fosfolipid, etanol, kenar aktivatörleri	Etozolara benzer, eklenen kenar aktivatörleri membran elastikiyetini artırır ve deriyi hidrate eder.	(Zhan ve diğerleri, 2024)
Ufazomlar	Yağ asitleri (oleik asit), kolesterol,	<i>Stratum corneum</i> lipitleri ile oleik asitin yer değişimi sonrası derinin bariyer fonksiyonunu azaltır.	(Chacko, Ghate, Dsouza ve Lewis, 2020)

2.6.2. Veziküler sistemlerin üretim yöntemleri

Lipid temelli veziküler sistemlerin hazırlanması için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu bölümde, genel hazırlama yöntemleri olan film hidrasyon, ters-faz buharlaştırma ve eter-etanol enjeksiyon yöntemleri açıklanmıştır. Özelleştirilmiş veziküler sistemler için farklı hazırlama yöntemleri de kullanılmaktadır. Uygun hazırlama yönteminin seçimi çeşitli parametreler göz önünde bulundurularak yapılır. Bu parametreler etkin maddenin ve veziküler sistemin fizikokimyasal özellikleri, etkin madde yükleme dozu, istenilen kesecik boyutu, dağılımı ve yüzey yükü ve üretilecek formülasyon miktarıdır. Veziküler sistem formülasyonlarının üretimini ardından kesecik yapısının ve boyutunun değiştirilmesi için uygulanan yöntemler de mevcuttur. Bu yöntemler ultrasonikasyon ve ekstrüzyon yöntemleridir.

Ultrasonikasyon işlemi multilamellar yapıda elde edilen veziküler sistemlerin ünilemellar yapıya dönüştürülmesini sağlar. Prob sonikasyon ve banyo sonikasyon olarak iki çeşidi mevcuttur. Her iki yöntemin temel prensibi, veziküler sistem dispersiyonunun yüksek enerjili ses dalgası ile titreşim uygulanarak parçalanmasını sağlamaktır. Bu durum, veziküler sistemin katman sayısının azaltılmasının yanında boyutunun düşürülmesi ve boyut dağılımının homojenize edilmesini sağlar (Riaz, 1996).

Ekstrüzyon işlemi, ultrasonikasyona benzer olarak, veziküler sistemlerin multilamellar yapıdan ünilemellar yapıya dönüştürülmesini, boyut küçültülmesini ve boyut dağılımının homojenize edilmesini sağlamak amacıyla uygulanır. Tekdüze por çapına sahip polikarbonat veya polietersülfon membranlardan veziküler sistemlerin basınç uygulanarak geçmeye zorlanması işlemi olarak tanımlanır. Kullanılması gereken membranın por boyutu, uygulanacak basınç ve sıcaklık ve veziküler sistemin boyutuna göre ayarlanır (Guillot, Martínez-Navarrete, Garrigues ve Melero, 2023).

Film hidrasyon yöntemi

Film hidrasyon yönteminde, hazırlanması planlanan veziküler sistem formülasyonunun lipid bileşenleri (fosfolipid, kolesterol, kenar aktivatörleri, yağ asitleri vb.) bir balon içerisinde organik solvanda çözülür. Bu çözeltinin organik solvanı, düşük basınç ve lipidlerin faz dönüşüm sıcaklığının üzerinde uçurulur; böylece balon çeperinde lipid filmin oluşturulması

sağlanır. Ardından, faz dönüşüm sıcaklığının üzerinde su fazı ilave edilir ve karıştırılır. Film hidrasyon yöntemi, tüm veziküler sistem türlerinin hazırlanabilmesine olanak tanır. Hidrasyon etanolik bir çözelti ile gerçekleştirilirse etozomal veziküler sistemlerin üretimi de sağlanabilir. Elde edilen veziküler sistemler genellikle multilamellar yapıdadır (Guillot ve diğerleri, 2023; Lopez-Pinto, Gonzalez-Rodriguez ve Rabasco, 2005).

Ters-faz buharlaştırma

Ters-faz buharlaştırma yöntemi, ters misel oluşturma prensibine dayanır. Sulu fazda etkin madde ve suda çözünür diğer bileşenler yer alırken, organik fazda amfifilik moleküller yer alır. Her iki fazın karıştırılmasının ardından ve organik solvanın uçurulması ile birlikte amfifilik moleküller sulu faza geçerek ters miseller oluşturur. Kritik konsantrasyonu geçtikten sonra misel oluşturmamış amfifilik moleküller ters misellerin etrafını sararak veziküler sistemleri meydana getirir. Bu yöntemin en önemli avantajı su oranının yüksek olduğu durumlarda bile yüksek enkapsülasyon sağlayabilmesidir. Elde edilen veziküler sistemler multilamellar veya ünilammellar yapıda olabilir (Akbarzadeh, Rezaei-Sadabady, Davaran, Joo, Zarghami ve diğerleri, 2013).

Eter-etanol enjeksiyonu

Eter-etanol enjeksiyon yöntemlerinde eter, etanol veya eter-etanol karışımında çözünen lipid fazı, sulu faz içerisine belirli hızda enjekte edilir ve organik solvanın faz dönüşüm sıcaklığının üzerinde uzaklaştırılması ile veziküler sistemler elde edilir. Bu yöntem çok basit olmasına karşın, elde edilen veziküler sistemlerin boyut aralığı geniştir. Genellikle ünilammellar yapıda veziküler sistemlerin elde edilmesi sağlanır (Akbarzadeh ve diğerleri, 2013; Guillot ve diğerleri, 2023).

Veziküler sistemlere etkin madde yüklenmesi

Veziküler sistem formülasyonlarına etkin madde yüklenmesi için iki farklı yaklaşım vardır. Yaygın olan yaklaşım, formülasyonların hazırlanması sırasında etkin maddenin yüklenmesidir. Bu yaklaşımda etkin madde çözünebildiği faza eklenir. Keseciklerin oluşumu sırasında etkin madde enkapsüle edilir (Manca, Manconi, Falchi, Castangia, Valenti ve diğerleri, 2013).

Diğer yaklaşımda ise keseciklerin oluşumu sonrasında etkin madde yüklenir. Hazırlanmış sistemlere etkin madde yüklenmesi için farklı yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, tüm yöntemler konsantrasyon gradyanı oluşturularak ortamdaki etkin maddenin kesecik içerisine difüze olması prensibine dayanır. Veziküler sistemin dağıldığı ortama aşırı etkin madde eklenmesi, etkin maddenin ortamdaki çözünürlüğünün pH veya ortak iyon etkisi gibi faktörlerle azaltılması ve donma-çözme işlemi uygulanarak etkin maddenin kesecik içerisine difüze olmasının sağlanması bu yöntemlere örnek olarak gösterilebilir (Guillot ve diğerleri, 2023).

2.6.3. Veziküler sistemlerin karakterizasyonu

Geliştirilen veziküler sistemlerin, deriden geçebilmesi ya da deride birikebilmesi için çeşitli özelliklere sahip olması gerekir. Bu özelliklerin belirlenmesi için karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Karakterizasyon parametreleri boyut, boyut dağılımı, zeta potansiyel, morfoloji, enkapsülasyon etkinliği, elastikliği, etkin maddenin salımı ve ex vivo değerlendirmeler olarak sayılabilir. Bu yöntemlerin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

Boyut, boyut dağılımı ve zeta potansiyel

Nano boyutlu veziküler sistemler dinamik ışık saçılımı yöntemi ile analiz edilir. Dinamik ışık saçılımı yöntemi nano ve mikro boyutlu dispersiyonların boyutlarının ölçülmesi amacıyla kullanılır. Çeşitli ışık dağılımı teorilerine dayanarak, veziküler sistem dispersiyonu üzerine gönderilen ışının saçılımından hareketle boyut hesaplaması gerçekleştirilir. Dinamik ışık saçılımı yönteminde çok sayıda keseciğin analiz edilebilmesi nedeniyle, yüksek doğrulukla boyut ve boyut dağılımı belirlenebilir (Guillot ve diğerleri, 2023). Zeta potansiyel ölçümü ise keseciklerin elektrik alandaki hareket hızlarının ölçülmesi prensibine dayanır (Bhattacharjee, 2016).

Veziküler sistemin boyutu, deriden geçiş için önemli bir parametredir. Boyut artışıyla birlikte deriye penetrasyonunu ve deriden difüzyonun zorlaştığı bilinmektedir. 200 nm'den küçük veziküler sistemler deriden geçebilirken 600 nm'nin üstünde olanlar *stratum corneum*'un üzerinde kalmaktadır (Šentjurs, Vrhovnik ve Kristl, 1999). Boyut dağılımı ve zeta potansiyel, veziküler sistem formülasyonun stabilitesini de etkiler. Dar boyut dağılımına sahip formülasyonların daha stabil olduğu bilinmektedir. Uygun zeta potansiyel değerine (>

30 mV veya $< -30\text{mV}$) sahip elektriksel çift tabaka, veziküler sistemlerin flokülasyon sonrası agregasyonunu engellemektedir (Guillot ve diğerleri, 2023).

Morfoloji

Veziküler sistemlerin morfolojisinin incelenmesi amacıyla çeşitli mikroskopi yöntemleri kullanılmaktadır. Mikroskopi yöntemleri aynı zamanda boyut analizi için de kullanılabilir. Elektron mikroskopi yöntemleri nano boyutlu keseciklerin görüntülenmesine imkan tanır. Ancak, taramalı elektron mikroskopisi fiksasyon ve yüksek vakum gerektirmesi nedeniyle disperse haldeki veziküler sistemlerin görüntülenmesinde kullanılamaz. Ancak liyofilize veziküler sistemlerin görüntülenmesi için uygundur. Transmisyon elektron mikroskopisi, disperse haldeki partiküler sistemlerin görüntülenmesinde en fazla kullanılan yöntemdir. Özellikle, cryo-transmisyon elektron mikroskopisi yöntemi ile keseciklerin dağılım ortamındaki doğal halinin görüntülenmesi sağlanabilir. Transmisyon elektron mikroskopisinde kesecik boyutu, dağılımı, şekli ve iç yapısı (ünilamellar veya multilamellar) analiz edilebilir. Atomik kuvvet mikroskopisi ile veziküler sistemlerin yüzey morfolojisinin analizi gerçekleştirilebilir (Guillot ve diğerleri, 2023).

Enkapsülasyon etkinliği

Yüksek enkapsülasyon etkinliği veziküler sistemler için istenilen önemli bir karakteristik özelliktir. Enkapsülasyonun yüksek olması durumunda, kesecik içerisinde yer alan etkin madde miktarı yüksek olacağından, deri altına taşınan etkin madde miktarı artar. Enkapsülasyon etkinliği, kesecik boyutu, üretim yöntemi, keseciğin katman sayısı ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri gibi faktörlere bağlıdır. Lipofilik etkin maddeler, amfifilik moleküllerin lipid bölgesine yerleşirken, hidrofilik ilaçlar kesecik yapısının sulu çekirdeğine yerleşir. Çoklu katmana sahip keseciklerde, birim kesecikteki lipid miktarının artması nedeniyle lipofilik ilaçların enkapsülasyonu artabilir (Guillot ve diğerleri, 2023).

Enkapsülasyon etkinliği direkt veya indirekt yöntemler ile belirlenebilir. Direkt yöntemler, temelde kesecik bileşenlerinin organik solvan veya sürfaktan ilavesi ile parçalanarak doğrudan etkin madde miktarının saptanması prensibine dayanır (Gulati, Grover, Singh ve Singh, 1998). İndirekt yöntemde, dispersiyon halindeki keseciklere süzme ve/veya santrifüj işlemi uygulanıp, dispersiyon ortamında kalan etkin maddenin miktarı belirlenir. Hazırlama

sürecinde eklenen etkin madde miktarından çıkartılarak yüklenen etkin madde miktarı bulunur (Cui, Zhang, Zheng ve Kawashima, 2004).

Deformasyon (esneklik) katsayısı

Esneklik, veziküler sistemlerin *stratum corneum*'daki porlardan geçebilmesi için kritik bir özelliktir. Esnekliğin belirlenmesi için tanımlanmış bir parametre olan deformasyon katsayısı, veziküler sistem dispersiyonunun silindirik, belirli boyutta ve homojen por çapına sahip bir membrandan sabit basınç altında ve belirli bir süre boyunca geçirilmesi ile belirlenir. Farklı hesaplama yöntemleri olan deformasyon katsayısında belirleyici faktörler ekstrüzyon sonrası elde edilen dispersiyon hacmi veya ekstrüzyon sonrası elde edilen kesecik boyutunun membran por boyutuna oranıdır. Sabit süre ve basınç altında membrandan geçebilen dispersiyon hacmi doğrudan sistemin esnekliği ile ilişkilidir. Ekstrüzyon sonrası kesecik boyutunda azalma meydana gelmesi, sistemin esnek olmadığını göstermektedir (Guillot ve diğerleri, 2023; Raza, Singh, Mahajan, Negi, Bhatia ve Katare, 2011).

İn vitro salım çalışmaları

İn vitro ilaç salım çalışmaları, veziküler sistemlerin etkin maddeyi ne oranda, hızda ve hangi kinetik modele göre saldıgının değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla geliştirilmiş çeşitli yöntemler mevcuttur. Diyaliz yöntemi en çok tercih edilen metotlardan bir tanesidir. Veziküler sistemlerin doğrudan salım ortamına dağılması engellenerek, sadece serbest etkin maddenin analiz edilmesi sağlanır. Bu amaçla diyaliz torbaları ve diyaliz kasetleri veya Franz difüzyon hücresi yöntemleri kullanılır. Franz difüzyon hücresi yönteminde alıcı ve verici kompartmanlar arasına yerleştirilen membran sabit salım yüzey alanı sağlar. Böylece birim alandan salınan madde miktarı hesaplanabilir. Etkin maddenin zamana karşı salım ortamına çıkış grafiklerinden hareketle salım kinetikleri değerlendirilebilir (Guillot ve diğerleri, 2023).

Ex vivo permeabilite ve dokuda birikim çalışmaları

Permeabilite ve dokuda birikimin değerlendirilmesi, veziküler sistemlerin dokuya penetrasyonu ne derece artırdığının belirlenmesi açısından önemlidir. Franz difüzyon

hücrelerine yerleştirilmiş deri dokusu ile yapılan permeabilite ve dokuda birikim çalışmalarında, alıcı faza geçen ve çalışma sonunda dokuda biriken etkin madde miktarı belirlenir. Bu çalışmalar sayesinde, veziküler sistem formülasyonlarının in vivo koşullardaki davranışlarının kestirilmesi sağlanır. Ex vivo deri dokusu olarak fare, sıçan, domuz ya da insan derisi kullanılabilir (Guillot ve diğerleri, 2023).

Deri dokusunda biriken etkin maddenin belirlenmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Farklı deri katmanlarında biriken etkin maddenin belirlenmesinde “bant soyma” yöntemi yaygın olarak kullanılır. Farklı sayıda adhezif bantlar deri dokusuna yapıştırılıp çekilerek farklı deri tabakalarının soyulması sağlanır. Daha sonra bantlar ekstre edilerek farklı katmanlardaki etkin madde miktarları belirlenir (Lademann, Jacobi, Surber, Weigmann ve Fluhr, 2009). Eğer kullanılan etkin madde floresans özellik gösteriyorsa ya da etkin maddeye floresans boyalar kovalent olarak bağlanırsa, farklı deri katmanlarındaki birikim konfokal lazer mikroskobu ile belirlenebilir (Kathuria, Handral, Cha, Nguyen, Cai ve diğerleri, 2021). Deri dokusunun tümünde etkin madde birikimin belirlenmesi için, doğrudan deri dokusu ekstre edilerek, içerisindeki etkin madde miktarı bulunabilir (Tunçel ve diğerleri, 2024).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit	Sigma Aldrich, ABD
Hidroksipropil metilselüloz (Affinisol™ HPMC HME 15LV)	Colorcon, ABD
Aklofen Jel® (Diklofenak sodyum, benzil alkol, hyaluronik asit, propilen glikol, dietilen glikol monoetil eter) (Seri No:10007743028172, SKT: 12.2023)	Lilyum İlaç, Türkiye
Asetonitril	Carlo Erba, İtalya
Diklofenak sodyum	VEM İlaç, Türkiye
Dimetilsülfoksit	Merck, Almanya
Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri (DMEM)	Capricorn, ABD
Formalin	Merck, Almanya
Polivinil metileter-Maleik asit kopolimeri (Gantrez™ S97)	Ashland, ABD
HaCaT hücre hattı	ATCC, ABD
Hidroklorik asit	Merck, Almanya
Hyaluronik asit	Kadıoğlu Medikal, Türkiye
Keta-Control®	Doğa İlaç, Türkiye
Kloroform	Carlo Erba, İtalya
Kolesterol	Sigma Aldrich, ABD
Ksilen	Merck, Almanya
Soya fosfatidilkolini (Lipoid S100)	Lipoid, Almanya
Metanol	Carlo Erba, İtalya
Polikarbofil (Noveon® AA-1)	Lubrizol, ABD
o-Fosforik asit	Merck, Almanya
Oleik asit	Lipoid, Almanya
PGE2 analiz kiti	Relassay Diagnostics, Türkiye
Polidimetil siloksan	Aydın Kompozit, Türkiye
Polietilenglikol	Merck, Almanya
Polivinil alkol (Polyviol G 40/140)	Wacker, Almanya

Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich, ABD
Dietilenglikol monoetileter (Transcutol CG)	Azelis, Türkiye

3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar

Alüminyum pan	Shimadzu, Japonya
Adhezif bant	(CoTran PTGA, 3M Pharmaceuticals, ABD)
Diferansiyel taramalı kalorimetre	DSC 60, Shimadzu, Japonya
Distile su cihazı	Millipore, ABD
Diş modelleme mumu	Polywax, Bilkim, Türkiye
Elektronik kumpas	Mituyoto, Japonya
Enjektör	Genject, Türkiye
Eppendorf tüp	Borox, Türkiye
Farmasötik adhezif bant (CoTran PTGA)	3M Pharmaceuticals, ABD
Franz difüzyon hücresi	Çalışkan Cam, Türkiye
FTIR	Perkin-Elmer, Spectrum 400, ABD
Hassas terazi	Precisa, İsviçre
HPLC	Agilent 1100 series, ABD
HPLC kolonu (C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm)	ACE Columns, İrlanda
İklimlendirme dolabı	TK252, Nüve, Türkiye
İnsülin enjektörü	Genject, Türkiye
İnvert Floresan Mikroskop	Olympus, Japonya
İpek flaster	Roll®, Kurtsan Medikal, Türkiye
Onlu manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Optik tensiyometre	Attension-Theta Lite, Biolin Scientific, Finlandiya
Otomatik pipet seti	Eppendorf, Almanya
Parafilm M®	Bemis Company, ABD
Partikül boyutu ölçüm cihazı	Malvern ZetaSizer, Malvern Instruments, BK
pH metre	Milwaukee, ABD
Pnömatik pompa	Axolotl Biosystems, Türkiye
Polikarbonat filtre	Whatman, BK
PVDF/L filtre (0,22 µm)	Labmaker, Türkiye

Santrifüj	Nüve NF800, Türkiye
Santrifüj	Allegra X-30 R, Beckman Coulter, ABD
Santrifüj filtrasyon tüpü	Amicon Ultra-0.5 mL, Millipore, ABD
Selüloz filtre (0,45 µm 47 mm)	Labmaker, Türkiye
SEM	Quanta 400F, FEI Company, ABD
SLA, 3 boyutlu yazıcı	Formlabs Form 3, ABD
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Sualtı manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
TEM	FEI Tecnai G2 Spirit, ABD
UV spektrofotometre	708-DS, Agilent Technologies, Singapur, Malezya
Ultrasonikasyon cihazı	Vibra-cell, Sonics & Materials, ABD
Üçlü ısıtıcılı manyetik karıştırıcı	Daihan, Güney Kore
Viskozimetre	Brookfield DV III+, ABD
Vorteks	Isolab, Almanya
Yapı analizi cihazı	Stable Micro Systems, BK

3.2. Yöntem

3.2.1. Diklofenak sodyumun fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışmaları

Diklofenak sodyumun, formülasyonların hazırlandığı ortam olan distile su için 25°C'deki ve salım çalışmalarının gerçekleştirildiği ortam olan pH 7,4 fosfat tamponu için 25°C ve 37°C'deki çözünürlüğü belirlenmiştir. Çözünürlük çalışmaları 3 paralel halinde yürütülmüştür.

25°C'de, distile sudaki çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla yaklaşık 200 mg diklofenak sodyum tartılmış ve 5 mL distile su içeren viallere konulmuştur. 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 72 saat boyunca $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda, manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. 72 saatin sonunda alınan örnekler 10 dakika 10000 rpm'de santrifüjlendikten sonra 0,22 µm por çapına sahip PVDF/L filtrelerden

süzülmüş ve 1000 kat seyreltilmiştir. Valide edilmiş analitik metot ile UV-Visible spektrofotometrede, 276 nm’de analiz edilmiştir.

25°C’de, pH 7,4 fosfat tamponundaki çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla yaklaşık 80 mg diklofenak sodyum tartılmış ve 2 mL pH 7,4 fosfat tamponu içeren viallere konulmuştur. 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 72 saat boyunca $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ’lik su banyosunda, manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. 72 saatin sonunda alınan örnekler 10 dakika 10000 rpm’de santrifüjlendikten sonra 0,22 µm por çapına sahip PVDF/L filtrelerden süzülümüş ve 600 kat seyreltilmiştir. Valide edilmiş analitik metot ile UV-Visible spektrofotometrede, 276 nm’de analiz edilmiştir.

37°C’de, pH 7,4 fosfat tamponundaki çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla yaklaşık 200 mg diklofenak sodyum tartılmış ve 5 mL pH 7,4 fosfat tamponu içeren viallere konulmuştur. 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 72 saat boyunca $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ’lik su banyosunda, manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. 72 saatin sonunda alınan örnekler, etüvde bekletilerek 37°C sıcaklığa getirilmiş 0,22 µm por çapına sahip PVDF/L filtrelerden süzülümüş ve 2000 kat seyreltilmiştir. Valide edilmiş analitik metot ile UV-Visible spektrofotometrede, 276 nm’de analiz edilmiştir (Kincl, Meleh, Veber ve Vrecer, 2004).

Diklofenak sodyumun FTIR analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) etkin madde, yardımcı madde ve formülasyonların kimyasal yapılarının aydınlatılması amacıyla kullanılan bir analiz yöntemidir. FTIR analizi, toz diklofenak sodyum numunesi üzerinde FTIR spektrofotometresi (Perkin-Elmer, Spectrum 400, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. 4000-600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında analiz gerçekleştirilerek etkin maddeye ait IR spektrumu elde edilmiştir (Swain, Nagamani ve Panda, 2015). Bu çalışma, diğer formülasyon bileşenleri ile de yapılmış ve IR spektrumları elde edilmiştir. Etkin maddenin bu bileşenler ile etkileşim olasılığı, elde edilen spektrumlar karşılaştırılarak incelenmiştir.

Diklofenak sodyumun DSC analizi

Diferansiyel Taramalı Kalometri (DSC), sıcaklık veya zamanın bir fonksiyonu olarak, kontrollü sıcaklık değişikliklerine maruz kalan bir örnek ile inert bir referans arasındaki ısı enerjisi farkının ölçülmesini sağlayan bir analiz cihazıdır. DSC analizi için yaklaşık 2 mg ağırlığında toz diklofenak sodyum numunesi alüminyum pan içerisine konularak DSC cihazının (Shimadzu, DSC-60, Japonya) numune bölmesine yerleştirilmiştir. Azot gazı altında 10°C/dk hızla ısıtma gerçekleştirilerek yapılan analizde, 25-320°C aralığındaki etkin madde termogramı elde edilmiştir. Bu çalışma, diğer formülasyon bileşenleri ile de yapılmış ve DSC termogramları elde edilmiştir. Etkin maddenin bu bileşenler ile etkileşim olasılığı, elde edilen termogramlar karşılaştırılarak incelenmiştir.

3.2.2. Diklofenak sodyumun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi

İleri çalışmalarda, mikroiğne formülasyonlarının üretimi sırasında termal çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, mikroiğneler 24 saat boyunca 80°C’de bekletilmiştir (Donnelly, McCrudden, Zaid Alkilani, Larrañeta, McAlister ve diğerleri, 2014). Mikroiğne formülasyonlarının termal çapraz bağlanması sürecinde, etkin maddenin yüksek sıcaklığa maruz kalacağı süre boyunca stabilitesini koruması gereklidir. Bu amaçla etkin maddenin 80°C’deki katı hal stabilitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Diklofenak sodyum 80°C’ye ayarlanmış etüvde (Mikrotest MVE-30, Türkiye) 24 saat boyunca toz halde bekletilmiştir. 0, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde 5 mg’lık örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 50 mL pH 7.4 fosfat tamponunda çözülmüş ve ardından 1/5 oranında seyreltilerek spektrofotometrik olarak 276 nm’de analiz edilmiştir. Çalışmalar üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca diklofenak sodyumun 80°C’de 24 saat boyunca tutulmasının ardından DSC analizi gerçekleştirilmiş ve DSC termogramında değişiklik gözlenip gözlenmediği belirlenmiştir.

3.2.3. Diklofenak sodyumun analiz yöntemleri ve validasyonları

UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Mikroiğne ve veziküler sistem formülasyonlarının karakterizasyonu ve in vitro salım çalışmalarında kullanılmak üzere distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında analiz yapılması planlanmıştır. Diklofenak sodyumun, bu ortamlardaki maksimum absorbans gösterdiği dalga boylarının belirlenmesi amacıyla pH 7,4 fosfat tamponu ve distile suda yaklaşık 10 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin, UV-Visible spektrofotometre cihazı (708-DS, Agilent Technologies, Singapur, Malezya) ile, 200-400 nm aralığındaki dalga boyu taramaları yapılmıştır. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyları belirlenmiş ve geliştirilen analitik metotlarda bu dalga boyları kullanılmıştır. Maksimum absorbans değerleri distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu için 276 nm olarak bulunmuştur.

Diklofenak sodyumun pH 7,4 fosfat tamponu ve distile suda kalibrasyon doğrularının elde edilmesi amacıyla 100 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. 100 µg/mL'lik stoklar, çeşitli konsantrasyonlarda seyreltilerek 276 nm'de UV-Visible spektrofotometre cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve bilinen çözelti konsantrasyonlarına lineer regresyon uygulanarak, iki parametre arasındaki ilişkiyi açıklayan doğru denklemleri elde edilmiştir. Çalışmalar üç paralel olarak yürütülmüştür. Geliştirilen analitik yöntemlerin validasyonu ICH Q2(R1) kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda doğrusalılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve stabilite testleri yapılmıştır. Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı değerleri hesaplanmıştır.

Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları kapsamında, analitik yöntemin geliştirilmesi ile elde edilen doğru denklemlerinin determinasyon katsayısı (r^2) incelenmiştir. r^2 değerinden hareketle kalibrasyon doğrularının doğrusalılığı değerlendirilmiştir.

Seçicilik

Seçicilik çalışmaları için, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin yaklaşık 100 µg/mL konsantrasyona sahip distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki çözeltilerinin 200-

400 nm aralığındaki UV spektrumları taranmıştır. Ayrıca mikroiğne formülasyonlarının in vitro salım çalışması kapsamında kullanılan alüminyum folyo ve adeziv bantın (CoTran PTGA, 3M Pharmaceuticals, ABD) ortama verebileceği kirliliklerin analizi etkilemeyeceğinden emin olmak için 50 mL pH 7,4 fosfat tamponu ortamına, yaklaşık 1 cm² alana sahip ilgili materyaller eklenerek ortam sıcaklığında 12 saat karıştırılmış ve 200-400 nm aralığındaki UV spektrumları taranmıştır. Bu kapsamda, diklofenak sodyumun maksimum absorbans gösterdiği ve analizlerin yapıldığı dalga boylarında, yardımcı maddelerin absorbans gösterip göstermediği kontrol edilmiştir.

Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında, hem distile su hem de pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için gerçek etkin madde miktarının doğru olarak tayin edebildiklerini göstermek amacıyla, her iki ortam için 8, 10 ve 12 µg/mL konsantrasyonlara sahip olduğu bilinen 3 stoktan ölçümler yapılmış ve yüzde geri elde değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin %97-103 aralığında olması beklenmektedir.

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında, arka arkaya yapılan ölçümlerin birbirine yeterince yakın olduğunu göstermek amacıyla, her iki ortam için 4 µg/mL konsantrasyona sahip stoktan yapılan 10 ölçümün bağıl standart sapması belirlenmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmalarında, farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin tutarlılığının belirlenmesi amacıyla, her iki ortam için 6, 10 ve 15 µg/mL'lik stoklar, 3 farklı gün içerisinde ölçülerek bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olması beklenmektedir.

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında yapılacak analizlerdeki ölçülebilir en düşük etkin madde konsantrasyonunun belirlenmesi için duyarlılık sınırı (LOD) ve kantitatif olarak analiz edilebilir en düşük konsantrasyonunun belirlenmesi için saptama sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. LOD ve LOQ, sırasıyla Eş. 3.1 ve Eş. 3.2'ye göre belirlenmiştir.

$$\text{LOD} = (3,3 \times \text{SS}) / E \quad (3.1)$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{SS}) / E \quad (3.2)$$

Bu eşitliklerde, SS en düşük konsantrasyonun standart sapmasını, E ise kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir.

Stabilite

Yapılan çalışmalar süresince örneklerin stabil olduğunu göstermek amacıyla stabilite çalışmaları yapılmıştır. Stabilite çalışmaları kapsamında, her iki ortam için 20 µg/mL'lik stoklardan alınan üç örnek, 5, 25 ve 40°C'de 48 saat bekletilerek, 24 ve 48. saatteki bağıl sapma değerleri hesaplanmıştır. Bağıl sapma değerinin %2'den küçük olması beklenmektedir.

HPLC analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Mikroiğne ve veziküler sistem formülasyonlarının ex vivo deriden geçiş ve etkin madde miktar tayini çalışmalarında kullanılmak üzere metanol ortamında analiz yapılması planlanmıştır. Diklofenak sodyumun, bu ortamdaki maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun belirlenmesi amacıyla metanolde yaklaşık 10 µg/mL'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti, kullanılan HPLC'de dalga boyu taraması özelliği bulunmaması nedeniyle, UV-Visible spektrofotometre cihazı (708-DS, Agilent Technologies, Singapur, Malezya) ile, 200-400 nm aralığındaki dalga boyu taraması yapılmıştır. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu 282 nm olarak belirlenmiştir.

Diklofenak sodyumun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent Technologies 1200 Series, ABD) ile analiz metodu, pH 7,4 fosfat tamponu, distile su ve metanoldeki stok çözeltilerinden hareketle hazırlanan belirli konsantrasyondaki standartların verdiği pik alanlarının, konsantrasyona karşı regresyon işlemi uygulanması ile geliştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril:10 mM orto-fosforik asit çözeltisi (55:45), sabit faz olarak 4,6x150 mm, 100 Å por çapına sahip C18 kolon (ACE Columns, İrlanda) kullanılmıştır. Analizlerin yapıldığı dalga boyu distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu için 276 nm, metanol için 282 nm'dir. Metot şartları 1 mL/dk akış hızı, 35°C kolon sıcaklığı, distile su ve metanol ortamları için 20 µL, pH 7,4 fosfat tamponu için 5 µL enjeksiyon hacmi olarak belirlenmiştir.

Çalışmalar üç paralel halinde yapılmıştır. Geliştirilen analitik yöntemlerin validasyonu ICH Q2(R1) kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda doğrusalılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve stabilite testleri yapılmıştır. Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı değerleri hesaplanmıştır.

Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları kapsamında, analitik yöntemin geliştirilmesi ile elde edilen doğru denklemlerinin determinasyon katsayısı (r^2) incelenmiştir. r^2 değerinden hareketle kalibrasyon doğrularının doğrusalılığı değerlendirilmiştir.

Seçicilik

Seçicilik çalışmaları için, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin yaklaşık 100 µg/mL konsantrasyona sahip pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamındaki çözeltilerinin kromatogramları incelenmiştir. Ayrıca metanol ortamında deride kalan etkin madde miktarının analizi yapılacağından, sıçan derisinin ortama verebileceği kirliliğin belirlenmesi amacıyla, sadece sıçan derisinin metanol ortamında karıştırılması sonrası elde edilen süzüntünün kromatogramı incelenmiştir. Bu kapsamda, elde edilen kromatogramlardaki piklerin, diklofenak sodyumun alıkonma zamanından farklı alıkonma zamanı gösterip göstermedikleri kontrol edilmiştir.

Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında, distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamları için gerçek etkin madde miktarının doğru olarak tayin edebildiklerini göstermek amacıyla, her üç ortam için 5, 10 ve 15 µg/mL konsantrasyonlara sahip olduğu bilinen 3 stoktan yapılan ölçümlerde, yüzde geri elde değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin %97-103 aralığında olması beklenmektedir.

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında, arka arkaya yapılan ölçümlerin birbirine yeterince yakın olduğunu göstermek amacıyla, distile su için 2 µg/mL, pH 7,4 fosfat

tamponu için 30 µg/mL ve metanol için 5 µg/mL konsantrasyona sahip stoklardan yapılan 6 ölçümün bağıl standart sapması belirlenmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmalarında, farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin tutarlılığının belirlenmesi amacıyla, tüm ortamlar için 5, 10 ve 20 µg/mL'lik stoklar, 3 farklı gün içerisinde ölçülerek bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olması beklenmektedir.

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması, UV-Visible spektrofotometrik analizin validasyonunda yapılan aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Stabilite

Yapılan çalışmalar süresince örneklerin stabil olduğunu göstermek amacıyla yapılan stabilite çalışmaları kapsamında, distile su ve metanol için 30 µg/mL'lik stoktan, pH 7,4 fosfat tamponu için 50 µg/mL'lik stoktan alınan üç örnek, 5, 25 ve 40°C'de 72 saat (metanol için 48 saat) bekletilerek, 24, 48 ve 72. saatteki bağıl sapma değerleri hesaplanmıştır. Bağıl sapma değerinin %2'den küçük olması beklenmektedir.

Sağlamlık

Tampon molaritesinin analiz doğruluğunu etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi amacıyla pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için sağlamlık validasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, 3 farklı molaritede pH 7,4 fosfat tamponu kullanılarak, 5 µg/mL'lik konsantrasyona sahip diklofenak sodyum çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler HPLC ile analiz edilerek, analiz yönteminin geliştirildiği 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponuna göre bağıl sapmaları hesaplanmıştır. Bağıl sapma değerinin %2'den küçük olması beklenmektedir.

3.2.4. Mikroiğne formülasyonlarının geliştirilmesi

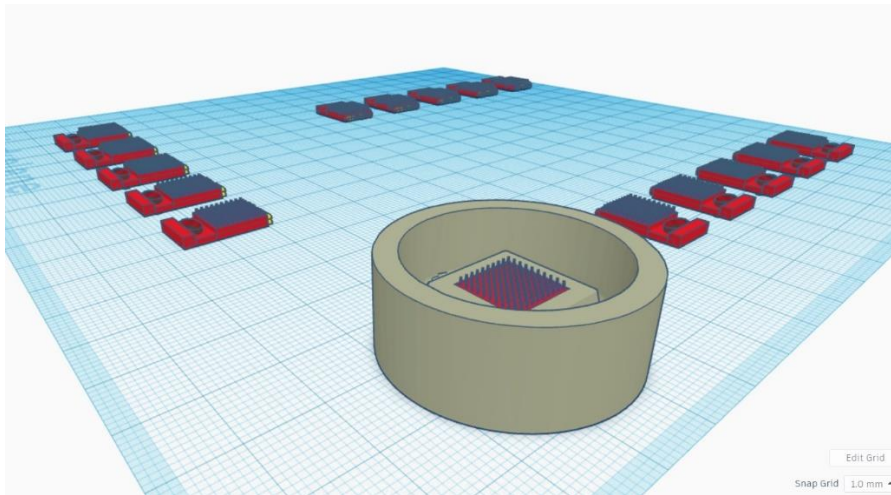
Mikroiğne formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi

Polimerik mikroiğne formülasyonlarının geliştirilmesi için doğrudan kalıp dolum yöntemi kullanılmıştır. Kalıbın oluşturulması işlemi ana kalıbın eşlenmesi prensibine dayanır. Ana

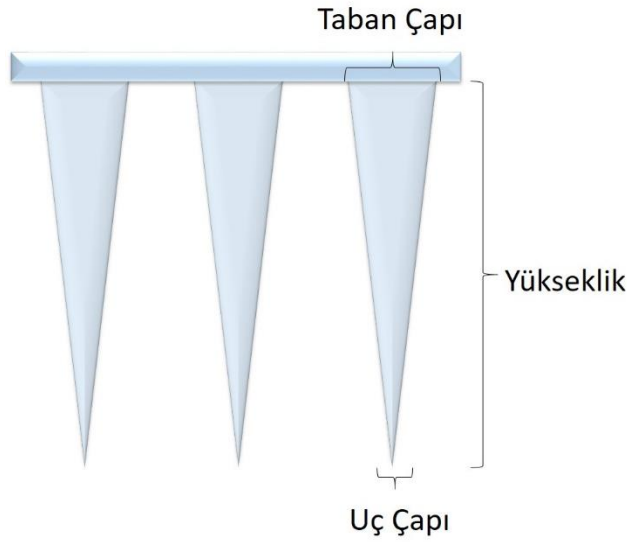
kalıp olarak, yaklaşık 500 μm uzunluğunda 10x10 mikroiğne dizisine sahip 3 boyutlu baskı teknolojisi ile üretilmiş solid mikroiğneler kullanılmıştır.

Ana kalıp üretimi

Ana kalıpların üretimi için stereolitografi temelli (SLA) 3 boyutlu yazıcı (Formlabs Form 3, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle ana kalıbı istenilen boyutlarda elde edebilmek için, CAD programları (Tinker CAD®, Autodesk®) ile farklı boylara (800, 900, 1000, 1100, 1200 μm) ve taban çaplarına sahip (200, 250, 300 μm), 10x10 koni şeklinde mikroiğne dizileri tasarlanmıştır (Şekil 3.1). SLA 3 boyutlu yazıcı, Z eksen birim uzunluğu 50 μm 'ye ayarlanarak yazdırma işlemi gerçekleştirilmiş ve mikroiğne dizileri elde edilmiştir. Elde edilen mikroiğnelerin boyutları optik mikroskop yardımı ile (Olympus IX53 inverted microscope, Japonya) ölçülmüştür. Mikro boyutlarda yapılan tasarımlarda, SLA 3 boyutlu yazıcıların yazdırma çözünürlüğünden kaynaklanan farklılar meydana gelmektedir (Krieger ve diğerleri, 2019). Bu nedenle girdi parametreleri ile çıktı parametreleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Üretilen solid mikroiğnelerin ölçülen yükseklik, taban çapı ve uç çapı uzunlukları (Şekil 3.2) karşılaştırılmış ve gerçekte elde edilen boyutlar ile tasarlanan boyutlar arasındaki matematiksel ilişki değerlendirilmiştir. Elde edilmek istenilen 500 μm uzunluk ve 250 μm taban çapına en yakın olan tasarım seçilerek ana kalıp olarak kullanılmıştır.



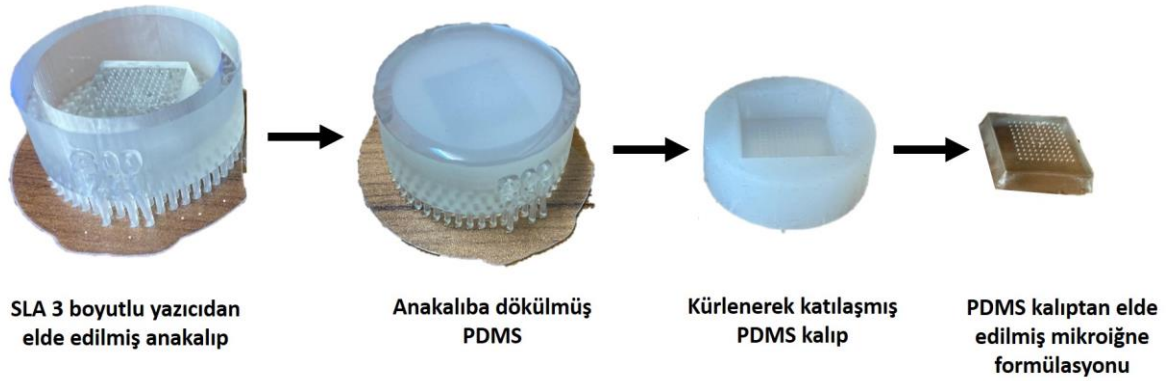
Şekil 3.1. 800, 900, 1000, 1100, 1200 μm boy ve 200, 250, 300 μm taban çapı kombinasyonlarından oluşan 10x10 mikroiğne dizilerine ait CAD tasarımı



Şekil 3.2. Anakalıbı oluşturan solid mikroiğnelerin şematik gösterimi

Ana kalıptan hareketle polidimetil siloksan (PDMS) mikroiğne kalıbının oluşturulması

Ana kalıp, oda sıcaklığında kürlenebilen (döküldüğü alanın şeklini alarak çapraz bağlanıp, katılaşabilen) platin temelli gıda sınıfı polidimetil siloksan (PDMS) yapısındaki kalıp silikonu yardımı ile eşlenerek, mikroiğne kalıpları oluşturulmuştur. A (PDMS) ve B (platin temelli kürlleme ajanı) komponentlerinin eşit oranda karıştırılması sonrası 1 saat içerisinde katılaşmaya başlayan kalıp silikonu, karıştırma sırasında oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması amacıyla 3000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş (Nüve NF800, Türkiye), ardından kalıp ayırıcı sıkılan ana kalıp üzerine dökülmüştür. 24 saat ortam sıcaklığında bekleyen ve kürlenerek tamamen katılaşan silikon kalıplar, ana kalıptan ayrılarak, polimerik mikroiğne formülasyonlarının geliştirilmesi için kullanılmıştır (Şekil 3.3). Her bir kalıbın üretimi için tüm süreç yaklaşık olarak 26 saat sürmektedir.



Şekil 3.3. PDMS mikroigne kalıplarının üretimi

Mikroigne formülasyonlarında kullanılmak üzere diklofenak sodyum dozunun belirlenmesi

Mikroigne formülasyonlarında kullanılmak üzere diklofenak sodyum dozu, aktinik keratoz tedavisinde kullanılmakta olan ve %3 diklofenak sodyum içeren Aklofen Jel® (Lilyum İlaç, Türkiye) (eşdeğer ürün) ve Solaraze Gel® (Almirall, S.A., İspanya) (orijinal ürün) müstahzarının kısa ürün bilgisine (KÜB) göre belirlenmiştir. İlgili müstahzarların KÜB'üne göre, %3 diklofenak sodyum içeren jelin uygulama miktarı $500 \text{ mg} / 25 \text{ cm}^2$ 'dir. Bu durumda tedavi için uygulanan diklofenak sodyum dozu $600 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olmaktadır. Bu dozun sağlanabilmesi için, toplam 10 g olacak şekilde polimer ve su karışımının içersine 35 mg diklofenak sodyum konulmuştur. Kalıplara dökülen 600 mg'lık polimer karışımları ile $1 \times 1 \text{ cm}^2$ alana sahip bir mikroigne filminde 2,1 mg diklofenak sodyum olması sağlanmıştır. Mikroigne kalıbının şekli nedeniyle oluşan kenar kısımları kesilmiştir. Kenar kısımlarının çıkartılması sonrası elde edilen mikroigne filmlerinin ağırlığı ile tüm film ağırlığı oranı yaklaşık 0,4 olarak belirlenmiştir. Bu durumda yaklaşık $800 \text{ } \mu\text{g} / \text{cm}^2$ diklofenak sodyum dozu sağlanmaktadır.

Mikroigne formülasyonlarının hazırlanması

Öncelikle mikroigne formülasyonlarının temelini oluşturan, etkin madde içeren polimer karışımları hazırlanmıştır. Bu karışımları, çözelti ya da süspansiyon formunda olabildiği için bu karışımlar genel olarak “polimer karışımları” (polimerler + etkin madde + su) olarak tanımlanacaktır. Polimer karışımlarının mikroigne filmi oluşturabilmesi, karışımların reolojik özellikleri ve kalıp materyal olan PDMS ile yaptığı temas açısıyla ilişkili olduğu

bilinmektedir. Bu nedenle tüm polimer karışımlarının bu iki özelliği incelenmiştir (Jang, Tang, Schwendeman ve Prausnitz, 2022; Wang, Yao, Dong, Gong, Li ve diğerleri, 2015).

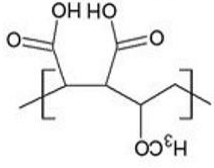
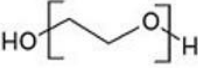
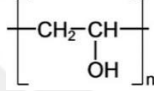
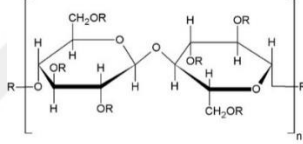
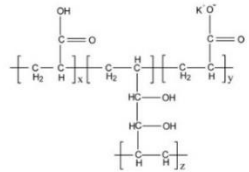
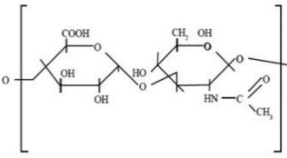
Polimer karışımlarının hazırlanması: Oda sıcaklığındaki 10 g distile su içerisinde 35 mg diklofenak sodyum çözülmüş ve etkin madde çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından ilgili formülasyon karışımlarında yer alan polimerik maddeler (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3) sırayla etkin madde çözeltisine eklenerek, homojen bir karışım elde edilebilmesi için 250 rpm’de manyetik karıştırıcı üzerinde en az 4 saat karıştırılmıştır.

Mikroiğne formülasyonlarının hazırlanması: Homojen duruma gelen karışımlar darası alınmış silikon mikroiğne kalıplarına, enjektör yardımı ile 600 mg ağırlığında dökülmüş ve doğrudan dolum gerçekleştirilmiştir. Kalıp içerisindeki polimer karışımlarının, iğne deliklerine tam dolumunu gerçekleştirmek ve olası hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için, rotor merkezi ile 180° açı oluşturabilen açılır rotorlu santrifüj cihazında (Nüve NF800, Türkiye) 30 dakika boyunca 2500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra polimer karışımlarını taşıyan kalıplar laminar akım altına bırakılarak, oda sıcaklığında 48 saat boyunca kurutulmuştur. Kurumanın ardından elde edilen mikroiğne formülasyonları kalıptan çıkartılmıştır. 24 saat boyunca 80°C’lik etüvde bekletilerek çapraz bağlanması sağlanmıştır (Donnelly ve diğerleri, 2014). Bölüm 4.2. “Diklofenak sodyumun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi” başlığı altında belirtildiği üzere, diklofenak sodyumun 80°C’de stabil olduğu gösterilmiştir. İlgili mikroiğne formülasyonlarının ayrıntılı içerikleri Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4’te verilmiştir. Her bir formülasyonun hazırlanması yaklaşık olarak 4 gün sürmüştür.

Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin belirlenmesi

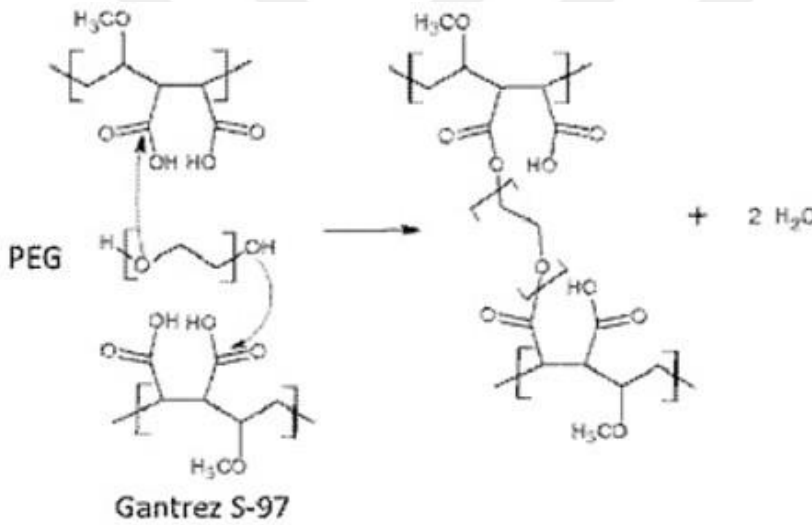
Aşağıda mikroiğne formülasyonlarının üretiminde kullanılan polimerlere ait bilgilerin verildiği Çizelge 3.1 yer almaktadır. Bu polimerlerin etkin madde ile fiziksel karışımları ve mikroiğne haline getirildikten sonraki şekilleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ve Foriuer Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile incelenmiştir (Bölüm 4.4). Ayrıca formülasyon haline getirilen polimerlerin sitotoksisiteleri incelenmiştir (Bölüm 4.10).

Çizelge 3.1. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin ticari isimleri, kimyasal yapıları, kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve kullanım amaçları

Polimerler	Kimyasal yapıları	Kapalı formülü	Molekül ağırlıkları	Kullanım amaçları	Kaynak
Polivinil metileter-Maleik asit kopolimeri (PVME-MA) (Gantrez™ S97)		$(C_4H_4O_4 \cdot C_3H_6O)_n$	1500 kDa	Film oluşturuç polimer	(Larraneta, Lutton, Brady, Vicente-Perez, Woolfson ve diğerleri, 2015)
Polietilen glikol (PEG)		$(C_2H_4O)_nH_2O$	0,4 kDa 1,5 kDa 6 kDa	Çapraz bağlayıcı polimer	(De Martino, Battisti, Napolitano, Palladino, Serpico ve diğerleri, 2022; Larraneta ve diğerleri, 2015)
Polivinil alkol (PVA) (Polyviol G 40/140)		$(C_2H_4O)_n$	20 kDa	Mekanik dayanıklılığı artırmak	(Chen, Ashfaq, Zhang, Zhang ve Guo, 2018)
Hidroksipropil metilselüloz (HPMC) (Affinisol™ HPMC HME 15LV)		$C_{56}H_{108}O_{30}$	<100 kDa	Mekanik dayanıklılığı artırmak	(Quinten, De Beer, Remon ve Vervaet, 2011; B. Wang, Zhang, Zhao, Lian ve Gao, 2022)
Polikarbofil (Noveon® AA-1 Polycarbophil)		$(C_{20}H_{18}Ca_4O_{18})_n$	Yüksek molekül ağırlıklı	Mekanik dayanıklılığı artırmak	(Hamman, 2010; Kraisit, Limmatvapirat, Nunthanid, Sriamornsak ve Luangtana-Anan, 2017)
Hyaluronik asit		$(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$	400 kDa	Epidermal tutulumu artırmak, mekanik dayanımı artırmak, film oluşturmak	(Cilurzo, Vistoli, Gennari, Selmin, Gardoni ve diğerleri, 2014; Shakouri, Parvan, Adljouy ve Abdolalizadeh, 2020)

Mikroiğne formülasyonlarının üretiminde ana polimerler olarak polivinilmetileter-maleik asit kopolimeri (PVME-MA) (Gantrez S97), polietilenglikol (PEG) ve hyaluronik asit kullanılmıştır.

İlk aşamada geliştirilen mikroiğne formülasyonları, Gantrez S97 ve farklı molekül ağırlıklarına sahip PEG'ler (PEG400, PEG1500 ve PEG6000) kullanılarak üretilmiştir (F1-F3). Gantrez S97 ve kullanılan PEG'lerin molar oranı sabit tutulmuştur (1:0,75). Molar oranın sabit tutulması çapraz bağlanma reaksiyonuna katılan PEG terminal hidroksil gruplarının sayısının sabit tutulmasını sağlamıştır. Optimum şişme ve mekanik özelliklerine göre uygun molekül ağırlığına sahip PEG seçilmiştir. Şekil 3.4'te Gantrez S97 ve PEG arasında gerçekleşen termal çapraz bağlama reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.4. Gantrez S97 ile PEG arasında gerçekleşen termal çapraz bağlama reaksiyonu (Lutton ve diğerleri, 2015)

Daha sonraki formülasyonlarda (F4-F6), polikarbofil, polivinilalkol (PVA) ve hidroksiipropilmetilselüloz (HPMC) kullanılarak, bu polimerlerin mikroiğne formülasyonlarının mekanik dayanıklılığı ve şişme indeksi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu aşamadan sonra, en yüksek mekanik dayanıklılık ve en yüksek şişme indeksine sahip olduğu belirlenen formülasyonların polimerleri kullanılarak deneysel tasarım aşamasına geçilmiştir. Bu aşamaya kadar olan formülasyonların içerikleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. PEG1500 ve polikarbofil içeren mikroiğnelerin, mekanik dayanıklılık ve şişme indeksi açısından daha iyi performansa sahip olması nedeniyle deneysel tasarım aşamasında bu polimerlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Hyaluronik asitin, deride ilaç tutulumu artırmasına yönelik literatürden elde edilen bilgiler dahilinde, optimum formülasyonlarda

mutlak olarak yer alması planlanmıştır (Franzé, Marengo, Stella, Minghetti, Arpicco ve Cilurzo, 2018). Sonuç olarak, deneysel tasarım aşamasında Gantrez S97, PEG1500, polikarbofil ve hyaluronik asit polimerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Farklı PEG molekül ağırlıkları ve farklı polimerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin incelenmesi amacıyla üretilen mikroiğne formülasyonlarının içerikleri

Formülasyonlar	Diklofenak sodyum (% a/a)	Gantrez S97 (% a/a)	PEG (% a/a)	PVA (% a/a)	HPMC (% a/a)	Polikarbofil (% a/a)	Distile Su y.m. (% a/a)
F1	0,35	20	4,5 ^a	-	-	-	100
F2	0,35	20	1,125 ^b	-	-	-	100
F3	0,35	20	0,3 ^c	-	-	-	100
F4	0,35	20	1,125 ^b	1	-	-	100
F5	0,35	20	1,125 ^b	-	-	1	100
F6	0,35	20	1,125 ^b	-	1	-	100
^a PEG6000, ^b PEG1500, ^c PEG400							

Deneysel tasarım kullanılarak optimum mikroiğne formülasyonlarının belirlenmesi

Kullanılacak polimerlerin belirlenmesinin ardından deneysel tasarım (DoE) ile optimum formülasyonlarda kullanılacak polimer oranlarının belirlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla Box-Behnken Tasarımı (BBD), merkezi kompozit tasarıma göre daha az sayıda çalışma gerektirdiğinden DoE için yanıt yüzeyi yöntemi olarak seçilmiştir (Mahmoud ve McConville, 2023). BBD, Design Expert® 13.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gantrez S97-PEG1500 oranı sabit tutulmak üzere, formülasyondaki Gantrez S97-PEG1500 yüzdesi, hyaluronik asit yüzdesi ve polikarbofil yüzdesi bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Polimer yüzdelerinin, şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, bu iki parametre bağımlı değişkenler olarak tanımlanmıştır. BBD kapsamında üç merkezi nokta tasarımıyla 15 formülasyon hazırlanmıştır. Çizelge 3.3'te, BBD ile geliştirilen formülasyonların içerikleri görülmektedir.

Çizelge 3.3. Box-Behnken Tasarımı kapsamında üretilen mikroiğnelerin içerikleri

Formülasyonlar	Diklofenak sodyum (% a/a)	Hyaluronik asit (% a/a)	Polikarbofil (% a/a)	Gantrez S97 (% a/a)	PEG1500 (% a/a)	Distile Su y.m. (% a/a)
F7	0,35	1	1	15	0,843	100
F8	0,35	0,1	1	15	0,843	100
F9	0,35	0,1	0,1	15	0,843	100
F10	0,35	0,1	0,55	20	1,125	100
F11	0,35	0,1	0,55	10	0,563	100
F12	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F13	0,35	1	0,55	20	1,125	100
F14	0,35	0,55	1	10	0,563	100
F15	0,35	1	0,1	15	0,843	100
F16	0,35	0,55	0,1	20	1,125	100
F17	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F18	0,35	1	0,55	10	0,563	100
F19	0,35	0,55	0,1	10	0,563	100
F20	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F21	0,35	0,55	1	20	1,125	100

Hazırlanan 15 formülasyonun (F7-F21) mekanik dayanıklılık ve şişme indeksleri saptanmış ve sonuçlar Design Expert® 13.0 yazılımına tanımlanarak, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişki belirlenmiştir. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişkiyi tanımlayan denklem kullanılarak, tasarım aralığında yer alan, mekanik dayanıklılığın ve şişme indeksinin en fazla olabileceği formülasyonlar belirlenmiştir. Belirleme aşamasında en yüksek mekanik dayanıklılık “çok önemli” olarak, en yüksek şişme indeksi ise “çok önemli”, “az önemli” ve “önemsiz” olarak tanımlanmıştır. Bunun sonucunda, yazılım tarafından belirlenen üç farklı optimum formülasyon (F22-F24) bileşimi ortaya çıkmıştır. İn vitro karakterizasyon çalışmaları bu üç optimum formülasyon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların içerikleri Çizelge 3.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Box-Behnken Tasarımı sonucunda, Design Expert® 13.0 yazılımı tarafından önerilen optimum mikroiğne formülasyonlarının bileşenleri ve oranları

Formülasyonlar	Diklofenak sodyum (% a/a)	Hyaluronik asit (% a/a)	Polikarbofil (% a/a)	Gantrez S97 (% a/a)	PEG1500 (% a/a)	Distile Su y.m. (% a/a)
F22	0,35	0,1	0,1	20	1,125	100
F23	0,35	0,42	0,1	20	1,125	100
F24	0,35	1	0,1	20	1,125	100

3.2.5. Mikroiğne formülasyonlarının karakterizasyonları

Polimer karışımları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları

Polimer karışımlarının mikroiğne oluşumu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, polimer karışımlarının iki özelliği incelenmiştir. Polimer karışımlarının mikroiğne oluşumunu sağlayabilmesi için, silikon kalıplar üzerinde yer alan iğne deliklerini tam olarak doldurmaları gerekmektedir. Bu çerçevede, iğne deliklerinin dolumunu etkileyebilecek en önemli parametrelerin, polimer karışımlarının reolojik özellikleri ve kalıp materyali ile oluşturduğu temas açıları olabileceği öngörülmüştür (Jang ve diğerleri, 2022; Q. Wang ve diğerleri, 2015). Bu iki parametrenin iğne oluşumu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Polimer karışımlarının reolojik özellikleri

Polimer karışımlarının reolojik özellikleri çok noktalı koni-tabla prensibine dayanan reometre ile (Brookfield, DV-III Rheometer, ABD) belirlenmiştir. Optimum mikroiğne formülasyonlarının üretimi için kullanılan polimer karışımları 0,5 mL hacimde örnek tablasına konulmuş ve spindle CPE-51 kullanılarak 25°C’de analiz edilmiştir. Farklı kayma hızlarındaki kayma gerilimleri ölçülerek kayma gerilim–kayma hızı ve viskozite-kayma hızı grafikleri oluşturulmuştur. Viskozite-kayma hızı grafikleri Ostwald de Waele Power-Law eşitliği kullanılarak doğrusallaştırılmıştır. Her bir kayma hızı için kaydedilen 3 farklı kayma gerilim değerinin ortalaması dikkate alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Ostwald de Waele eşitliği Eş. 3.3 ve Eş.3.4’te gösterilmiştir.

$$\text{Viskozite} = K (\text{Kayma hızı})^{(n-1)} \quad (3.3)$$

$$\text{Log(Viskozite)} = \text{Log}(K) + (n-1)\text{Log(kayma hızı)} \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte, K akış kıvam indeksini, n ise akış davranış indeksini ifade etmektedir. Viskozite birimi “cP (mPa.sn)”, K değerinin birimi “mPa.snⁿ”, kayma hızı birimi “sn⁻¹” ve n değeri birimsizdir. n<1 psödoplastik akışı, n=1 Newtonian akışı, n>1 ise dilatant akışı ifade etmektedir (Kumar, Sasmal ve Pal, 2008). n değeri ile birlikte kayma hızının sabit tutulması durumunda, K değeri doğrudan akışa karşı olan direnci ifade etmektedir (Kapadia, Qin, Zhao, Phan, Haines ve diğerleri, 2022).

Polimer karışımlarının PDMS ile temas açısı tayini

Polimer karışımlarının hazırlanacak olan mikroğne kalıbının materyali olan PDMS ile yaptığı temas açısı optik tensiyometre cihazı yardımı ile ölçülmüştür. PDMS tabaka üzerine damlatılan polimer karışımları, optik görüntüleme ile analiz edilmiştir. Ölçümler, her bir çözelti için 20 saniyelik görüntüleme boyunca toplam 20 kez gerçekleştirilmiştir.

Mikroğneler üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları

DSC analizi

Diferansiyel Taramalı Kalometri (DSC) analizi, mikroğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Toplamda yaklaşık 2 mg ağırlığında olacak şekilde toz diklofenak sodyum, Gantrez S97, PEG1500, hyaluronik asit, polikarbofil, tüm polimerlerin diklofenak sodyumla 1:1 fiziksel toz karışımları ve havanda toz haline getirilmiş optimum mikroğne formülasyonları (F22-F24) alüminyum panlar içerisine konularak DSC cihazında (Shimadzu, DSC-60, Japonya) analiz edilmiş ve termogramları elde edilmiştir. Çalışmalar azot gazı altında 10°C/dk hızla ısıtma gerçekleştirilerek, 25-320°C aralığında gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi, mikroğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi ve çapraz

bağlanarak hidrojel oluşturuocu forma getirilen mikroiğne formülasyonlarının çapraz bağlanma sonrası moleküler değişimlerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Toz diklofenak sodyum, Gantrez S97, PEG1500, hyaluronik asit, polikarbofil, tüm polimerlerin diklofenak sodyumla 1:1 fiziksel toz karışımları ve havanda toz haline getirilmiş optimum mikroiğne formülasyonları (F22-F24) FTIR spektrofotometresinin (Perkin-Elmer, Spectrum 400, ABD) analiz kristali üzerine konularak analiz edilmiştir. 4000-600 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilen analiz sonucunda IR spektrumları elde edilmiştir.

Şişme indeksi

Mikroiğne formülasyonlarının zamana karşı şişme seviyelerini değerlendirmek için, 5x5 iğne içerecek şekilde kesilen mikroiğne formülasyonları, yüzmelerini engellemek için metal ataçlara tutturulmuştur. Ataçlanmış mikroiğne filmleri, her zaman noktasında tartılması amacıyla tampon içerisinden çıkarılırken parçalanmasını engellemek için metal diskler üzerine konulmuştur. Şişme testi için hazır hale getirilen bu yapılar pH 7,4 fosfat tamponu içeren ve 37°C'lik su banyosu içerisinde bulunan beherlerin içerisine daldırılmıştır (Resim 3.1). Mikroiğne formülasyonları belirli zaman aralıklarında tampon ortamından çıkarılmış ve filtre kağıdı yardımı ile örnek üstünde kalan fazla tampon uzaklaştırılmıştır. Ardından tartım yapılarak her zaman noktası için mikroiğne film ağırlıkları belirlenmiştir. Çalışmalar üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir zaman noktası için şişme indeksi Eş. 3.5'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şİ} = (A_t - A_0) / A_0 * 100 \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte, Şİ şişme indeksini (% şişme), A₀ mikroiğne filminin başlangıç ağırlığını (mg) ve A_t tamponda bekletilen filmin ağırlığını (mg) ifade etmektedir (Nakhat, Kondawar, Rathi ve Yeole, 2008). Daha sonra zamana karşı şişme indeksi verileri grafiğe geçirilmiş, denge durumuna ulaşma zamanı ve şişme hızı parametreleri hesaplanmıştır.



Resim 3.1. 5x5 iğne içeren mikro iğne formülasyonlarının şişme testlerinin gerçekleştirilebilmesi için hazırlanan örnekler

Mekanik dayanıklılık

Mekanik dayanıklılık, mikro iğnenin deriye uygulanması sırasında karşılaştığı kuvvete karşı dayanıp dayanmayacağı ya da kırılıp kırılmayacağını gösteren önemli bir özelliktir. Geliştirilen mikro iğne formülasyonlarının mekanik dayanıklılıklarını saptamak için yapı analiz cihazı kullanılmıştır. Cihazın sıkıştırma modunda sertlik değerleri ölçülmüştür. 2 iğne içerecek şekilde kesilen mikro iğne formülasyonları, yapı analiz cihazının taban platformuna iğneler dikey konumda olacak şekilde yerleştirilmiştir. Alüminyum prob, iğne ucu ile temas noktasından itibaren 0,1 mm/s hızla 250 μ m mesafeye kadar indirilmiş ve iğnelerin gösterdiği karşı kuvvet kaydedilmiştir. Böylece iğne başına düşen dikey sertlik değeri (N) elde edilmiştir. Ölçümler en az on kez tekrarlanmıştır (Badhe, Adkine ve Godse, 2021).

Etkin madde miktar tayini

Etkin madde miktar tayini çalışmaları için hazırlanan optimum mikro iğne formülasyonları, 10 mL metanol içeren ağzı sıkıca kapatılmış beherlerde 24 saat boyunca 250 rpm'de karıştırılmıştır. Alınan örnekler 0,22 μ m por çapına sahip PVDF/L filtrelerden süzülerek HPLC ile 282 nm'de analiz edilmiştir. Çalışmalar 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Optik mikroskop ile morfolojik inceleme

Optimum mikro iğne formülasyonlarının yükseklik, taban çapı ve uç çapını değerlendirmek için optik mikroskop (Olympus IX53 Inverse Microscope, Japonya) kullanılmıştır. 10 kez

büyütme oranında incelenen mikroiğnelerin ortalama boyutları, mikroiğne filmi üstünde bulunan, rastgele seçilmiş dokuz farklı iğnenin boyutlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 3.2).

SEM ile morfolojik inceleme

Optimum mikroiğne formülasyonlarının yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Quanta 400F, FEI Company, ABD) kullanılarak çeşitli büyüme oranları ile incelenmiştir. SEM incelemesi Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. SEM görüntüleri 30 kV gerilim altında, altın/paladyum kaplama sonrasında elde edilmiştir.

Ex vivo deri delme çalışmaları

Optimum mikroiğne formülasyonlarının ex vivo deri delme çalışmaları için, başka bir çalışmada kontrol grubu olarak kullanılıp kurban edilmiş sıçan derileri kullanılmıştır (Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Kodu: G.Ü.ET-21.075). Optimum mikroiğne formülasyonları 5x5 iğne içerecek şekilde kesilerek, tıraş edilmiş sıçan derilerine 30 saniye boyunca parmak kuvvetiyle uygulanmıştır. Mikroiğnelerin uygulandığı deriler 12 saat boyunca laminar akış altında kurutulmuştur. Böylece yüksek vakum gerektiren SEM görüntüleme için altın/paladyum kaplamaya hazır hale getirilmiştir (Pireddu, Schlich, Marceddu, Valenti, Pini ve diğerleri, 2020). Görüntülemeden önce mikroiğne formülasyonları pens yardımı ile deriden ayrılmıştır. Mikroiğne formülasyonlarının deride oluşturduğu porlar SEM yardımı ile görüntülenmiştir. Mikroiğnelerin şekinden kaynaklanan katmanlar sayılarak, iğnelerin teorik batma derinliği hesaplanmıştır.

Stabilite çalışmaları

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen mikroiğne formülasyonuna (F24) ait uzun süreli stabilite testleri ICH Q1A(R2) kılavuzunda belirtildiği gibi $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ortamında, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamında ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%75 \pm 5$ bağıl nem ortamında gerçekleştirilmiştir. 6 ay boyunca gerçekleştirilmiş çalışmalarda, başlangıç, 1., 3. ve 6. ay sonlarında test kabinlerinde yer alan, petri kabı içerisinde saklanan mikroiğne formülasyonlarından örnekler alınmıştır. Alınan mikroiğne formülasyonu örneklerinin etkin

madde miktarları, şişme indeksleri, sertlik değerleri, ağırlıkları ölçülmüş ve morfolojik incelemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Mikroigne formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları

Optimum mikroigne formülasyonlarından etkin madde salımının incelenmesi için iki farklı metot kullanılmıştır. İlk metot “beher yöntemi” olarak adlandırılacak olup, mikroigne filminin, herhangi bir polimerik hidrojel gibi kabul edildiği ve tüm yüzeylerinden etkin madde salımının incelendiği metottur (Dathathri ve diğerleri, 2020). İkinci metot ise “Franz difüzyon hücresi yöntemi” olarak adlandırılacak olup, yalnızca mikroigne filminin üzerinde yer alan iğnelerin yüzeyinden etkin madde salımının incelendiği metottur. Literatürde her iki metot da kullanılmış olup, ikinci metodun, gerçeğe daha yakın sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Larraneta ve diğerleri, 2016).

Beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

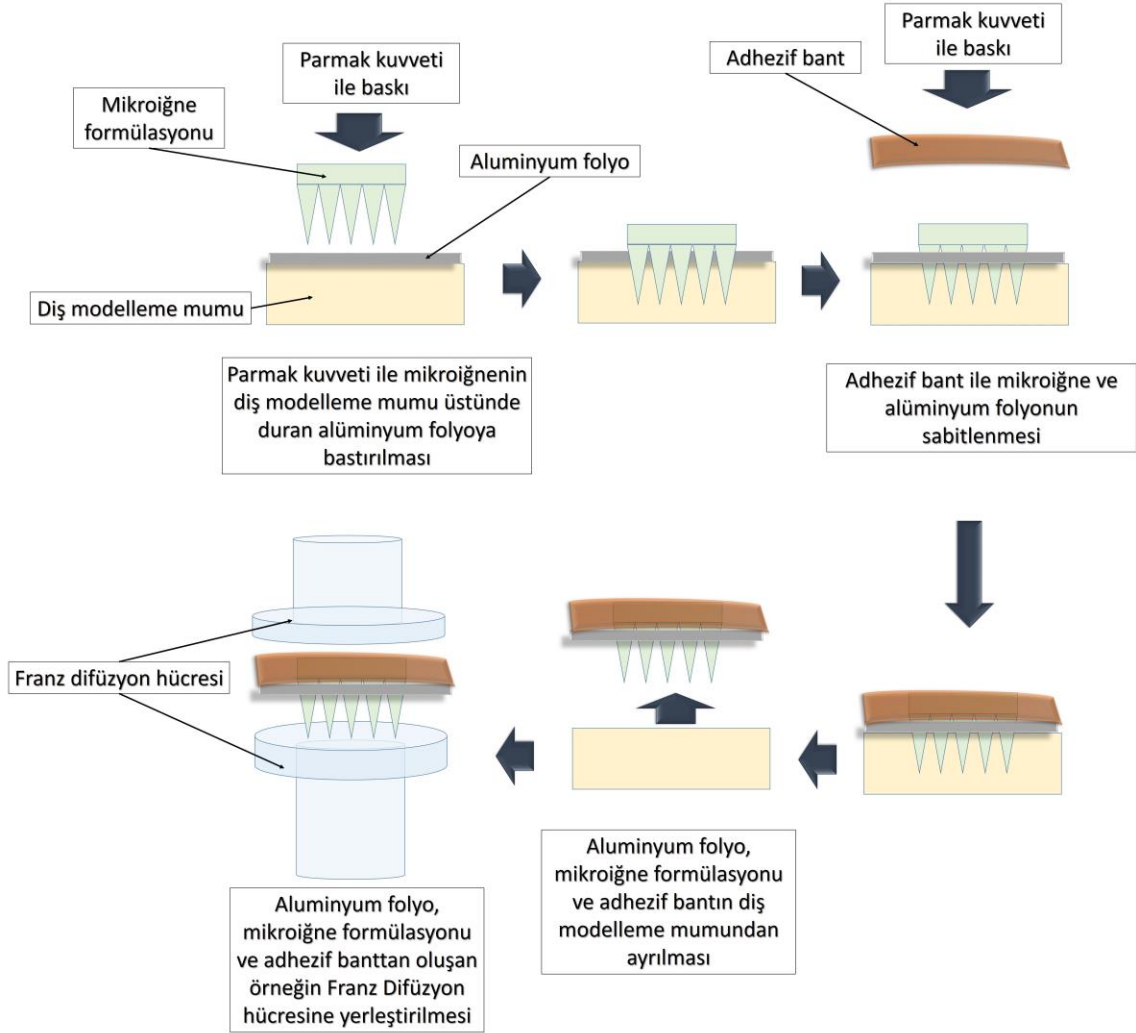
Bu çalışma, 10 mL pH 7,4 fosfat tamponu ortamında, 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Tüm mikroignelerden 5x5 iğne içeren kesitler alınmış ve her bir kesit, yüzmesini engelleyecek şekilde bir metal ataça tutturularak ortam içerisine atılmıştır. Manyetik karıştırıcı ile 50 rpm hızda karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında ortamdan örnekler alınarak UV-Visible spektrofotometrede 276 nm’de analiz edilmiştir. Gerekli hesaplamaların ardından zaman-% salınan etkin madde miktarı grafikleri oluşturulmuştur.

Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında Larrañeta ve arkadaşlarının geliştirdiği, yalnızca mikroignelerin alıcı faz ile temas halinde olduğu ve sadece iğneler aracılığıyla etkin madde salımının gerçekleştiği metot kullanılmıştır (Larraneta ve diğerleri, 2016). Bu metoda göre, Franz difüzyon hücresinin alıcı ve verici hücreleri arasına, üzerine mikroigne formülasyonunun bastırıldığı Parafilm M® yerleştirilerek, salımın sadece iğneler üzerinden gerçekleştirilmesi sağlanmaktadır. Ancak ilgili metot kullanıldığında 24 saatlik salım çalışması süresi sonunda Parafilm M®’nin reseptör bölmesinde yer alan 37°C’deki pH 7,4 fosfat tamponu ile teması sonucu eridiği ve hasar gördüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak Parafilm M® yerine alüminyum folyo kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir.

(Thakur, Tekko, Al-Shammari, Ali, McCarthy ve Donnelly, 2016). Bu amaçla alüminyum folyo, dış modelleme mumunun (dış paterninin elde edilmesi amacıyla dışçilikte kullanılan parafin bazlı bir mum filmi) üzerine yerleştirilmiş ve 5x5 iğne içeren mikroiğne kesitleri, parmak kuvvetiyle folyo üstüne bastırılmıştır (Donnelly, Majithiya, Singh, Morrow, Garland ve diğerleri, 2011). Farmasötik kalitede adhezif bant (CoTran PTGA, 3M Pharmaceuticals, ABD), mikroiğne filmlerinin üzerine uygulanmıştır. Böylece en alt tabakada alüminyum folyo, orta kısımda mikroiğne formülasyonu ve en üstte hazırlanan sistemi bir arada tutan adhezif banttıan oluştıan sandviç yapıındaki örnekler oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Bu örneklerin hazırlanmasındaki amaç, sadece iğne yapılarından etkin madde çıkışı sağlanarak gerçeğe daha yakın sonuçlar elde etmektir. Hazırlanan bu yapı, Franz difüzyon hücresine yerleştirilmiştir. Salım çalışması, reseptör bölmesinde pH 7,4 fosfat tamponu konularak 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda, 50 rpm hızda karıştırılarak, 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman noktalarında alınan ve 0,22 µm PVDF/L membran filtre ile süzülen numuneler, 276 nm'de HPLC ile analiz edilmiştir.

Optimum mikroiğne formülasyonlarının salım kinetiklerinin incelenmesi amacıyla DDSolver® yazılımı kullanılmıştır. r^2 , r^2_{adj} , AIC (Akaike Bilgi Ölçütü), and MSC (Model Seçim Kriteri) parametreleri kullanılarak Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin (Düzlemsel), Peppas-Sahlin (Silindirik) ve Weibull matematiksel modelleri ile, elde edilen %Salım-Zaman profillerinin uyumu incelenmiştir. Sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modelleri ile elde edilen uyum ölçütü değerlerinin, yukarıda belirtilen kinetik modeller ile kıyaslanamayacak düzeyde olması nedeni ile sonuçları paylaşılmamıştır.



Şekil 3.5. 5x5 iğne içeren mikroiğne formülasyonlarının alüminyum folyo ve adhezif bant arasına yerleştirilmesi ile hazırlanan in vitro salım örnekleri

Farmasötik kalitede adhezif banta etkin madde partisyonunun belirlenmesi

Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları için kullanılan farmasötik kalitede adhezif bant (CoTran PTGA, 3M Pharmaceuticals, ABD), 1x1 cm² alanda kesilerek, 20 mL'lik pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 50 µg/mL konsantrasyona sahip diklofenak sodyum çözeltisi içerisine konulmuştur. Oda sıcaklığında, 100 rpm'de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda, ortamdan alınan örnekler 0,22 µm PVDF/L membran filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edilmiştir. Partisyon yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Partisyon} = (A-B) / A \times 100 \quad (3.6)$$

Burada A başlangıçta çözeltideki diklofenak sodyum miktarı, B 24 saatin sonunda çözeltideki diklofenak sodyum miktarını ifade eder.

3.2.7. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının geliştirilmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılmak üzere diklofenak sodyum dozunun belirlenmesi

“Mikroiğne formülasyonlarında kullanılmak üzere diklofenak sodyum dozunun belirlenmesi” başlığı altında belirtildiği üzere, piyasada bulunan ve %3 diklofenak sodyum içeren jel müstahzarlarının KÜB’üne göre, aktinik keratoz tedavisi için $600 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ diklofenak sodyum uygulanması gereklidir. Esnek veziküler sistem formülasyonları toplamda 3 mL hacimde 20 mg diklofenak sodyum içerecek şekilde hazırlanmıştır. cm^2 ’ye yaklaşık 100 μL ’lik veziküler sistem formülasyonunun uygulanacağı varsayıldığında, yaklaşık $667 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ diklofenak sodyum dozu deriye uygulanmış olacaktır. 100 μL ’lik uygulama hacmine, ön denemeler sonucunda karar verilmiştir.

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretilmesi için film hidrasyon metodunun kullanılması planlanmıştır. Öncelikle kesecik yapısını oluşturacak temel bileşenlerden soya fosfatidilkolini (Lipoid S100), kolesterol ve epidermal tutulumu artırdığı bilinen dietilenglikol monoetiler (Transcutol CG) kullanılarak kaba veziküler sistemler oluşturulmuştur. Formülasyonların geliştirilmesi için, yardımcı maddelerin başlangıçta kullanılan miktarları literatüre göre belirlenmiştir (Alam, Imran, Gupta ve Akhtar, 2023; Briuglia, Rotella, McFarlane ve Lamprou, 2015; Manconi ve diğerleri, 2011). Kaba sistemin oluşturulması için 100 mg Lipoid S100, 50 mg kolesterol, 10 mg Transcutol CG ve 20 mg diklofenak sodyum kullanılmıştır (V1 formülasyonu). Bu sistem üzerinde, 3 dakika prob sonikasyon ve farklı sayılarda ekstrüzyon tekrarı yapılmıştır. İlgili işlemler Çizelge 3.5’te verilmiştir. En küçük kesecik boyutu (KB) ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerinin elde edildiği işlem olan, 3 dakika prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) ardından 10’ar kez 0,4 ve 0,2 μm por çapına sahip polikarbonat membranlardan ekstrüzyon işleminin uygun olduğuna karar verilmiştir (İşlem No: 9).

Çizelge 3.5. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretiminin geliştirilmesi sırasında yapılan işlemler (Kullanılan formülasyon: V1)

İşlem No:	İşlem:
1	İşlemsiz
2	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri)
3	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,8 µm por çaplı membrandan 5 kez ekstrüzyon
4	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,8 µm por çaplı membrandan 10 kez ekstrüzyon
5	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,4 µm por çaplı membrandan 5 kez ekstrüzyon
6	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,4 µm por çaplı membrandan 10 kez ekstrüzyon
7	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,4 µm por çaplı membrandan 15 kez ekstrüzyon
8	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,4 µm por çaplı membrandan 20 kez ekstrüzyon
9	3 dk prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) + 0,4 µm por çaplı membrandan 10 kez + 0,2 µm por çaplı membrandan 10 kez ekstrüzyon

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretimine ait işlem parametreleri saptandıktan sonra (İşlem No:9), kullanılacak temel yardımcı maddelerin (Lipoid S100, kolesterol, Transcutol CG) oranlarının ve eklenen diğer yardımcı maddelerin (oleik asit ve hyaluronik asit) etkin madde salımı, derideki etkin madde tutulumu ve formülasyon karakteristiklerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Temel yardımcı maddeler olan Lipoid S100 ve kolesterolün oranları 2:1 olarak sabit tutulmuştur (Çizelge 3.6). Briuglia ve ark., 2:1 fosfolipid:kolesterol oranının en stabil formülasyonların elde edildiği oran olduğunu bildirmişlerdir (Briuglia ve diğerleri, 2015). Lipoid S100, kolesterol, Transcutol CG, oleik asit (bazı formülasyonlarda) ve diklofenak sodyum, Çizelge 3.6’da belirtilen miktarlarda tartılarak 4 mL kloroform:metanol (3:1) karışımında çözülmüştür. Şilifli balon içerisinde rotavapor yardımı ile 60°C’de, vakum altında 45 dakika boyunca uçurulmuştur. Oluşan lipid film tabakası 3 mL distile su (V1-V7) ya da Çizelge 3.6’da gösterilen miktarlarda hyaluronik asit içeren 3 mL sulu çözelti (V8-V9) ile hidrate edilerek 60°C’de, 400 rpm’de 3 saat karıştırılmıştır. Ardından 3 dakika (3 saniye aç-kapa döngüleri) prob sonikasyon ve sırası ile 0,4 ve 0,2 µm çapa sahip polikarbonat membranlardan 10 kez geçirilerek ekstrüzyon işlemleri uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının içerikleri

Formülasyonlar	Diklofenak Sodyum (mg)	Lipoid S100 (mg)	Kolesterol (mg)	Transcutol CG (mg)	Oleik Asit (mg)	Hyaluronik Asit (mg)	Distile su (mL)
V1	20	100	50	10	-	-	3
V2	20	100	50	20	-	-	3
V3	20	100	50	30	-	-	3
V4	20	125	62,5	30	-	-	3
V5	20	150	75	30	-	-	3
V6	20	125	62,5	30	10	-	3
V7	20	125	62,5	30	20	-	3
V8	20	125	62,5	30	-	15	3*
V9	20	125	62,5	30	-	30	3**
*15 mg hyaluronik asit içeren 3 mL çözelti							
**30 mg hyaluronik asit içeren 3 mL çözelti							

Karakterizasyon verilerine göre optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi

Ön denemelerde kullanılan miktarlar temel alınarak, bu miktarların her aşamada tek bir parametresinin değiştirilmesi ile optimum formülasyonun elde edilmesi amaçlanmıştır. Literatürden elde edilen bilgiler dahilinde, oleik asit ve hyaluronik asitin derideki tutulumu artırmasını (Manconi ve diğerleri, 2011; Yue, Zhao ve Yin, 2018) incelemek üzere, bir adet hyaluronik asit içeren, bir adet oleik asit içeren ve bir adet her ikisini de içermeyen 3 farklı formülasyonun optimum olarak seçilmesi planlanmıştır.

Optimum veziküler sistemlerin seçilmesi sırasında, karakterizasyon parametreleri olan KB ve PDI'nın küçük, zeta potansiyeli (ZP) ve enkapsülasyon etkinliği (EE%)'nin yüksek olmasına dikkat edilmiştir. İlk olarak geliştirilen V1, V2 ve V3 formülasyonları arasında Transcutol CG'nin etkisi incelenmiştir. Karakterizasyon parametrelerine göre V3 temel alınarak geliştirilen V4 ve V5 formülasyonlarında Lipoid S100:kolesterol oranı sabit tutularak, yüksek lipid miktarlarının etkisi incelenmiştir. Daha sonraki aşamalarda V4 formülasyonu temel alınarak geliştirilen V6 ve V7 formülasyonları ile oleik asit miktarının karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Benzer şekilde V4 formülasyonu temel alınarak geliştirilen V8 ve V9 formülasyonları ile hyaluronik asit miktarının karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sıralı eleme çalışmaları sonucunda V4, V7 ve V8 formülasyonları, optimum esnek veziküler sistem

formülasyonları olarak belirlenmiştir. KB, PDI, ZP ve EE% dışındaki karakterizasyon çalışmaları bu formülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon parametrelerinin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

3.2.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının karakterizasyonu

Esnek veziküler sistemlerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında KB, PDI, ZP ve EE%, optimum formülasyonların belirlenmesinde kullanılan parametreler olarak belirlenmiştir. Optimum formülasyonların belirlenmesinde, KB ve PDI için minimum değerin elde edilmesi amaçlanırken, ZP ve EE% için maksimum değerin elde edilmesi amaçlanmıştır (Yalcin, Tuncel, Yucel ve Tirnaksiz, 2022).

DSC analizi

DSC analizi, esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan katı yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Toplamda yaklaşık 2 mg ağırlığında olacak şekilde toz diklofenak sodyum, Lipoid S100, kolesterol ve tüm katı yardımcı maddelerin diklofenak sodyumla 1:1 fiziksel toz karışımları alüminyum panlar içerisine konularak DSC cihazında (Shimadzu, DSC-60, Japonya) analiz edilmiş ve termogramları elde edilmiştir. Çalışmalar azot gazı altında 10°C/dk hızla ısıtma gerçekleştirilerek, 25-320°C aralığında gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizi

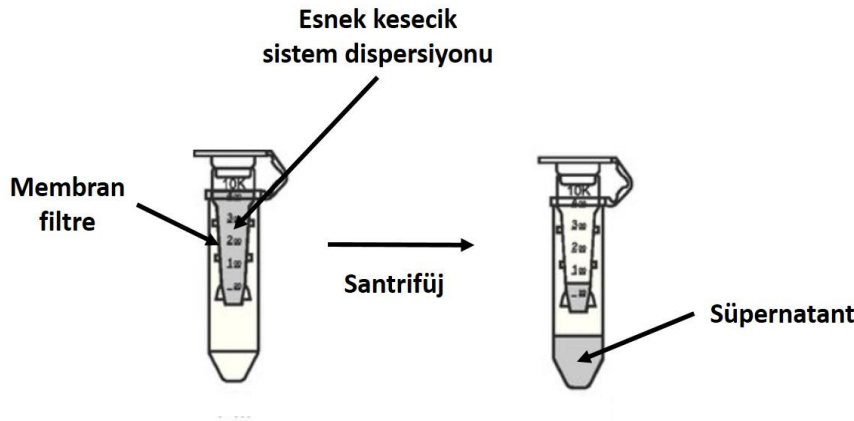
FTIR analizi, veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Lipoid S100, kolesterol, Transcutol CG ve oleik asitin diklofenak sodyumla 1:1 oranında fiziksel karışımları hazırlanmış ve FTIR spektrofotometresinin (Perkin-Elmer, Spectrum 400, ABD) analiz kristali üzerine konularak analiz edilmiştir. 4000-600 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilen analiz sonucunda IR spektrumları elde edilmiştir.

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının kesecik boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçümü

Hazırlanan esnek veziküler sistemler, 1:200 oranında distile su ile seyreltilmiştir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibine dayanan partikül boyutu ölçüm cihazı kullanılarak KB, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür. KB ve PDI ölçümü için tek kullanımlık partikül boyutu ölçüm küvetlerine 1 mL örnek konulmuş ve 20 kez ölçüm gerçekleştirilmiştir. ZP ölçümleri için ise kılcal zeta küvetlerine 1 mL örnek konulmuş ve 10 kez ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi

EE% değerinin belirlenmesi için indirekt metot kullanılmıştır. 400 µL veziküler sistem dispersiyonları santrifüj filtrasyon tüplerinin üst kısmına konulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Santrifüj filtrasyon tüplerinin çalışma prensibi

15000 rpm’de 30 dakika santrifüjlenen tüplerin alt kısmına geçen süpernatandan 25 µL alınmıştır. Ultra saf su ile 5 mL’ye seyreltilerek 276 nm’de UV-Visible spektrofotometre ile analiz edilmiştir. EE% aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$EE\% = (A-B) / A \times 100 \quad (3.7)$$

Burada A toplam diklofenak sodyum miktarı, B enkapsüle olmayan diklofenak sodyum miktarını ifade eder.

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri çok noktalı koni-tabla prensibine dayanan reometre ile (Brookfield, DV-III Rheometer, ABD) belirlenmiştir. Optimum veziküler sistem formülasyonları 0,5 mL hacimde örnek tablasına konulmuş ve spindle CPE-40 kullanılarak 25°C’de analiz edilmiştir. Farklı kayma hızlarındaki kayma gerilimleri ölçülerek kayma gerilim–kayma hızı ve viskozite-kayma hızı grafikleri oluşturulmuştur. Viskozite-kayma hızı grafikleri Ostwald de Waele Power-Law eşitliği kullanılarak doğrusallaştırılmıştır (Bkz. Eş. 3.3). Her bir kayma hızı için kaydedilen 3 farklı kayma gerilim değerinin ortalaması dikkate alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Morfolojik analiz

Oluşturulan optimum formülasyonlara ait Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) (FEI, Tecnai G2 Spirit, ABD) görüntülemesi ODTÜ Merkez Laboratuvarı’nda yapılmıştır. Esnek veziküler sistem dispersiyonları 1:200 oranında distile su ile seyreltilerek karbon gridler üzerine damlatılmış ve 24 saat ortam sıcaklığında kurutulmuştur. Gridler üzerinde kuruyarak suyunu kaybeden esnek veziküler sistemler yüksek vakum altında görüntülenmiştir.

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon (esneklik) katsayılarının belirlenmesi

Deriden geçişin artırılmasının hedeflendiği formülasyon geliştirmeye çalışmalarında lipozomlara göre daha fazla esneyebilen özelleştirilmiş veziküler sistem formülasyonlarının hazırlandığı görülmektedir. Lipozomlardan farklı olarak lipid çift tabakası içerisine kenar aktivatörü denilen maddelerin eklenmesi ile geliştirilen bu formülasyonlara transfersome®’lar örnek olarak verilebilir. Bu formülasyonlar esneyebilen kesecik zarları sayesinde, kendi boyutlarından daha küçük porlar içeren bariyerlerden geçebilmektedirler. Bu durum *stratum corneum* tabakası ile korunan derinin çok küçük porlarından veziküler sistemlerin geçebilmesini sağlayabilmektedir (Opatha ve diğerleri, 2020). Veziküler sistemlerin esnekliklerini değerlendirmek için deformasyon katsayısı hesaplanmaktadır. Tez çalışması kapsamında geliştirilen optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının (V4, V7 ve V8) deformasyon katsayılarının belirlenmesi amacıyla, veziküler sistem dispersiyonları, 100 nm por çapına sahip polikarbonat membran filtreden ekstrüde edilmiştir.

Ekstrüzyon işlemi pnömatik pompa (AXO Pneumatic Syringe Pump, Axolotl Biosystems, Türkiye) yardımı ile 2,5 bar sabit basınç uygulanarak yaklaşık 4 dakika boyunca sürdürülmüştür. Ekstrüzyon sonrasında, membrandan geçebilen veziküler sistem dispersiyonlarının hacimleri belirlenmiş ve kesecik boyutları DLS metodu ile ölçülmüştür. Eş. 3.8'e göre deformasyon katsayıları hesaplanmıştır.

$$D = J / t (r_v / r_p)^2 \quad (3.8)$$

Bu eşitlikte D deformasyon katsayısını ($\mu\text{L}/\text{dk}$), J ekstrüde olan dispersiyon hacmini (mL), t zamanı (sn), r_v ekstrüzyon sonrası kesecik boyutunu (nm), r_p polikarbonat membranın por çapını (nm) ifade etmektedir (Mouez, Nasr, Abdel-Mottaleb, Geneidi ve Mansour, 2016).

Stabilite çalışmaları

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen esnek veziküler sistem formülasyonuna (V4) ait uzun süreli stabilite testleri ICH Q1A(R2) kılavuzunda belirtildiği gibi $5 \pm 3^\circ\text{C}$ sıcaklık ortamında, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamında ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%75 \pm 5$ bağıl nem ortamında gerçekleştirilmiştir. 6 ay boyunca gerçekleştirilmiş çalışmalarda, başlangıç, 1., 3. ve 6. ay sonlarında test kabinlerinde yer alan, polipropilen tüp içerisinde saklanan esnek veziküler sistem formülasyonundan örnekler alınmıştır. Alınan esnek veziküler sistem formülasyonu örneklerinin etkin madde miktar tayini, KB, PDI ve EE% değerlerinin ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları

Optimum olarak seçilen esnek veziküler sistem formülasyonları (V4, V7 ve V8), aynı konsantrasyonda etkin madde içerecek şekilde distile suda hazırlanmış diklofenak sodyum çözeltisi ve ticari ürünün (Aklofen® Jel) in vitro salım çalışmaları Franz difüzyon hücresi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Cut-off değeri 12.000-14.000 Da olan diyaliz membran, Franz difüzyon hücresinin alıcı ve verici kompartmanı arasına yerleştirilmiştir. Alıcı kompartmana pH 7,4 fosfat tamponu eklenmiştir. 32°C 'ye ayarlanmış su banyosu içerisine hazırlanan Franz difüzyon hücreleri yerleştirilerek 50 rpm karıştırma hızında, in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirli aralıklarla alıcı hücredeki örnekler toplanarak UV-Visible spektrofotometre ile 276 nm'de analiz edilmiştir. pH 7.4 fosfat tamponu ortamında

40°C’de en az 72 saat stabil olduğu gösterilen diklofenak sodyumun, 32°C’de stabilite çalışması yapılmasına gerek olmadığına karar verilmiştir (Bkz. Bölüm 4.3.3).

Diyaliz membrana etkin madde partisionunun belirlenmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarından in vitro salım çalışmaları için kullanılan diyaliz membran, 1x1 cm² alanda kesilerek, 20 mL’lik pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 50 µg/mL konsantrasyona sahip diklofenak sodyum çözeltisi içerisine konulmuştur. Oda sıcaklığında, 100 rpm’de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda, ortamdan alınan örnekler 0,22 µm PVDF/L membran filtreden geçirilerek HPLC’de analiz edilmiştir. Partisyon yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\%Partisyon = (A-B) / A \times 100 \quad (3.9)$$

Burada A başlangıçta çözeltideki diklofenak sodyum miktarı, B 24 saatin sonunda çözeltideki diklofenak sodyum miktarını ifade eder.

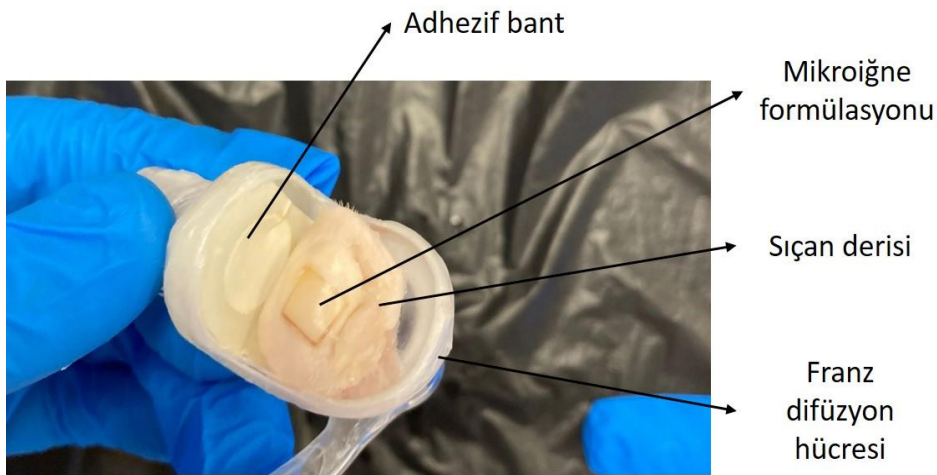
3.2.10. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, Doç Dr. Çiğdem YÜCEL tarafından gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit (MTT) testi kullanılmıştır. HaCaT (İnsan Epidermal Keratinositi) hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında, her kuyucuk başına 1x10⁴ sayıda hücre olacak şekilde üretim yapılmıştır (Avadhani, Manikkath, Tiwari, Chandrasekhar, Godavarthi ve diğerleri, 2017). Her bir kuyucuğa 100 µL hücre kültürü ortamı eklenmiş ve 24 saat boyunca 37°C’de CO₂’li etüvde bekletilmiştir. Mikroigne formülasyonları havanda toz edilerek 600 µg/mL konsantrasyonda diklofenak sodyum içerecek şekilde Dulbecco’s Modifiye Eagle’s Besiyeri (DMEM) içerisinde ekstre edilmiştir. Veziküler sistem formülasyonları 600 µg/mL etkin madde içerecek şekilde DMEM ile seyreltilmiş ve 600 µg/mL konsantrasyonda DMEM ortamında etkin madde çözeltisi (%0,6 a/h) hazırlanmıştır. Boş DMEM ortamı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu, hazırlanan ekstre ve çözeltiler, 100 µL’lik hacimlerde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından 24 saat 37°C’de CO₂’li etüvde bekletilmiştir. 24 saatin

sonunda plaklardaki içerik boşaltılmış ve tüm kuyucuklara 100 μ L taze DMEM ile 13 μ L MTT çözeltisi (fosfat tamponu içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda) eklenmiştir. Kültür kapları alüminyum folyo ile sıkıca sarılarak 4 saat boyunca 37°C’de CO²’li etüvde bekletilmiştir. 4 saatin sonunda etüvden çıkarılan kaplar boşaltılmış ve kuyucuklara 100’er μ L dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm’de analiz edilmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Her bir gruba ait absorbans değerleri kontrol grubunun absorbans değerine oranlanarak yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır.

3.2.11. Ex vivo deriden geçiş ve deride birikim çalışmaları

Ex vivo çalışmalar, Franz difüzyon hücresi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan sıçanların, sakrifikasyon sonrası derileri toplanarak tıraşlanmış ve ayrılmıştır (Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay kodu: G.Ü.ET-21.075). Elde edilen dokular deneyin yapılacağı zamana kadar -20°C’de saklanmıştır. Mikroigne formülasyonları, eşit yüzey alanına sahip olacak şekilde kesilerek (5x5 iğne içeren kesitler), dokunun Franz difüzyon hücresine yerleştirilmesi öncesinde 1 dakika boyunca parmak kuvveti ile doku üzerine bastırılarak doku üstüne sabitlenmiştir. Farmasötik kalitede adeziv bant, mikroignelerin üzerine transdermal yama formu oluşturulacak şekilde uygulanmış ve mikroignelerin çalışma boyunca doku üzerinde kalması sağlanmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Mikroigne formülasyonlarının ex vivo çalışmalar sonrasında, deri dokusu ile beraber Franz difüzyon hücresinden çıkartılırken çekilmiş görüntüsü

Esnek veziküler sistem dispersiyonları ise Franz hücresinin alıcı ve verici bölmeleri arasına yerleştirilmiş doku üzerine doğrudan uygulanmıştır. Çalışmalar 6 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Alıcı bölme pH 7,4 fosfat tamponu konulmuştur. Çalışmaya hazır hale gelen hücreler 37°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosuna yerleştirilerek, manyetik karıştırıcı ile 50 rpm’de karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında alıcı bölmeden örnekler alınarak, 0,22 µm PVDF/L filtrelerden süzölmüş ve HPCL ile 276 nm’de analiz edilmiştir.

Çalışmanın sonunda, deri dokuları Franz hücrelerinden çıkartılmıştır. 20 mL fosfat tamponu ile yüzeyi yıkanan deriler, makas yardımı ile parçalara ayrılmıştır. Parçalanmış deri dokuları 10 mL metanol içerisinde 4°C’de, 24 saat boyunca ekstre edilmiştir. Ekstreler 0,22 µm PVDF/L filtrelerden süzölmüş ve HPLC ile 282 nm’de analiz edilmiştir. Geliştirilen formölasyonların karşılaştırması amacı ile aktinik keratoz tedavisinde kullanılan %3 diklofenak sodyum içeren ticari ürün (Aklofen® Jel) ve aynı oranda etkin madde içeren diklofenak sodyum sulu çözeltisi, veziküler sistem formölasyonları ile aynı dozda kullanılmıştır. Ticari ürün ve etkin madde çözeltisinin ex vivo çalışmaları, veziküler sistemler ile aynı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Permeabilite katsayısı Eş. 3.10’a göre hesaplanmıştır.

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/(A \times C_0) \quad (3.10)$$

Bu eşitlikte P_{app} permeabilite katsayısını (cm/saat), dQ/dt birim zamanda deriden geçen ilaç miktarını (µg/saat), A ilacın uygulandığı derinin yüzey alanını (0,785 cm²) ve C_0 verici hücredeki ilacın başlangıç derişimini (µg/mL) ifade etmektedir (Inoue, Furubayashi, Tanaka, Sakane ve Sugano, 2020). Ex vivo çalışmaların sonunda dokuda en yüksek miktarda kalan etkin madde miktarına sahip mikroiğne (F24) ve esnek veziküler sistem (V4) formölasyonları, in vivoda kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.12. İn vivo çalışmalar

Literatürde, aktinik keratoz tedavisinin değerlendirilmesi amacıyla özel olarak geliştirilmiş in vivo hastalık modellerinin mevcut olduğu görölmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, tüysüz SKH-1 farelerine 14-15 hafta boyunca her gün, UV-B ışığı uygulanmış; özel kafes ve ışık sistemleri kullanılmıştır (Pillon ve diğerleri, 2017). Ancak bu modellerin oluşturulabilmesi için gerekli olan alt yapının kurulması ve söz konusu transgenik deney

hayvanlarının tedarik edilmesi uygulanabilirlik açısından mümkün olamamıştır. Ayrıca, hem hastalık modelinin oluşumu hem sonucun gözlenmesi uzun süre gerektirmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, geliştirilen formülasyonların aktinik keratoz üzerindeki etkinliğinin kısa sürede değerlendirilebilmesi için, diklofenak sodyumun aynı yolak üstünden (COX-2 yolağı) tedavi edici etkinliğini gösterdiği bilinen akut cilt inflamasyonu modeli olan, ksilen ile indüklenen kulak ödemi modelinin kullanılması planlanmıştır (Soliman ve diğerleri, 2023). Ksilen ile indüklenen kulak ödemi modeli ile aktinik keratoz hastalığı, inflamatuvar yanıtı bağlı olarak COX2/PGE2 düzeylerinde yükselme (Berman ve Cockerell, 2013) ve epidermal kalınlaşma (Sharma, Werth ve Werth, 2011) gibi ortak biyobelirteçlere sahiptir. Bu hastalık modeli üzerinde, geliştirilen formülasyonların anti-inflamatuvar aktiviteleri, ticari ürün ve kontrol grupları ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

İpek flastere etkin madde partisyonunun belirlenmesi

İn vivo çalışmalar kapsamında, uygulanan formülasyonların sıçan kulakları üzerinde kalmasının sağlanabilmesi için ipek flaster kullanılmıştır. Diklofenak sodyumun ipek flastere partisyonunun belirlenmesi için, ipek flaster 1x1 cm² alanda kesilerek, 20 mL'lik pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 50 µg/mL konsantrasyona sahip diklofenak sodyum çözeltisi içerisine konulmuştur. Oda sıcaklığında, 100 rpm'de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda, ortamdan alınan örnekler 0,22 µm PVDF/L membran filtreden geçirilerek HPLC'de analiz edilmiştir. Partisyon yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\%Partisyon = (A-B) / A \times 100 \quad (3.11)$$

Burada A başlangıçta çözeltideki diklofenak sodyum miktarı, B 24 saatin sonunda çözeltideki diklofenak sodyum miktarını ifade eder.

Deney hayvanları

Çalışma kapsamında toplam 24 adet erkek 200-270 g ağırlığında Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. Deneyler sırasında Sprague-Dawley sıçan kullanılmasının nedeni, kulak genişlik ve kalınlıklarının, mikroiğne formülasyonlarının uygulanabilmesine imkan vermesidir (B. M. Lee, Lee, Lahiji, Jung, Chung ve Jung, 2020). Hayvanlar deney sürecinden 1 hafta öncesinde ve deney boyunca standart nem (%30-40 bağıl nem), ışık (12 saat loş

ışık/12 saat karanlık) ve sıcaklık koşullarında ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) tutulmuş, standart laboratuvar diyeti koşullarıyla (pellet yem, ad libitum) ve musluk suyuyla beslenmişlerdir. Deney protokolüne göre önce formülasyonlar uygulanmış ve ardından model oluşumu gerçekleştirilmiştir (Oh, Jeong, Cho, Ha, Gu ve Ma, 2015). Tüm in vivo çalışma, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Laboratuvarında yürütülmüştür. Tüm deney protokolleri Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (G.Ü.ET-21.075) tarafından onaylanmıştır.

Her bir grup altı kulaktan oluşmak üzere, toplam sekiz grup oluşturulmuştur. Gruplar Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. İn vivo çalışma grupları

Hayvanlar	Gruplar	Yapılan uygulamalar
1.Hayvan Grubu- Sağ Kulak (n=6)	Negatif Kontrol	Ksilen ve formülasyon uygulanmamıştır.
1.Hayvan Grubu- Sol Kulak (n=6)	Pozitif Kontrol	Sadece ksilen uygulanmıştır.
2.Hayvan Grubu- Sağ Kulak (n=6)	MN Kontrol	Diklofenak sodyum içermeyen F24 uygulanmıştır.
2.Hayvan Grubu- Sol Kulak (n=6)	Ticari Ürün	Ticari ürün + ksilen uygulanmıştır.
3.Hayvan Grubu- Sağ Kulak (n=6)	F24 Boş	Diklofenak sodyum içermeyen F24 + ksilen uygulanmıştır.
3.Hayvan Grubu- Sol Kulak (n=6)	F24	Diklofenak sodyum içeren F24 + Ksilen uygulanmıştır.
4.Hayvan Grubu- Sağ Kulak (n=6)	V4 Boş	Diklofenak sodyum içermeyen V4 + ksilen uygulanmıştır.
4.Hayvan Grubu- Sol Kulak (n=6)	V4	Diklofenak sodyum içeren V4 + Ksilen uygulanmıştır.

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen formülasyonların uygulanması

Çalışma planı, Anyasor ve diğerlerinin önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Veziküler sistem formülasyonları, mikropipet yardımı ile doğrudan sıçanların kulaklarının iç yüzeyine uygulanmıştır. Mikroigne formülasyonları ise, 5x5 adet iğne içeren kesitler halinde, hayvanların kulaklarının iç kısmına 30 saniye boyunca, parmak kuvveti ile bastırılarak yapıştırılmıştır. Her iki formülasyonun uygulanması sonrası, tüm kulaklar ipek flaster ile kapatılmıştır (Resim 3.3). Standardizasyonun sağlanması amacıyla, kontrol gruplarının

Anestezi, sedasyon, ötenazi ve doku toplanması

Formülasyonların uygulanmasından önce ve ksilen uygulamasından önce, tüm hayvanlara 40 mg/kg ketamin uygulanarak sedasyon sağlanmıştır. 1 saatin sonunda, sıçanlara 10 mg/kg ksilazin ve 80 mg/kg ketamin uygulanarak derin anestezi sağlanmıştır. Derin anestezi altında intrakardiyal kan alınarak sakrifiye edilen sıçanların kulaklarından, eşit birim alana sahip olması için 6 mm'lik çapa sahip doku pançı yardımı ile örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler tartılmıştır. Alınan örnekler alüminyum folyo ile sarılarak sıvı azot içerisine atılarak dondurulmuştur. -80°C'de biyokimyasal inceleme için saklanmıştır. Kalan kulak dokusu ise tamponlu formalin içerisine alınarak fikse edilmiş ve oda sıcaklığında histolojik inceleme için saklanmıştır.

İn vivo çalışmalar kapsamında değerlendirilen parametreler

Yapılan ölçümlerle zaman içerisindeki kulak kalınlığı değişimi saptanmıştır. Deney sonucunda kesilen kulak dokularının ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buradan elde edilen verilerden hareketle kulak kalınlığı değişimi, ödem inhibisyon yüzdesi, ödemdeki azalma hızı, ödem kalınlığı-zaman grafiğinin eğri altında kalan alanı (EAA) ve kulak ağırlıkları hesaplanmıştır. Ayrıca sakrifikasyon sonrası alınan örneklerden biyokimyasal ve histolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir.

EAA değerleri GraphPad® Prism 9.0.0 istatistiksel analiz yazılımı yardımı ile, ödem inhibisyon yüzdesi ise Eş. 3.12'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ödem inhibisyon yüzdesi} = [(Kontrol - Örnek) / Kontrol] \times 100 \quad (3.12)$$

Burada kontrol, kontrol grubunda yer alan kulak kalınlıklarını; örnek, %inhibisyonu hesaplanacak olan grubun kulak kalınlığını ifade etmektedir (Nadri, Salim, Basar, Yahya ve Zulkifli, 2014). Ödemdeki azalma hızı, ödem kalınlığı-zaman grafiğinin en yüksek noktasından en düşük noktasına kadar olan noktaların doğrusal regresyonu ile hesaplanmıştır.

Biyokimyasal inceleme

Alınan kulak dokuları, KCl tamponu (0,14 M) içerisinde 1:9 oranında homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4°C'de 7000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Prostaglandin E2

(PGE2) miktarı, enzim bağımlı immünosorbent analiz (ELISA) kiti (Relassay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak 450 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Bu çalışma hizmet alımı (Baran Medikal San. ve Tic. Ltd.Şti.) ile gerçekleştirilmiştir.

Histolojik inceleme

Bu çalışma hizmet alımı (Baran Medikal San. ve Tic. Ltd.Şti.) ile gerçekleştirilmiştir. %10 tamponlu formaldehit kullanılarak fikse edilen kulak dokuları parafine gömülmüş ve mikrotom yardımı ile oluşturulan bloklardan 4 µm'lik kesitler alınmıştır. Deparafinize edilen kesitler, sırasıyla ksilol ve dereceli alkol çözeltilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Kesitler, Mayer Hematoksilen ve Eozin B boyaları kullanılarak Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyanan kesitler entellan ile kapatılıp ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Görüntülenen kesitlerde mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve konjestif alanlar histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan incelemelerde, her gruba ait rastgele 5 ayrı kesitten elde edilen 200x'lik büyütmedeki mikrograflarda daha önce uygulanan yöntemlere dayanarak skorlama işlemi gerçekleştirilmiştir (Gibson-Corley, Olivier ve Meyerholz, 2013; Pillon ve diğerleri, 2017). Skorlama işleminde 0 normal/yok, 1 hafif, 2 orta ve 3 şiddetli-yaygın olarak kabul edilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel değerlendirme

Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalara ait veriler, aksi belirtilmedikçe “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak verilmiştir. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9[®] yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki grubun kıyaslandığı çalışmalarda Student t testi kullanılmıştır. Çoklu grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (one way-ANOVA), gruplar arası karşılaştırmalarda Tukey HSD post-hoc testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi, aksi belirtilmedikçe $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Ex vivo ve in vivo çalışmalarda, aşırı sapan değerler Grubbs's outliers testi ile $\alpha = 0,2$ anlamlılık düzeyinde belirlenmiştir. Bu değerler hesaplamalara ve istatistiksel analizlere dahil edilmemiştir.



4. BULGULAR

4.1. Diklofenak Sodyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.1.1. Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışmaları

Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışması Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi distile su ortamında 25°C’de ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamında ortamında 25°C ve 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de yer almaktadır.

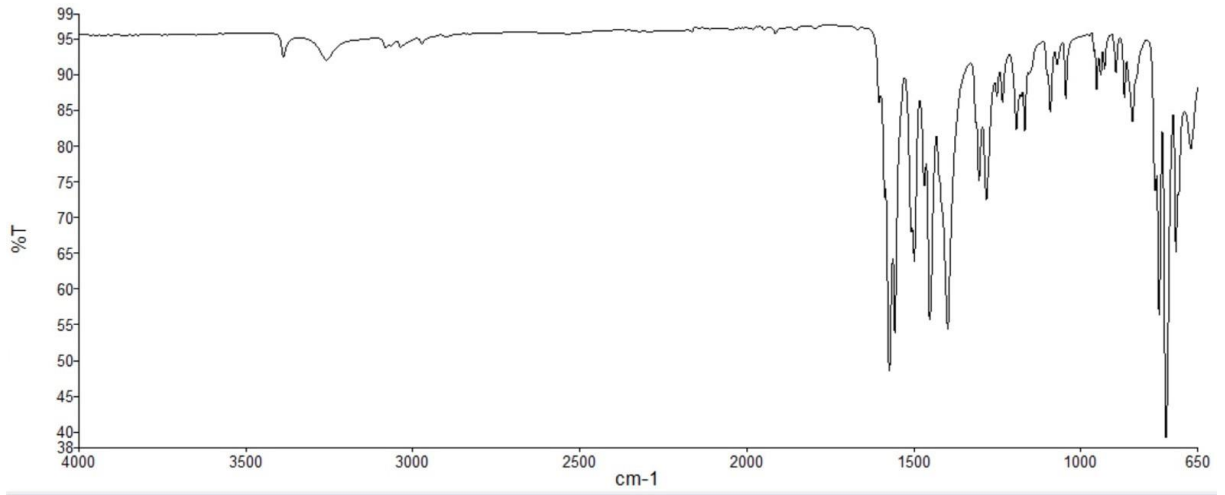
Çizelge 4.1. Diklofenak sodyumun farklı ortam ve sıcaklıklardaki çözünürlük değerleri

Sıcaklık (°C)	Distile su (mg/mL)	pH 7,4 fosfat tamponu (mg/mL)
25	18,98 ± 0,17	9,24 ± 0,14
37	*	14,50 ± 1,31
Ortalama ± SS, n=3 *İlgili çalışma yapılmamıştır.		

Çözünürlük çalışması sonuçlarına göre salım çalışmaları ve ex vivo çalışmalar için tüm ortam ve sıcaklıklarda sink koşulun sağlanabildiği belirlenmiştir.

4.1.2. Diklofenak sodyumun FTIR analizi

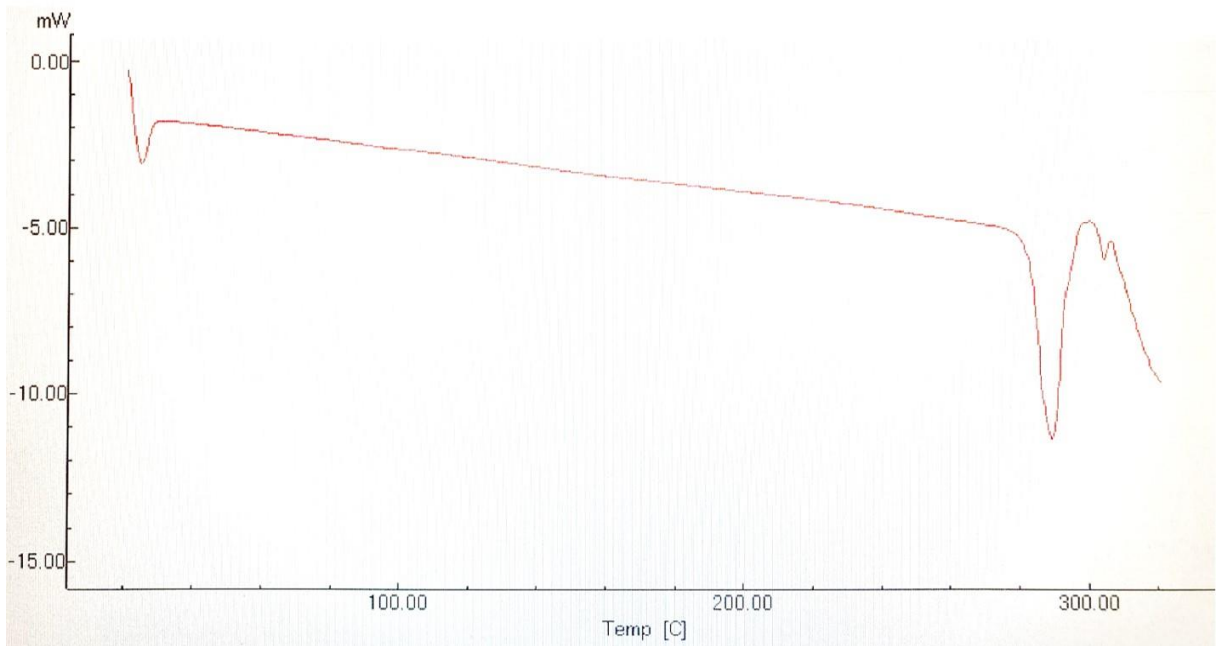
Diklofenak sodyumun FTIR analizi Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun FTIR spektrumu Şekil 4.1’de verilmiştir. Saf diklofenak sodyum, 3380 cm⁻¹’de sekonder amin piki, 1570 cm⁻¹’de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm⁻¹’de -C-Cl piki, 1000-1350 cm⁻¹’de -CN grubuna ait olan pikler meydana getirmektedir (Öztürk, Namlı, Güleç ve Kıyan, 2020).



Şekil 4.1. Diklofenak sodyumun karakteristik piklerinin görüldüğü FTIR spektrumu

4.1.3. Diklofenak sodyumun DSC analizi

Diklofenak sodyumun DSC analizi Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2’de yer alan saf diklofenak sodyum numunesine ait termogramda yaklaşık 283°C’de endotermik erime piki gözlenmiştir.



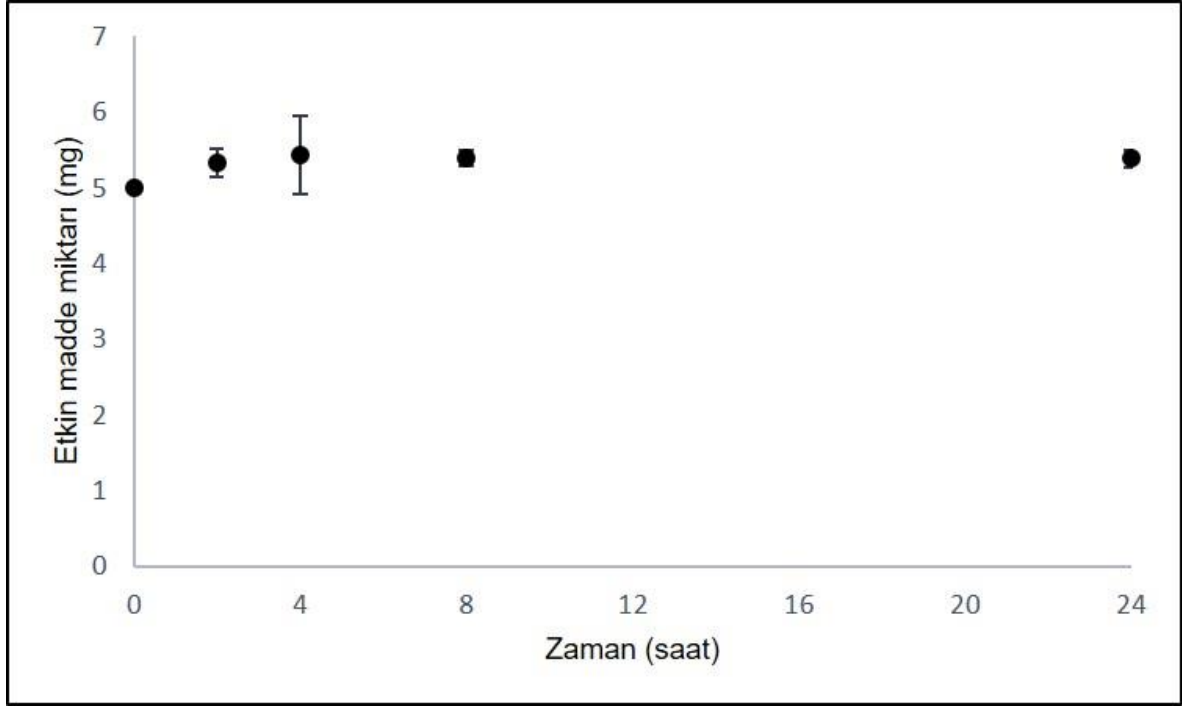
Şekil 4.2. Diklofenak sodyumun endotermik erime piki gösteren DSC termogramı

4.2. Diklofenak Sodyumun Kısa Süreli Stabilesinin Belirlenmesi

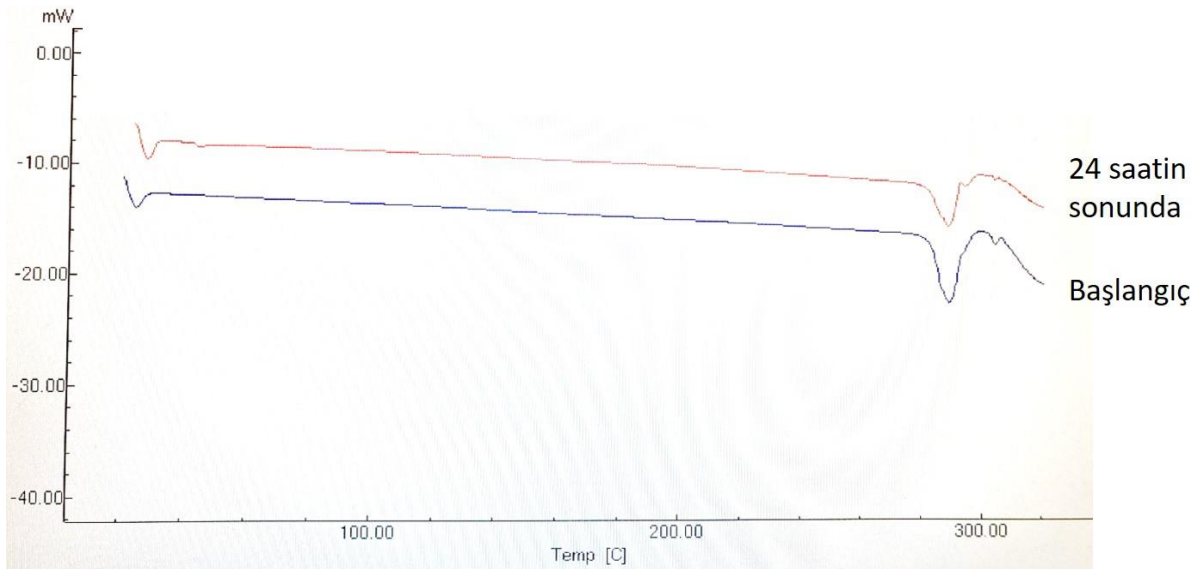
İleri çalışmalarda geliştirilen mikroiğne formülasyonlarının termal çapraz bağlama işlemi, mikroiğnelerin 24 saat boyunca 80°C’de bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Donnelly ve diğerleri, 2014). Çapraz bağlama işlemi sırasında, mikroiğne filmini oluşturan polimer matrisi içerisinde disperse halde bulunan diklofenak sodyumun, 24 saat boyunca 80°C’de stabilesini koruyup korumadığının belirlenmesi için yapılan testin sonuçları Şekil 4.3’te sunulmuştur. 24 saat boyunca diklofenak sodyum miktarında belirgin değişiklik saptanamamıştır.

Ayrıca diklofenak sodyumun 80°C’de 24 saat boyunca tutulmasının ardından DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun başlangıç ve 24. saat sonunda elde edilen DSC termogramları Şekil 4.4’te sunulmuştur. 24. saatin sonunda değişiklik meydana gelmediği saptanmıştır.

Katı hal stabilesinin yanında, diklofenak sodyumun distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamlarındaki çözeltilerinin stabilesi “Diklofenak sodyumun analiz yöntemleri ve validasyonları” başlığı altında değerlendirilmiştir. Tüm ortamlar ve sıcaklıklarda (5, 25 ve 40°C) en az 48 saat stabil olduğu bulunmuştur (Bkz. Bölüm 4.3.3).



Şekil 4.3. 80°C’de 24 saat boyunca tutulan diklofenak sodyumun miktarındaki değişim (Ortalama $\pm$ SS, n=3)



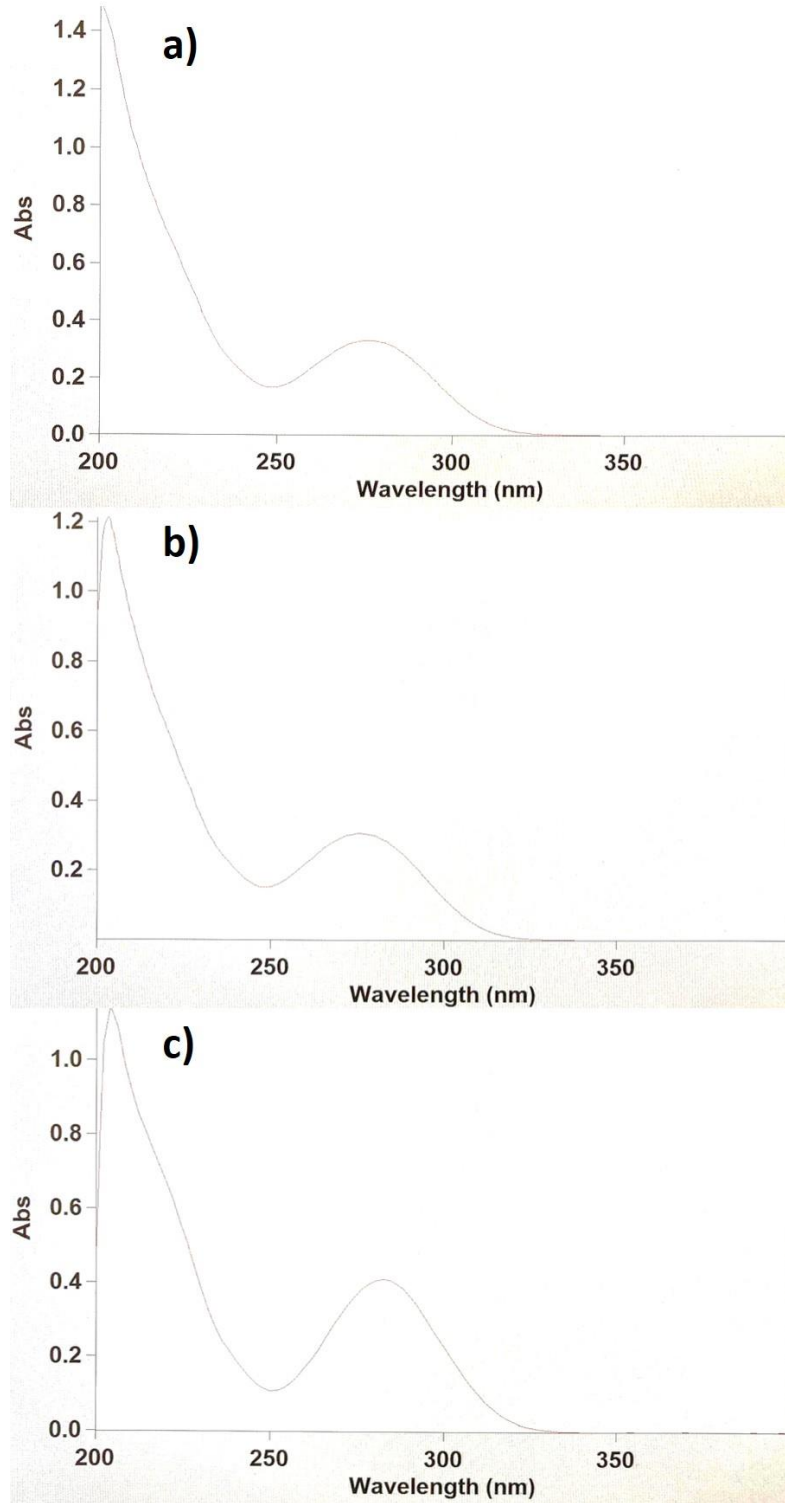
Şekil 4.4. 80°C’de 24 saat boyunca tutulan diklofenak sodyumun DSC termogramı

4.3. Diklofenak Sodyumun Analiz Yöntemleri ve Validasyonları

4.3.1. Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki dalga boyu absorbans taraması

Diklofenak sodyumun UV-Visible spektrofotometrik dalga boyu taraması Bölüm 3.2.3’te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun 10 $\mu\text{g/mL}$ ’lik distile su, pH

7,4 fosfat tamponu ve metanoldeki stok çözeltilerine ait UV-visible spektrumları Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Diklofenak sodyumun maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



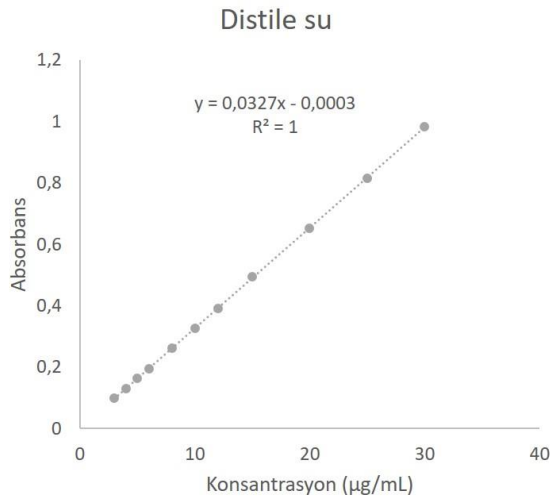
Şekil 4.5. Diklofenak sodyumun a) distile sudaki, b) pH 7,4 fosfat tamponundaki ve c) metanoldeki 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltilerinin 200-400 nm aralığında UV spektrumları

Çizelge 4.2. Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki maksimum dalga boyları

Ortam	Maksimum Dalga Boyu (nm)
Distile su	276
pH 7,4 fosfat tamponu	276
Metanol	282

4.3.2. UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Diklofenak sodyumun UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusunun elde edilebilmesi için 100 µg/mL'lik stoktan 3 - 30 µg/mL aralığında 11 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmış ve UV-Visible spektrofotometrede 276 nm'de analiz edilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi $y=0,0327x - 0,0003$ olarak bulunmuştur. Lineer regresyonun istatistiksel verileri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

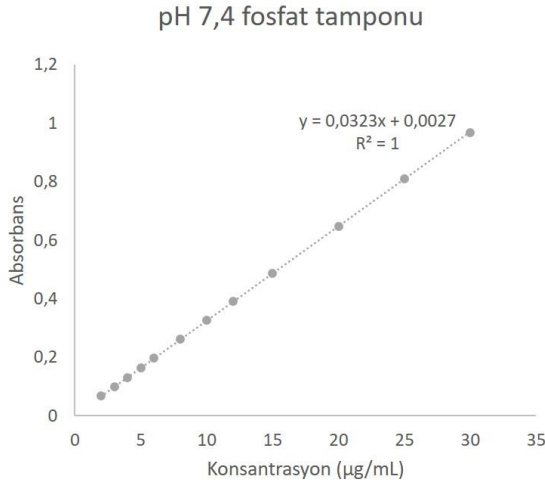


Şekil 4.6. Diklofenak sodyumun distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.3. Distile su ortamı için UV-Visible spektrofotometrede yapılan lineer regresyonun istatistikleri

Eğim ± SH	0,0327 ± 0,0001
Kesişim ± SH	-0,0003 ± 0,0011
R²	1
Regresyonun Standart Hatası	0,0020

Diklofenak sodyumun pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusunun elde edilebilmesi için 100 µg/mL'lik stoktan 2 - 30 µg/mL aralığında 12 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmış ve UV-Visible spektrofotometrede 276 nm'de analiz edilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi $y=0,0323x + 0,0027$ olarak bulunmuştur. Lineer regresyonun istatistiksel verileri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Diklofenak sodyumun pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.4. pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için UV-Visible spektrofotometrede için yapılan lineer regresyonun istatistikleri

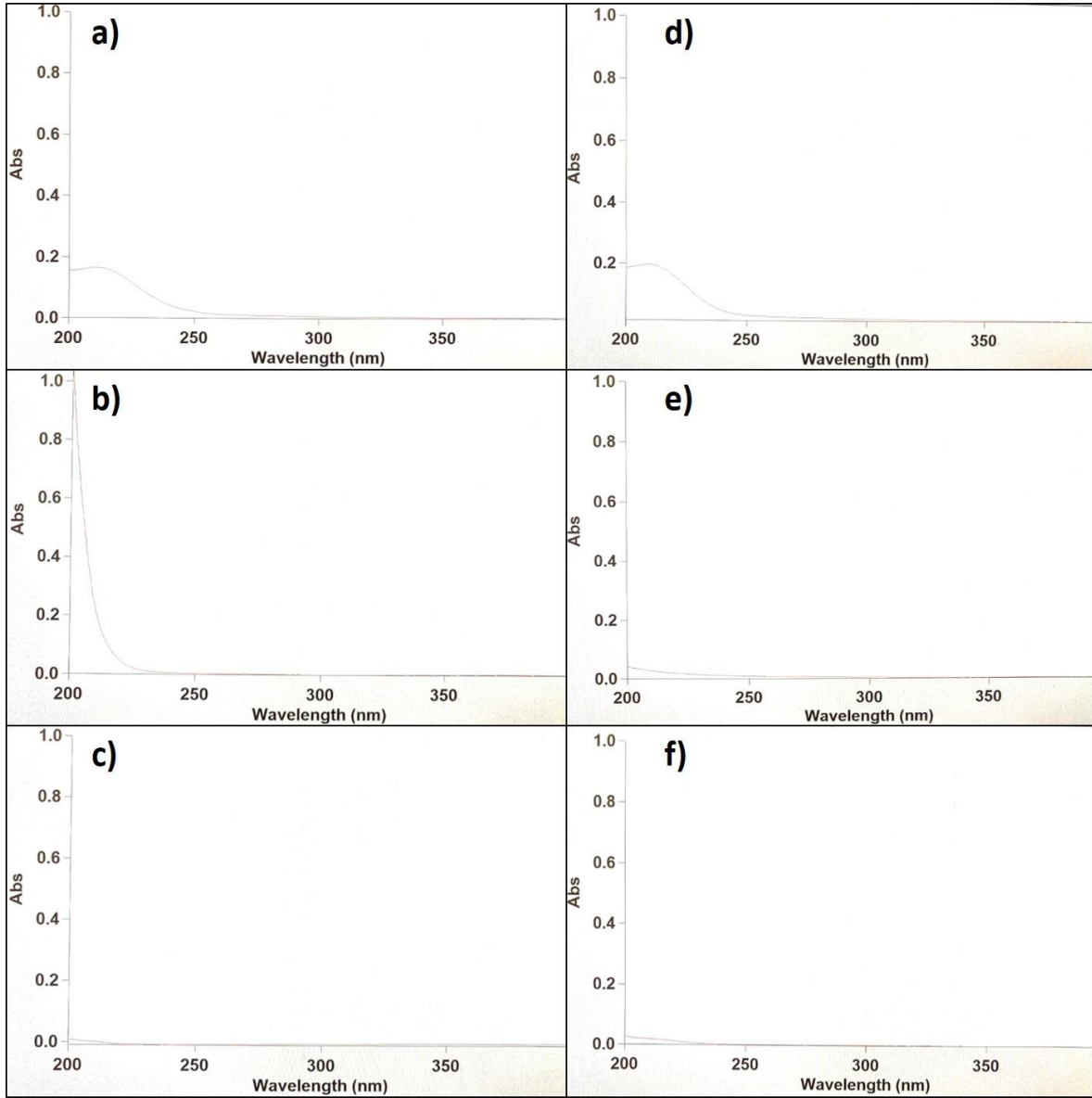
Eğim ± SH	0,0323 ± 0,0000
Kesişim ± SH	0,0027 ± 0,0007
R²	1
Regresyonun Standart Hatası	0,0013

Doğrusallık

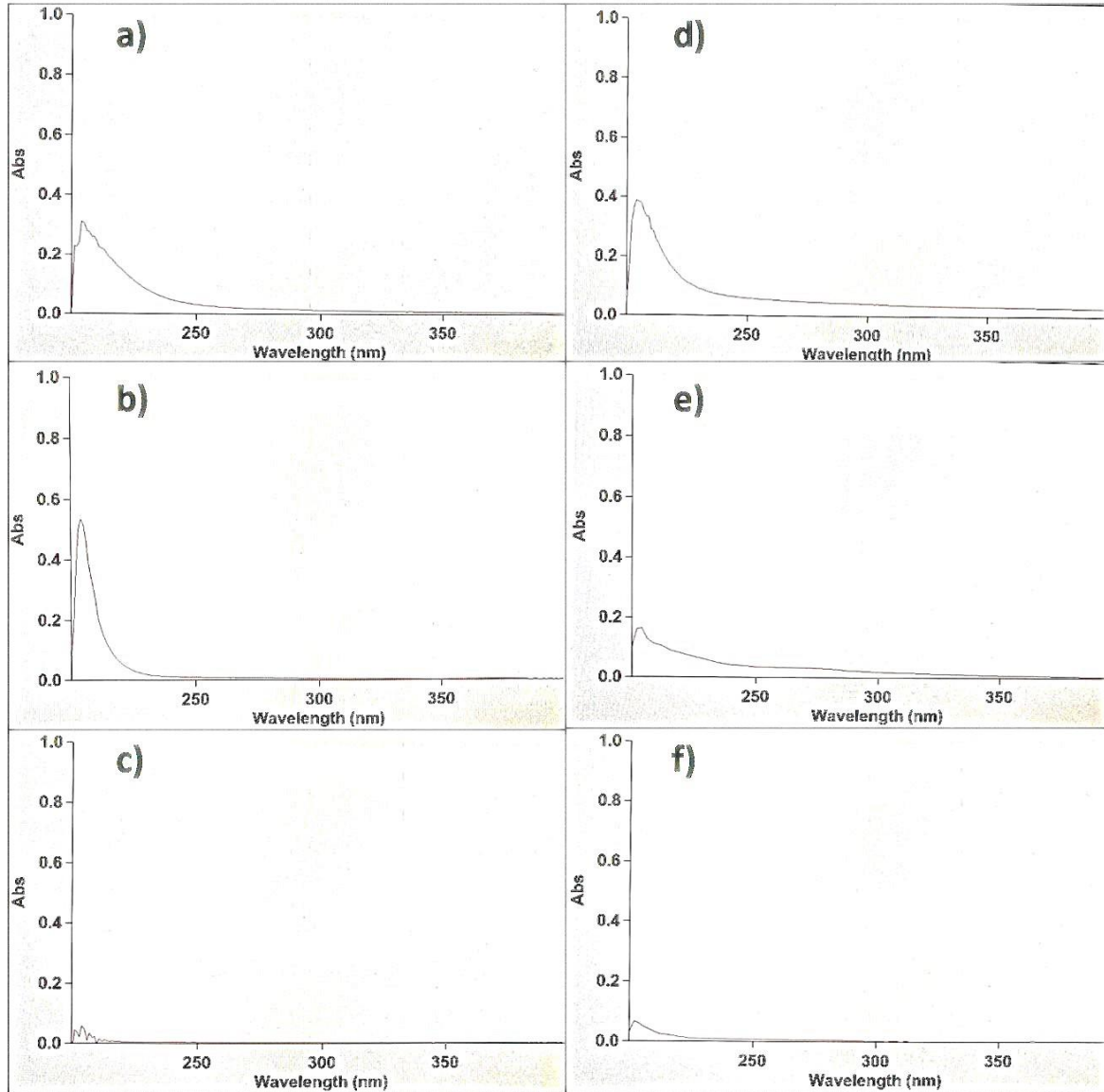
Diklofenak sodyumun her iki ortam için geliştirilen kalibrasyon doğrusunun determinasyon katsayısı (r^2) 1 olarak bulunmuştur. Bu değer elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Seçicilik

Seçicilik çalışmaları kapsamında mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarındaki UV-Visible spektrumları taranmıştır. Ayrıca in vitro salım çalışmalarında kullanılan alüminyum folyo ve adeziv bantın pH 7,4 fosfat tamponu ortamına verebileceği kirliliklerin analizi engellemeyeceğinin belirlenmesi için UV-Visible spektrumları taranmıştır. Hem distile su ortamında (Şekil 4.8) hem de pH 7,4 fosfat tamponu ortamında (Şekil 4.9) spektrumları taranan çözeltilerin, analizlerin yapıldığı 276 nm’de pike sahip olmadıkları görülmüştür.



Şekil 4.8. Distile su ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil, e) HPMC ve f) PVA çözeltilerinin UV spektrumları



Şekil 4.9. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 100 µg/mL’lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil çözeltilerinin ve e) adhezif bant, f) alüminyum folyo ile karıştırılmış pH 7,4 fosfat tamponlarının UV spektrumları

Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında, hem distile su hem de pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için geliştirilen analitik yöntemlerin, gerçek etkin madde miktarını doğru olarak tayin edebildiklerini göstermek amacıyla, her iki ortam için 8, 10 ve 12 µg/mL konsantrasyonlara sahip olduğu bilinen 3 stoktan ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5’te sunulmuştur. Tüm değerlerin %97-103 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin doğruluk çalışmaları kapsamında elde edilen %geri elde değerleri

	%	Çözeltideki Diklofenak Sodyum miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan Diklofenak Sodyum miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri Elde
Distile Su	80	8	$7,92 \pm 0,000$	98,9
	100	10	$9,89 \pm 0,000$	98,93
	120	12	$11,84 \pm 0,002$	98,63
pH 7,4 Fosfat Tamponu	80	8	$8,025 \pm 0,003$	100,31
	100	10	$10,061 \pm 0,002$	100,61
	120	12	$12,043 \pm 0,037$	100,36

Ortalama $\pm$ SS, n=3

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında, arka arkaya yapılan ölçümlerin birbirine yeterince yakın olduğunu göstermek amacıyla, her iki ortam için $4 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyona sahip stoktan yapılan 10 ölçümün bağıl standart sapması Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri

Örnek No	Çözeltili Derişimi ($\mu\text{g/mL}$)	Distile su ortamında hesapla bulunan derişimler ($\mu\text{g/mL}$)	pH 7,4 fosfat tamponu ortamında hesapla bulunan derişimler ($\mu\text{g/mL}$)
1	4	3,97	4,02
2	4	3,97	4,02
3	4	3,97	4,02
4	4	3,97	4,06
5	4	3,97	4,02
6	4	3,98	4,08
7	4	3,98	4,02
8	4	3,98	4,03
9	4	3,97	4,03
10	4	3,97	4,03
Ortalama		3,97	4,035
Standart Sapma		0,004	0,018
Bağıl Standart Sapma (%)		0,108	0,443

Deneyler arası kesinlik çalışlarında, farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin tutarlılığının belirlenmesi amacıyla, her iki ortam için 6, 10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stoklar, 3 farklı gün içerisinde ölçülerek bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin deneyler arası kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri

	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
Distile Su	6,0	5,901	5,904	5,863	5,890	0,023	0,386
	10,0	9,886	9,911	9,869	9,889	0,022	0,218
	15,0	14,769	14,767	14,775	14,770	0,004	0,029
pH 7,4 Fosfat Tamponu	6,0	5,890	5,890	5,953	5,910	0,035	0,591
	10,0	10,030	10,030	10,090	10,050	0,038	0,376
	15,0	15,047	15,045	15,090	15,061	0,025	0,166

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

Geliştirilen spektrofotometrik analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. İlgili sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Distile Su	0,703	2,129
pH 7,4 Fosfat Tamponu	0,436	1,321

Stabilite

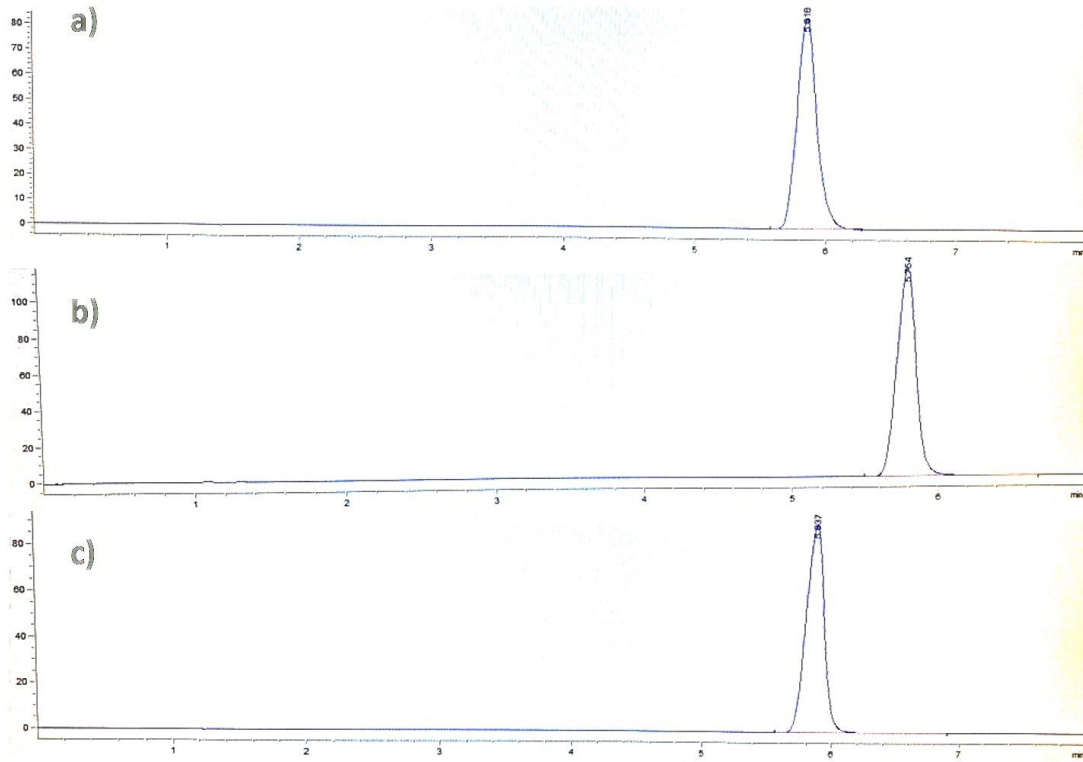
Stabilite çalışmaları kapsamında, her iki ortam için 20 µg/mL'lik stoklardan alınan örnekler 5, 25 ve 40°C'de 48 saat bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Hesaplanan bağıl sapma değerleri Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Distile su ortamı için geliştirilen yöntemin 25°C'de yapılan stabilite çalışmasının 48. saati dışında, tüm bağıl sapma değerlerinin %2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Geliştirilen UV-Visible spektrofotometrik analiz yöntemlerinin stabilite testi sonuçları

	Sıcaklık	Konsantrasyon (µg/mL)			Bağıl Sapma (%)	
		Başlangıç	24. Saat	48. Saat	24. Saat	48. Saat
Distile Su	5°C	19,8	19,9	19,8	0,010	0,460
	25°C	19,9	19,9	20,3	0,240	2,110
	40°C	19,9	19,9	20,1	0,060	0,840
pH 7,4 Fosfat Tamponu	5°C	20,1	20,1	20,2	0,159	0,432
	25°C	20,1	20,2	20,2	0,294	0,479
	40°C	20,1	20,2	20,3	0,227	0,982

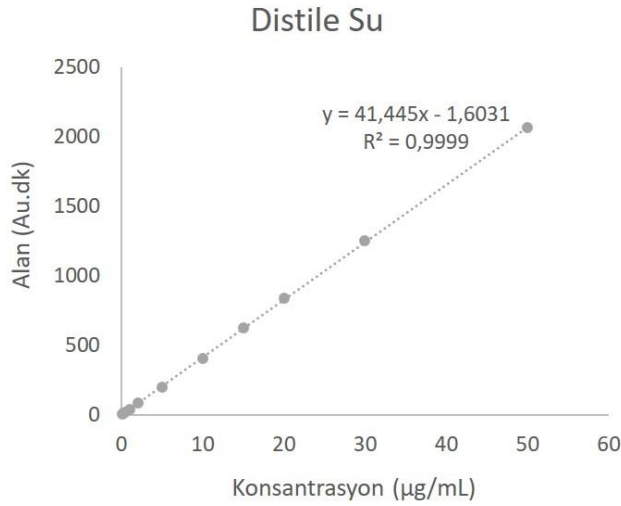
4.3.3. Kromatografik yöntem kullanılarak analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Diklofenak sodyumun HPLC ile analiz metodu pH 7,4 fosfat tamponu, distile su ve metanol ortamları için geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik metotlar kullanılarak diklofenak sodyumun ilgili ortamlardaki 10 µg/mL’lik stokları ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 4.10’da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemlerine ait a) distile su, b) pH 7,4 fosfat tamponu ve c) metanol ortamlarındaki kromatogramları

Diklofenak sodyumun distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusunun elde edilebilmesi için 100 µg/mL’lik stoktan 0,1 - 50 µg/mL aralığında 11 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. HPLC ile 276 nm’de analiz edilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi $y=41,445x - 1,6031$ olarak bulunmuştur. Lineer regresyonun istatistiksel verileri ve alıkonma zamanı Çizelge 4.10’da gösterilmiştir.

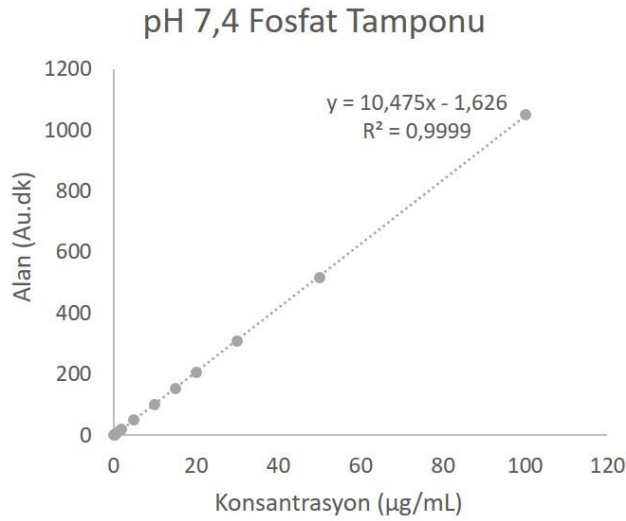


Şekil 4.11. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.10. Distile su ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı

Eğim ± SH	41,445 ± 0,114
Kesişim ± SH	-1,6031 ± 2,2141
R²	0,9999
Regresyonun Standart Hatası	5,7260
Alıkonma zamanı (dk)	5,92

Diklofenak sodyumun pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusunun elde edilebilmesi için için 100 µg/mL’lik stoktan 0,1 - 100 µg/mL aralığında 12 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmış ve HPLC ile 276 nm’de analiz edilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi $y=10,475x - 1,626$ olarak bulunmuştur. Lineer regresyonun istatistiksel verileri ve alıkonma zamanı Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

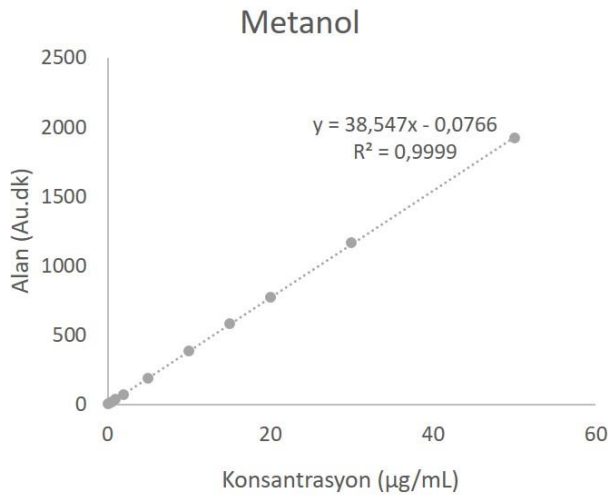


Şekil 4.12. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.11. pH 7,4 fosfat tamponu ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı

Eğim ± SH	10,475 ± 0,029
Kesişim ± SH	-1,6260 ± 0,9774
R²	0,9999
Regresyonun Standart Hatası	2,7880
Alıkonma zamanı (dk)	5,76

Diklofenak sodyumun metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusunun elde edilebilmesi için 100 µg/mL’lik stoktan 0,1 - 100 µg/mL aralığında 12 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmış ve HPLC ile 282 nm’de analiz edilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.13’te gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi $y=38,547x - 0,0766$ olarak bulunmuştur. Lineer regresyonun istatistiksel verileri ve alıkonma zamanı Çizelge 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Diklofenak sodyumun HPLC ile geliştirilen analitik yöntemine ait metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 4.12. Metanol ortamı için HPLC’de yapılan lineer regresyonun istatistikleri ve alıkonma zamanı

Eğim ± SH	38,547 ± 0,100
Kesişim ± SH	-0,0766 ± 1,9483
R²	0,9999
Regresyonun Standart Hatası	5,0388
Alıkonma zamanı (dk)	5,84

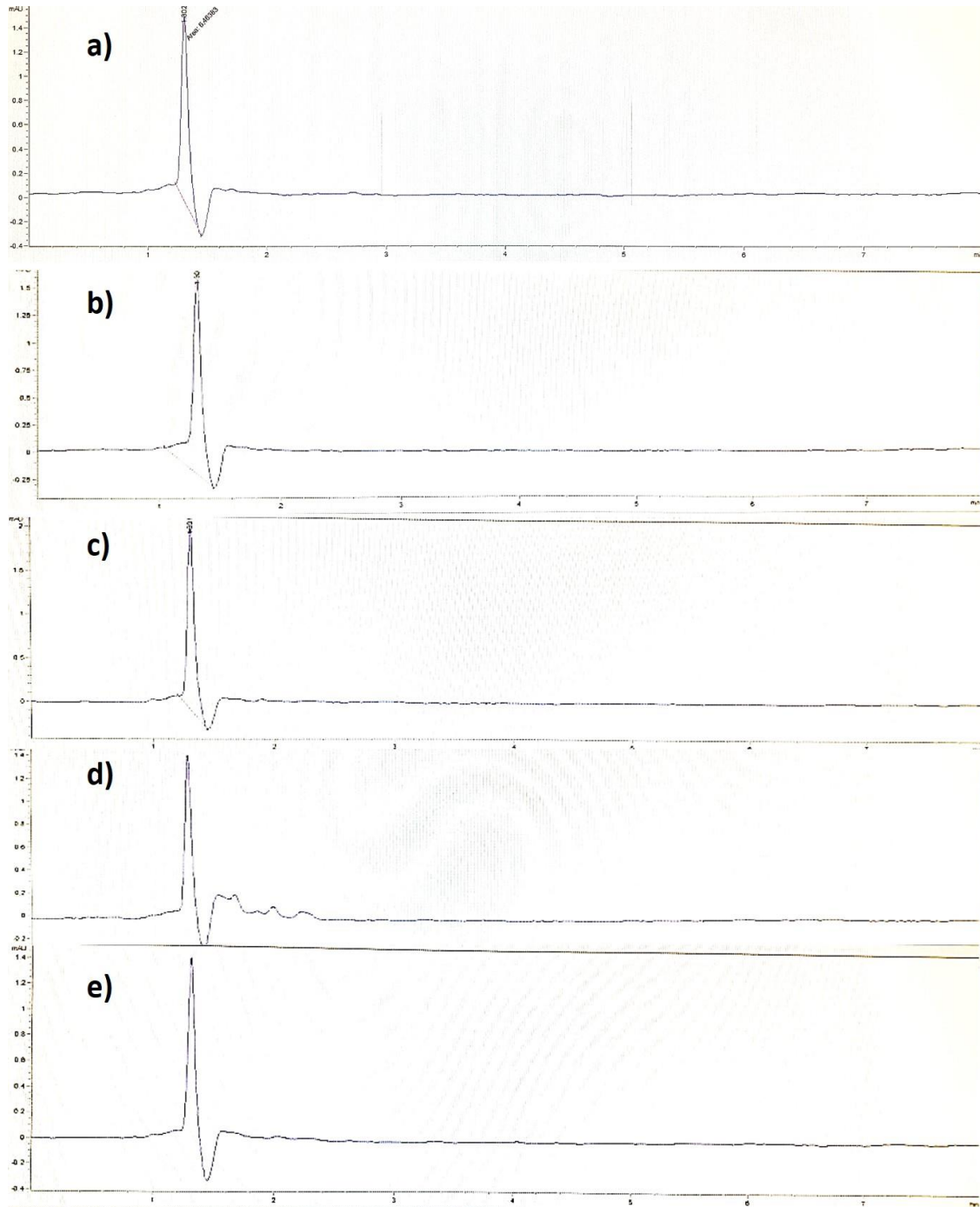
Doğrusallık

Diklofenak sodyumun her üç ortam için geliştirilen kalibrasyon doğrularının r^2 değerleri 0,999 olarak bulunmuştur. Bu değer elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

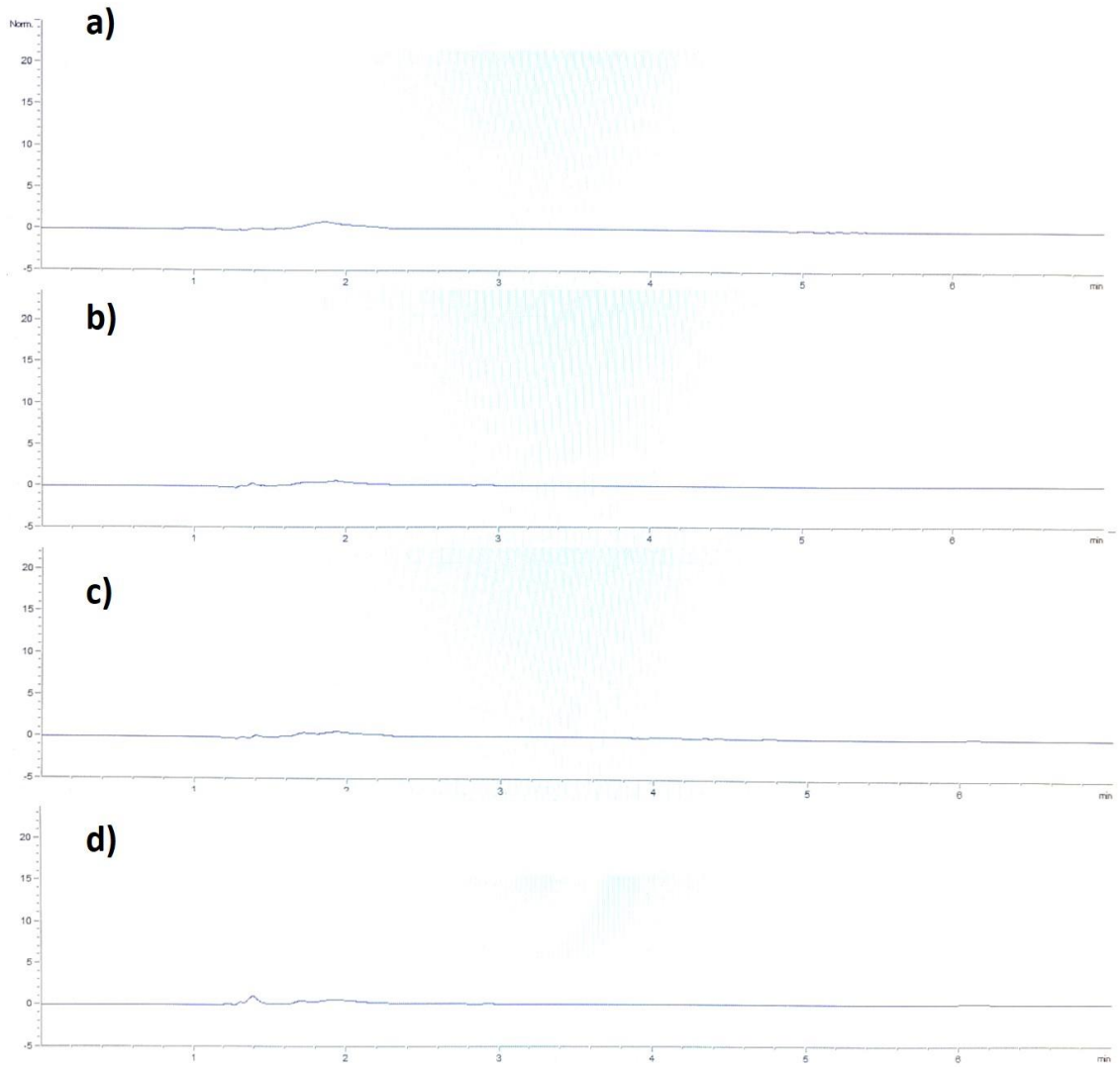
Seçicilik

Seçicilik çalışmaları kapsamında mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin ve yardımcı maddelerin pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamlarındaki kromatogramları alınmıştır. Ayrıca ex vivo deriden geçiş çalışmalarında kullanılan derinin, metanol ortamına verebileceği kirliliklerin analizi engelleyip engellemeyeceğinin belirlenmesi için kromatogramları alınmıştır. Hem pH 7,4 fosfat tamponu ortamında (Şekil 4.14) hem de

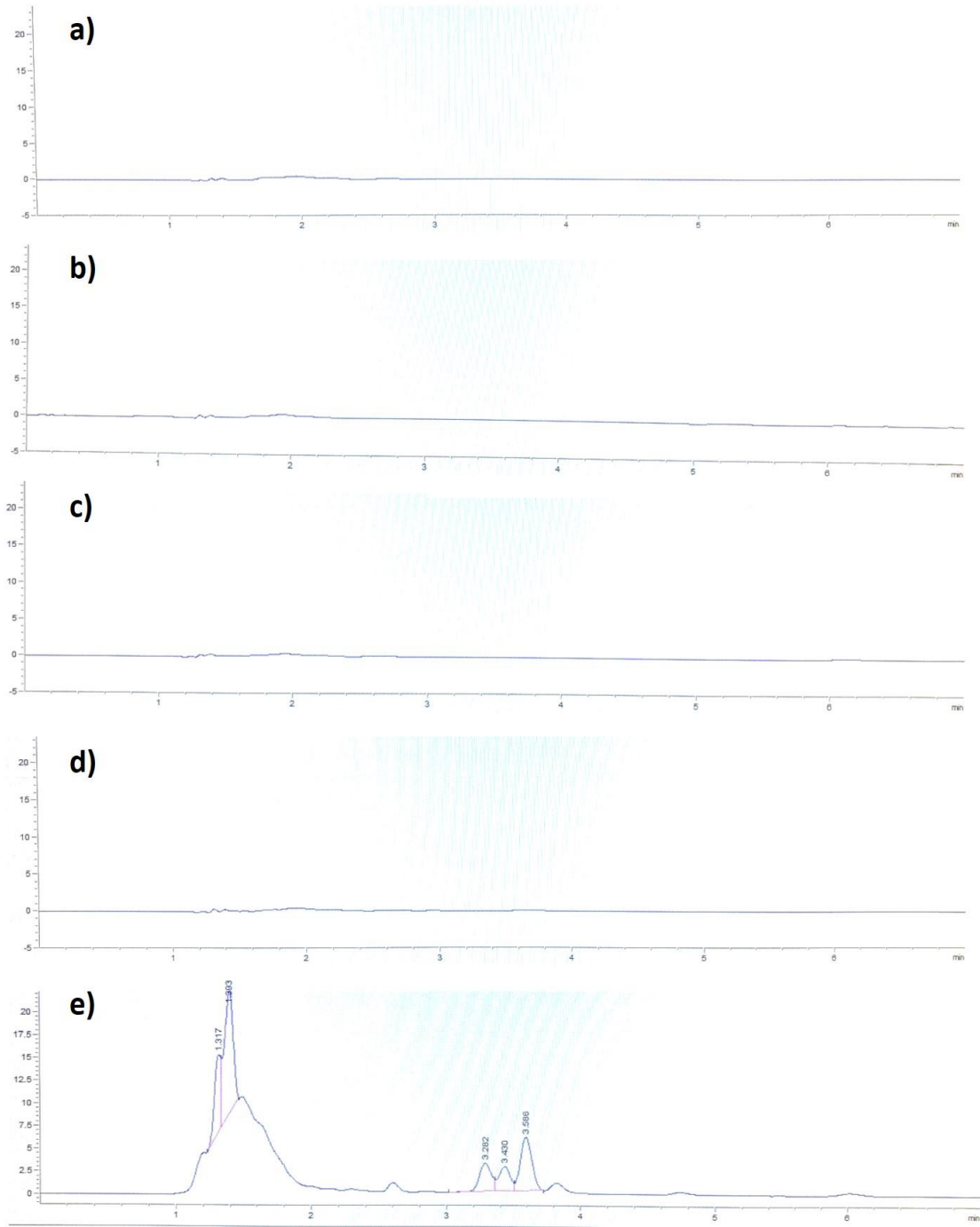
metanol ortamında (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) spektrumları taranan çözeltilerin, analizlerin yapıldığı alıkonma zamanında pike sahip olmadıkları görülmüştür.



Şekil 4.14. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil ve e) Transcutol CG çözeltilerinin kromatogramları



Şekil 4.15. Metanol ortamında 100 µg/mL'lik a) Gantrez S97, b) hyaluronik asit, c) PEG1500, d) polikarbofil çözeltilerinin kromatogramları



Şekil 4.16. Metanol ortamında 100 µg/mL'lik a) Lipoid S100, b) kolesterol, c) Transcutol CG, d) oleik asit çözeltilerinin ve e) sadece sıçan derisiyle yapılan metanol ekstraksiyonunun kromatogramları

Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamları için geliştirilen analitik yöntemlerin, gerçek etkin madde miktarını doğru olarak tayin edebildiklerini göstermek amacıyla, her iki ortam için 5, 10 ve 15 µg/mL konsantrasyonlara

sahip olduğu bilinen 3 stoktan ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.13'te sunulmuştur. Tüm değerlerin %97-103 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin doğruluk çalışmaları kapsamında elde edilen %geri elde değerleri

	%	Çözeltilerdeki Diklofenak Sodyum miktarı (µg/mL)	Hesaplanan Diklofenak Sodyum miktarı (µg/mL)	% Geri Elde
Distile Su	50	5	5,00 ± 0,002	100,08
	100	10	10,10 ± 0,022	98,96
	150	15	15,11 ± 0,026	99,25
pH 7,4 Fosfat Tamponu	50	5	5,06 ± 0,020	98,88
	100	10	9,90 ± 0,025	100,98
	150	15	14,90 ± 0,024	100,66
Metanol	50	5	5,10 ± 0,005	98,01
	100	10	9,82 ± 0,009	101,84
	150	15	14,70 ± 0,014	101,98

Ortalama ± SS, n=3

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında, arka arkaya yapılan ölçümlerin birbirine yeterince yakın olduğunu göstermek amacıyla distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol için sırasıyla, 4, 30 ve 5 µg/mL konsantrasyona sahip stoklardan yapılan 6 ölçümün bağıl standart sapması Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri

Örnek No	Distile Su		pH 7,4 Fosfat Tamponu		Metanol	
	Çözeltili derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)	Çözeltili derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)	Çözeltili derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)
1	2	2,00	30	29,87	5	5,10
2	2	1,99	30	29,83	5	5,10
3	2	1,99	30	29,72	5	5,13
4	2	1,99	30	29,74	5	5,09
5	2	1,99	30	29,87	5	5,09
6	2	1,99	30	29,78	5	5,09
Ortalama		1,990		29,802		5,10
Standart Sapma		0,003		0,066		0,02
Bağıl Standart Sapma		0,153		0,222		0,30

Deneyler arası kesinlik çalışlarında, farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin tutarlılığının belirlenmesi amacıyla, her iki ortam için 5, 10 ve 20 µg/mL’lik stoklar, 3 farklı gün içerisinde ölçülerek bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.15’te sunulmuştur. Bağıl standart sapma değerlerinin %2’den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin deneyler arası kesinlik çalışmaları kapsamında elde edilen bağıl standart sapma değerleri

	Derişim($\mu\text{g/mL}$)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
Distile Su	5,0	5,00	5,00	5,00	5,00	0,002	0,001
	10,0	10,10	10,09	10,11	10,10	0,009	0,001
	20,0	19,40	19,41	19,39	19,40	0,01	0,001
pH 7,4 Fosfat Tamponu	5,0	5,06	5,03	5,08	5,05	0,022	0,442
	10,0	9,90	9,88	9,96	9,91	0,043	0,432
	20,0	19,98	19,92	20,06	19,99	0,067	0,335
Metanol	5,0	5,10	5,11	5,132	5,11	0,019	0,364
	10,0	9,82	9,75	9,91	9,82	0,082	0,835
	20,0	19,65	19,62	19,82	19,70	0,108	0,548

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. İlgili sonuçlar Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin LOD ve LOQ değerleri

	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Distile Su	0,018	0,056
pH 7,4 Fosfat Tamponu	0,047	0,143
Metanol	0,047	0,143

Stabilite

Stabilite çalışmaları kapsamında distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamları için sırasıyla 30, 50 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stoklardan alınan örnekler 5, 25 ve 40°C'de 72 saat bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.17'de sunulmuştur. Bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin stabilite testi sonuçları

	Sıcaklık	Konsantrasyon (µg/mL)				Bağıl Sapma (%)		
		Başlangıç	24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Distile Su	5°C	28,7	28,7	28,7	28,8	0,289	0,289	0,481
	25°C	28,7	28,9	29,0	28,7	0,770	1,091	0,257
	40°C	28,7	28,8	28,7	28,7	0,385	0,289	0,064
pH 7,4 Fosfat Tamponu	5°C	50,8	50,9	50,9	50,9	0,306	0,325	0,230
	25°C	50,8	50,9	51,0	51,0	0,191	0,479	0,479
	40°C	50,8	50,9	50,9	51,0	0,230	0,211	0,421
Metanol	5°C	29,5	29,4	29,7	*	0,292	0,799	*
	25°C	29,5	29,3	30,0	*	0,538	1,846	*
	40°C	29,5	29,1	29,8	*	1,348	1,028	*
*İlgili çalışma yapılmamıştır.								

Sağlamlık

Sağlamlık validasyonu kapsamında, 3 farklı molariteye sahip pH 7,4 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan 5 µg/mL’lik diklofenak sodyum çözeltileri analiz edilmiştir. Hesaplanan bağıl sapma değerleri Çizelge 4.18’de sunulmuştur. Bağıl sapma değerlerinin %2’den küçük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. Geliştirilen HPLC analiz yönteminin sağlamlık testi sonuçları

pH 7,4 Fosfat Tamponu Molaritesi (M)	Ortalama	Standart Sapma	Bağıl Sapma (%)
0,05	5,15	-	-
0,025	5,14	0,017	0,958
0,005	5,14	0,028	1,276

4.4. Mikroigne Formülasyonlarının Geliştirilmesi

4.4.1. Mikroigne formülasyonlarının 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak üretim yönteminin geliştirilmesi

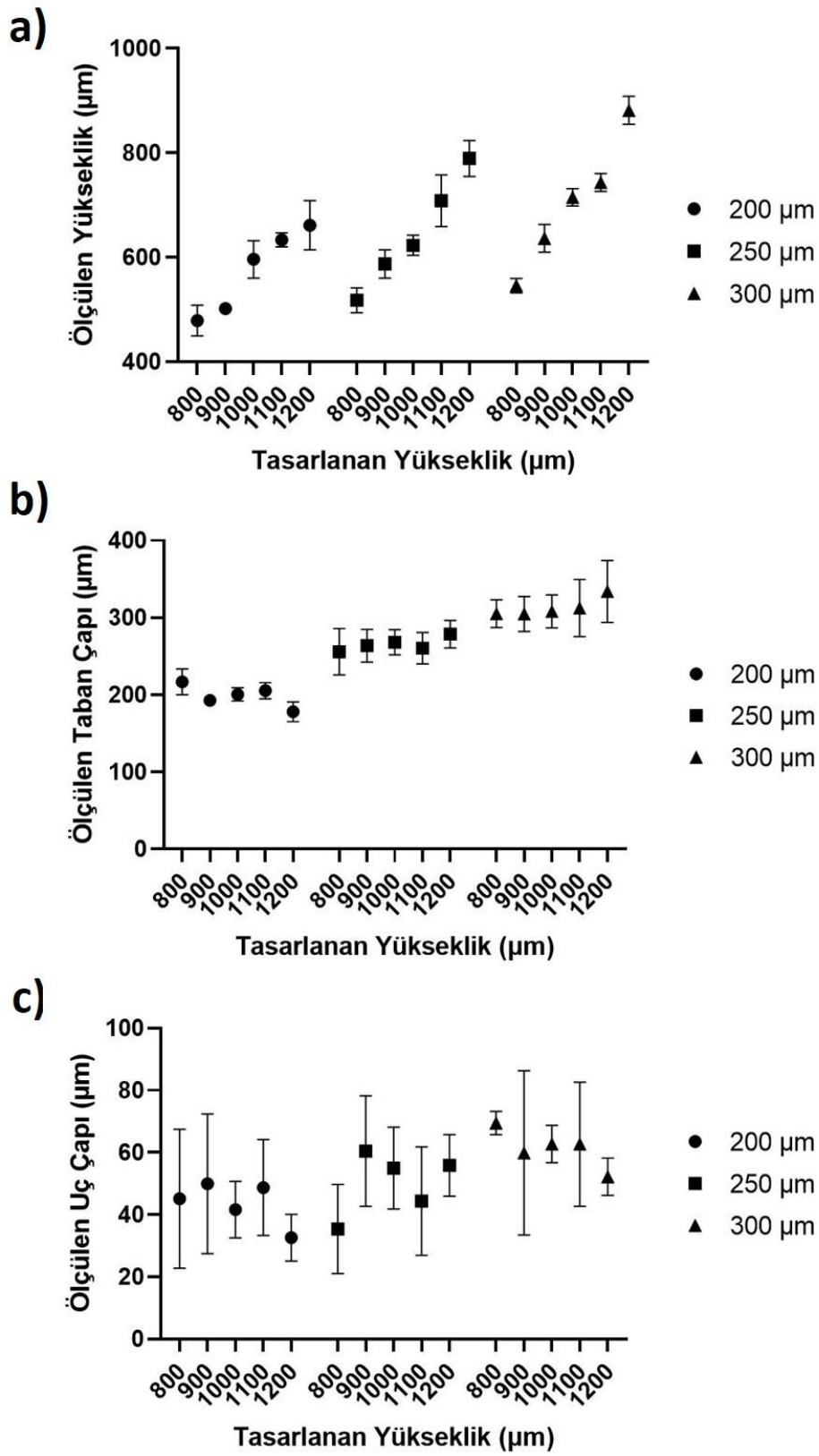
Kalıbın oluşturulması işlemi ana kalıbın eşlenmesi prensibine dayandığı için, ana kalıp olarak yaklaşık 500 μm uzunluğunda 10x10 adet mikroigne dizisine sahip 3 boyutlu baskı teknolojisi ile üretilmiş solid mikroigneler kullanılmıştır.

Ana kalıp üretimi

Ana kalıp üretimi Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikro boyutlarda yapılan tasarımlarda, SLA 3 boyutlu yazıcıların yazdırma çözünürlüğünden kaynaklanan farklılar meydana gelmektedir (Krieger ve diğerleri, 2019). Bu nedenle farklı yükseklik (800, 900, 1000, 1100, 1200 μm) ve taban çaplarına sahip (200, 250, 300 μm), 10x10 adet koni şeklinde mikroigne dizileri tasarlanmış ve SLA 3 boyutlu yazıcı ile yazdırılarak, elde edilen boyutlar optik mikroskop yardımı ile ölçülmüştür. Yapılan tasarımlar ile elde edilen mikroignelerin boyut kıyaslamasına ait grafikler Şekil 4.17'de gösterilmiştir. 3 tekrarlı yapılan ölçümlerde, aynı yükseklikte tasarlanan mikroignelerin, taban çapı arttıkça boylarının da arttığı gözlenmiştir. Boy:taban çapı oranı 4 olan tasarımlar karşılaştırıldığında 800:200 olarak tasarlanan mikroignenin girdi ve çıktı boyları arasındaki oran yaklaşık 0,6 iken, 1200:300 olarak tasarlanan mikroignede bu oran 0,73'tür. Bu durumda farklı taban çapları arasında, boy:taban çapı oranları doğrusallık göstermemektedir.

Taban çapları için girdi ve çıktı değerleri birbirine yakın elde edilmiştir. Uç çapları ile girilen yükseklik ve taban çapı parametreleri arasında ise bir ilişki bulunamamıştır.

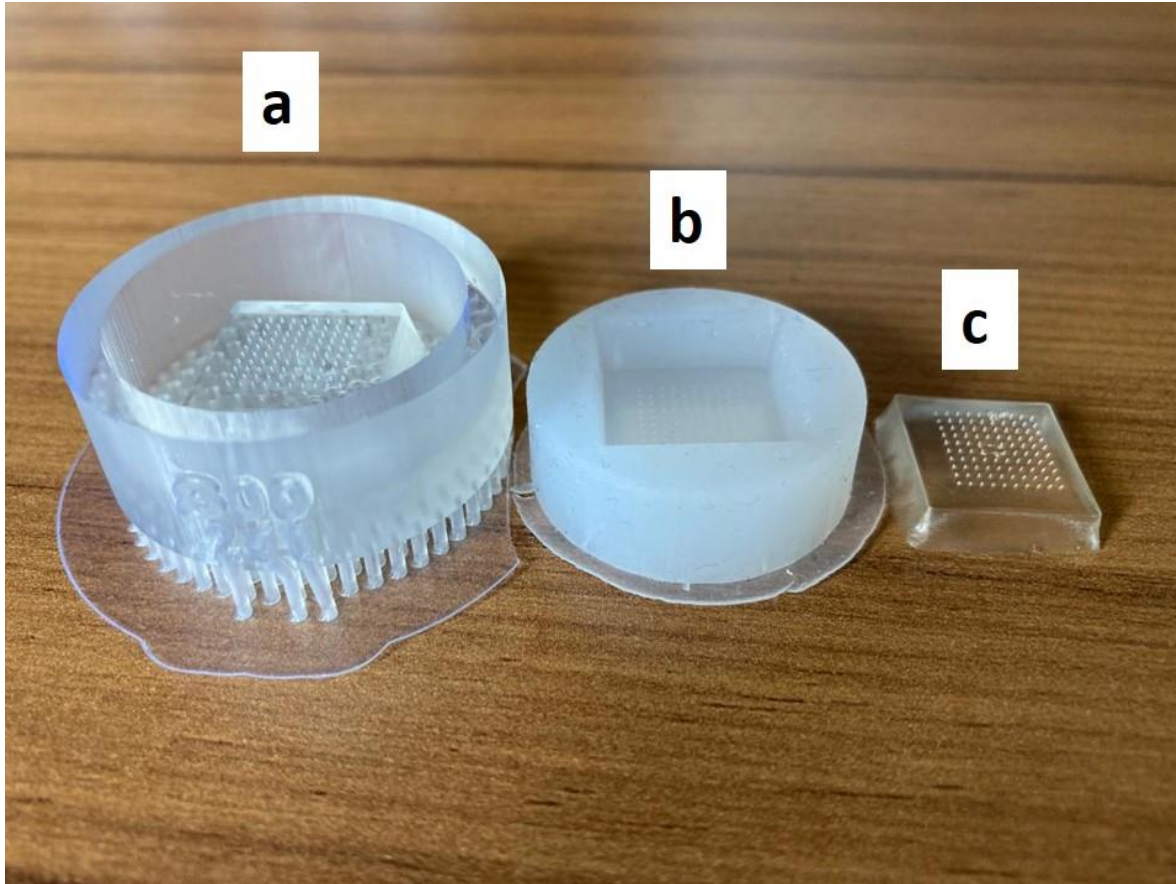
Yapılan denemeler sonucu 250 μm taban çapı ve 800 μm iğne yüksekliği ile tasarlanan mikroignelerde, yaklaşık 500 ($517,5 \pm 23,7$) μm uzunluk ve yaklaşık 250 ($255,8 \pm 30,0$) μm taban çapı elde edilmiştir. Bu mikroignelerin uç çapı $35,4 \pm 14,3$ μm olarak belirlenmiştir. Bu tasarım elde edilen en sivri mikroigne olup, ana kalıbın tasarlanması için kullanılmıştır.



Şekil 4.17. 3 boyutlu baskı ile üretilen solid mikroiğnelerin ölçülen a) yükseklik, b) taban çapı ve c) uç çapı parametrelerinin tasarlanan yükseklik ve taban çapına göre değişimi (Ortalama $\pm$ SS, n=6)

Ana kalıptan hareketle PDMS mikroiğne kalıbının oluşturulması

Ana kalıptan hareketle PDMS mikroiğne kalıplarının oluşturulması Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. PDMS mikroiğne kalıpları başarıyla oluşturulmuştur. Kalıpların mikroiğne üretiminde kullanılabilirliğini görmek amacıyla sadece Gantrez S97 içeren polimer çözeltisi ile mikroiğne üretimi gerçekleştirilmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1. (a) SLA 3 boyutlu yazıcıdan elde edilmiş ana kalıp, (b) ana kalıptan eşlenmiş PDMS kalıp, (c) PDMS kalıp ile üretilmiş Gantrez S97 mikroiğne

4.4.2. Mikroiğne formülasyonlarının hazırlanması

Mikroiğne formülasyonları, Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Belirtilen üretim yöntemi ile Bölüm 3.2.4'te yer alan Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'teki tüm mikroiğne formülasyonları başarıyla elde edilmiştir. Üretilen mikroiğneler kalıp şeklini almış, homojen ve minimum düzeyde hava kabarcığı içerecek şekilde elde edilmiştir.

Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin belirlenmesi

Bölüm 3.2.4'te yer alan Çizelge 3.2'de içeriklerinin ayrıntılı olarak verildiği F1, F2 ve F3 mikroiğne formülasyonlarında, çapraz bağlanma seviyeleri sabit tutulacak şekilde farklı molekül ağırlıklarına sahip PEG'ler kullanılmış ve en uygun PEG molekül ağırlığının seçilmesi amaçlanmıştır. Maksimum mekanik dayanıklılık ($p<0,01$) ve şişme indeksi ($p<0,05$) PEG1500 içeren F2 formülasyonu ile elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki aşamalarda üretilen mikroiğnelerde PEG1500 kullanılmıştır.

Farklı polimerik maddelerin mikroiğne formülasyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla F4, F5 ve F6 formülasyonları geliştirilmiştir. F4, F5 ve F6 formülasyonlarının mekanik dayanıklılık istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. F4 formülasyonunun ise F5 ve F6 formülasyonlarına göre daha düşük şişme indeksine sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). F5 ve F6 formülasyonlarının şişme indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın ortalama olarak en yüksek şişme indeksi F5 formülasyonu ile elde edilmiştir ($p>0,05$). Şişme, formülasyonlardan etkin madde salımının kontrol edilmesini sağlayan çok önemli bir parametredir. Bu nedenle, polikarbofil içeren F5 formülasyonu en uygun formülasyon olarak belirlenmiştir. İlgili formülasyonlara ait sertlik ve şişme indeksi sonuçları Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Bu aşamadan sonra, F5 formülasyonunu oluşturan polimerlere (Gantrez S97, PEG1500, polikarbofil) hyaluronik asit de eklenmiş ve bu polimerler deneysel tasarım ile oluşturulan optimum formülasyonların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.19. Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerlerin belirlenmesi amacıyla geliştirilen F1-F6 formülasyonlarının şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık sonuçları

Formülasyonlar	Şişme İndeksi* (%)	Mekanik Dayanıklılık** (N)
F1	1315 ± 149	2,70 ± 0,59
F2	4189 ± 544	3,87 ± 1,00
F3	2395 ± 153	2,38 ± 0,61
F4	1104 ± 163	4,47 ± 1,07
F5	3392 ± 468	4,36 ± 0,92
F6	2907 ± 788	3,86 ± 0,90

*Ortalama ± SS, n=3

**Ortalama ± SS, n>10

Deneysel tasarım kullanılarak optimum mikroïğne formülasyonlarının belirlenmesi

Deneysel tasarım Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada BBD kullanılarak, optimum formülasyonlarda kullanılacak polimer oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Gantrez S97/PEG1500 oranı sabit tutulmak üzere (2:0,125), formülasyondaki Gantrez S97 yüzdesi, hyaluronik asit yüzdesi ve polikarbofil yüzdesi bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Polimer yüzdelерinin, şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık üzerindeki etkisi incelenmiştir. İçerikleri Bölüm 3.2.4'te verilen (Bkn. Çizelge 3.3) 15 formülasyona ait şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık sonuçları Çizelge 4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Box-Behnken Tasarımı kapsamında üretilen mikroïğne formülasyonlarının şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık sonuçları

Formülasyonlar	Şişme İndeksi* (%)	Mekanik Dayanıklılık** (N)
F7	1037 ± 117	3,29 ± 0,79
F8	2985 ± 272	2,93 ± 0,96
F9	3078 ± 478	2,91 ± 0,54
F10	2607 ± 356	3,27 ± 1,04
F11	3299 ± 126	1,59 ± 0,66
F12	1557 ± 98	3,18 ± 0,57
F13	1036 ± 35	4,79 ± 0,81
F14	834 ± 62	1,83 ± 0,42
F15	1630 ± 300	2,31 ± 0,68
F16	1474 ± 36	3,38 ± 0,69
F17	1678 ± 154	2,75 ± 0,52
F18	1589 ± 84	2,37 ± 0,94
F19	1133 ± 61	2,89 ± 0,90
F20	1555 ± 97	2,58 ± 0,63
F21	1455 ± 67	3.38 ± 0.59

*Ortalama ± SS, n=3

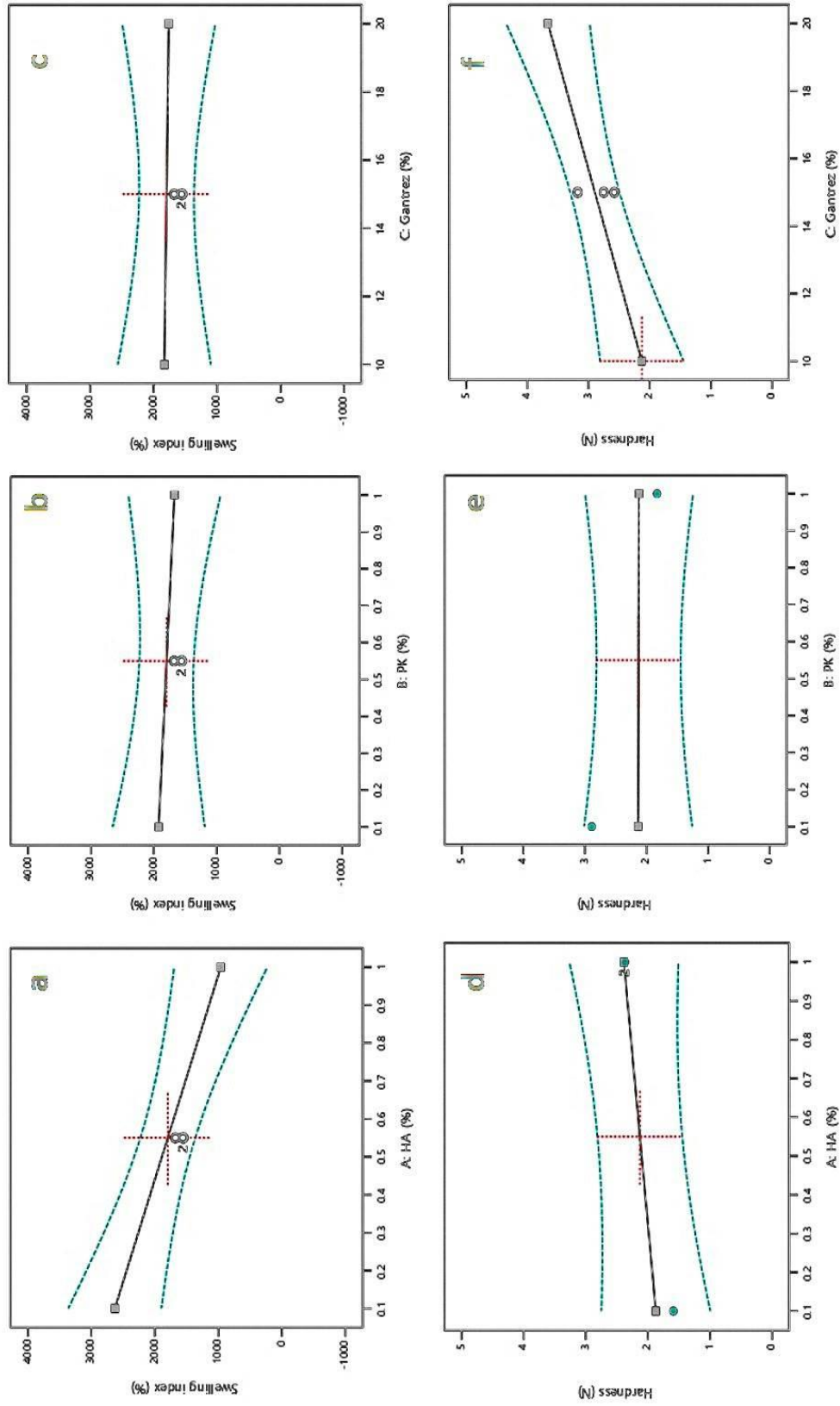
**Ortalama ± SS, n>10

Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki, her iki bağımsız değişken için doğrusal olarak belirlenmiştir. İlgili doğrusal matematiksel modele ait uyum parametreleri ve eşitlikler Çizelge 4.21'de verilmiştir. Doğrusal modelin ANOVA testi sonucunda, her iki bağımsız değişken için anlamlı ($p<0,01$) olduğu ve uyum eksikliği testinin anlamsız olduğu

($p>0,01$) belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre hyaluronik asit yüzdesinin şişme indeksi üzerinde, Gantrez S97 yüzdesinin ise sertlik üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). Şekil 4.18’de, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında kurulan doğrusal ilişki sonucu elde edilmiş grafikler gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. BBD’ye göre bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında oluşturulan matematiksel modelin ANOVA sonuçları, uyumluluk parametreleri ve eşitlikleri

	Şişme indeksi			Mekanik dayanıklılık		
	F değeri	P değeri		F değeri	P değeri	
Model	6,54	0,0085	anlamlı	6,93	0,0069	anlamlı
x_1 (Hyaluronik asit)	19,1	0,0011		2,1	0,1748	
x_2 (Polikarbofil)	0,432	0,5244		0,002	0,9671	
x_3 (Gantrez S97)	0,034	0,8566		18,7	0,0012	
Uyum eksikliği	70,8	0,0140	anlamsız	3,00	0,2750	anlamsız
R²	0,641			0,654		
Ayarlanmış R²	0,543			0,560		
Eşitlik	$y = 3080 - 1860 \times x_1 - 279 \times x_2 - 7,06 \times x_3$			$y = 0,289 + 0,572 \times x_1 - 0,017 \times x_2 - 0,154 \times x_3$		



Şekil 4.18. Şişme indeksi üzerindeki (a) hyaluronik asit, (b) polikarbofil, (c) Gantrez S97-PEG1500 yüzdelерinin etkisi ve mekanik dayanıklılık üzerindeki (d) hyaluronik asit, (e) polikarbofil, (f) Gantrez S97-PEG1500 yüzdelерinin etkisi

Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişkiyi tanımlayan denklemler kullanılarak, tasarım aralığında yer alan, mekanik dayanıklılığın ve şişme indeksinin en fazla olabileceği formülasyonlar belirlenmiştir. Belirleme aşamasında en yüksek mekanik dayanıklılık “çok önemli” olarak, en yüksek şişme indeksi ise “çok önemli”, “az önemli” ve “önemsiz” olarak 3 seviyede tanımlanmıştır. Bunun sonucunda, yazılım tarafından belirlenen üç farklı optimum formülasyon bileşimi ortaya çıkmıştır (F22, F23 ve F24, Bkz. Çizelge 4.22). Bu formülasyonların içerikleri, Design Expert® 13.0 yazılımı tarafından belirlenen “istenebilirlik katsayısı”, yazılım tarafından tahmin edilen bağımsız değişken verileri ve bu bağımsız değişkenlerin deneysel verileri Çizelge 4.22’de verilmiştir. İstenebilirlik katsayısı, elde edilmek istenilen özelliklerin yazılım tarafından önerilen formülasyonlar ile ne ölçüde sağlanabileceğinin bir parametresidir. 1 en yüksek sağlamayı, 0 en düşük sağlamayı ifade eder.

Geliştirilen modelin uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, bağımsız değişkenler olan şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık parametrelerinin tahmin edilen ve deneysel olarak elde edilen sonuçları kıyaslanmıştır. Her iki parametre için yazılımın verdiği sonuçlar ile deneysel sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durum, deneysel tasarımın doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Optimum formülasyonlar (F22, F23 ve F24) üzerinde şişme indeksi çalışmaları, mekanik dayanıklılık testi, etkin madde miktar tayini, morfolojik inceleme, ex vivo deri delme çalışmaları, stabilite çalışmaları, in vitro salım çalışmaları, hücre kültürü çalışmaları, ex vivo deriden geçiş/deride birikim çalışmaları ve in vivo çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.22. Optimum formülasyonların içerikleri, istenebilirlik katsayıları, tahmin edilen bağımsız değişken verileri ve bu bağımsız değişkenlerin deneysel verileri

Formülasyonlar		F22	F23	F24
İstenebilirlik katsayısı		0,661	0,609	0,731
Formülasyon bileşenleri (% a/a)	Diklofenak sodyum	0,35	0,35	0,35
	Hyaluronik asit	0,1	0,42	1
	Polikarbofil	0,1	0,1	0,1
	Gantrez S97	20	20	20
	PEG1500	1,125	1,125	1,125
Şişme indeksi (%)	Önemlilik	çok önemli (+++++)	az önemli (+)	Önemsiz ()
	Tahmin edilen	2721 ± 540	2128 ± 540	1052 ± 540
	Deneysel	2646 ± 107	1955 ± 161	1220 ± 99
	T testi (p=)	0,826	0,623	0,624
Mekanik dayanıklılık (N)	Önemlilik	çok önemli (+++++)	çok önemli (+++++)	çok önemli (+++++)
	Tahmin edilen	3,41 ± 0,50	3,60 ± 0,50	3,93 ± 0,50
	Deneysel	3,64 ± 0,74	3,73 ± 0,79	4,17 ± 0,86
	T testi (p=)	0,617	0,786	0,638
Deneysel veriler şişme indeksi için Ortalama ± SS, n=3 mekanik dayanıklılık için Ortalama ± SS, n>10 olarak verilmiştir.				

4.5. Mikroigne Formülasyonlarının Karakterizasyonları

4.5.1. Polimer karışımlarının reolojik özellikleri

Mikroigne formülasyonlarının polimer karışımlarının içerikleri Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'te verilmiştir.

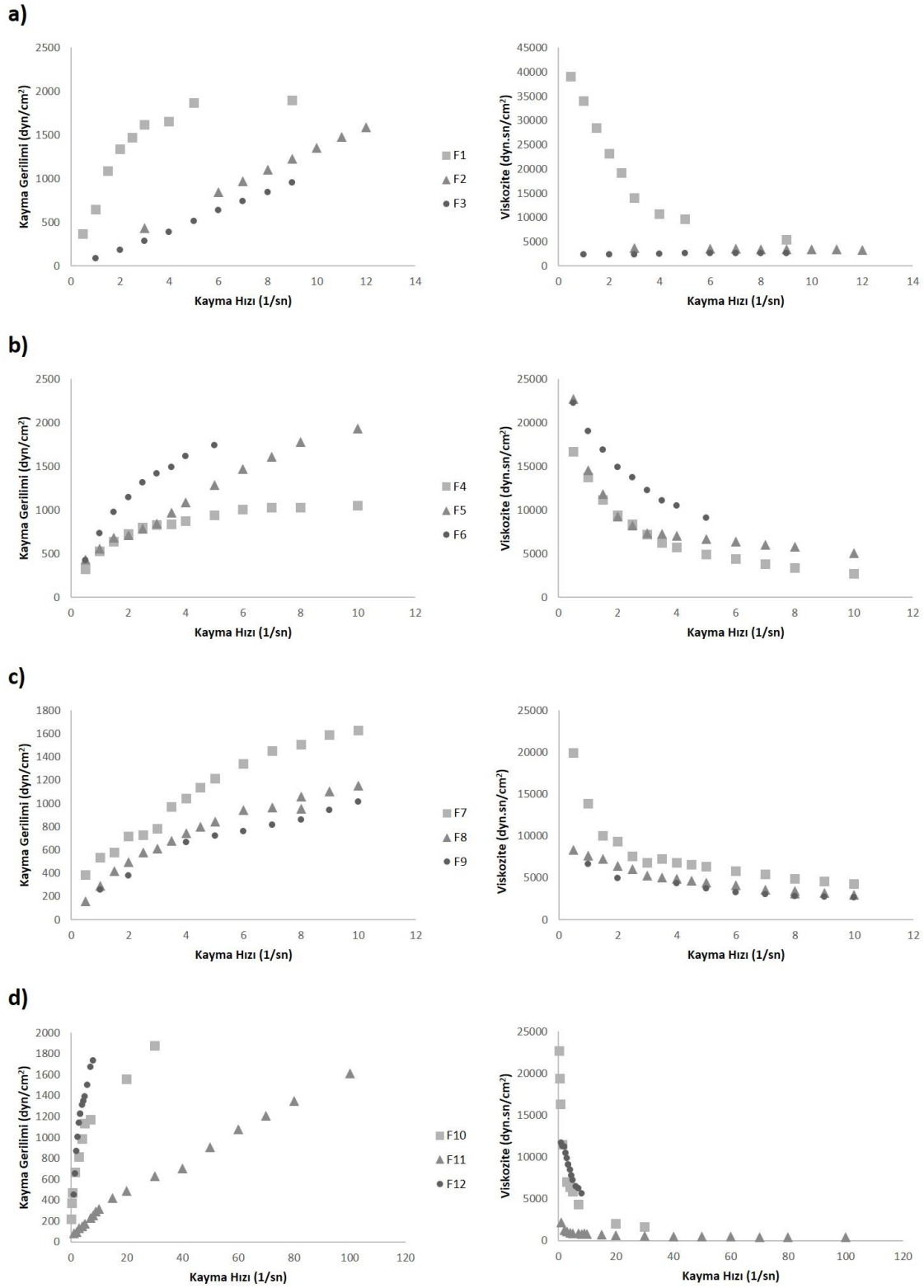
Çizelge 4.24. F7-F24 formülasyonlarının polimer karışımlarının bileşenleri ve oranları

Formülasyonlar	Diklofenak sodyum (% a/a)	Hyaluronik asit (% a/a)	Polikarbofil (% a/a)	Gantrez S97 (% a/a)	PEG1500 (% a/a)	Distile Su y.m. (% a/a)
F7	0,35	1	1	15	0,843	100
F8	0,35	0,1	1	15	0,843	100
F9	0,35	0,1	0,1	15	0,843	100
F10	0,35	0,1	0,55	20	1,125	100
F11	0,35	0,1	0,55	10	0,563	100
F12	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F13	0,35	1	0,55	20	1,125	100
F14	0,35	0,55	1	10	0,563	100
F15	0,35	1	0,1	15	0,843	100
F16	0,35	0,55	0,1	20	1,125	100
F17	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F18	0,35	1	0,55	10	0,563	100
F19	0,35	0,55	0,1	10	0,563	100
F20	0,35	0,55	0,55	15	0,843	100
F21	0,35	0,55	1	20	1,125	100
F22	0,35	0,1	0,1	20	1,125	100
F23	0,35	0,42	0,1	20	1,125	100
F24	0,35	1	0,1	20	1,125	100

Mikroiğne formülasyonlarının temelini oluşturan polimer karışımlarının viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan polimer çözeltilerinin Kayma gerilimi-Kayma hızı ve Viskozite-Kayma hızı grafikleri Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Elde edilen grafiklere göre polimer karışımlarının Newtonian akış göstermedikleri belirlenmiştir. Bu nedenle Viskozite-Kayma Hızı grafikleri Ostwald de Waele Power-Law eşitliği kullanılarak doğrusallaştırılmıştır. Doğrusallaştırılmış Log(Viskozite)-Log(Kayma hızı) grafikleri Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

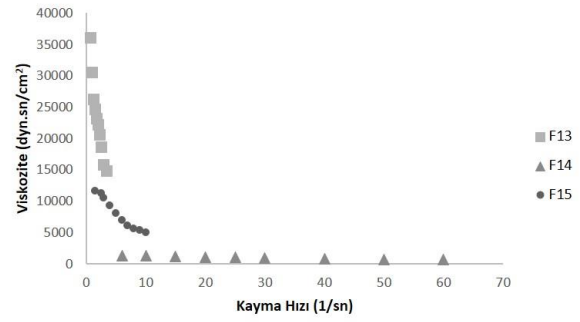
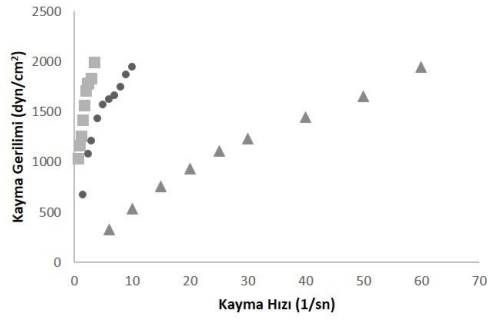
Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K ve n değerleri Çizelge 4.25, Çizelge 4.26 ve Çizelge 4.27’de gösterilmiştir. F3 formülasyonu (dilatan akış) haricinde tüm formülasyonların psödoplastik akış gösterdiği bulunmuştur. F22, F23 ve F24 polimer karışımlarının K değerleri ile hyaluronik asit miktarları arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Hyaluronik asit oranının artışı ile beklenildiği gibi polimer karışımlarının viskozitesi de artmıştır. Tüm polimer karışımları ile mikroiğne formülasyonlarının üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma alanı içerisinde, polimer karışımlarının viskozitelerindeki farklılığın mikroiğne oluşumu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.



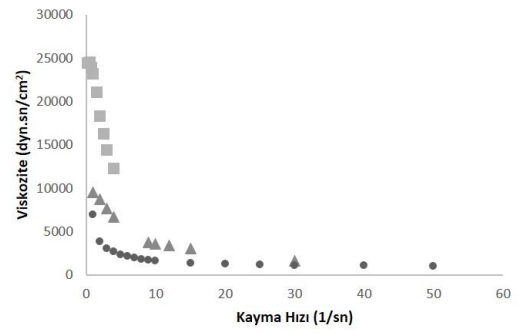
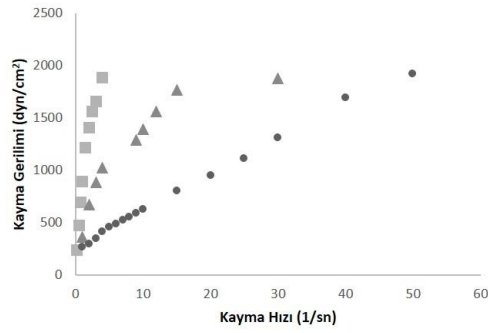


Şekil 4.19. (a) F1, F2, F3, (b) F4, F5, F6, (c) F7, F8, F9, (d) F10, F11, F12 polimer karışımlarının Kayma Gerilim-Kayma Hızı ve Viskozite-Kayma Hızı grafikleri

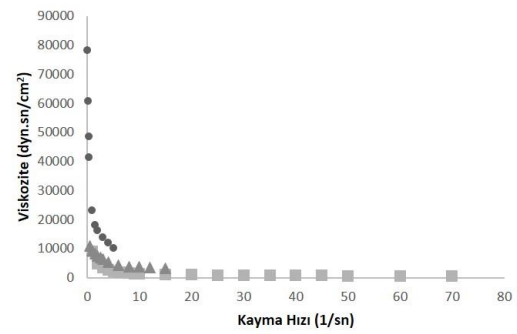
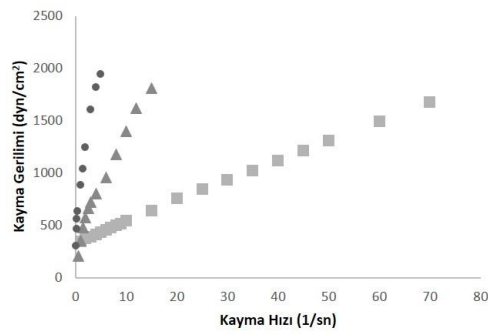
a)



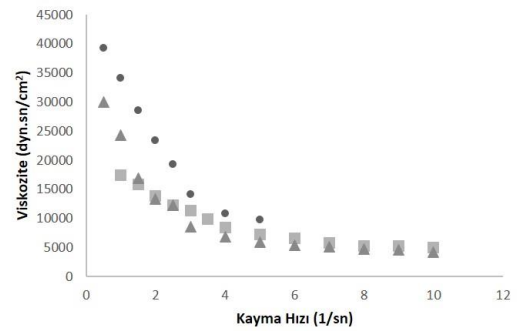
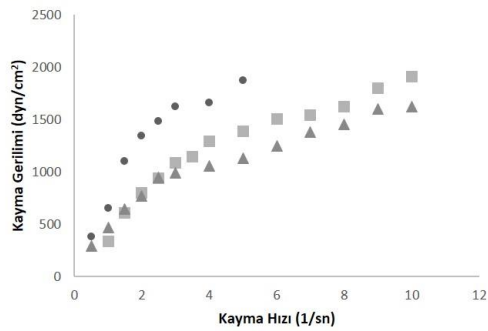
b)



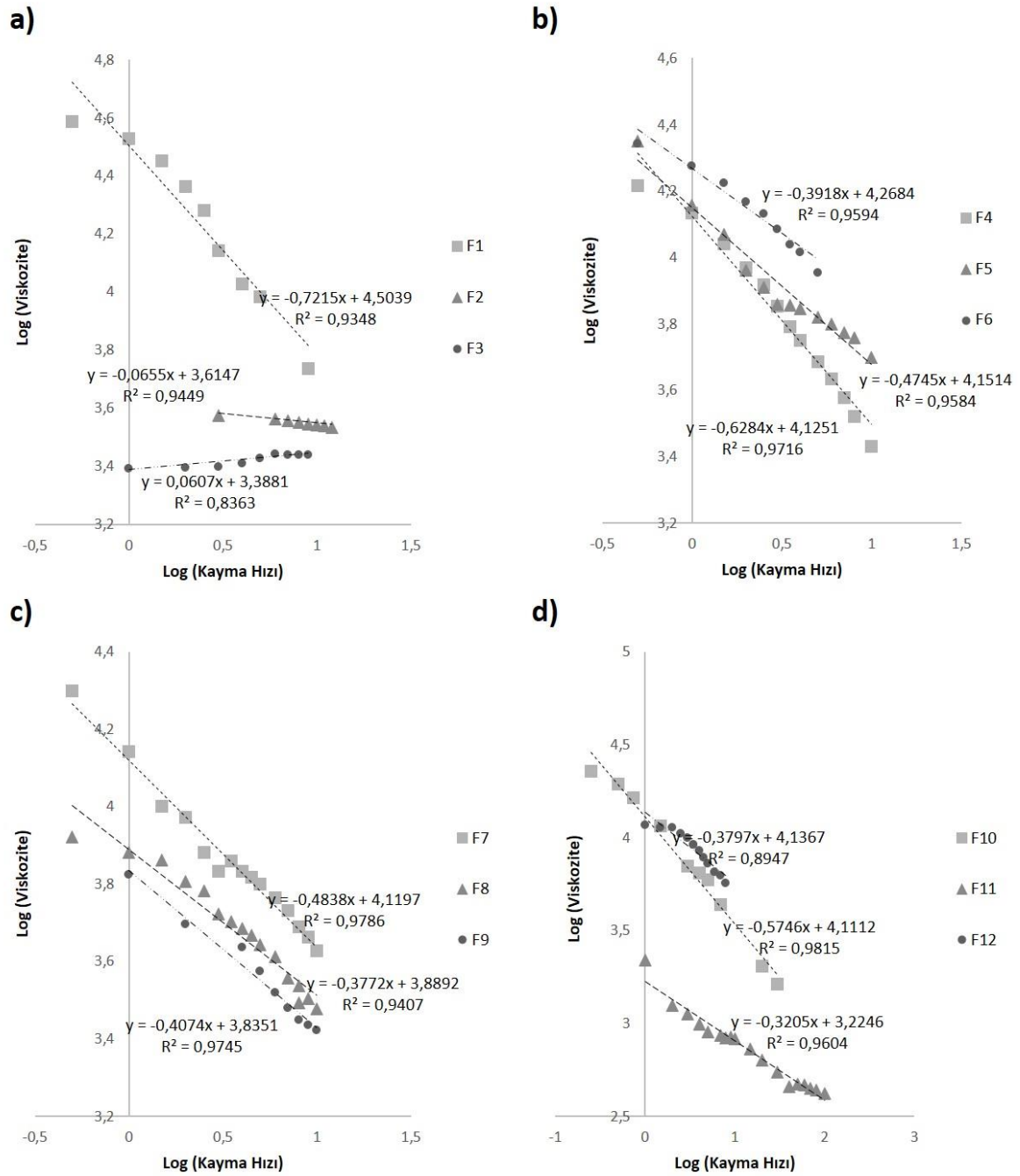
c)



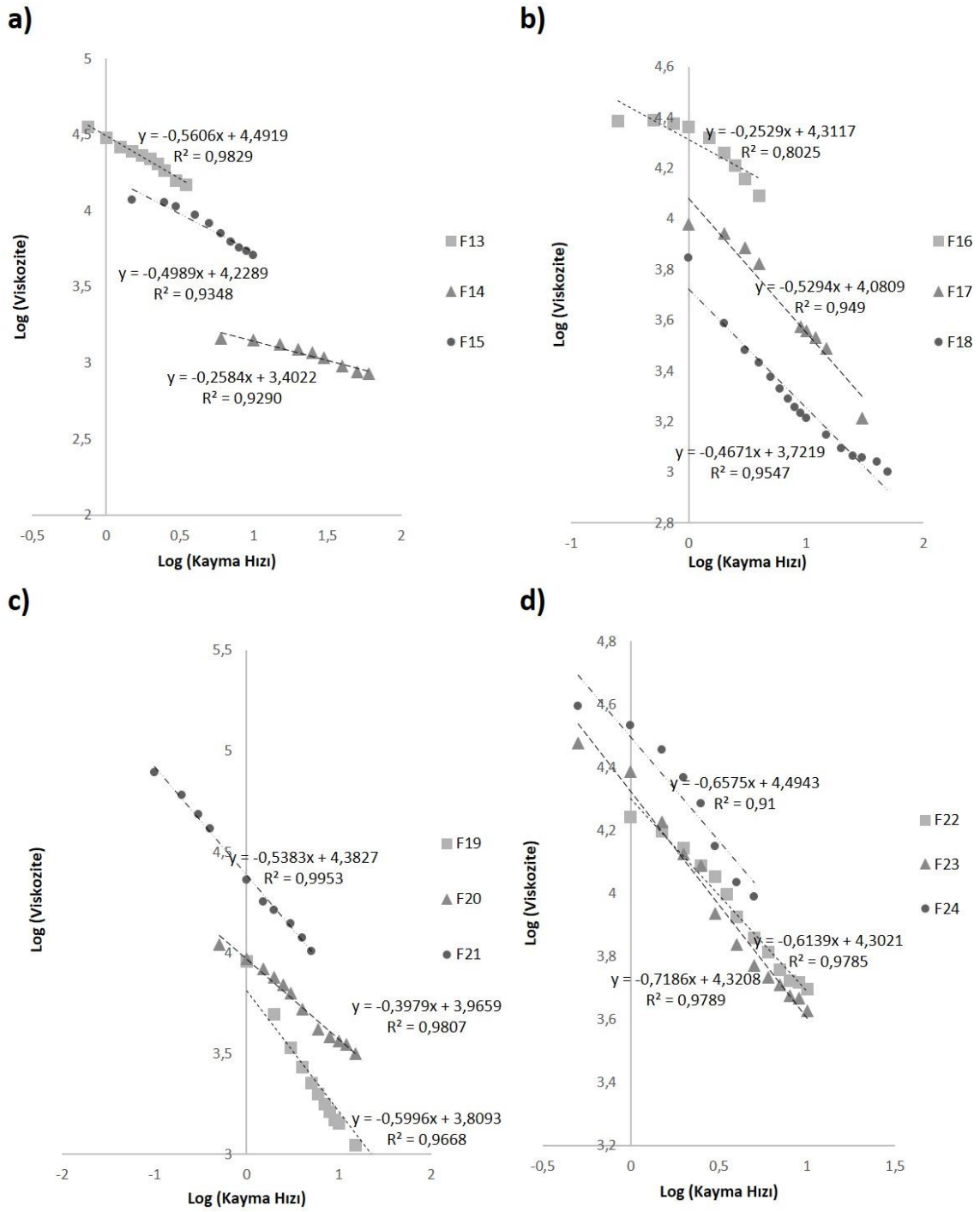
d)



Şekil 4.20. (a) F13, F14, F15, (b) F16, F17, F18, (c) F19, F20, F21, (d) F22, F23, F24 polimer karışımlarının Kayma Gerilim-Kayma Hızı ve Viskozite-Kayma Hızı grafikleri



Şekil 4.21. (a) F1, F2, F3, (b) F4, F5, F6, (c) F7, F8, F9, (d) F10, F11, F12 polimer karışımlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri



Şekil 4.22. (a) F13, F14, F15, (b) F16, F17, F18, (c) F19, F20, F21, (d) F22, F23, F24 polimer karışımlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri

Çizelge 4.25. F1-F6 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r^2 değerleri

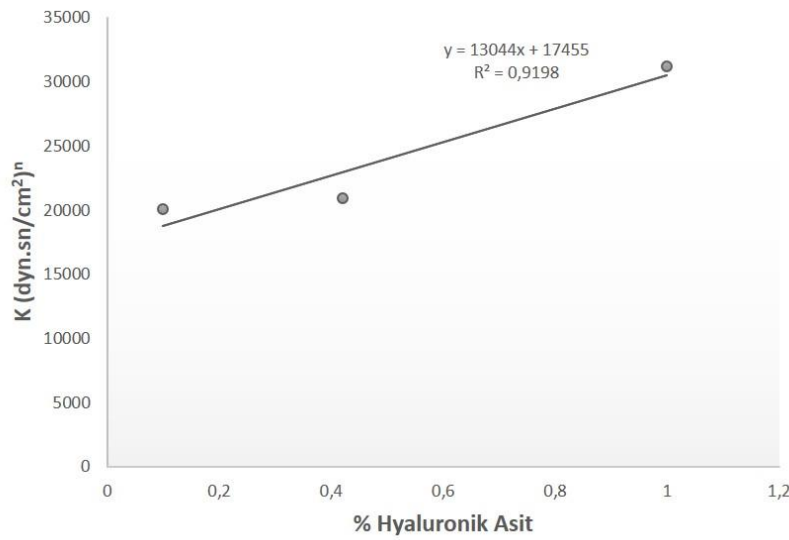
Formülasyonlar	n	K (dyn.sn/cm ²) ⁿ	r^2
F1	0,278	31908	0,935
F2	0,934	4118	0,945
F3	1,061	2444	0,839
F4	0,372	13337	0,972
F5	0,525	14171	0,958
F6	0,608	18552	0,959

Çizelge 4.26. F7-F21 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r^2 değerleri

Formülasyonlar	n	K (dyn.sn/cm ²) ⁿ	r^2
F7	0,516	13173	0,979
F8	0,623	7747	0,941
F9	0,593	6841	0,975
F10	0,425	12917	0,982
F11	0,680	1677	0,960
F12	0,620	13699	0,895
F13	0,439	31037	0,983
F14	0,742	2525	0,929
F15	0,501	16941	0,935
F16	0,747	20497	0,803
F17	0,471	12046	0,949
F18	0,533	5271	0,955
F19	0,400	8370	0,967
F20	0,602	9245	0,981
F21	0,462	24140	0,995

Çizelge 4.27. F22-F24 polimer karışımlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K, n ve r² değerleri

Formülasyonlar	n	K (dyn.sn/cm ²) ⁿ	r ²
F22*	0,386	20049	0,979
F23**	0,281	20931	0,979
F24***	0,343	31210	0,910
Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1			



Şekil 4.23. Optimum formülasyonların K değerleri ile hyaluronik asit yüzdeleri arasındaki ilişki

4.5.2. Polimer karışımlarının PDMS ile temas açısı tayini

Polimer karışımlarının, hazırlanan mikroiğne kalıplarının materyali olan PDMS ile yaptığı temas açısı ölçümü Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.28'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunsa da ($p > 0,05$), optimum formülasyonları oluşturan F22, F23 ve F24 polimer karışımlarının temas açısı verilerine göre hyaluronik asit miktarı arttıkça temas açısı artmıştır. Bu durum hyaluronik asit miktarındaki artışın, polimer karışımı hidroflikliğini artırdığını göstermektedir. Tüm polimer karışımlarının PDMS ile oluşturdukları temas açıları 90°'den küçük bulunmuş ve PDMS'i ıslatabileceği sonucuna varılmıştır. Tüm polimer karışımları ile mikroiğne formülasyonlarının üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi nedeniyle, polimer karışımlarının PDMS ile oluşturduğu temas açısının mikroiğne oluşumu üzerinde olumsuz herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.28. Polimer karışımlarının PDMS ile yaptığı temas açısı

Formülasyonlar	Temas Açısı (°)
F4	79,00 ± 6,58
F5	75,06 ± 8,85
F6	66,75 ± 6,78
F7	72,79 ± 12,72
F8	67,67 ± 3,79
F9	66,39 ± 8,37
F10	78,07 ± 1,43
F11	78,68 ± 6,68
F12	59,08 ± 4,95
F13	58,85 ± 4,44
F14	62,2 ± 5,64
F15	70,81 ± 14,04
F16	64,64 ± 10,15
F17	67,39 ± 3,27
F18	63,72 ± 3,92
F19	70,54 ± 4,13
F20	68,91 ± 8,79
F21	56,41 ± 8,22
F22*	59,91 ± 12,7
F23**	65,35 ± 10,58
F24***	70,22 ± 10,36

Ortalama ± SS, n=3

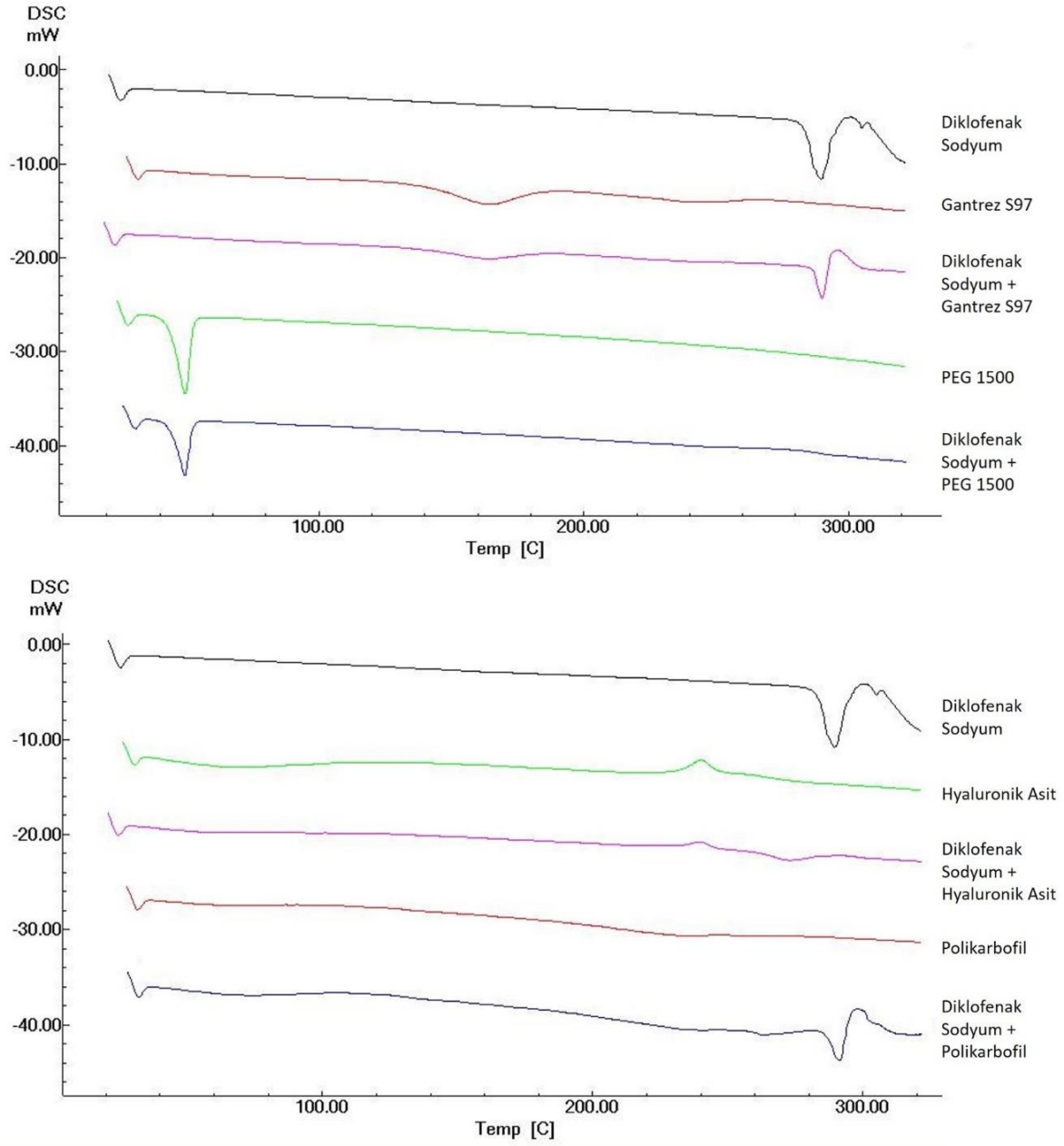
Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1

4.5.3. DSC analizi

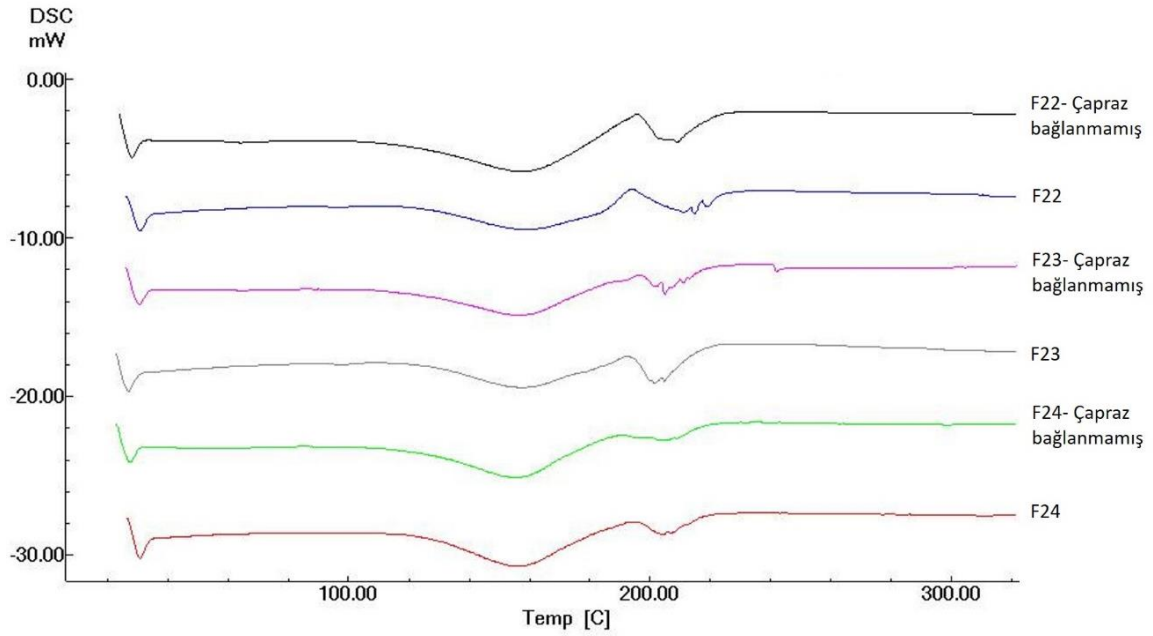
Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi için yapılan DSC analizi bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroiğne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve etkin maddeye ait DSC termogramları Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Saf diklofenak sodyum numunesine ait termogramda yaklaşık 283°C'de endotermik pik gözlenmiştir. Gantrez S97'ye ait termogramda, 157°C'de geniş bir pik meydana gelmiştir. Gantrez S97 ve diklofenak

sodyumun fiziksel karışımında her iki maddeye de ait pikler mevcut olup aralarında etkileşim meydana gelmemiştir. PEG1500'e ait endotermik pik yaklaşık 50°C'de elde edilmiştir. Diklofenak sodyum ve PEG1500'ün fiziksel karışımında ise diklofenak sodyuma ait pik kaybolmuştur. Hyaluronik asit termogramında 250°C'de yer alan ekzotermik bir pik gözlenmiştir. Hyaluronik asit–diklofenak sodyumun fiziksel karışımında ise hyaluronik asite ait ekzotermik pik gözlenirken, etkin maddeye ait pik kaybolmuştur.

Optimum mikroiğne formülasyonlarına ait DSC termogramları Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Çapraz bağlama reaksiyonunun, formülasyonların termogramlarında değişikliğe neden olup olmadığının kontrol edilmesi için çapraz bağlanmamış mikroiğne formülasyonlarının da DSC analizleri yapılmıştır. Formülasyonların iskelet polimeri olan Gantrez S97'ye ait pik gözlenebilirken, diğer bileşenlere ait pikler gözlenmemiştir. Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, etkin madde ile formülasyon bileşenleri arasında belirgin bir geçimsizlik gözlenmemiştir.



Şekil 4.24. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve diklofenak sodyumun DSC termogramları

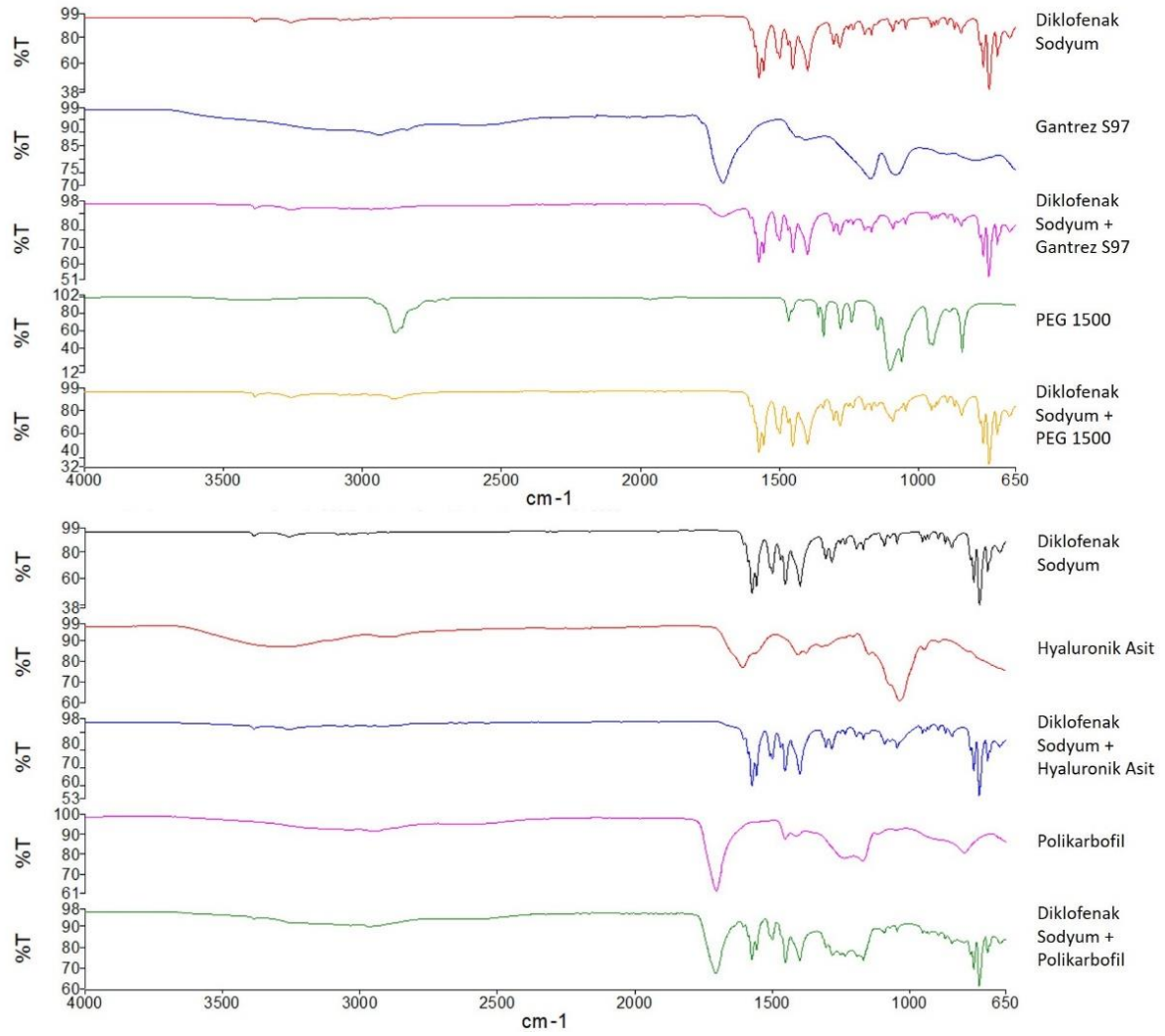


Şekil 4.25. Mikroigne formülasyonlarının DSC termogramları

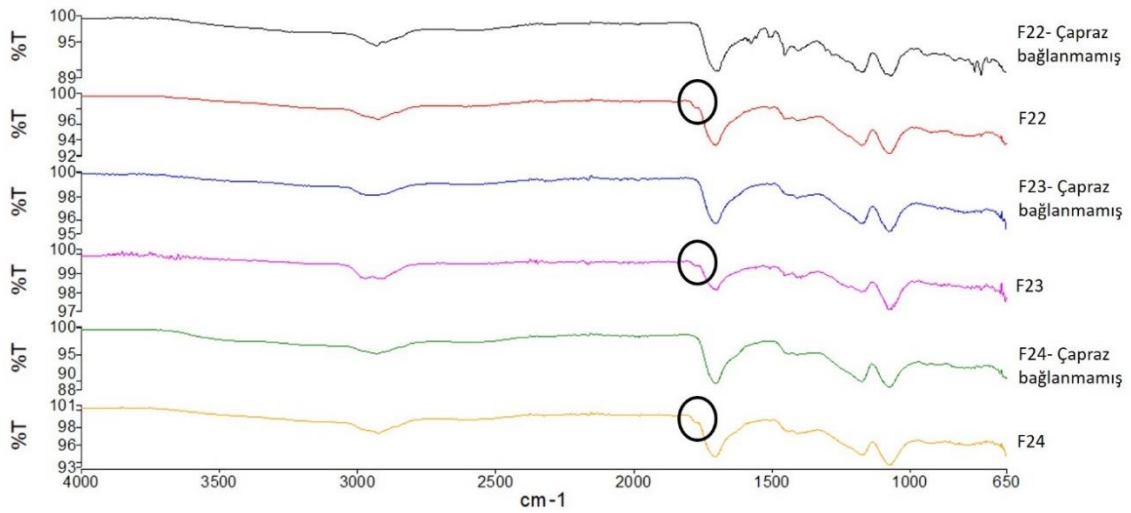
4.5.4. FTIR analizi

Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi için yapılan FTIR analizi Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve etkin maddeye ait FTIR spektrumları Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Saf diklofenak sodyum 3380 cm^{-1} 'de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} 'de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm^{-1} 'de -C-Cl piki, $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ 'de -CN grubuna ait olan pikler meydana getirmektedir (Öztürk ve diğerleri, 2020). Mikroigneleri oluşturan yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun fiziksel karışımlarına ait FTIR spektrumları incelenmiş ve tüm etkin madde-polimer karışımlarında diklofenak sodyumun 3380 cm^{-1} 'deki sekonder amin piki ile parmak izi bölgesindeki piklerinin varlığını koruduğu görülmüştür.

Optimum mikroigne formülasyonlarına ait FTIR spektrumları Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Çapraz bağlama reaksiyonunun, formülasyonların spektrumlarında değişikliğe neden olup olmadığının kontrol edilmesi için çapraz bağlanmamış mikroigne formülasyonlarının da FTIR analizleri yapılmıştır. Yuvarlak içerisine alınmış 1780 cm^{-1} 'de yer alan piklerin çapraz bağlama işleminden sonra meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.26. Mikroigne formülasyonlarında kullanılan polimerler ve diklofenak sodyumun FTIR spektrumları



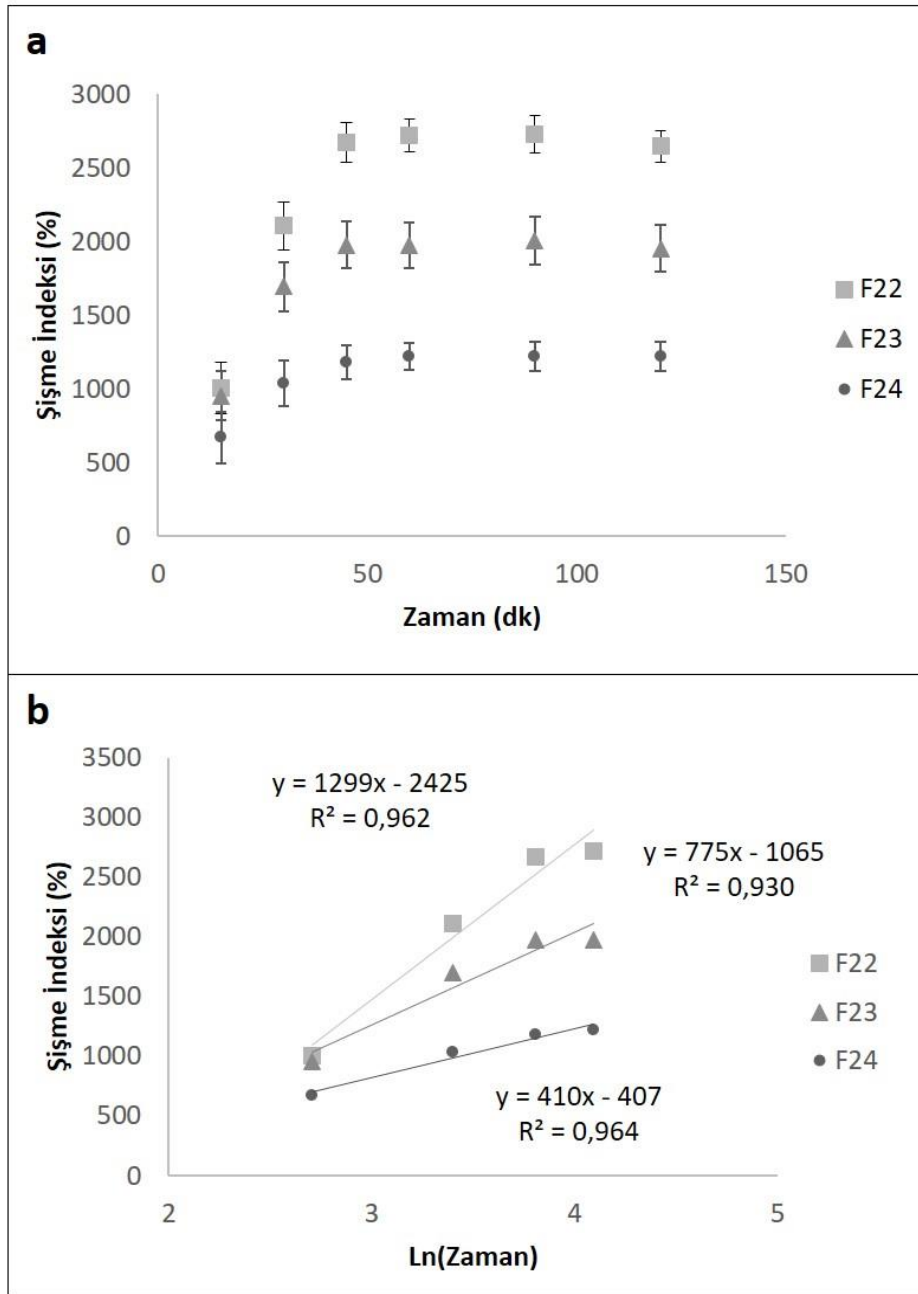
Şekil 4.27. Mikroigne formülasyonlarının FTIR spektrumları

4.5.5. Şişme indeksi

Şişme indeksi, mikroiğne formülasyonlarının optimizasyonu amacıyla kullanılan önemli parametrelerden birisidir. Bu çalışma Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroiğne formülasyonları için uygun polimer seçiminin yapılması amacıyla hazırlanan F1-F6 formülasyonlarının (Bkn. Çizelge 3.2), BBD kapsamında hazırlanan F7-F21 formülasyonlarının (Bkn. Çizelge 3.3) ve optimum formülasyonlar olarak belirlenen F22, F23 ve F24'ün (Bkn. Çizelge 3.4) şişme indekslerine ait sonuçlar Bölüm 4.4.2'de sunulmuştur.

Optimum mikroiğne formülasyonlarına ait Şişme İndeksi-Zaman grafikleri Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Yapılan ölçümlere göre mikroiğne formülasyonlarının şişme indeksleri 60. dakikada plato düzeyine ulaşmaktadır. Mikroiğne formülasyonları kendi ağırlıklarının 10-25 katına kadar su çekebilmektedir. Hyaluronik asit miktarındaki artış ile birlikte şişme indeksinin azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Optimum formülasyonlara ait şişme hızının belirlenmesi için, şişme indeksi-zaman grafiklerinin ilk 60 dakikası doğrusallaştırılmıştır. Bu amaçla, Şişme İndeksi-Ln(Zaman) grafikleri oluşturulmuştur (Şekil. 4.28). Elde edilen doğruların denklemlerinden hareketle şişme hızları belirlenmiş ve Çizelge 4.29'da gösterilmiştir. Hyaluronik asit miktarındaki artış ile birlikte mikroiğnelerin şişme özelliğinin lineer olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.29).

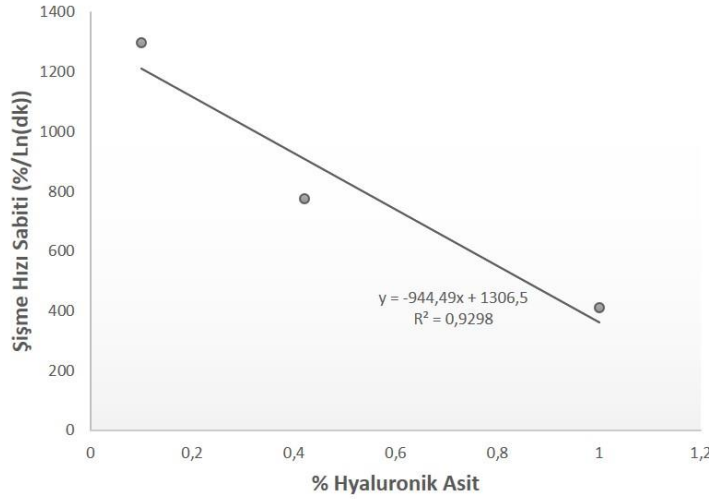


Şekil 4.28. Optimum formülasyonların (a) Şişme İndeksi-Zaman, (b) Şişme İndeksi-Ln(zaman) grafikleri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)

Çizelge 4.29. Optimum formülasyonların şişme hızı parametreleri

Formülasyonlar	Şişme Hızı Sabiti (%/Ln(dk))	r^2
F22*	1299	0,962
F23**	775	0,930
F24***	410	0,964

Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1

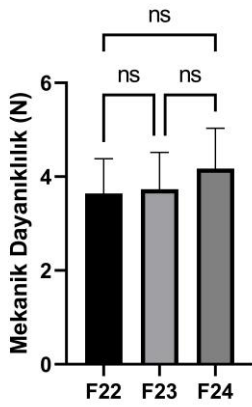


Şekil 4.29. Optimum formülasyonların şişme hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki

4.5.6. Mekanik dayanıklılık

Mekanik dayanıklılık, mikroiğne formülasyonlarının optimizasyonu amacıyla kullanılan önemli parametrelerden birisidir. Bu çalışma Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroiğne formülasyonları için uygun polimer seçiminin yapılması amacıyla hazırlanan F1-F6 formülasyonlarının (Bkn. Çizelge 4.19), BBD kapsamında hazırlanan F7-F21 formülasyonlarının (Bkn. Çizelge 4.20) ve optimum formülasyonlar olarak belirlenen F22, F23 ve F24'ün (Bkn. Çizelge 4.21) mekanik dayanıklılıklarına ait sonuçlar Bölüm 4.4.2'de sunulmuştur. F22, F23 ve F24'ün mekanik dayanıklılık verileri Çizelge 4.30'da gösterilmiştir.

Optimum mikroiğne formülasyonlarına ait mekanik dayanıklılık verilerinin kıyaslandığı sütun grafiği Şekil 4.30'da gösterilmiştir. F22, F23 ve F24 formülasyonları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamasına karşın mikroiğnelerdeki hyaluronik asit oranının artmasıyla mekanik dayanıklılığın lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.31).



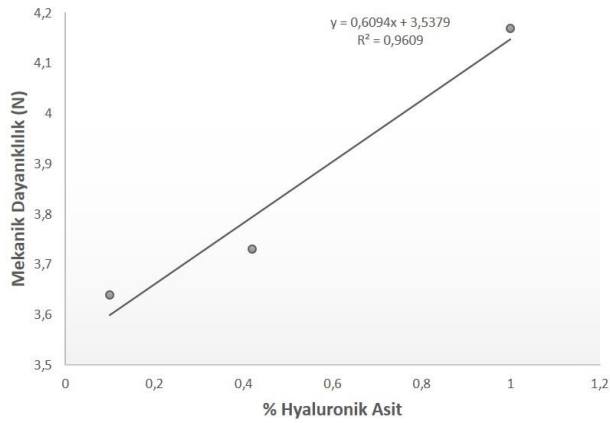
Şekil 4.30. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılıkları (Ortalama $\pm$ SS, $n > 10$) (ns: $p > 0,05$)

Çizelge 4.30. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılık verileri

Formülasyonlar	Mekanik Dayanıklılık (N)
F22*	3,64 $\pm$ 0,74
F23**	3,73 $\pm$ 0,79
F24***	4,17 $\pm$ 0,86

Ortalama $\pm$ SS, $n > 10$

Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1



Şekil 4.31. Optimum formülasyonların mekanik dayanıklılık ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki

4.5.7. Etkin madde miktar tayini

Mikroiğne formülasyonlarının etkin madde miktar tayini, Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Etkin madde miktar tayini sonuçları Çizelge 4.31'de sunulmuştur.

Çizelge 4.31. Optimum formülasyonların etkin madde miktar tayinleri

Formülasyonlar	Etkin Madde Yüzdesi (%)
F22	102,65 ± 1,45
F23	100,41 ± 0,58
F24	102,67 ± 0,46

Ortalama ± SS, n=3

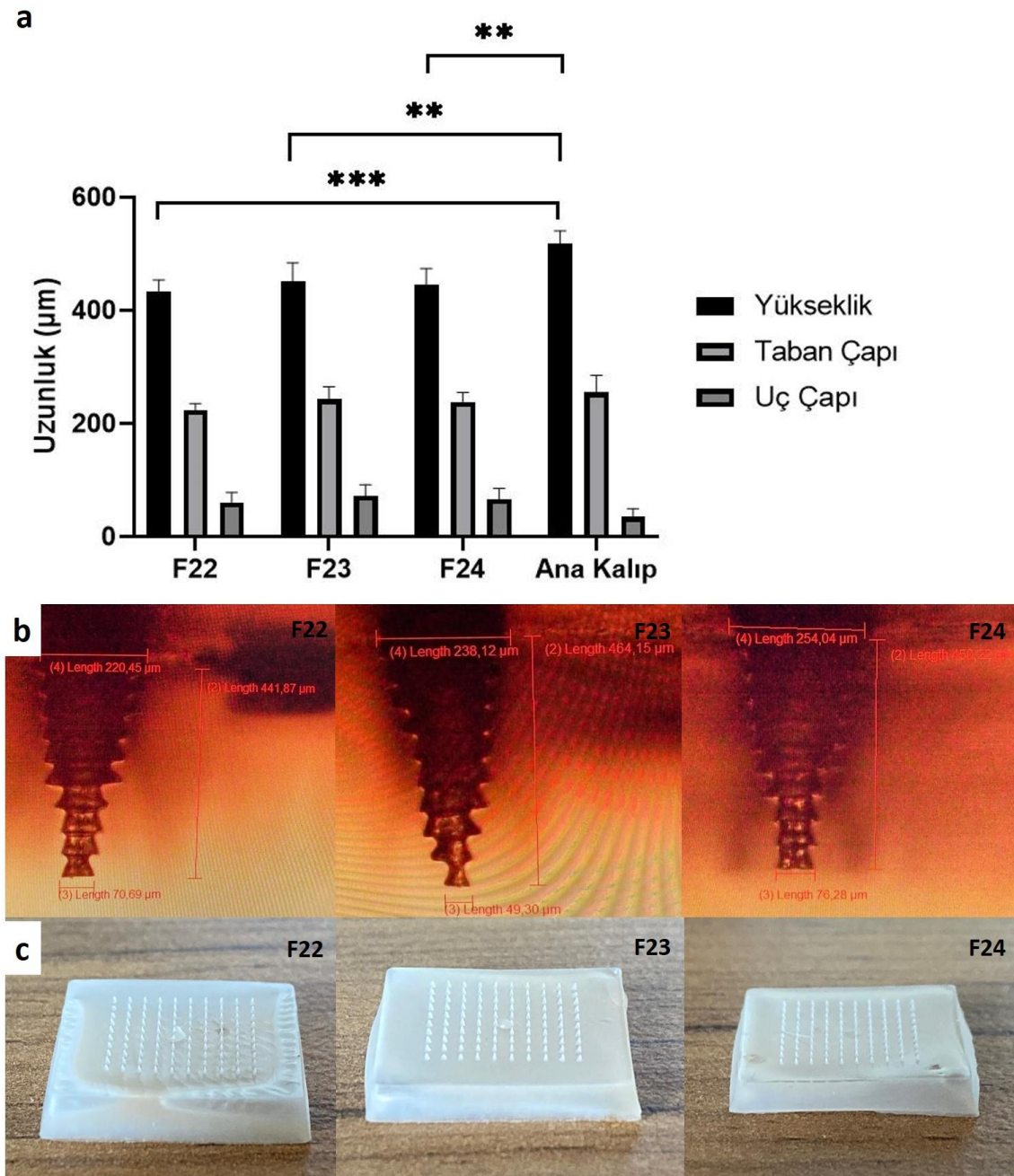
4.5.8. Optik mikroskop ile morfolojik inceleme

Optik mikroskop ile morfolojik inceleme Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Dijital kamera görüntülerinden anlaşıldığı üzere tüm optimum formülasyonlarda 10x10 adet iğne oluşumu gerçekleşmiştir. Optik mikroskop ile yapılan morfolojik incelemelerin sonuçları Çizelge 4.32'de ve Şekil 4.32'de sunulmuştur. Optimum formülasyonların taban çapı ve uç çapları, ana kalıbın boyutları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak yükseklikleri kıyaslandığında, ana kalıba göre istatistiksel olarak kısa oldukları sonucuna varılmıştır ($p<0,05$). Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde, 3 boyutlu yazıcının Z eksenindeki hareketinden kaynaklanan “testere” şeklindeki yazdırma paterni gözlenebilmektedir. Testere paterninde yer alan her bir katmanın yüksekliği yaklaşık olarak 50 μm ölçülmüştür.

Çizelge 4.32. Optik mikroskop ile morfolojik inceleme sonuçları

Formülasyonlar	İğne Boyutları (μm)		
	Yükseklik	Taban Çapı	Uç Çapı
*Anakalıp	517,5 ± 23,7	255,8 ± 30,0	35,4 ± 14,3
**F22	434,1 ± 18,9	224,2 ± 10,8	61,1 ± 16,7
**F23	451,8 ± 31,0	243,6 ± 20,2	72,5 ± 18,5
**F24	445,3 ± 27,4	238,9 ± 15,6	66,7 ± 18,0

Ortalama ± SS, *n=3, **n=9



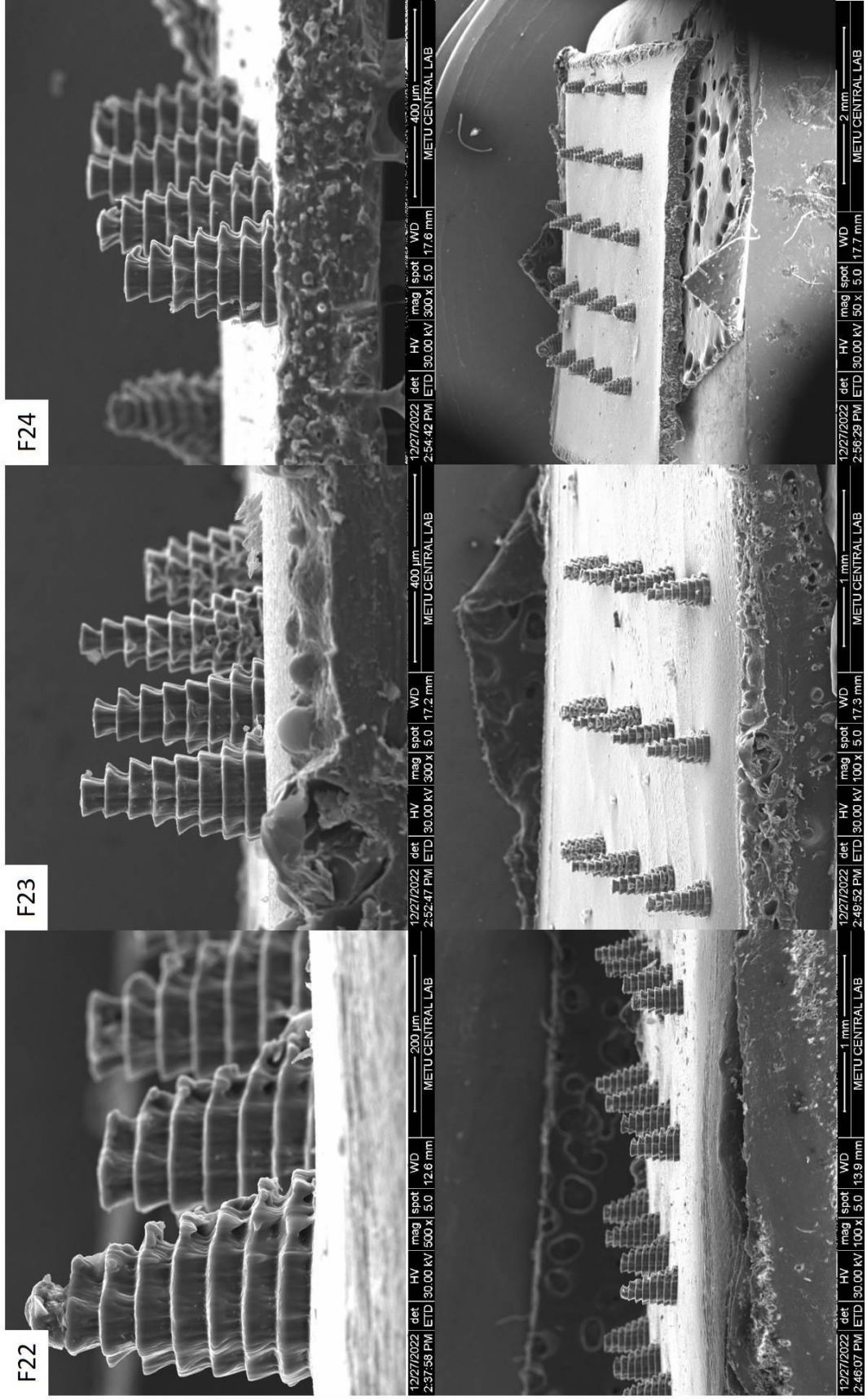
Şekil 4.32. (a) Optimum formülasyonların ve ana kalıbın ölçülerinin kıyaslandığı bar grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=9) (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$), optimum formülasyonların (b) optik mikroskop görüntüleri ve (c) dijital kamera ile çekilmiş görüntüleri

4.5.9. SEM ile morfolojik inceleme

SEM ile morfolojik inceleme Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimum formülasyonların SEM ile yapılan görüntülemelerine ait görseller Resim 4.2'de sunulmuştur. Optik mikroskop görüntülerine benzer olarak, 3 boyutlu yazıcının Z eksenindeki hareketinden kaynaklanan “testere” şeklindeki yazdırma paterni

gözlenebilmektedir. 5x5 iğne içerecek şekilde kesitlenen mikroigne formülasyonlarına ait görüntülerde, tüm iğnelerin 7-9 katmandan meydana geldikleri ve homojen bir şekilde oluştuğu gözlenmektedir. Her bir katman yaklaşık yaklaşık 50 μm boyutundadır. Bu durumda elde edilen mikroignelerin boy uzunlukları 350-450 μm aralığındadır.



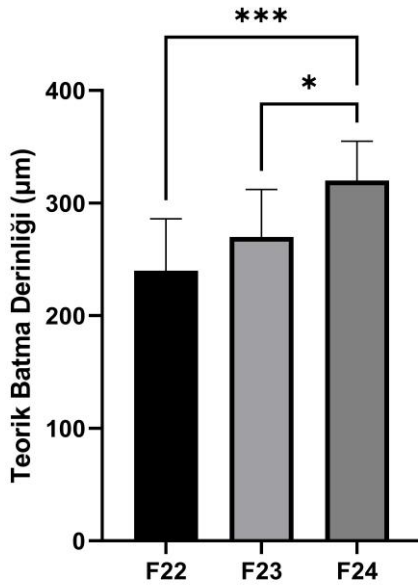


Resim 4.2. Optimum formülasyonlara ait SEM görüntüleri

4.5.10. Ex vivo deri delme çalışmaları

Optimum mikroiğne formülasyonlarının ex vivo deri delme çalışmaları Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimum mikroiğne formülasyonlarının sıçan derisinde oluşturduğu porlara ait görüntüler Resim 4.3'te verilmiştir.

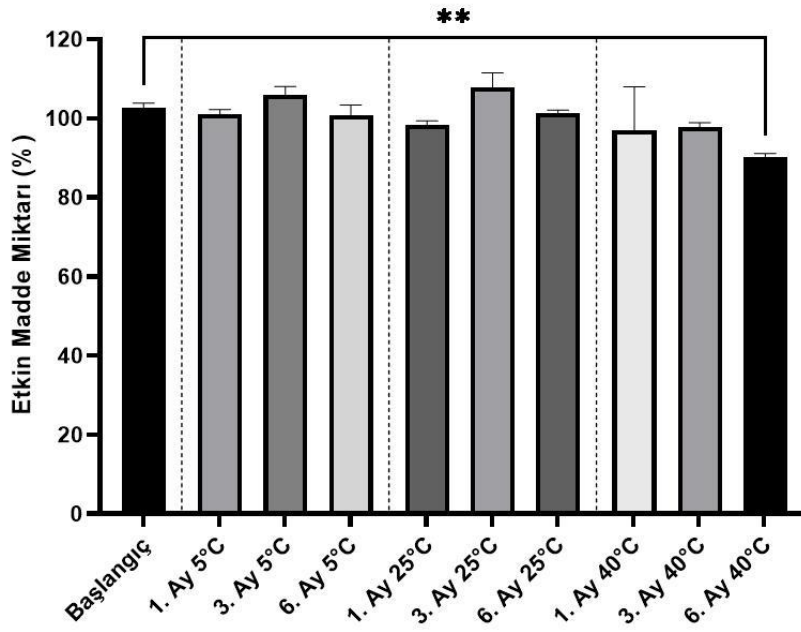
Resim 4.3'de, her bir mikroiğnenin deride oluşturduğu katmanlar görülmektedir. Bu katmanlar mikroiğne formülasyonlarının testere paterni nedeni ile oluşmaktadır. Mikroiğneler üzerinde oluşan Z eksenindeki katmanların yaklaşık 50 µm yüksekliğe sahip olduğu bilinmektedir (Bkn. Bölüm 4.5.8). Mikroiğne formülasyonlarının uygulanması sonrasında elde edilen sıçan derilerine ait SEM görüntülerindeki bu katmanlar görsel olarak sayılmıştır. Her bir katmanın teorik olarak 50 µm olduğu varsayılmıştır (Bkz. Bölüm 4.5.8.). Ex vivo penetrasyon derinliklerinin, mikroiğne yüksekliklerinden daha az olması dikkat çekicidir. Bunun nedeninin, mikroiğneler ile birlikte kurutulan deri örneklerinin kururken esnekliklerinin kaybolması ve büzülmesi; sonuç olarak mikroiğneleri yukarı itmesi ve en dipteki katmanların görülmesini engellemesi olduğu düşünülmüştür. Buna rağmen penetrasyon derinlikleri F22, F23 ve F24 için sırasıyla $240 \pm 45,9$, $270 \pm 42,2$ ve $320 \pm 34,9$ µm olarak bulunmuştur (Şekil 4.33).



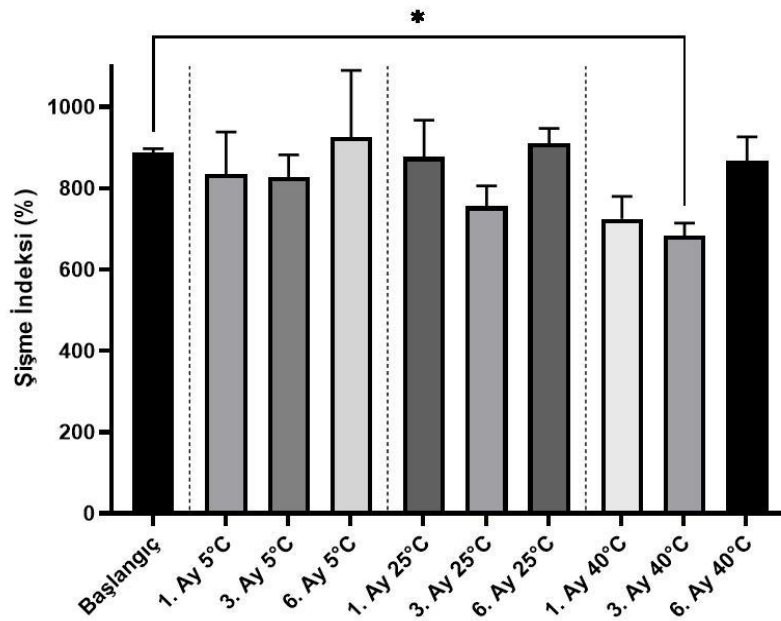
Şekil 4.33. Mikroigne formülasyonlarının deride oluşturduğu teorik penetrasyon derinliği (Ortalama $\pm$ SS, n=10) (*: $p<0,05$, ***: $p<0,001$)

4.5.11. Stabilite çalışmaları

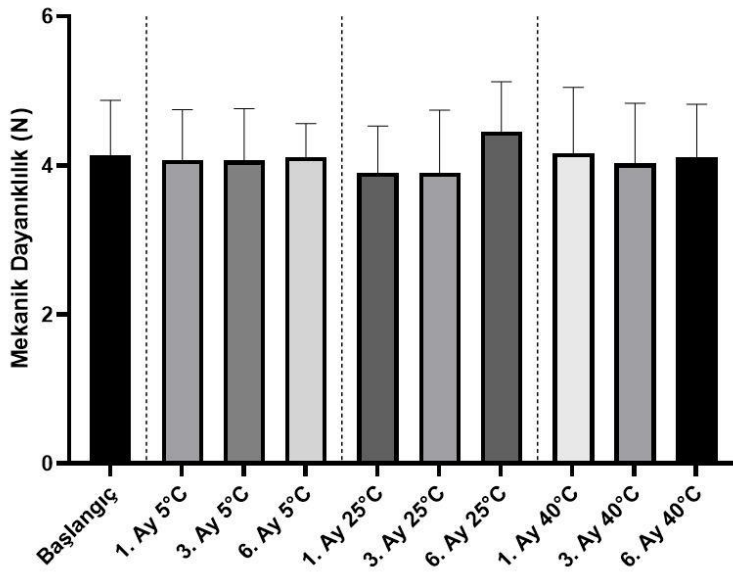
Stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışmaları in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen F24 ile gerçekleştirilmiştir. F24 formülasyonunun seçilme nedeni Bölüm 4.11'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışması kapsamında belirlenen etkin madde yüzdesi, şişme indeksi, mekanik dayanıklılık ve ağırlık verileri sırasıyla Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36 ve Şekil 4.37'de verilmiştir. 40°C'de yapılan etkin madde miktar tayini ve şişme indeksi testleri haricindeki diğer parametrelerin, stabilite çalışması boyunca istatistiksel olarak fark göstermediği belirlenmiştir. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışması kapsamında, morfolojik inceleme amacıyla çekilen dijital kamera görüntüleri Resim 4.4'de sunulmuştur.



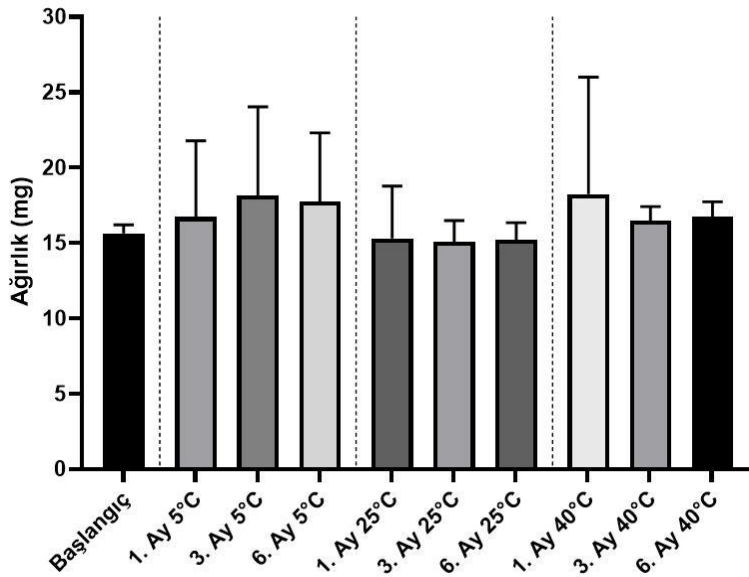
Şekil 4.34. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen etkin madde yüzdesi verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (**: p<0,001)



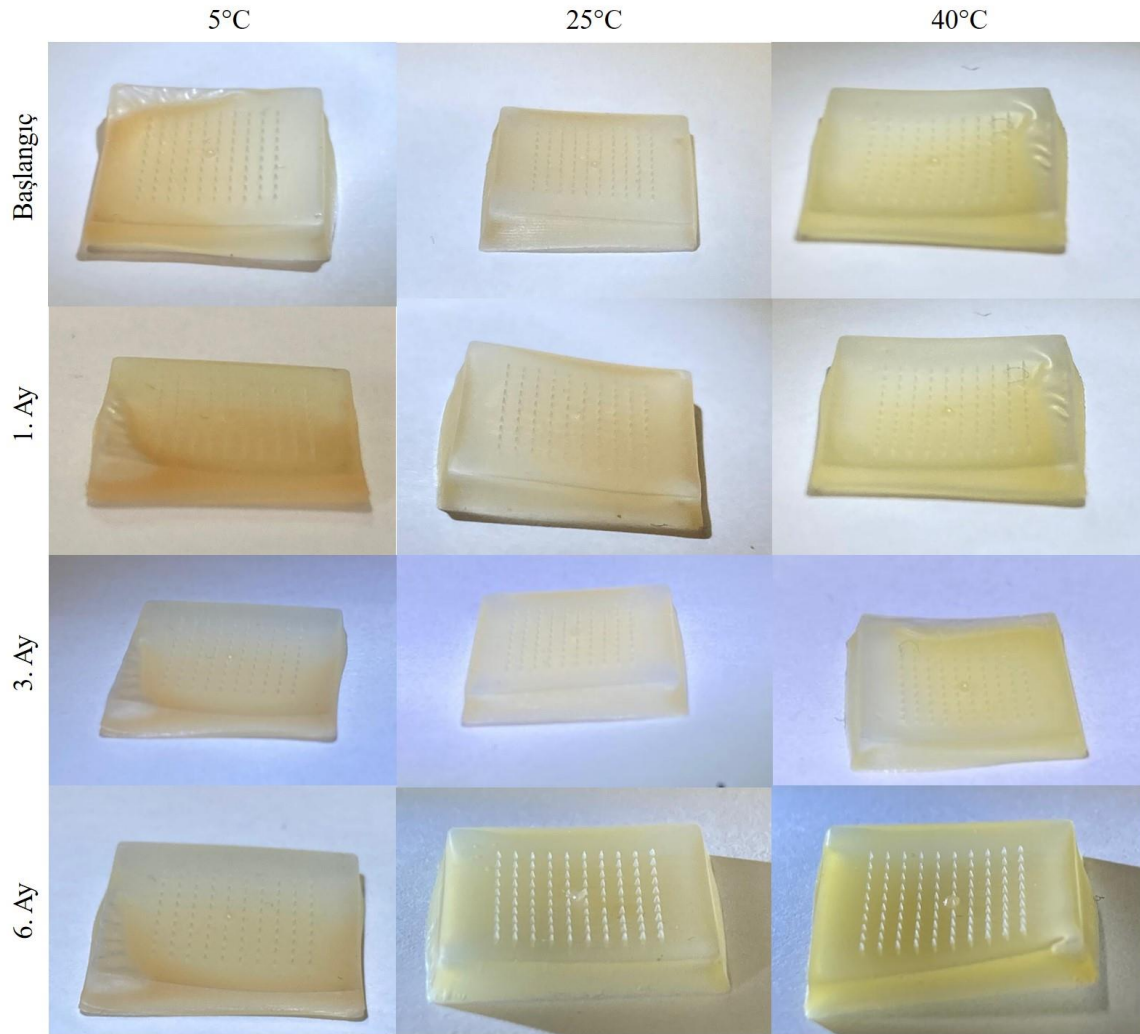
Şekil 4.35. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen şişme indeksi verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (*: p<0,05)



Şekil 4.36. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen mekanik dayanıklılık verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)



Şekil 4.37. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen ağırlık verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)



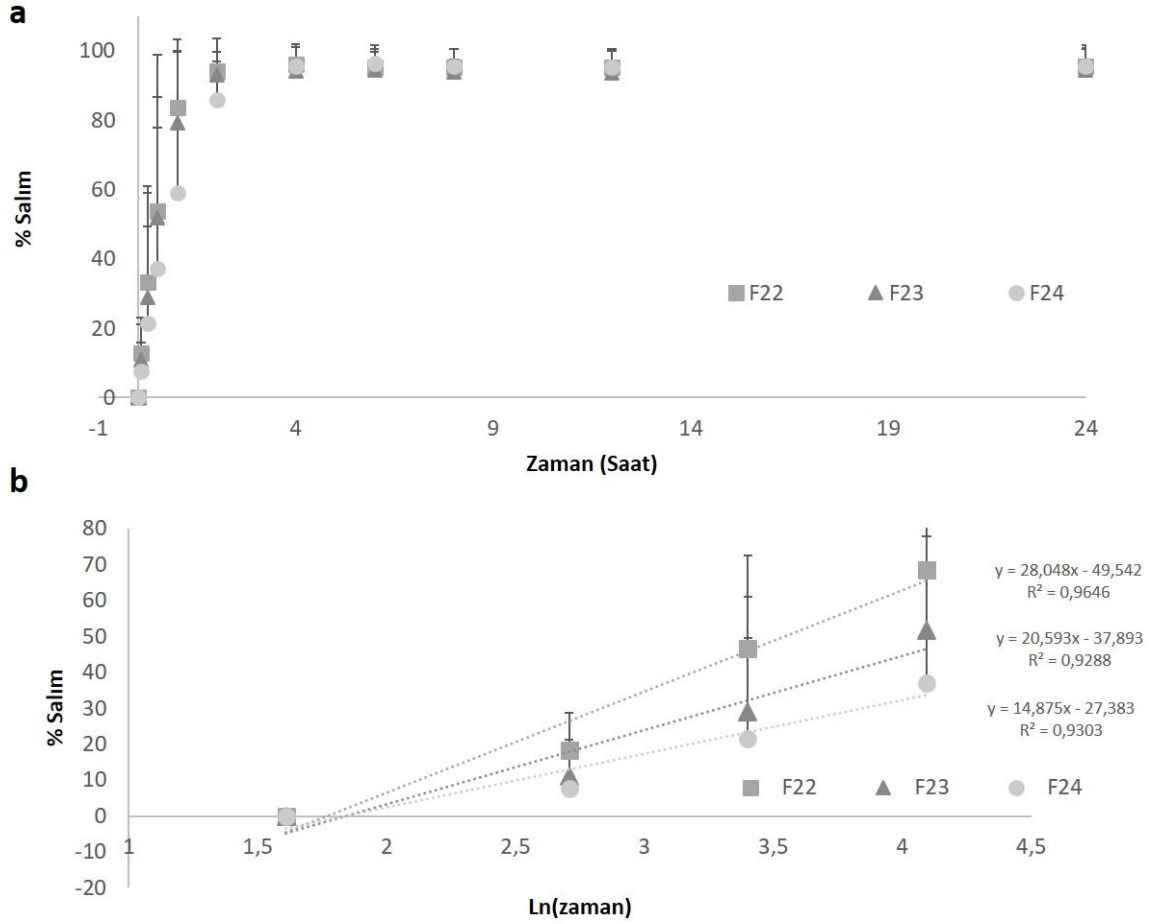
Resim 4.4. F24 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında morfoloji inceleme amacıyla çekilen dijital kamera görüntüleri

4.6. Mikroigne Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

4.6.1. Beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

Optimum mikroigne formülasyonlarının beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmanın sonucunda elde edilen %Salım-Zaman grafiği Şekil 4.38’de gösterilmiştir. 24 saat boyunca sürdürülen çalışmada, etkin madde salımı tüm formülasyonlar için 2 saatte tamamlanmıştır. Salım hızlarının belirlenmesi ve karşılaştırmalarının yapılabilmesi amacıyla, %Salım-Zaman grafiklerinin ilk 2 saati, %Salım-Ln(Zaman) grafikleri oluşturularak doğrusallaştırılmıştır. Doğrusallaştırılmış grafikler Şekil 4.38’de gösterilmiştir. Salım hızlarını gösteren hız sabitleri Çizelge 4.33’te yer almaktadır. Optimum mikroigne formülasyonlarında hyaluronik

asit oranının artışına bağlı olarak salım hızında azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.39).

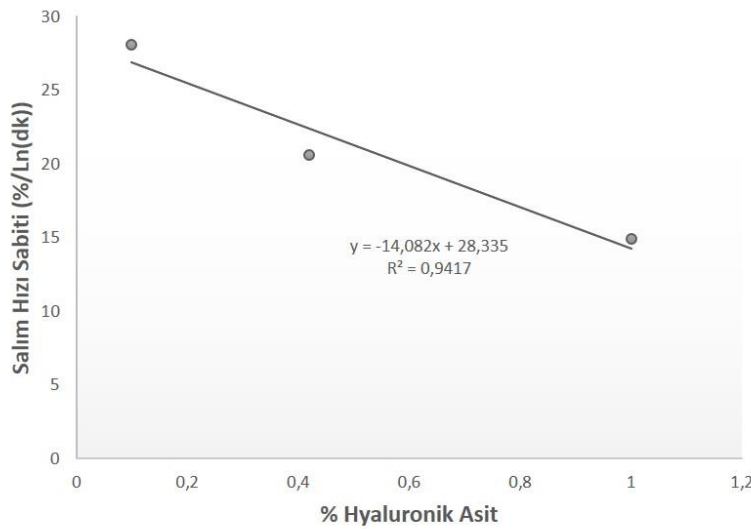


Şekil 4.38. Optimum mikroiğne formülasyonlarının beher yöntemine göre (a) %Salım-Zaman ve (b) %Salım-Ln(Zaman) grafikleri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)

Çizelge 4.33. Optimum formülasyonların beher yöntemine göre salım hızı parametreleri

Formülasyonlar	Salım Hızı Sabiti (%/Ln(dk))	r^2
F22*	28,1	0,965
F23**	20,6	0,929
F24***	14,9	0,930

Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1

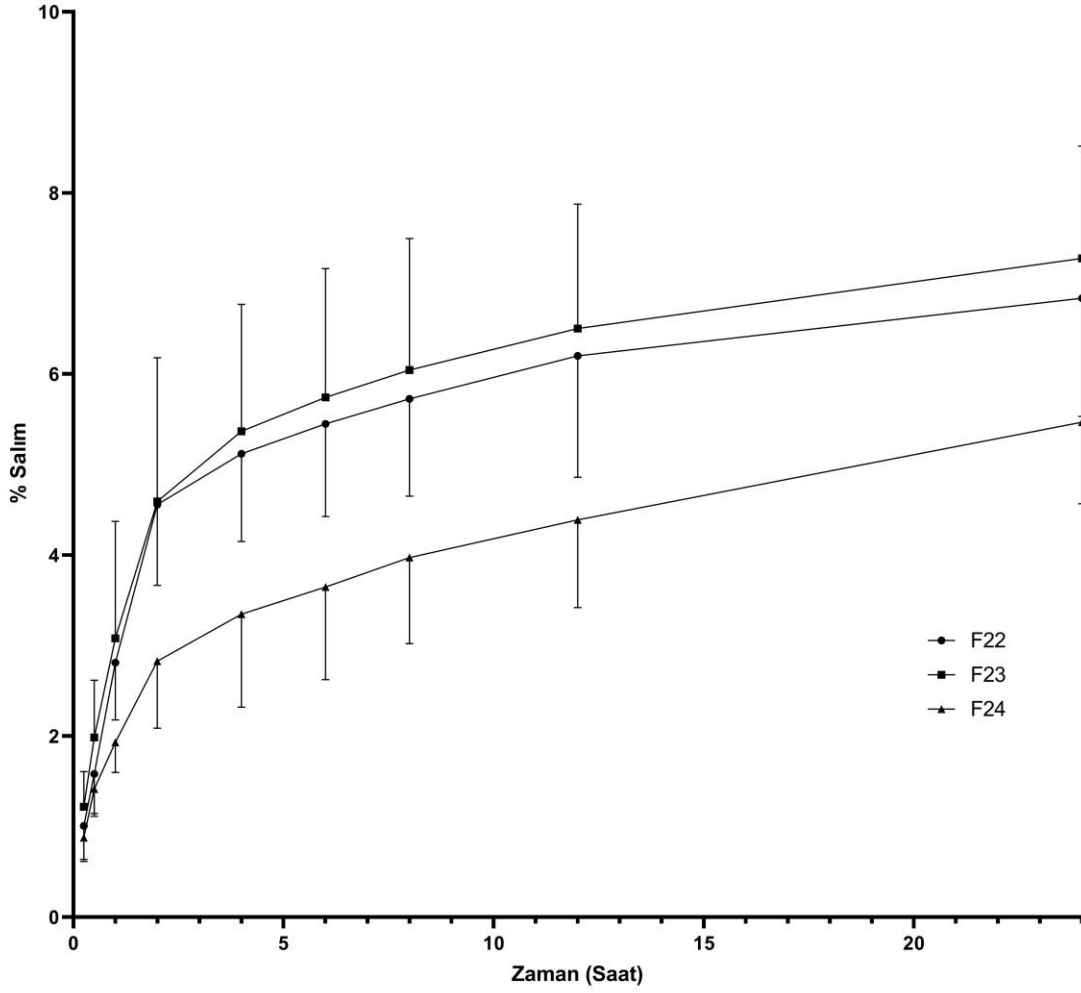


Şekil 4.39. Optimum formülasyonların salım hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki

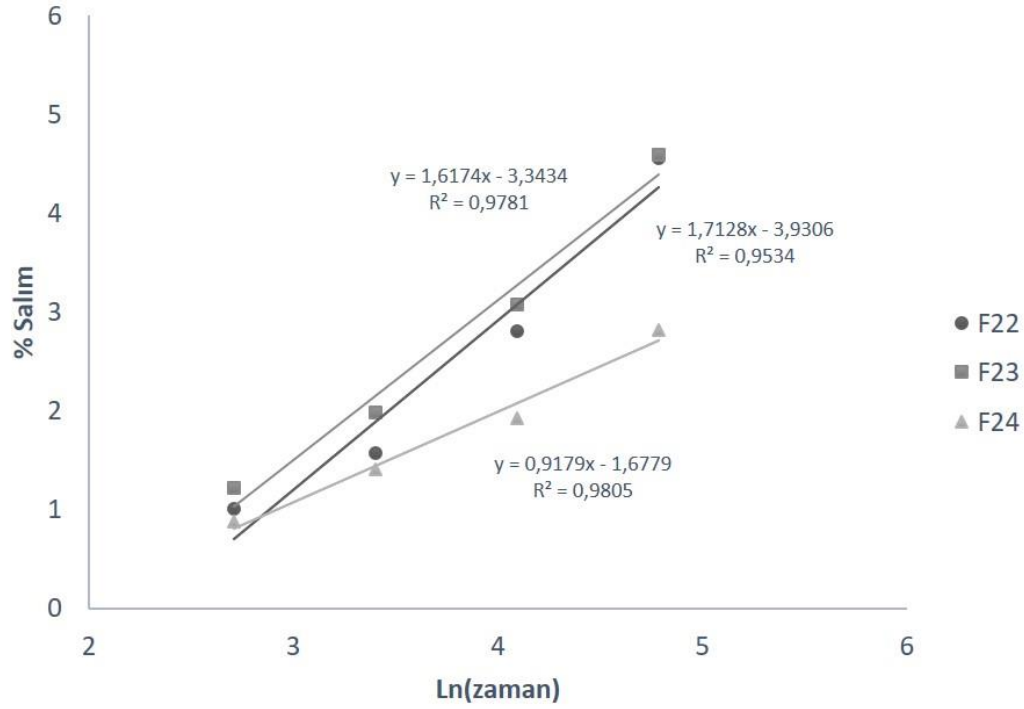
4.6.2. Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

Optimum mikroiğne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun farmasötik kalite adhezif banta partasyonu $\%0,63 \pm 0,18$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, analiz yönteminin deneyler arası tekrarlanabilirlik validasyonunun %bağıl sapması ile istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir ($p>0,05$). Bu nedenle pratik olarak adhezif banta etkin madde geçmediği varsayılmıştır. İlgili çalışmanın sonucunda elde edilen %Salım-Zaman grafiği Şekil 4.40'ta gösterilmiştir. 24 saatin sonunda F22, F23 ve F24 için sırasıyla, yüklenen toplam etkin maddenin $\%6,60 \pm 1,53$, $\%7,01 \pm 0,93$ ve $\%5,27 \pm 1,12$ 'si kadar etkin madde salımı elde edilmiştir. Tüm formülasyonlarda 2. saatten sonra salım hızında belirgin bir düşüş gerçekleştiği ve salım profilinin iki aşamadan oluştuğu saptanmıştır. Başlangıçtaki salım hızlarının belirlenmesi ve karşılaştırmalarının yapılabilmesi amacıyla, %Salım-Zaman grafiklerinin ilk 2 saati, %Salım-Ln(Zaman) grafikleri oluşturularak doğrusallaştırılmıştır. Doğrusallaştırılmış grafikler Şekil 4.41'de gösterilmiştir. Formülasyonlarının hyaluronik asit oranları ile ilk 2 saat verilerinden hareketle hesaplanan hız sabitleri arasında negatif bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.42). Hyaluronik asit miktarı arttıkça salım hızı yavaşlamıştır.

2. saatten sonra gerçekleşen salımın doğrusal olduğu görülmektedir. %Salım-Zaman grafiklerinin 2. saati ile 24. saati arasında kalan kısımlarına doğrudan lineer regresyon uygulanarak, 2. saatten itibaren görülen salım hız sabitleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.34).



Şekil 4.40. Optimum mikroiğne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemine göre %Salım-Zaman grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=3)

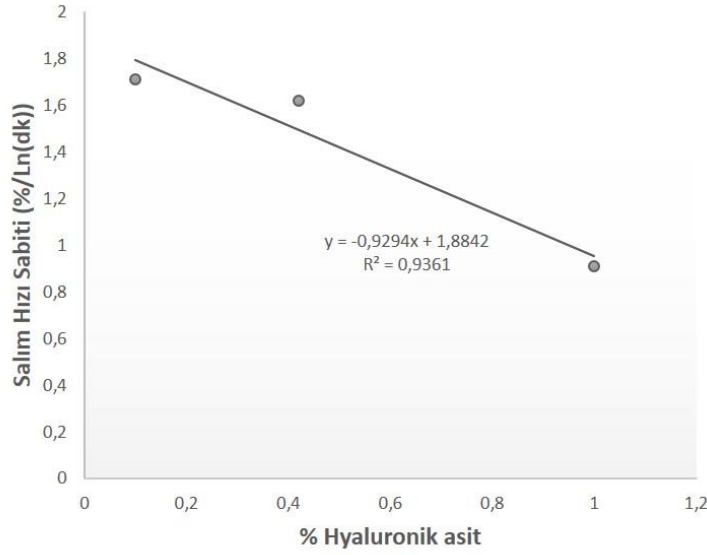


Şekil 4.41. Optimum mikroiğne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemine göre %Salım-Ln(Zaman) grafikleri

Çizelge 4.34. Optimum formülasyonların Franz difüzyon hücresi yöntemine göre salım hızı parametreleri

Formülasyonlar	Salım Hızı Sabiti (0-2. Saat) (%/Ln(dk))	r^2 (0-2. Saat)	Salım Hızı Sabiti (2-24. Saat) (%/dk)	r^2 (2-24. Saat)
F22*	1,71	0,953	0,0014	0,937
F23**	1,62	0,978	0,0015	0,951
F24***	0,91	0,981	0,0017	0,987

Hyaluronik asit oranları: * %0,1 , ** %0,42, *** %1



Şekil 4.42. Optimum formülasyonların 2. saate kadar olan salım hızı sabitleri ile hyaluronik asit oranları arasındaki ilişki

Optimum mikroiğne formülasyonlarının salım mekanizmalarının incelenmesi amacıyla DDSolver® yazılımı kullanılmıştır. r^2 , Ayarlanmış r^2 (r^2_{adj}), Akaike Bilgi Ölçütü (AIC) ve Model Seçim Kriteri (MSC) parametreleri kullanılarak Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin (Düzlemsel), Peppas-Sahlin (Silindirik) ve Weibull matematiksel modelleri ile, elde edilen %Salım-Zaman profillerinin uyumu incelenmiştir. Salım profillerinin tamamının (24 saatlik veri) incelendiği çalışma kapsamında hesaplanan model uyum parametreleri Çizelge 4.35'te sunulmuştur. En yüksek r^2 , r^2_{adj} ve MSC değerleri ile en düşük AIC değeri Peppas-Sahlin kinetiği ile elde edilmiştir.

Mikroiğne formülasyonlarının, Korsmeyer-Peppas ve Peppas-Sahlin kinetiklerine göre daha az uyum gösterdiği Weibull modelinde, β değerlerinin 1'den küçük olması erozyona bağlı bir salımın olmadığını göstermektedir. Mikroiğne formülasyonlarının şişen bir yapıda olması ve aşınan bir matris yapısına sahip olmaması nedeniyle Peppas kinetikleri ile yüksek uyum göstermesi beklenen bir durumdur. Peppas-Sahlin kinetiğinin genel denklemi Eş. 4.1'de gösterilmiştir.

$$\frac{M_t(t)}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n} \quad (4.1)$$

Peppas-Sahlin genel denklemindeki $\frac{M_t(t)}{M_\infty}$ zamana bağlı salınan etkin madde fraksiyonunu, $k_1 t^n$ ilacın Fick difüzyonunun etkin madde salım miktarına katkısını, $k_2 t^{2n}$ polimer

matrisinin şişme hızının etkin madde salım miktarına katkısını ifade eder. k_2 hız sabiti suyun sisteme girişi, hacim ve yüzey alanındaki artışı, etkin maddenin sistem içerisinden difüzlenererek sistem dışına çıkışı gibi kinetik olayların zaman içerisindeki hızının değişimini tanımlar.

Çizelge 4.35. Optimum mikroigne formülasyonlarının salım kinetiği modelleri ile uyumlulukları

		Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin (Düzlemsel)	Peppas-Sahlin (Silindirik)	Weibull
F22	r^2	0,833	0,955	0,950	0,758
	r^2_{adj}	0,809	0,949	0,934	0,723
	AIC	19,5	7,4	10,5	22,8
	MSC	1,4	2,7	2,4	1,0
F23	r^2	0,871	0,967	0,968	0,841
	r^2_{adj}	0,853	0,962	0,958	0,818
	AIC	16,4	3,6	6,2	19,0
	MSC	1,7	3,2	2,9	1,5
F24	r^2	0,955	0,972	0,978	0,936
	r^2_{adj}	0,948	0,968	0,971	0,927
	AIC	0,3	-3,0	-3,0	2,5
	MSC	2,8	3,2	3,2	2,6

4.7. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Geliştirilmesi

4.7.1. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi

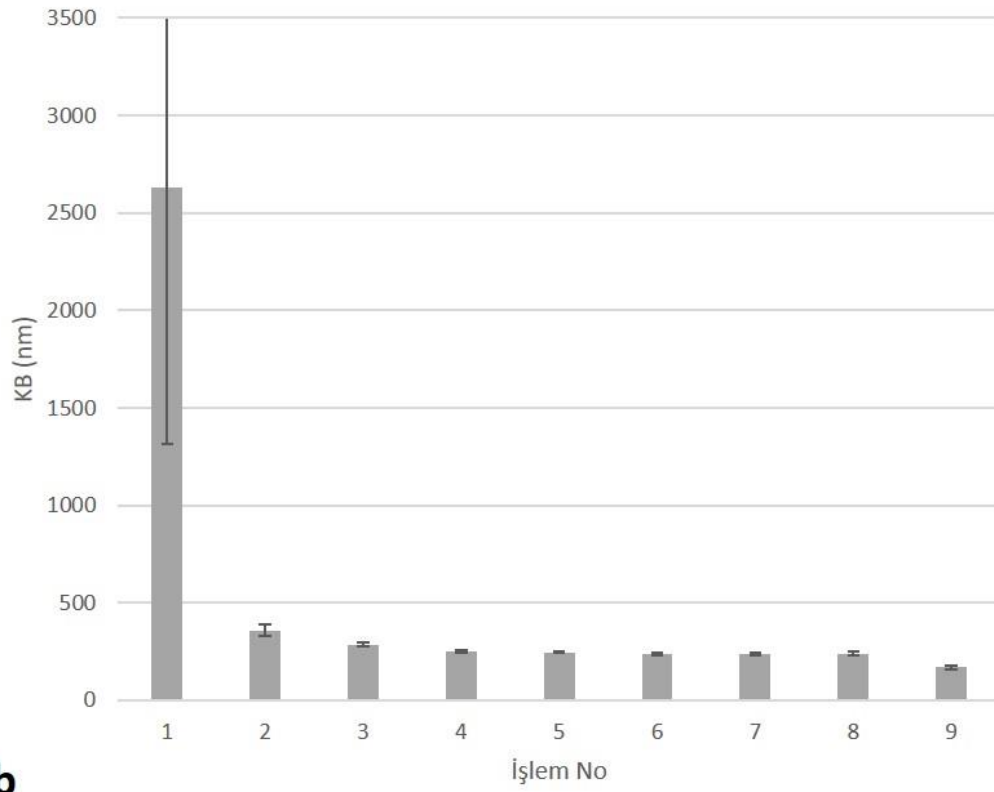
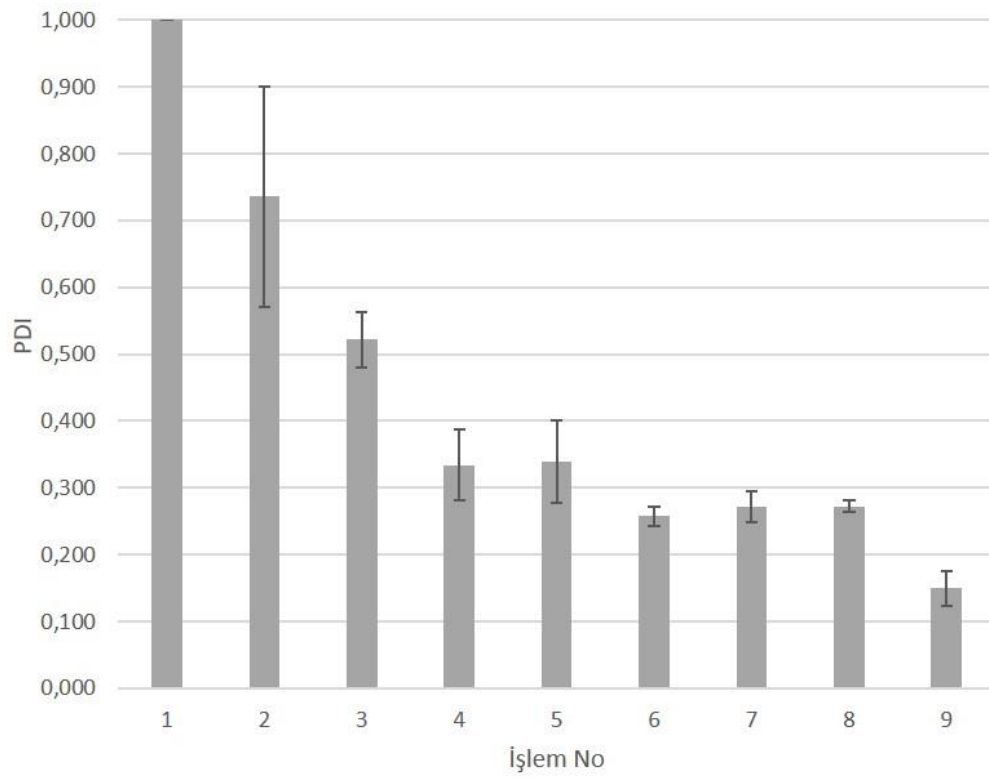
Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yöntemi Bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretimi için film hidrasyon metodu kullanılarak kaba kesecik sistem dispersiyonları elde edilmiştir. Ardından prob sonikasyon ve ekstrüzyon işlemleri uygulanarak tek düze veziküler sistem dispersiyonları elde edilmiştir. Yapılan işlemler Bölüm 3.2.7’de yer alan Çizelge 3.5’te ayrıntılı olarak verilmiştir. V1 formülasyonu üzerinde yapılan işlemlerin sonucunda elde edilen KB ve PDI değerleri Çizelge 4.36 ve Şekil 4.43’te gösterilmiştir. KB ve PDI

değerlerinin minimum düzeyde elde edildiği İşlem No:9'un, esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretilmesinde kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.36. Esnek veziküler sistem formülasyonlarına uygulanan işlemler sonucunda elde edilen KB ve PDI değerleri

İşlem No	KB (nm)	PDI
1	2628 ± 1311	1,000 ± 0,000
2	360 ± 28	0,736 ± 0,164
3	286 ± 10	0,522 ± 0,042
4	251 ± 5	0,334 ± 0,053
5	245 ± 3	0,339 ± 0,061
6	239 ± 7	0,258 ± 0,015
7	237 ± 4	0,272 ± 0,022
8	240 ± 12	0,272 ± 0,009
9	168 ± 8	0,149 ± 0,026

Ortalama ± SS, n=3

a**b**

Şekil 4.43. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında işlem parametrelerinin (a) KB ve (b) PDI'ya etkisi (Ortalama $\pm$ SS, n=3)

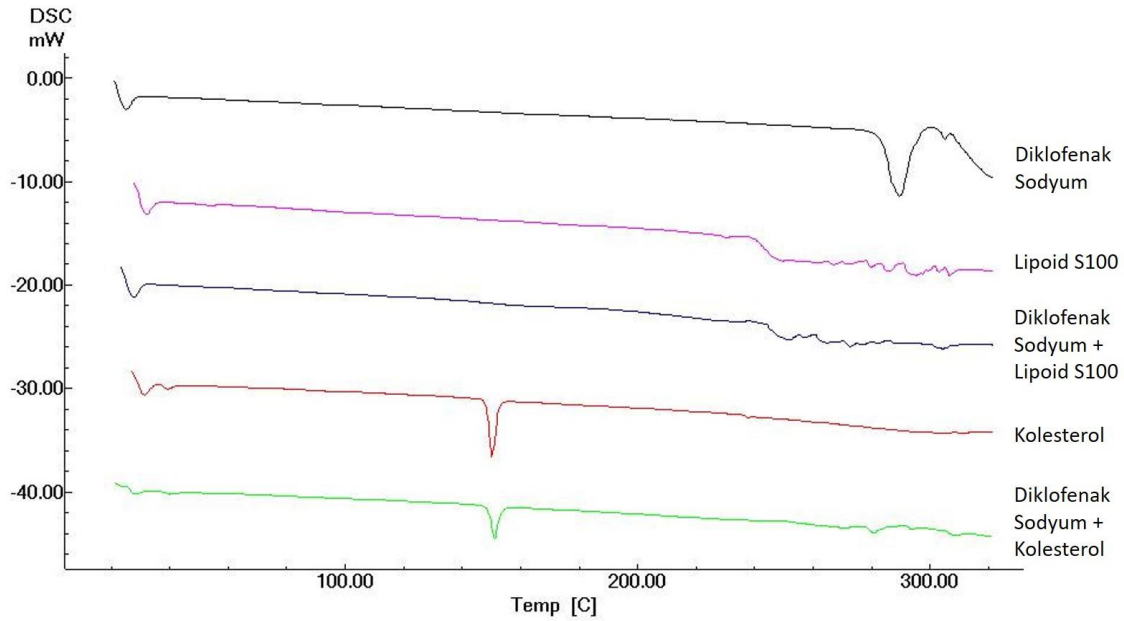
4.7.2. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması

Esnek veziküler sistem formülasyonları, Bölüm 3.2.7’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Belirtilen üretim yöntemi ile Bölüm 3.2.7’de yer alan Çizelge 3.6’daki tüm formülasyonlar başarıyla elde edilmiş ve Bölüm 3.2.8’de açıklanan özelliklere ait bulgular aşağıdaki bölümlerde gösterilmiştir.

4.8. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.8.1. DSC analizi

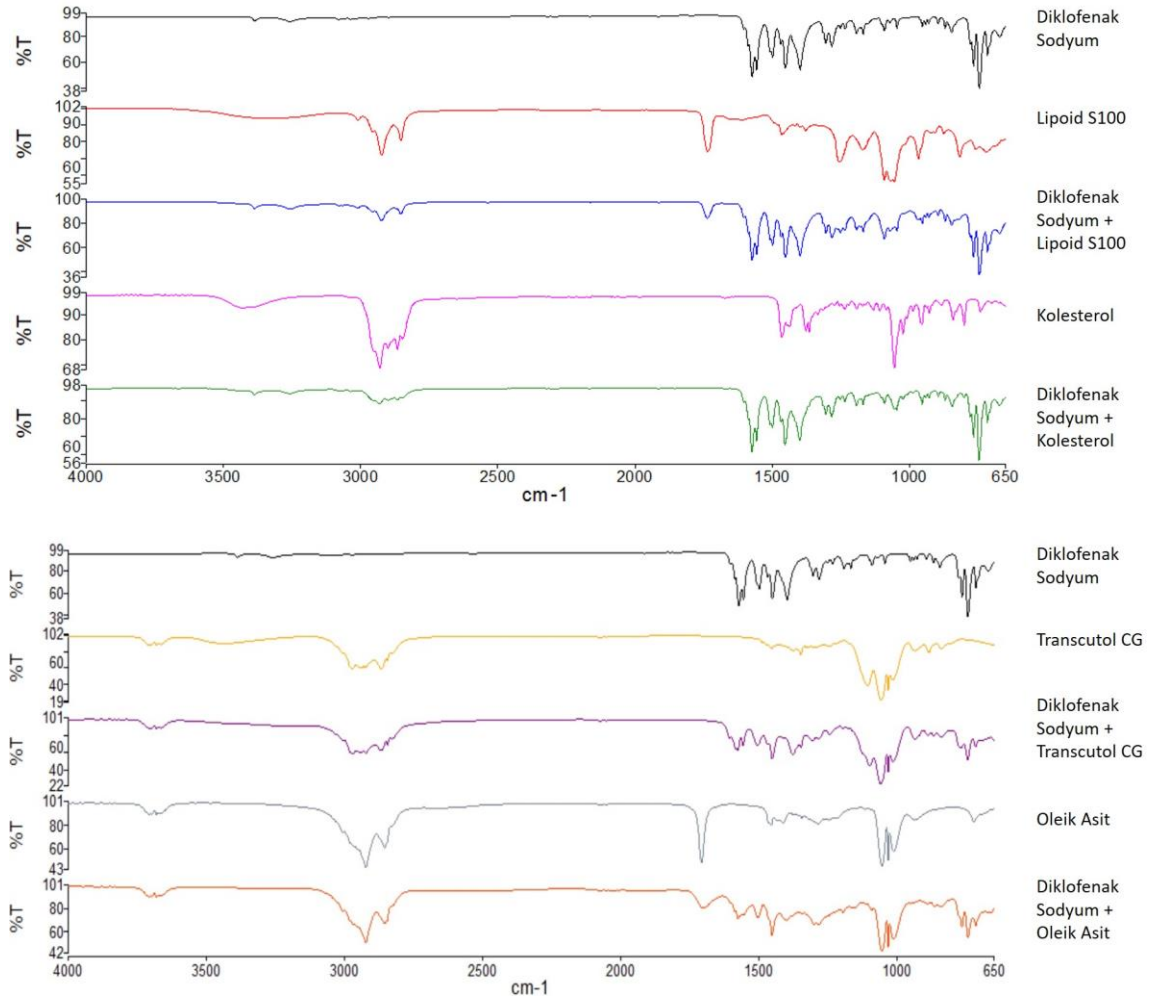
Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan katı yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi için yapılan DSC analizi Bölüm 3.2.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler ve etkin maddeye ait DSC termogramları Şekil 4.44’te gösterilmiştir. Saf diklofenak sodyum numunesine ait termogramda endotermik erime piki yaklaşık 283°C’de gözlenmiştir. Lipoid S100’ün faz dönüşüm sıcaklığı 55-65°C arasındadır (Londoño, Rojas, Yarce ve Salamanca, 2019). Ancak Lipoid S100’e ait termogramda herhangi bir pik gözlenmemiştir. Diklofenak sodyumun Lipoid S100 ile fiziksel karışımında, etkin maddenin endotermik erime pikinin kaybolduğu belirlenmiştir. Kolesterol yaklaşık 150°C’de endotermik bir pik meydana getirmiştir. Kolesterol ile diklofenak sodyumun fiziksel karışımının incelendiği termogramda, etkin maddeye ait endotermik erime piki kaybolmuştur. Sonuç formülasyonların sıvı formda olması nedeni ile DSC analizleri gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.44. Veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan katı yardımcı maddeler ve diklofenak sodyumun DSC termogramları

4.8.2. FTIR analizi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan katı yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun geçimliliğinin belirlenmesi için yapılan FTIR analizi Bölüm 3.2.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler ve etkin maddeye ait FTIR spektrumları Şekil 4.45’te gösterilmiştir. Saf diklofenak sodyum, 3380 cm^{-1} ’de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} ’de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm^{-1} ’de -C-Cl piki, $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ’de -CN grubuna ait olan pikler meydana getirmektedir (Öztürk ve diğerleri, 2020). Diklofenak sodyumun, hem Lipoid S100 hem de kolesterol ile olan fiziksel karışımlarında bu piklerin varlığını koruduğu gözlenebilmektedir. Transcutol CG ve oleik asit ile olan fiziksel karışımlarda ise 3380 cm^{-1} ’deki sekonder amin pikinin ve $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ’de -CN grubuna ait olan piklerin görülememesine karşın, 1570 cm^{-1} ’deki karbonil ve 750 cm^{-1} ’de -C-Cl piki görülebilmektedir.



Şekil 4.45. Esnek veziküler sistem formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler ve diklofenak sodyumun FTIR spektrumları

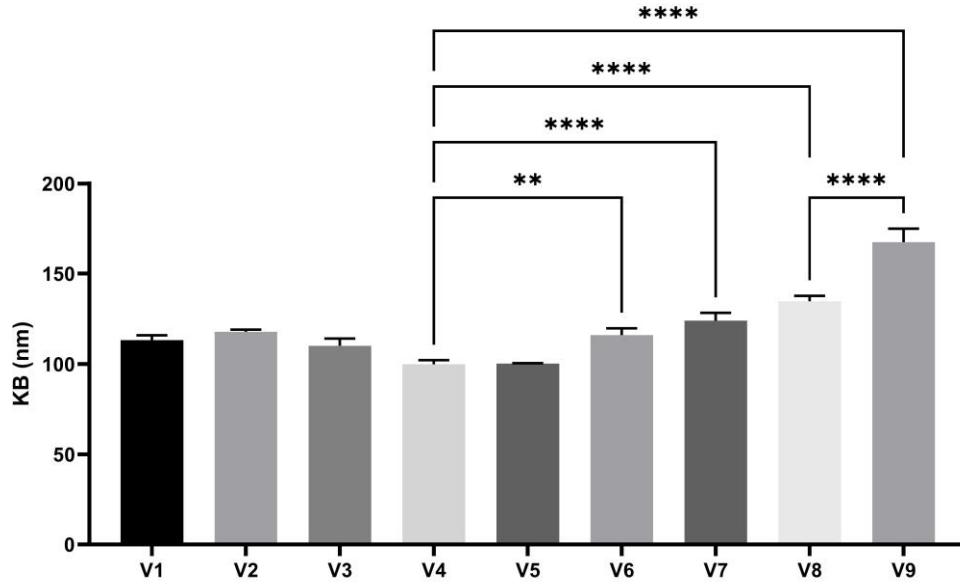
4.8.3. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının kesecik boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçümü

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB, PDI ve ZP değerlerinin ölçümü Bölüm 3.2.8’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB, PDI ve ZP değerleri Çizelge 4.37’de verilmiştir. KB, PDI ve ZP değerlerinin kıyaslanabilmesi için çizilen bar grafikleri sırasıyla Şekil 4.46, Şekil 4.47 ve Şekil 4.48’de yer almaktadır.

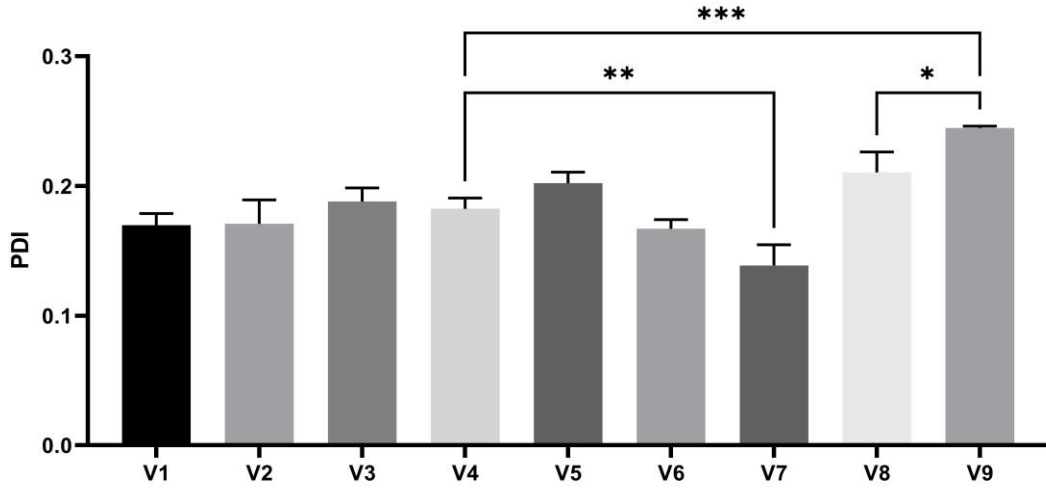
Çizelge 4.37. Hazırlanan esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB, PDI, ZP ve EE% değerleri

Formülasyonlar	KB (nm)	PDI	ZP (mV)	EE%
V1	113,3 ± 2,6	0,170 ± 0,009	-24,67 ± 1,12	57,43 ± 0,9
V2	117,8 ± 1,2	0,171 ± 0,019	-28,70 ± 1,35	60,77 ± 2,23
V3	110,1 ± 4,0	0,188 ± 0,010	-27,73 ± 0,50	57,93 ± 0,59
V4	99,8 ± 2,2	0,182 ± 0,008	-27,20 ± 0,44	71,00 ± 0,66
V5	100,1 ± 0,3	0,202 ± 0,009	-25,23 ± 0,35	70,43 ± 0,63
V6	116,0 ± 3,8	0,167 ± 0,007	-31,90 ± 1,51	65,17 ± 0,95
V7	123,9 ± 4,4	0,139 ± 0,016	-33,00 ± 2,09	70,01 ± 0,91
V8	135,0 ± 3,1	0,210 ± 0,016	-34,53 ± 0,70	64,75 ± 3,79
V9	167,0 ± 7,6	0,245 ± 0,002	-36,60 ± 0,61	69,62 ± 4,21

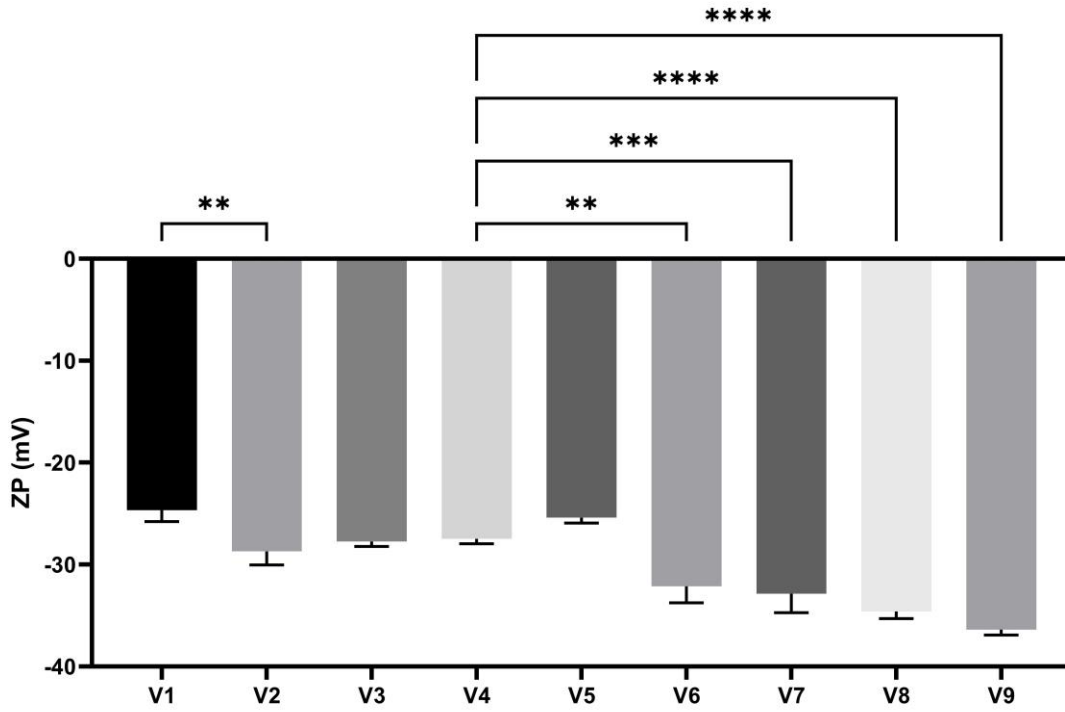
(Ortalama ± SS, n=3)



Şekil 4.46. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB değerleri (Ortalama ± SS, n=3)
(**: p<0,01, ****: p<0,0001)



Şekil 4.47. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının PDI değerleri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)
(*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$)

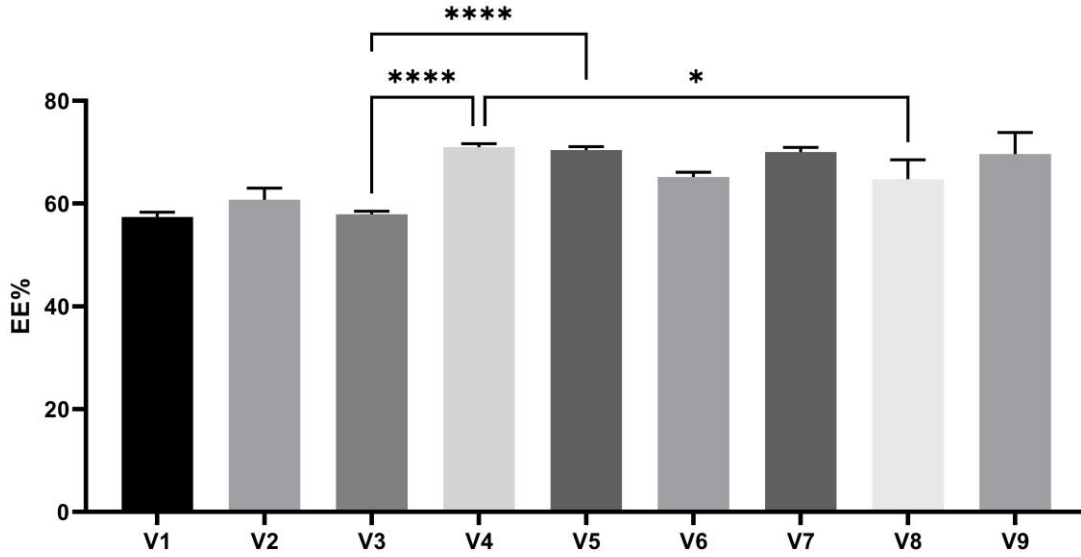


Şekil 4.48. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının ZP değerleri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)
(**: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)

4.8.4. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE% değerlerinin belirlenmesi Bölüm 3.2.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE%

değerleri Bölüm 4.8.3'te yer alan Çizelge 4.37'de verilmiştir. EE% değerlerinin kıyaslanabilmesi için çizilen bar grafiği Şekil 4.49'da gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE% değerleri (Ortalama ± SS, n=3) (*: $p < 0,05$, ****: $p < 0,0001$)

4.8.5. Karakterizasyon verilerine göre optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi

İlk olarak geliştirilen V1, V2 ve V3 formülasyonları arasında Transcutol CG'nin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Transcutol CG'nin ZP üzerindeki etkisi tartışmalıdır. V1 formülasyonunun ZP değeri V2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak V3 formülasyonunun V1'e göre anlamlı bir fark göstermediği görülmüştür ($p > 0,05$). Transcutol CG'nin diğer karakterizasyon parametreleri üzerinde de belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Transcutol CG'nin kesecik esnekliğini artıracığı göz önünde bulundurulmuş ve daha yüksek Transcutol CG içeren V3 formülasyonu bu aşama için seçilmiştir.

V3 temel alınarak geliştirilen V4 ve V5 formülasyonlarında fosfolipid:kolesterol oranı sabit tutularak, toplam lipid (fosfolipid + kolesterol) miktarlarının etkisi incelenmiştir. V3, V4 ve V5 formülasyonları için lipid miktarlarındaki artışın KB, PDI ve ZP değerlerinde anlamlı etkisi bulunmazken ($p > 0,05$), EE% değerinin, V3'e göre V4 ve V5 formülasyonlarında yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). V4 ve V5 formülasyonlarının EE% değerleri

arasındaki farkın anlamlı bulunmamasının yanında ($p>0,05$), düşük lipid miktarının maliyet ve üretim kolaylığı açısından tercih edilmesi nedeni ile V4 formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir. Oleik asit ve hyaluronik asitin formülasyon parametreleri üzerindeki etkisi V4 formülasyonuna eklenerek incelenmiştir.

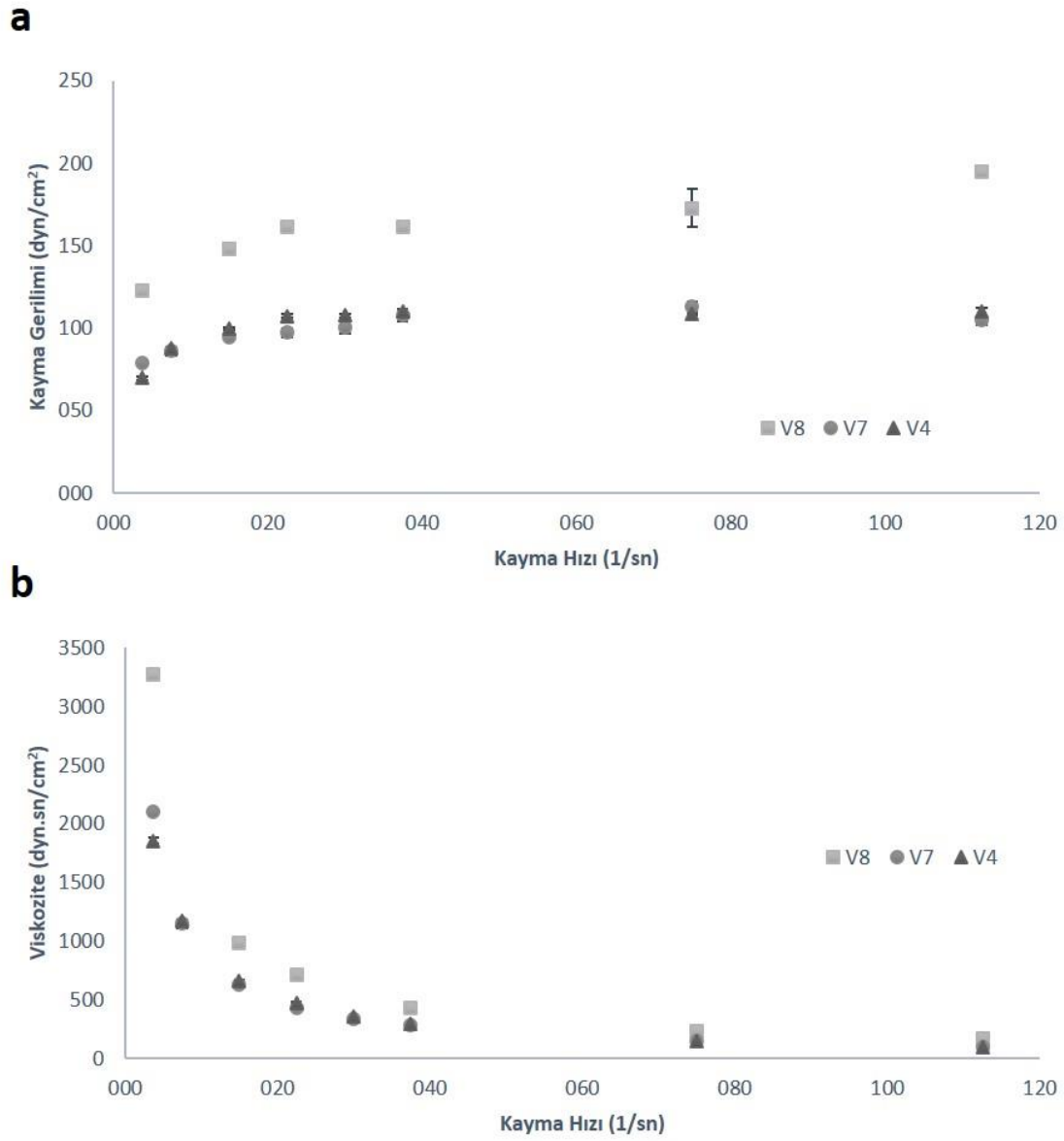
V4, V6 ve V7 formülasyonları kıyaslandığında, sadece PDI parametresi için anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. V7'nin V4'e göre anlamlı derecede düşük PDI'ya sahip olması nedeni ile V7 formülasyonu optimum formülasyonlardan biri olarak seçilmiştir.

V4 temel alınarak hyaluronik asitin etkinliğinin incelendiği V8 ve V9 formülasyonlarında ise, V4'e göre daha yüksek KB, PDI ve ZP değerleri elde edilmiştir ($p<0,05$). Hyaluronik asitin formülasyon parametreleri üzerindeki etkileri göz önünde bulundurularak, KB ve PDI açısından daha iyi performansa sahip olan V8 (düşük KB ve PDI), diğer bir optimum formülasyon olarak belirlenmiştir. Özetle, V4, V7 ve V8 formülasyonları optimum formülasyonlar olarak belirlenmiştir.

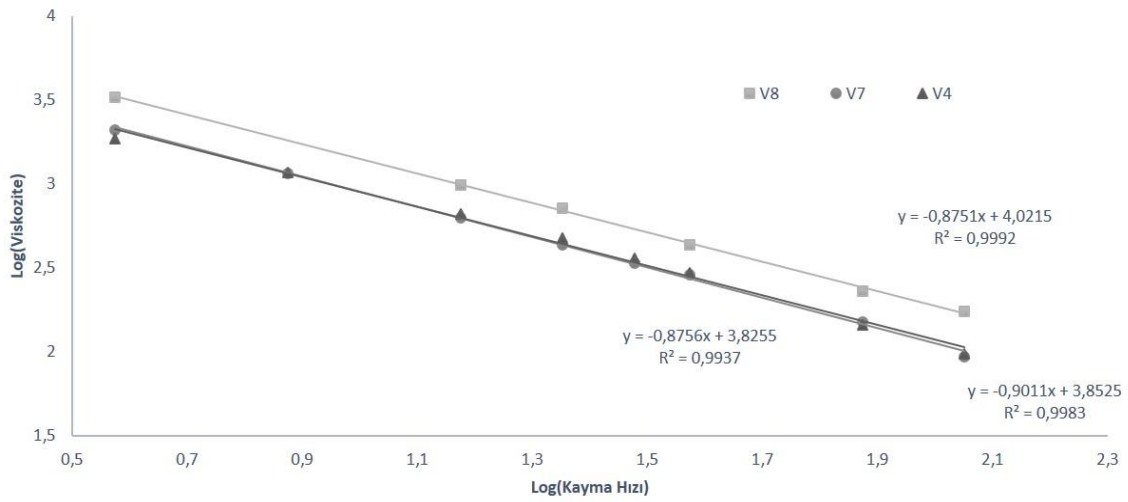
4.8.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.8'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının Kayma gerilimi-Kayma hızı ve Viskozite-Kayma hızı grafikleri Şekil 4.50'de gösterilmiştir. Elde edilen grafiklere göre esnek veziküler sistemlerin Newtonian akış göstermedikleri belirlenmiştir. Bu nedenle Viskozite-Kayma Hızı grafikleri Ostwald de Waele Power-Law eşitliği kullanılarak doğrusallaştırılmıştır. Doğrusallaştırılan $\log(\text{Viskozite})-\log(\text{Kayma hızı})$ grafikleri Şekil 4.51'de gösterilmiştir.

Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K ve n değerleri Çizelge 4.38'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar için $n<1$ olarak bulunmuştur. Buna göre tüm formülasyonlar psödoplastik akış göstermektedir. Akışa karşı direnç ile doğrudan ilişkili bir parametre olan K değerlerine göre, hem oleik asit hem de hyaluronik asit akışa karşı olan direnci artırmıştır. Polimerik yapıdaki hyaluronik asitin etkisinin, oleik asite göre çok daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.50. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının (a) Kayma Gerilimi-Kayma Hızı, (b) Viskozite-Kayma Hızı grafikleri (Ortalama $\pm$ SS, n=3)



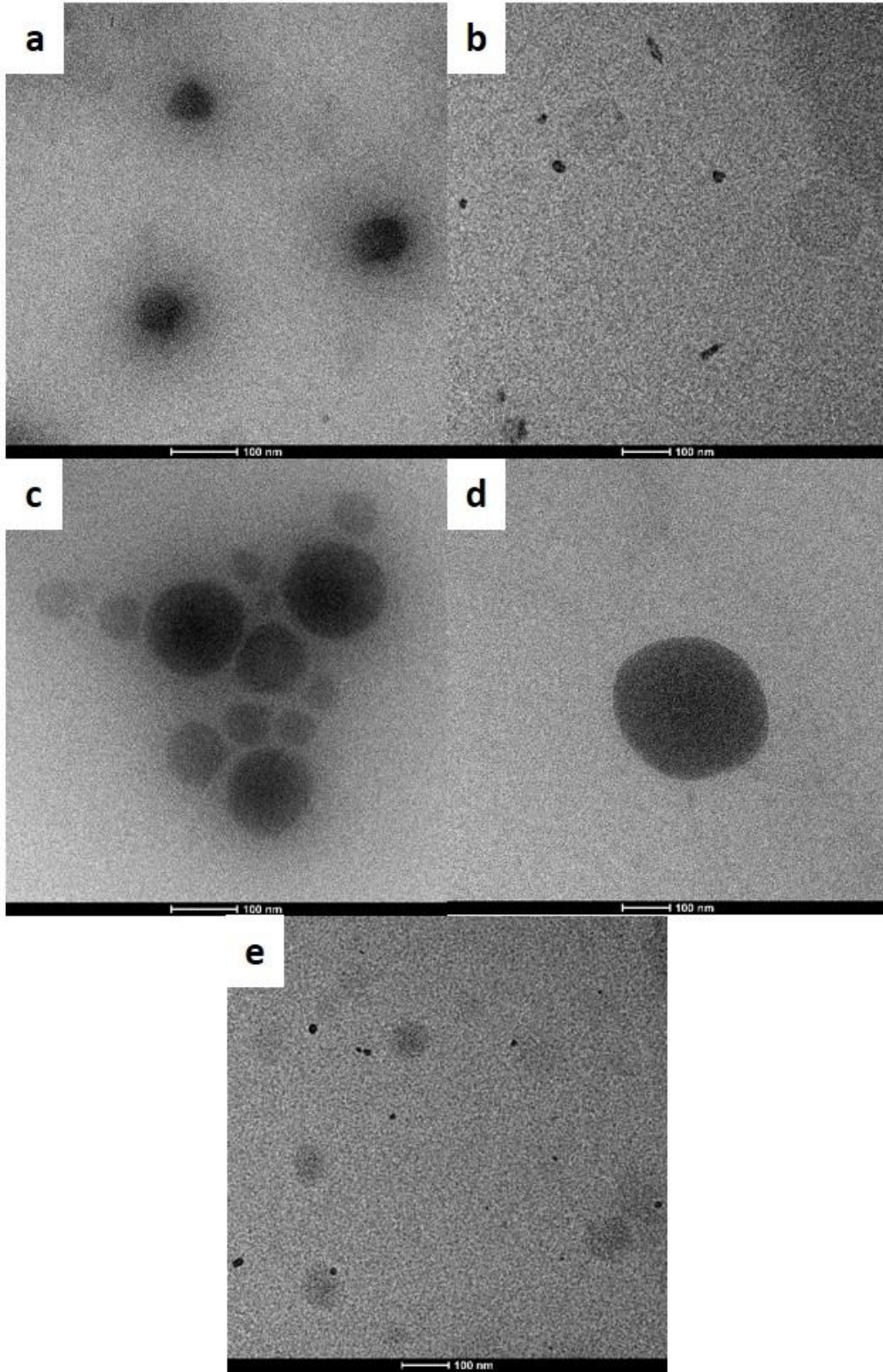
Şekil 4.51. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının Log(Viskozite)-Log(Kayma Hızı) grafikleri

Çizelge 4.38. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının Ostwald de Waele Power-Law eşitliğinin uygulanması sonucunda elde edilen K ve n değerleri

Formülasyonlar	n	K (dyn.sn/cm ²) ⁿ	r ²
V4	0,124	6691	0,994
V7*	0,099	7120	0,998
V8**	0,125	10508	0,999
* oleik asit içermekte, ** hyaluronik asit içermekte			

4.8.7. Morfolojik analiz

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının morfolojik analizleri Bölüm 3.2.8’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların TEM görüntüleri Resim 4.5’te verilmiştir. Görüntülemelerde tüm formülasyonların yaklaşık 100-200 nm arası damlacık çapına sahip olduğu görülmektedir. Kesecik yapısını oluşturan dış lipid katmanının görüntülenmesi amacı ile etkin maddesiz kesecikler üretilmiş ve görüntülemeleri yapılmıştır. Bunun yanında V7 formülasyonu etkin madde içermeyen elde edilememiş, hidrate edilme aşamasında faz ayrıştığı gözlenmiştir. Bu nedenle görüntüleme gerçekleştirilememiştir. Faz ayrışması görülmesinin olası nedenleri Bölüm 5.8.7’de tartışılmıştır.



Resim 4.5. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarından (a) V4, (b) etkin maddesiz V4, (c) V7, (d) V8, (e) etkin maddesiz V8'in TEM görüntüleri

4.8.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon (esneklik) katsayılarının belirlenmesi

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon katsayılarının belirlenmesi Bölüm 3.2.8’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon katsayıları Çizelge 4.39’da verilmiştir. Oleik asit ve hyaluronik asitin, esnek veziküler sistemlerin deforme olabilirliğini anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Hyaluronik asitin negatif etkisi oleik asite göre daha fazla bulunmuştur. Oleik asit ilavesi, esnek veziküler sistem formülasyonunun deformasyon katsayısını %47.3 oranında azaltırken, hyaluronik asit ilave %77,5 oranında azaltmıştır. Deformasyon katsayısının belirlenmesinde, sistemin viskozitesi göz ardı edilmiştir. Yüksek viskozitenin ekstrüzyon süresini uzatacağı düşünüldüğünde, yüksek viskoziteli olan sistemlerin deformasyon katsayısı daha düşük bulunmaktadır.

Çizelge 4.39. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon katsayıları

Formülasyonlar	Deformasyon Katsayısı ($\mu\text{L}/\text{dk}$)
V4	$30,41 \pm 1,71$
V7*	$16,02 \pm 0,27$
V8**	$6,84 \pm 0,23$

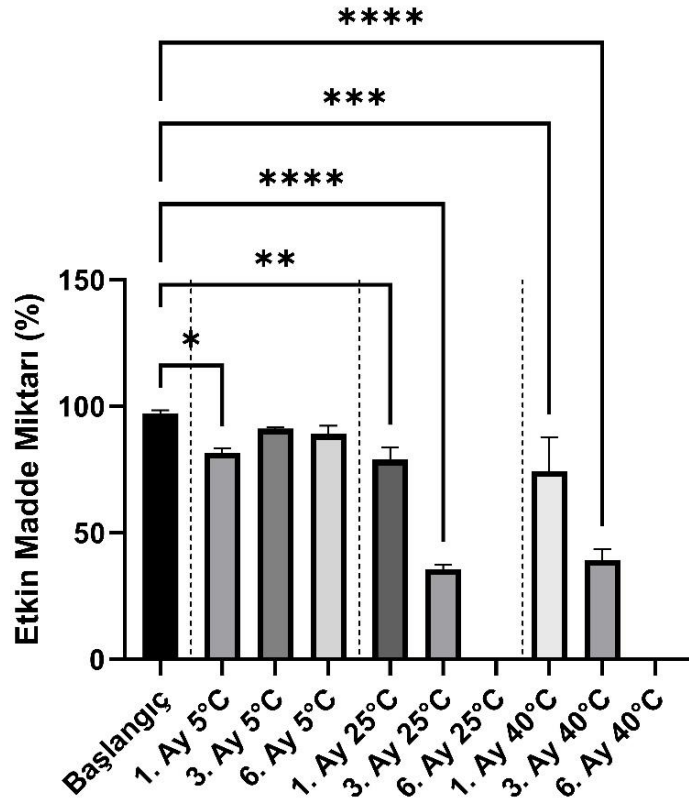
(Ortalama $\pm$ SS, n=3)

* oleik asit içermekte, ** hyaluronik asit içermekte

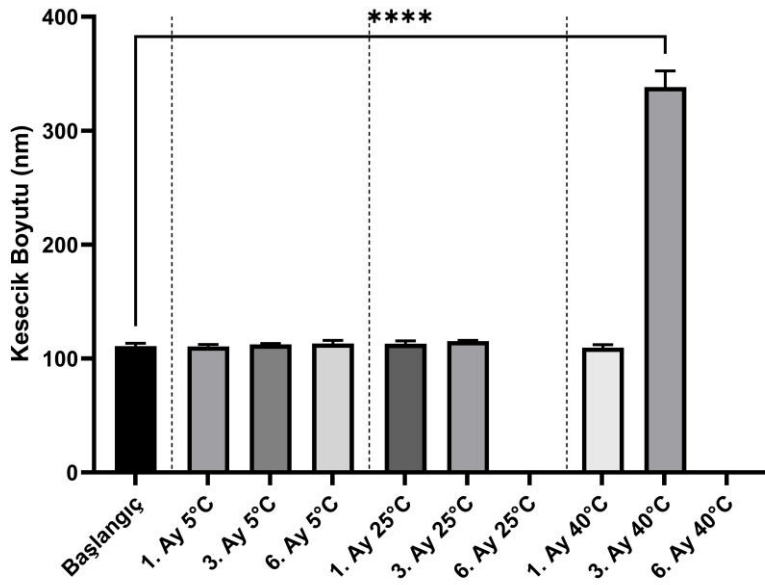
4.8.9. Stabilite çalışmaları

Stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.8’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışmaları, in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen V4 formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. V4 formülasyonunun seçilme nedeni Bölüm 4.11’de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışması kapsamında belirlenen etkin madde yüzdesi, KB, PDI, ZP ve EE% verileri sırasıyla Şekil 4.52, Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55 ve Şekil 4.56’da verilmiştir. V4 formülasyonunun 5°C’de 6 ay boyunca tüm parametrelerde stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. 25 ve 40°C’de 1. aydan itibaren etkin madde miktarında belirgin şekilde azalma meydana gelmiştir ($p<0,01$). V4 formülasyonunun KB, PDI ve ZP verileri açısından 25°C’de 3 ay, 40°C’de 1 ay boyunca

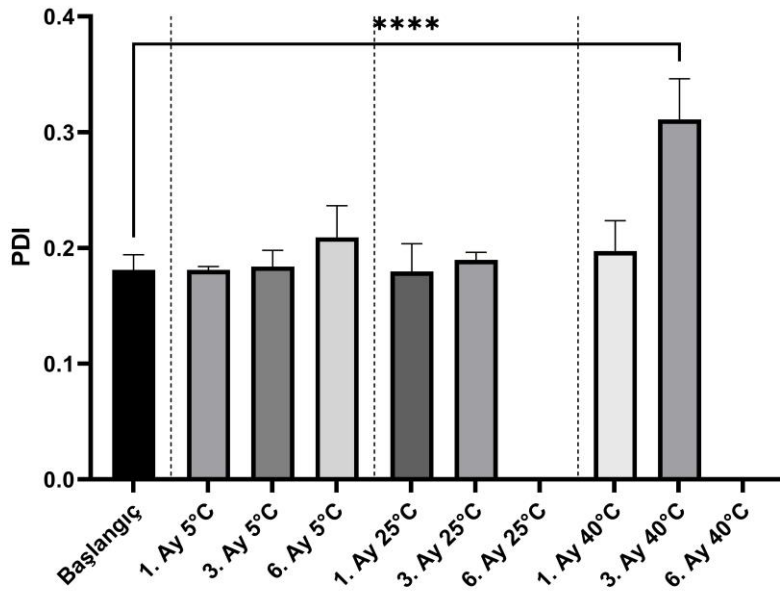
formülasyon özelliklerini korumasına karşın, mikrobiyolojik üreme nedeniyle her iki sıcaklık için 6. ay verileri elde edilememiştir.



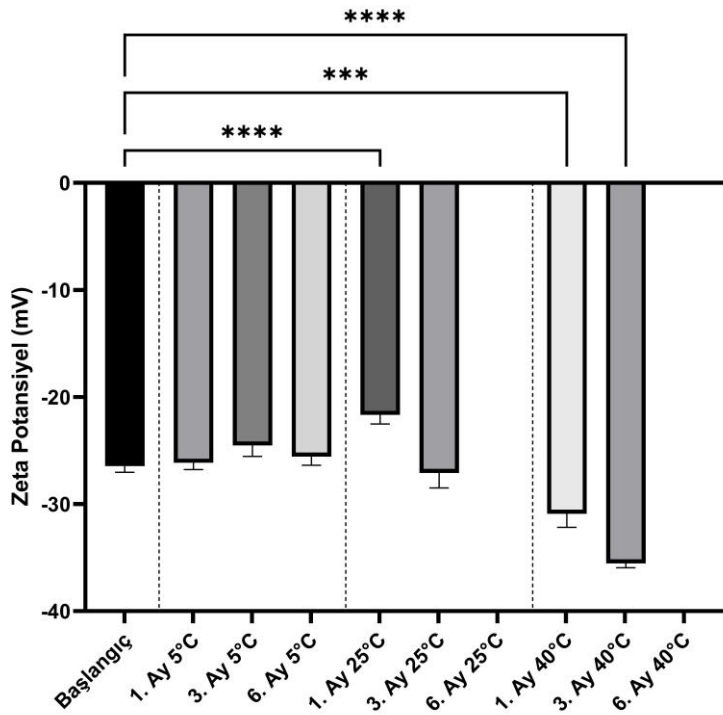
Şekil 4.52. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen etkin madde yüzdesi verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)



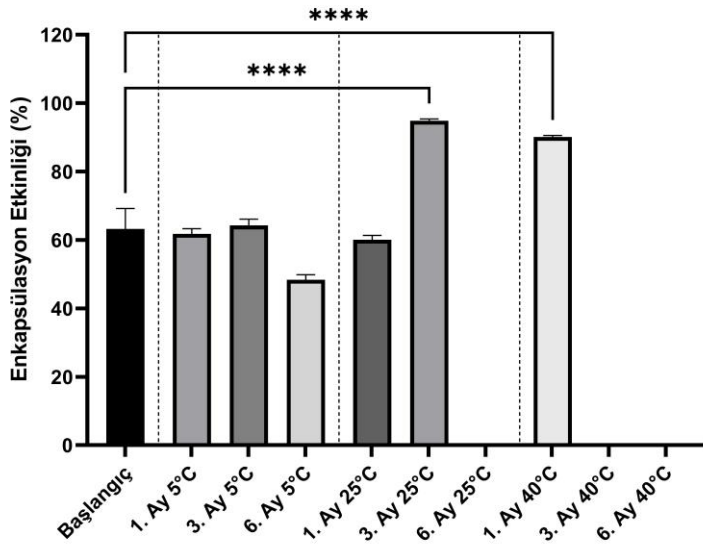
Şekil 4.53. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen kesecik boyutu verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (****: $p < 0,0001$)



Şekil 4.54. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen PDI verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (****: $p < 0,0001$)



Şekil 4.55. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen zeta potansiyel verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)

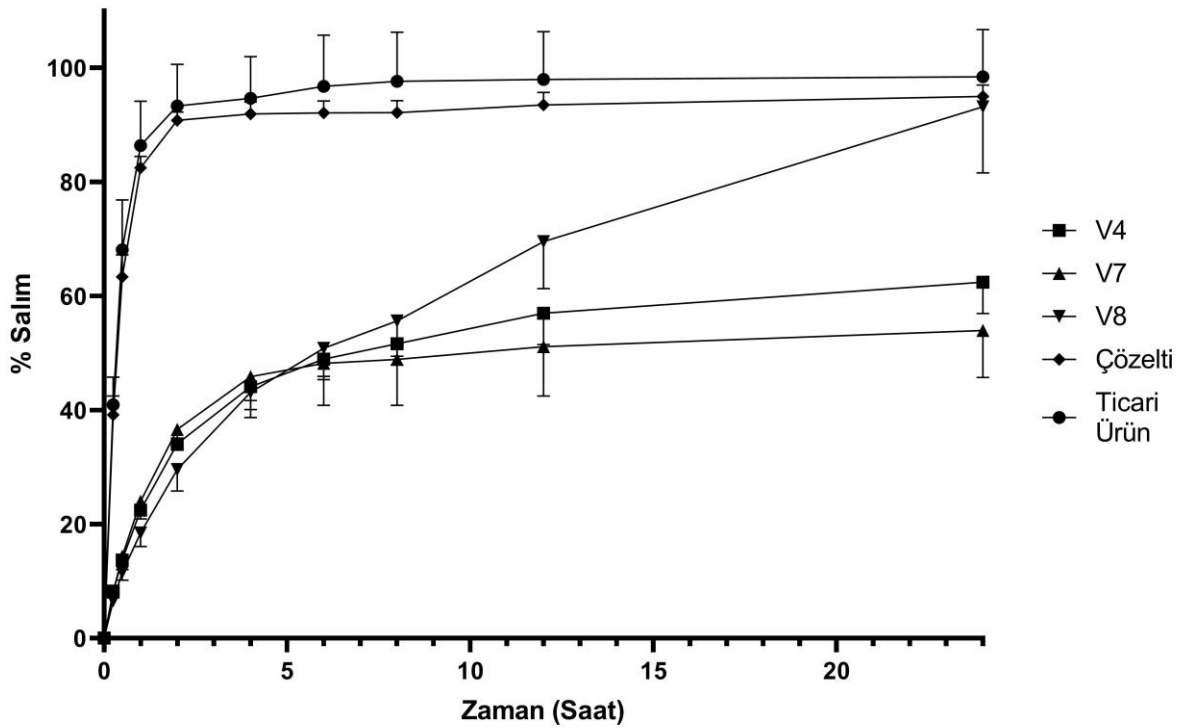


Şekil 4.56. V4 formülasyonunun 6 aylık stabilite çalışmaları kapsamında elde edilen enkapsülasyon etkinliği verileri (Ortalama $\pm$ SS, n=3) (****: $p<0,0001$)

4.9. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Diklofenak sodyumun, salım çalışmalarında

kullanılan diyaliz membrana olan partisiyonu $0,04 \pm 0,15$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerin, analiz yönteminin deney içi ve deneyler arası kesinlik validasyonlarında elde edilen %bağıl sapma değerinin altında olması nedeni ile etkin maddenin diyaliz membrana partisiyonunun olmadığı varsayılmıştır. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının, diklofenak sodyum çözeltisinin ve ticari ürünün in vitro salım çalışmalarının sonucunda elde edilen %Salım-Zaman grafiği Şekil 4.57’de gösterilmiştir. 24 saat boyunca sürdürülen çalışmada, etkin madde çözeltisinden ve ticari üründen yaklaşık 2 saatte %90’ın üzerinde salım gerçekleşmiştir. Veziküler sistem formülasyonlarından etkin madde difüzyonunun 6. saatten sonra belirgin şekilde yavaşladığı gözlenmiştir.



Şekil 4.57. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının %Salım-Zaman grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=3)

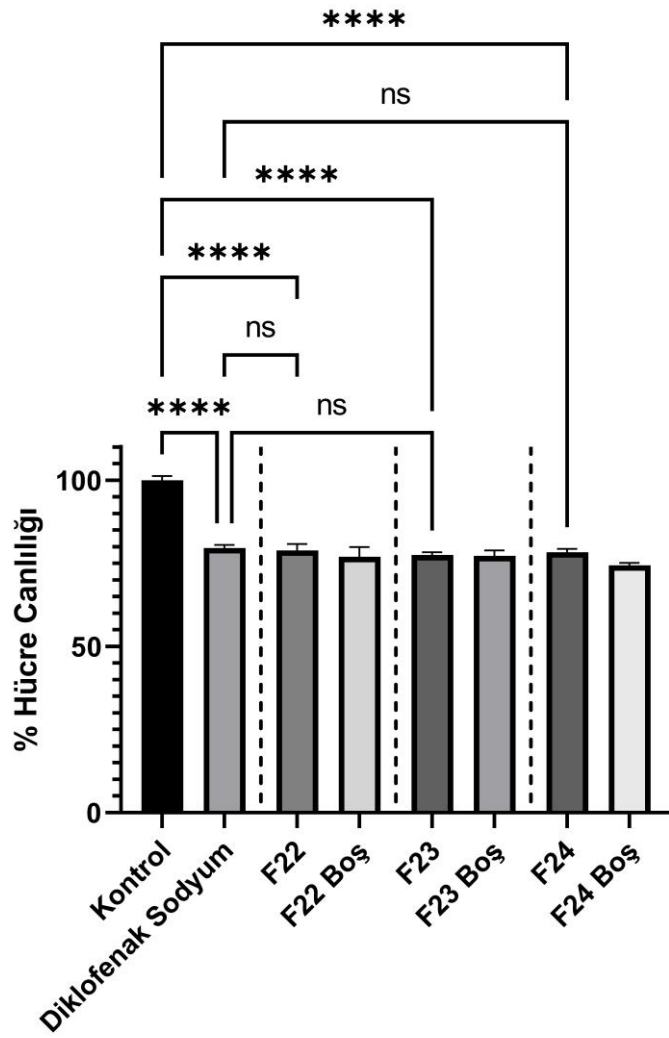
Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının salım mekanizmalarının incelenmesi amacıyla DDSolver® yazılımı kullanılmıştır. r^2 , r^2_{adj} , AIC ve MSC parametreleri kullanılarak 0. derece, 1. derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Weibull matematiksel modelleri ile elde edilen %Salım-Zaman profillerinin uyumu incelenmiştir. Hesaplanan model uyum parametreleri Çizelge 4.40’da sunulmuştur. En yüksek r^2 , r^2_{adj} ve MSC değerleri ile en düşük AIC değeri V4 ve V7 formülasyonları için Weibull, V8 formülasyonu için Higuchi kinetiği ile elde edilmiştir.

Çizelge 4.40. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının salım kinetiği modelleri ile uyumlulukları

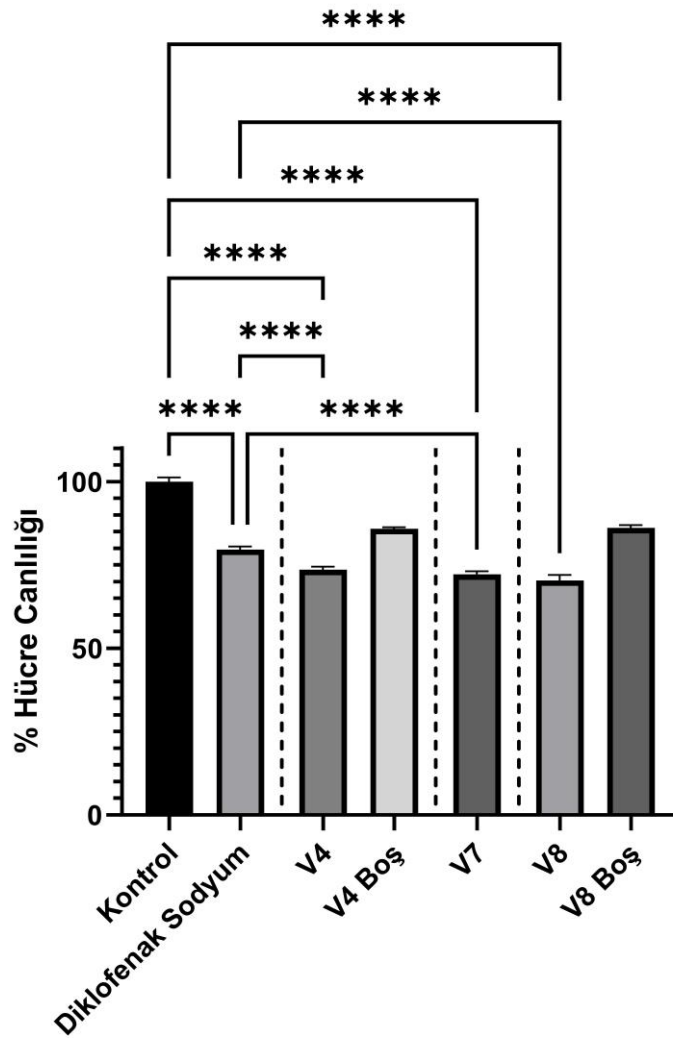
		0. Derece	1. Derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Weibull
V4	r^2	0,035	0,611	0,760	0,849	0,951
	r^2_{adj}	0,035	0,611	0,760	0,827	0,935
	AIC	85,4	76	61,2	59,1	49,6
	MSC	-0,5	0,5	1,2	1,5	2,5
V7	r^2	-1,059	-0,123	0,488	0,777	0,862
	r^2_{adj}	-1,059	-0,123	0,488	0,745	0,816
	AIC	78	72,1	65,4	60,1	57,7
	MSC	-0,9	-0,3	0,5	1,1	1,3
V8	r^2	0,588	0,929	0,989	0,971	0,981
	r^2_{adj}	0,588	0,929	0,989	0,966	0,974
	AIC	73	57,1	39	51,3	45,7
	MSC	0,7	2,4	4,5	3,1	3,7

4.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL tarafından, Erciyes Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı araştırmacı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Etkin madde içeren ve içermeyen optimum mikroiğne formülasyonları ile veziküler sistem formülasyonlarının hücre kültürü çalışmaları kapsamında HaCaT hücre hattı üzerindeki sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı şekilde MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların ve etkin maddeye ait 24 saat sonunda elde edilen %Hücre Canlılığı sonuçları Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Saf diklofenak sodyumun %79,6 hücre canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Mikroiğne formülasyonları olan F22, F23, F24 ve etkin madde içermeyen F22 Boş, F23 Boş; saf diklofenak sodyum ile benzer sitotoksite göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.58). Optimum veziküler sistem formülasyonlarından V4, V7 ve V8 ise saf diklofenak sodyuma göre daha yüksek sitotoksite göstermiştir ($p<0,0001$) (Şekil 4.59). Etkin madde içermeyen V4 Boş ve V8 Boş ise saf diklofenak sodyuma göre daha az sitotoksiteye neden olmuştur ($p<0,0001$).



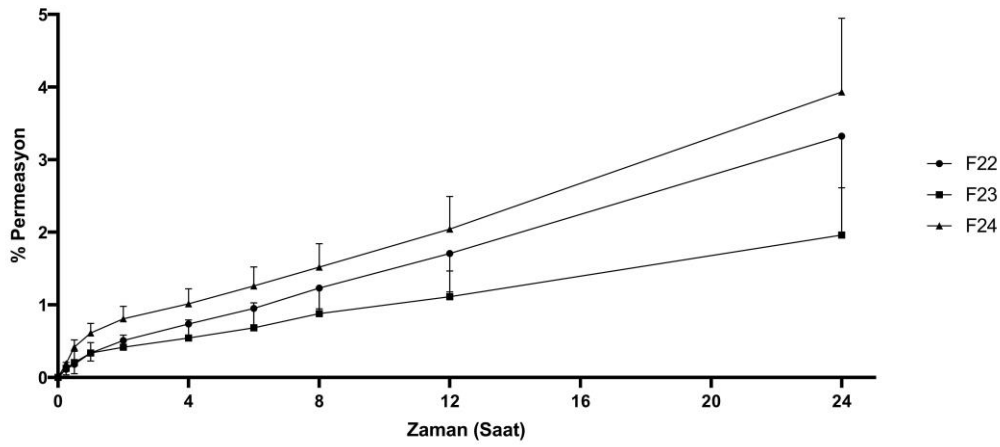
Şekil 4.58. Optimum mikroiğne formülasyonlarının MTT sitotoksosite test sonuçları (Ortalama ± SS, n=6) (ns: $p>0,05$, ****: $p<0,0001$)



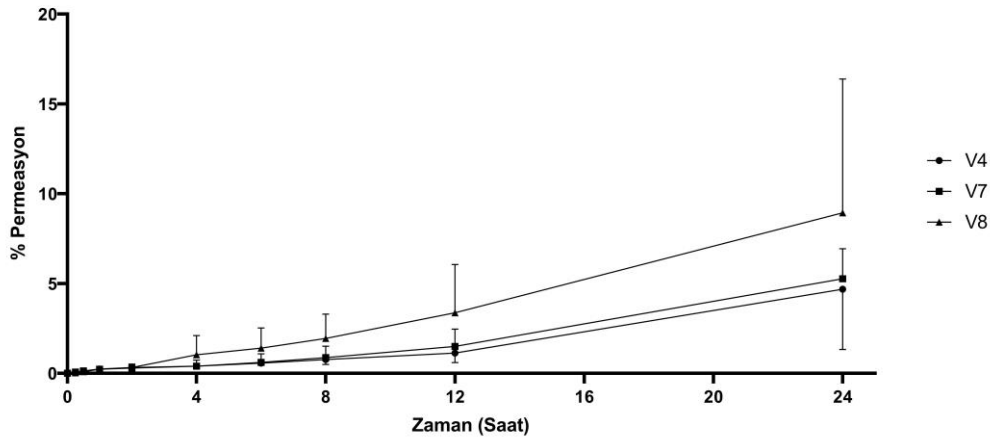
Şekil 4.59. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının MTT sitotoksosite test sonuçları (Ortalama ± SS, n=6) (****: $p < 0,0001$)

4.11. Ex Vivo Deriden Geçiş ve Deride Birikim Çalışmaları

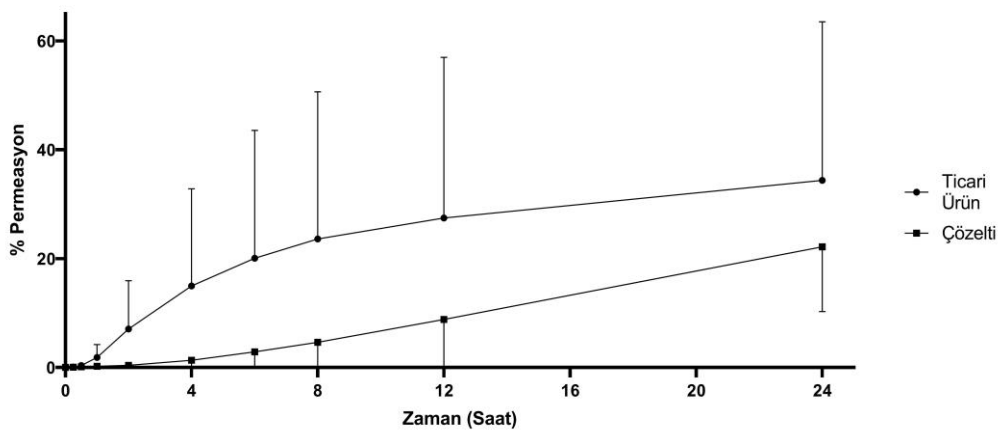
Ex vivo deriden geçiş ve deride birikim çalışmaları Bölüm 3.2.11’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ex vivo çalışmalar kapsamında, optimum mikroiğne formülasyonları, esnek veziküler sistem formülasyonları, ticari ürün ve etkin madde çözeltisinin zamana karşı alıcı faza geçen etkin madde yüzdesini gösteren grafikler Şekil 4.60, Şekil 4.61 ve Şekil 4.62’de verilmiştir. Tüm formülasyonlar için 24 saatin sonunda alıcı faza geçen etkin madde yüzdesi, dokuda kalan etkin madde yüzdesi ve hesaplanan permeabilite katsayıları, sırasıyla Şekil 4.63, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65’te gösterilmiştir. İlgili veriler Çizelge 4.41’de verilmiştir.



Şekil 4.60. Optimum mikroğne formülasyonlarının %Permeasyon-Zaman grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=6)



Şekil 4.61. Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının %Permeasyon-Zaman grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=6)



Şekil 4.62. Ticari ürün ve etkin madde çözeltisinin %Permeasyon-Zaman grafiği (Ortalama $\pm$ SS, n=6)

Şekil 4.60, Şekil 4.61 ve Şekil 4.62’de belirli zaman noktalarında standart sapma değerlerinin çok yüksek olduğu görülmektedir. Özellikle 12. ve 24. saat verileri arasında, bu sapmalara bağlı olarak %Permeasyon açısından farklılık saptanamayan durumlar meydana gelmiştir. Bunun nedeni, kullanılan sıçan derileri arasındaki farklılık ve deney süresinin uzun olması nedeniyle dokularda hasar meydana gelmiş olması olabilir.

%Permeasyon değerlerinin kıyaslanması

Optimum mikroiğne formülasyonları arasında, dokudan geçerek alıcı faza ulaşan en yüksek etkin madde yüzdesi F24 formülasyonu ile elde edilmiştir (Şekil 4.60 ve Şekil 4.63a). F24’ün F23 ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), F22 ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Esnek veziküler sistem formülasyonları arasında anlamlı fark bulunamasa da, V8 formülasyonu en fazla alıcı faza etkin madde geçişi sağlayan formülasyon olmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.61 ve Şekil 4.63b). Ticari ürüne ait ex vivo deriden geçiş çalışmalarında, alıcı faza ulaşan etkin madde yüzdesi, hem esnek kesecik hem de mikroiğne formülasyonlarından belirgin şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.62 ve Şekil 4.63c).

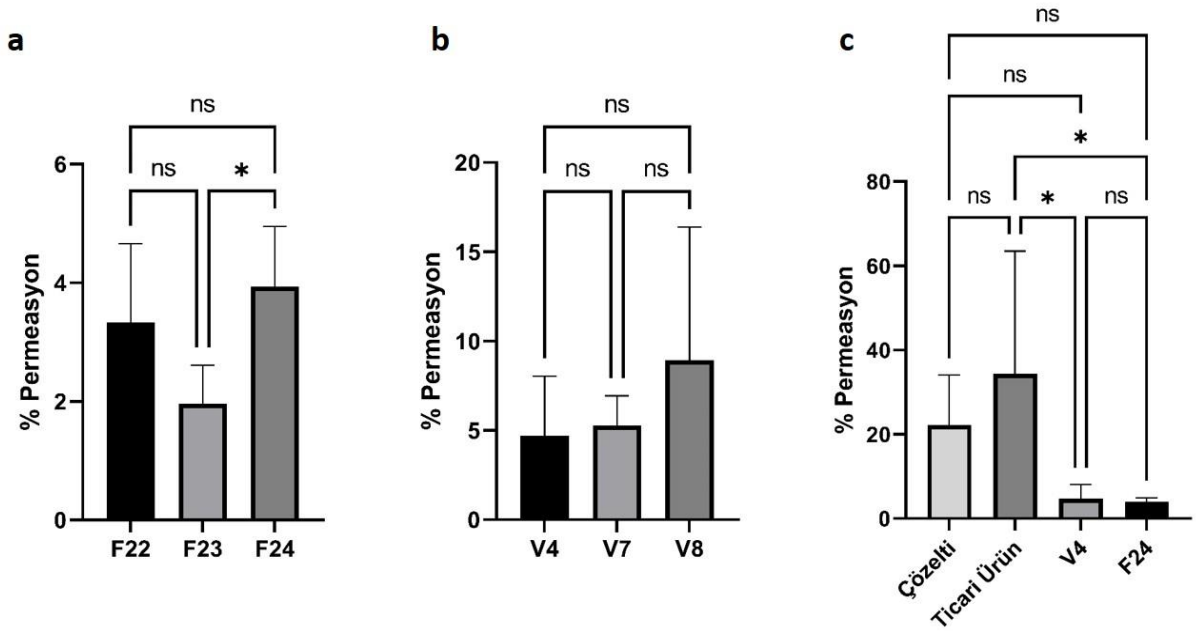
Dokuda kalan etkin maddenin kıyaslanması

Optimum mikroiğne formülasyonları arasında F24’ün, F22 ve F23’e göre belirgin şekilde daha fazla miktarda etkin maddenin deri içerisinde birikimini sağladığı (Şekil 4.64a) görülmektedir ($p<0,05$). Bu açıdan, F22 ve F23 arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Veziküler sistem formülasyonları arasında anlamlı fark bulunamasa da, V4 formülasyonu dokuda en fazla birikimi sağlayan formülasyon olmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.64b). Seçilen F24 ve V4 formülasyonlarının, çözelti ve ticari ürün ile arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.64c). Bu durumun ticari ürün ve etkin madde çözeltisinin standart sapma değerlerinin çok yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

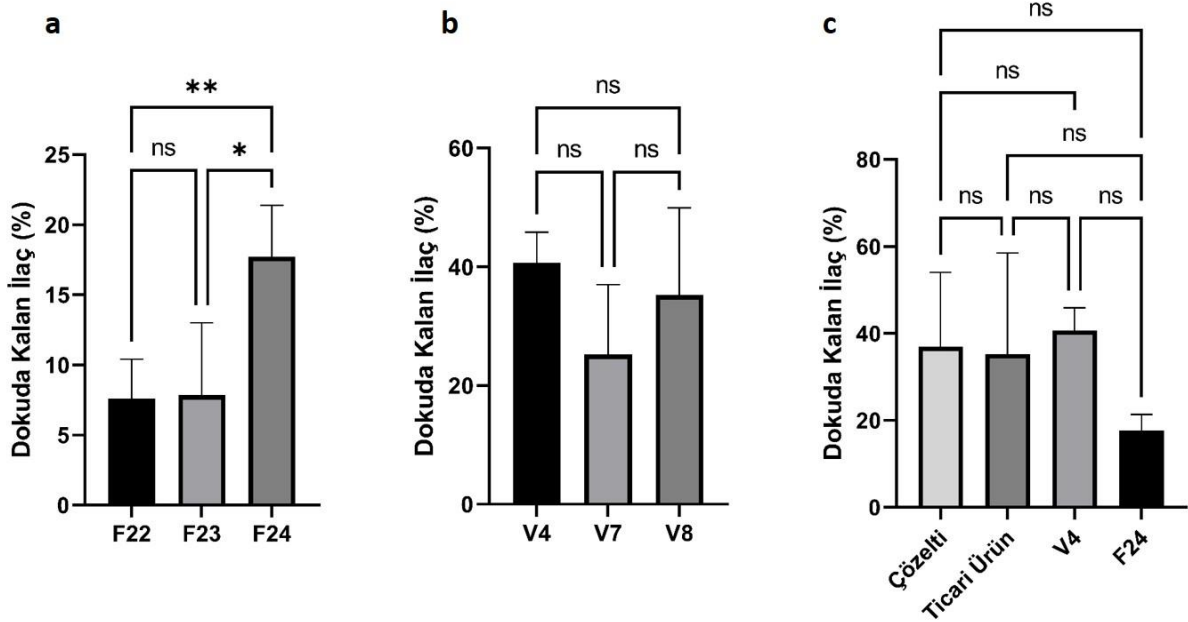
Permeabilite katsayılarının kıyaslanması

Optimum mikroiğne formülasyonları arasında en yüksek permeabilite katsayısı F24 formülasyonu ile elde edilmiştir. F24 ile F22 formülasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0,05$) ancak F24 ile F23 arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır

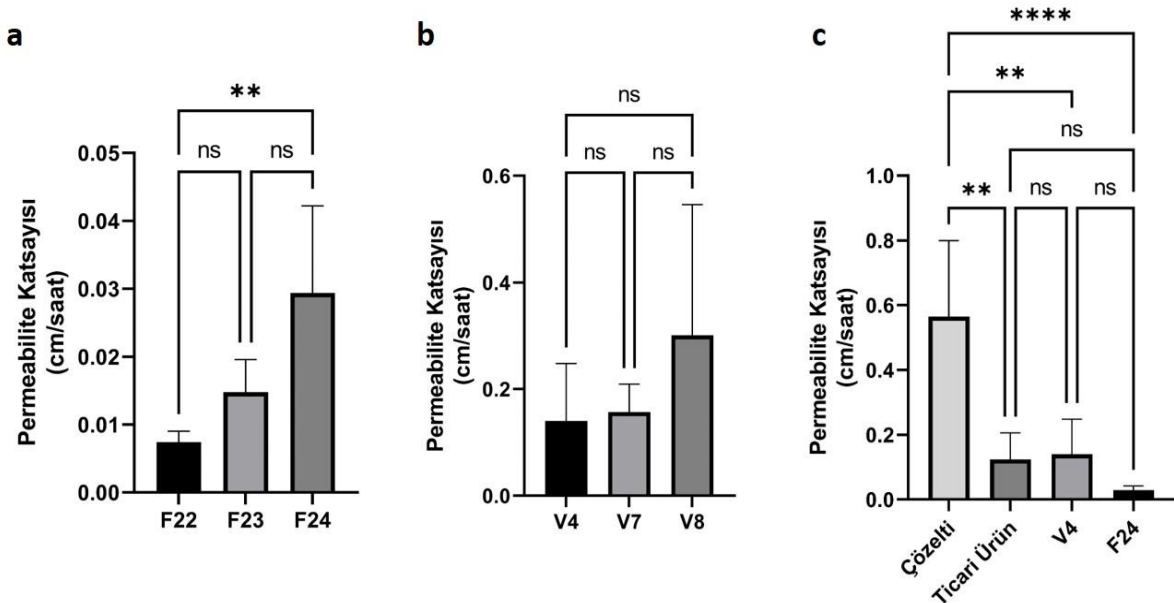
($p>0,05$) (Şekil 4.65a). Esnek veziküler sistem formülasyonlarının yüksek standart sapmaya sahip olmaları nedeniyle permeabilite katsayıları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.65b). Etkin madde çözeltisi en yüksek permeabilite katsayısını göstermiş olup ($p<0,01$), ticari ürün ile geliştirilen formülasyonların permeabilite katsayıları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.65c). Formülasyondan kaynaklanan herhangi bir etken olmadan derinin diklofenak sodyum için gösterdiği permeabilite 565 ± 234 mm/saat olarak bulunmuştur. Bu değer esas alındığında, in vivo çalışmalar için seçilmiş olan F24'ün deri geçirgenliğini %94,9 oranında, V4'ün %75,2 oranında azalttığı görülmektedir. Bu durum, klinik etki için amaçlanan deri dokusundaki birikime oranla sistemik maruziyetin azalacağını göstermektedir.



Şekil 4.63. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroigne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün, 24. saatin sonunda alıcı faza geçen etkin madde yüzdeleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (ns: $p>0,05$, *: $p<0,05$)



Şekil 4.64. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroigne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün, 24. saatin sonunda dokuda kalan etkin madde yüzdeleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (ns: $p>0,05$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$)



Şekil 4.65. Ex vivo çalışmalarda (a) Optimum mikroigne formülasyonlarının, (b) veziküler sistem formülasyonlarının, (c) seçilen formülasyonlar, etkin madde çözeltisi ve ticari ürünün permeabilite katsayıları (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (ns: $p>0,05$, **: $p<0,01$, ****: $p<0,0001$)

Çizelge 4.41. Optimum mikroiğne formülasyonlarının, optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının, ticari ürünün ve çözeltinin permeabilite katsayıları

Formülasyonlar	Dokuda Kalan (%)	% Permeasyon (24. Saat)	Permeabilite Katsayısı (cm/saat)
F22	7,6 ± 2,8	3,3 ± 1,3	0,007 ± 0,002
F23	7,8 ± 5,2	2 ± 0,6	0,015 ± 0,005
F24	17,7 ± 3,7	3,9 ± 1	0,029 ± 0,013
V4	40,7 ± 5,2	4,7 ± 3,4	0,140 ± 0,108
V7	25,2 ± 11,8	5,3 ± 1,7	0,157 ± 0,053
V8	35,3 ± 14,7	8,9 ± 7,4	0,301 ± 0,245
Ticari Ürün	35,3 ± 23,2	34,4 ± 29,1	0,124 ± 0,082
Çözelti	36,9 ± 17,1	22,2 ± 11,9	0,565 ± 0,234

Ortalama ± SS, n=6

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere esnek veziküler sistem formülasyonu ve mikroiğne formülasyonunun seçilmesi

Optimum mikroiğne formülasyonları üzerinde yapılan in vitro değerlendirmelere göre, F22 yüksek şişme indeksi ve şişme hızı göstermesine karşın, Franz yöntemi ile yapılan in vitro salım çalışmalarında belirgin bir üstünlük gösterememiştir. Öte yandan, F24 formülasyonu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da en yüksek mekanik dayanıklılık gösteren optimum mikroiğne formülasyonu olmuştur. Ex vivo deri delme çalışmalarında F24'ün teorik batma derinliği en yüksek bulunsa da, yapılan incelemenin görsel değerlendirmeye dayanması nedeniyle güvenilirliği tartışmalıdır. Özetle, in vitro çalışmalar sonucunda optimum mikroiğne formülasyonları arasında belirgin bir farklılık elde edilememiştir. Bu nedenle ex vivo çalışmalar, in vivoda kullanılmak üzere seçilecek formülasyonun belirlenmesinde kullanılmıştır. Formülasyonların geliştirilmesindeki amaç aktinik keratoz hastalığında kullanılan klasik dozaj şekline (jel preparatı) alternatif formülasyonlar (mikroiğne ve esnek veziküler sistem) geliştirilmesidir. Bu nedenle, aktinik keratozun meydana geldiği deri dokusunda biriken etkin madde yüzdesi çok önemli bir deneysel parametredir. Ex vivo çalışmalar kapsamında en fazla deride etkin madde birikimi F24 formülasyonu ile elde edilmiştir. Bu nedenle F24 formülasyonu, in vivoda kullanılmak üzere seçilen mikroiğne formülasyonu olmuştur.

Optimum veziküler sistem formülasyonları üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda en küçük KB, PDI ve EE% değeri ve en yüksek elastisite katsayısı V4 formülasyonu ile elde edilmiştir. PDI değeri açısından V7, ZP değeri açısından V8 formülasyonu en iyi performansa sahip optimum esnek kesecik sitem formülasyonları olmuştur. İn vitro salım çalışmalarında V8 formülasyonundan etkin madde salım miktarı en fazla bulunurken, ex vivo çalışmalarda V4 ve V7 formülasyonlarına karşı belirgin bir üstünlük gösterememiştir. Yukarıda açıklandığı üzere en önemli parametre olarak belirlenen deri dokusunda biriken etkin madde yüzdeleri açısından, V4 formülasyonu en düşük standart sapma ile en fazla etkin madde birikimi sağlayan formülasyon olmuştur. İn vitro çalışmalar için üretilen optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının, ilgili çalışmada kullanıldıktan sonra buzdolabında muhafaza edildiği süreçte, V8 formülasyonunda V4 ve V7 formülasyonuna göre çok daha hızlı faz ayrıştığı gözlenmiştir. Bu sonucun, kontrollü bir deney çalışması sonucunda elde edilmemiş olmasına karşın, formülasyonun kısa süreli stabilitesinin düşük olduğu ile ilgili verdiği bilgi göz ardı edilmemiştir. Hem dokuda biriken etkin madde yüzdesi hem de formülasyon stabilitesi göz önünde bulundurularak V4 formülasyonunun in vivo çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

4.12. İn Vivo Çalışmalar

İN vivo çalışmalar Bölüm 3.2.12’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Özetle, formülasyonlar, ilgili gruplarda bulunan Spargue-Dawley sıçanların (Bkn. Çizelge 3.7) kulaklarına uygulanmış, üstleri ipek flaster ile kapatılmış ve 24 saat beklenmiştir. Diklofenak sodyumun ipek flastere partasyonu $0,35 \pm 0,30$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, analiz yönteminin deneyler arası tekrarlanabilirlik validasyonunun %bağıl sapmasından daha düşüktür. Bu nedenle pratik olarak adhezif banta etkin madde geçmediği varsayılmıştır. Daha sonra formülasyonlar uzaklaştırılmış ve ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modeli oluşturularak farklı zaman noktalarında kulak kalınlıkları ölçülmüştür. Ksilen uygulanmasının ardından, 1 saatin sonunda kurbanlardan kulak dokuları alınarak ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra, PGE2 seviyesi ölçülmüş ve histolojik görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.66, ksilen uygulamasından 15, 30, 45 ve 60 dakika sonra kulak kalınlık değişimini göstermektedir. Ksilen uygulamasından sonraki 15 dakika içerisinde (pozitif kontrol grubunda 30 dakika) kulak ödemi maksimuma ulaşmış ve ardından tüm gruplarda doğrusal

olarak azalmıştır (Çizelge 4.42). Geliştirilen formülasyonların tüm süreç boyunca gösterdikleri etkilerini karşılaştırmak amacıyla kulak kalınlığı-zaman grafiğinin eğri altında kalan alanı (EAA) ve ödem azalma hızı hesaplanmıştır. Kulak kalınlığı-zaman grafiklerinin EAA'sı, ödem kalınlığı inhibisyon yüzdeleri, ölçülen kulak ağırlıkları ve deney sonunda tespit edilen PGE2 seviyeleri sırasıyla Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69 ve Şekil 4.70'te gösterilmiş, ayrıca tüm bu sonuçlara ait veriler Çizelge 4.44'te verilmiştir. Ödem kalınlığının azalma hızı, Kulak ödemi kalınlığı-Zaman grafiğinin 15. dakikası ve sonraki noktalarına lineer regresyon uygulanarak belirlenmiştir. Lineer regresyon sonuçları Çizelge 4.43'de gösterilmiştir.

Kulak kalınlığı-zaman grafiğinin EAA'sı, kulak ödeminin süre ve şiddetinin genel anlamda ifade eden bir parametredir (Yuan, Miao, Zhang, Li, Li ve Zhang, 2024). EAA'nın düşük olması, anti-inflamatuvar etkinliğin yüksek olduğunu göstermektedir. F24'ün, MN kontrole göre istatistiksel farkının ($p<0,05$), F24 Boş ve ticari ürünün MN kontrole göre istatistiksel farkından ($p<0,0001$) daha düşük olduğu belirlenmiştir. V4'ün ise, negatif kontrole göre istatistiksel farkının ($p<0,01$), V4 Boş ve ticari ürünün negatif kontrole göre istatistiksel farkından ($p<0,001$) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.67). EAA parametresine göre tüm tedavi gruplarının (ticari ürün, F24 ve V4) ödem azaltma etkisinin olduğu; ticari ürün ve F24'ün V4'e göre daha yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

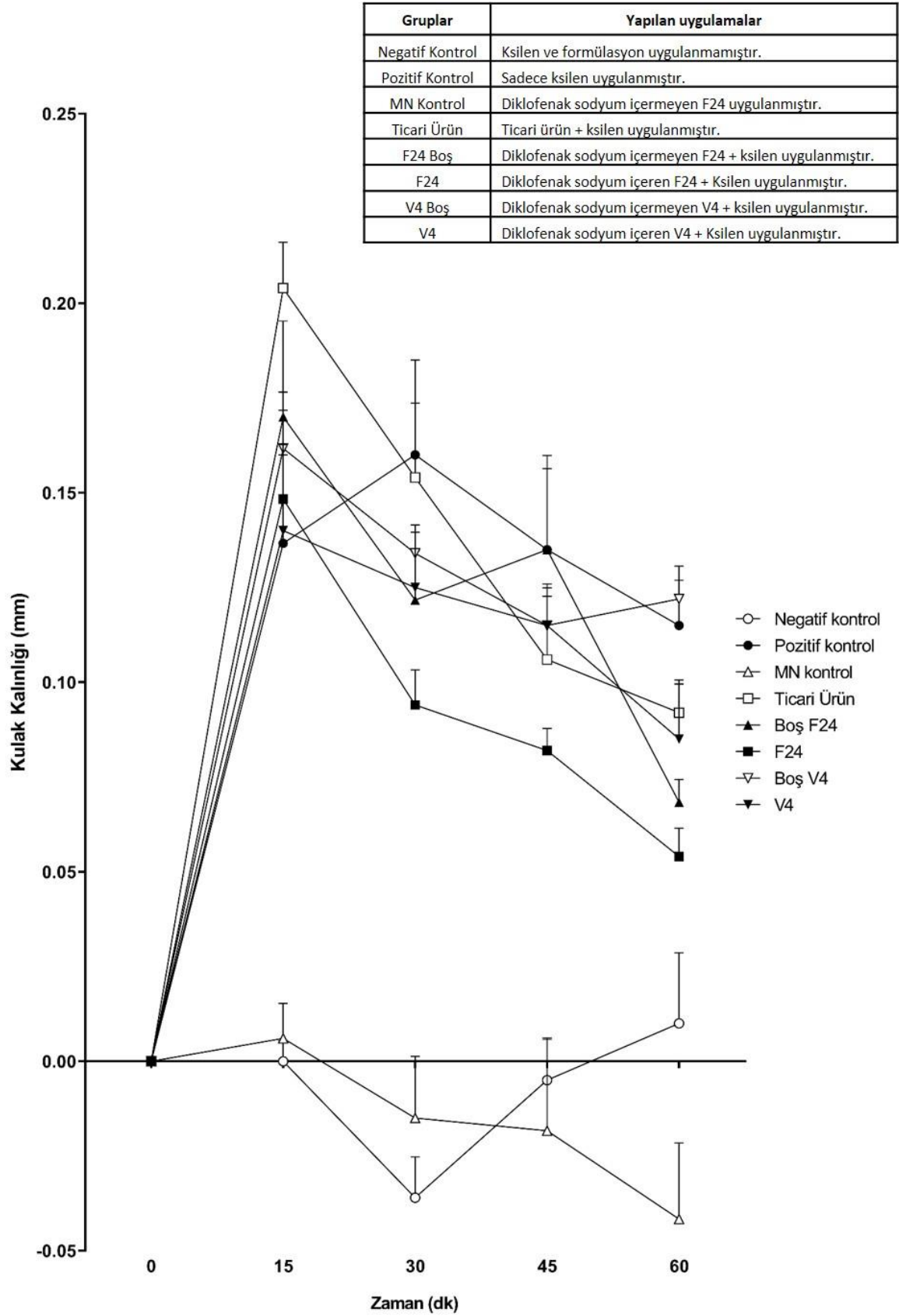
%İnhibisyon-Zaman grafiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, F24'ün diğer formülasyonlara göre tüm zaman noktalarında daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (15., 30., 45. ve 60. dakikalar için sırasıyla %7, %41, %40 ve %50) ($p>0,05$). 60. dakikada ise V4 Boş formülasyonuna karşı anlamlı şekilde fark oluşturduğu gözlenmiştir ($p<0,01$). F24 ve V4'ün, ticari ürün ile % inhibisyon performansları arasında, yüksek varyasyon nedeniyle anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.68). %İnhibisyon parametresi için F24'ün en etkili formülasyon olduğu görülmüştür.

Ödem kalınlığından hareketle elde edilen verilerin yüksek varyasyon göstermesi öngörülerek, sakrifikasyon sonrası kulak ağırlıkları ölçülmüştür. Ticari ürünün uygulandığı gruptaki kulak ağırlıkları ile MN kontrol ve negatif kontrol gruplarındaki kulakların ağırlıkları arasındaki fark anlamlıyken ($p<0,05$), F24'ün MN kontrol grubu ile arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde, V4 ile negatif kontrol arasında anlamlı bir fark oluşmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.69). Kulak ağırlığı parametresi

için F24 ve V4 formülasyonları ticari ürüne göre daha etkili bulunmuş, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da V4, F24'e göre daha fazla ödem azaltmıştır ($p>0,05$).

F24 ve V4 tedavi gruplarının pozitif kontrole göre anlamlı şekilde PGE2 düzeyini azalttığı ($p<0,01$) ve model oluşumu gerçekleştirilmeyen MN kontrol ve negatif kontrole göre PGE2 düzeylerinde fark gözlenmediği belirlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.70). PGE2 düzeyi açısından ticari ürün, F24 ve V4 formülasyonları benzer etkinlik göstermiştir ($p>0,05$).

Histolojik inceleme sonucunda mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve konjesyon değerlendirilmiştir (Resim 4.6). F24 ve V4 tedavi gruplarının pozitif kontrole göre anlamlı şekilde mononükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı (F24 için $p<0,001$ ve V4 için $p<0,01$) belirlenmiştir (Şekil 4.71). Ödem skoru değerlendirmesinde, F24 tedavi grubunun MN kontrol grubu ile arasındaki istatistiksel fark ($p<0,01$), F24 Boş grubunun MN kontrol grubu ile arasındaki istatistiksel farktan daha az bulunmuştur ($p<0,0001$). Ödem skoru açısından, F24 grubunun ticari ürün grubu ile benzer sonuç gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.72). F24 ve V4 tedavi gruplarının pozitif kontrole göre anlamlı şekilde konjesyonu azalttığı (F24 için $p<0,01$ ve V4 için $p<0,05$) görülmüştür (Şekil 4.73).



Şekil 4.66. Tüm grupların Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman grafikleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6)

Çizelge 4.42. Tüm grupların Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman verileri

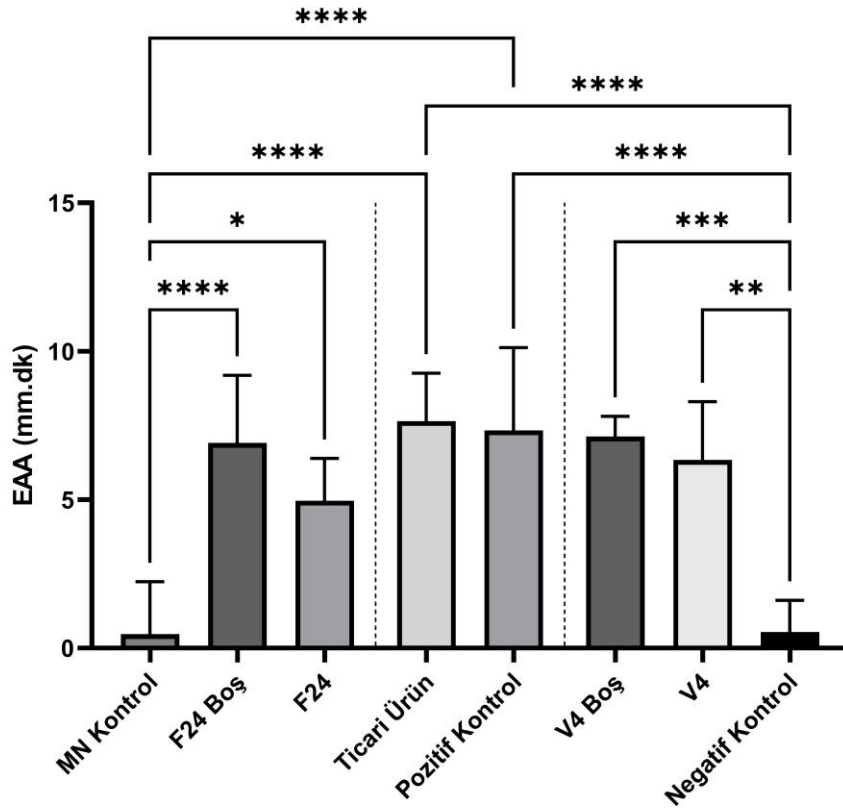
Gruplar	Kulak Ödem Kalınlığı (mm)				% Değişim			
	15. dk	30. dk	45. dk	60. dk	15. dk	30. dk	45. dk	60. dk
Negatif Kontrol	0 ± 0,012	-0,036 ± 0,024	-0,005 ± 0,027	0,01 ± 0,046	-0,3 ± 1,8	-3,9 ± 7,3	-1,1 ± 4,6	1,7 ± 7,5
Pozitif Kontrol	0,137 ± 0,057	0,16 ± 0,061	0,135 ± 0,061	0,115 ± 0,038	23,1 ± 10	27,3 ± 10,3	22,7 ± 9,8	18,6 ± 6,6
MN Kontrol	0,006 ± 0,021	-0,015 ± 0,04	-0,018 ± 0,059	-0,042 ± 0,049	1,0 ± 3,7	-2,8 ± 6,9	-2,9 ± 9,7	-6,7 ± 7,8
Ticari Ürün	0,204 ± 0,027	0,154 ± 0,044	0,106 ± 0,042	0,092 ± 0,019	34,3 ± 5	26,6 ± 7,1	17,7 ± 7,2	15 ± 3,1
F24 Boş	0,17 ± 0,062	0,122 ± 0,032	0,135 ± 0,052	0,068 ± 0,015	28,5 ± 10,1	20,8 ± 5,7	22,2 ± 8,6	11,1 ± 2,5
F24	0,148 ± 0,069	0,094 ± 0,021	0,082 ± 0,013	0,054 ± 0,017	24,8 ± 11,7	15,9 ± 3,4	13,6 ± 1,8	8,9 ± 2,5
V4 Boş	0,162 ± 0,025	0,134 ± 0,017	0,115 ± 0,019	0,122 ± 0,011	27,1 ± 3,8	23,0 ± 3,0	18,8 ± 3,1	19,9 ± 2,4
V4	0,14 ± 0,055	0,125 ± 0,036	0,115 ± 0,027	0,085 ± 0,036	23,8 ± 9,2	21,8 ± 6,1	19,1 ± 4,5	13,8 ± 5,9

Ortalama ± SS, n=6

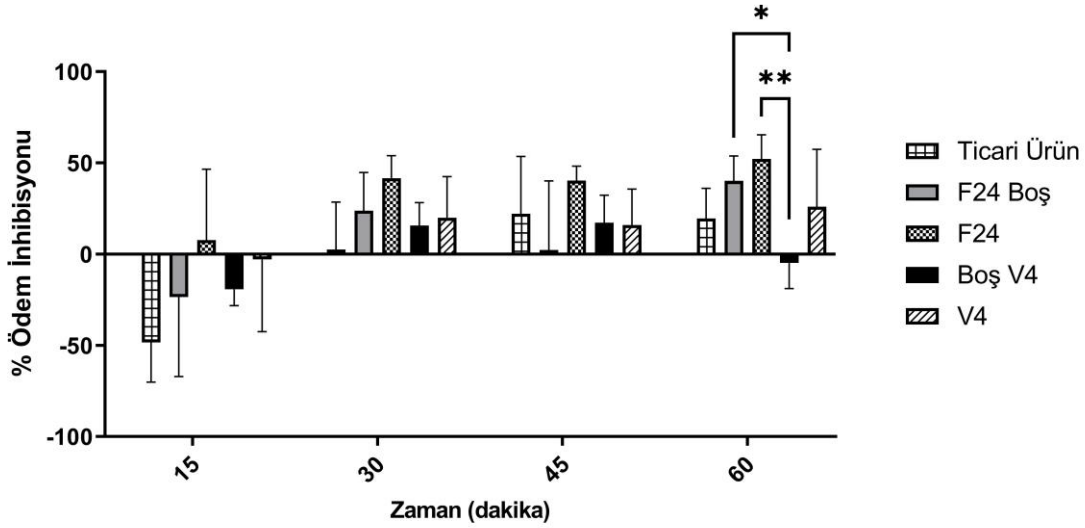
Çizelge 4.43. Kulak Ödem Kalınlığı-Zaman grafiğinin lineer regresyon sonuçları

	Pozitif kontrol	Ticari Ürün	F24 Boş	F24	V4 Boş	V4
Ödem kalınlığı azalma hızı (mm.dk⁻¹) (Eğim)	-0,60 x 10 ⁻³ ± 0,52 x 10 ⁻³	-2,56 x 10⁻³ ± 0,41 x 10⁻³	-1,94 x 10 ⁻³ ± 0,70 x 10 ⁻³	-1,97 x 10 ⁻³ ± 0,39 x 10 ⁻³	-0,92 x 10 ⁻³ ± 0,37 x 10 ⁻³	-1,17 x 10 ⁻³ ± 0,20 x 10 ⁻³
X eksen kesişim noktası (dk)	265,3	91,8	101,1	85,6	182,2	137,1
r²	0,398	0,952	0,796	0,927	0,751	0,946

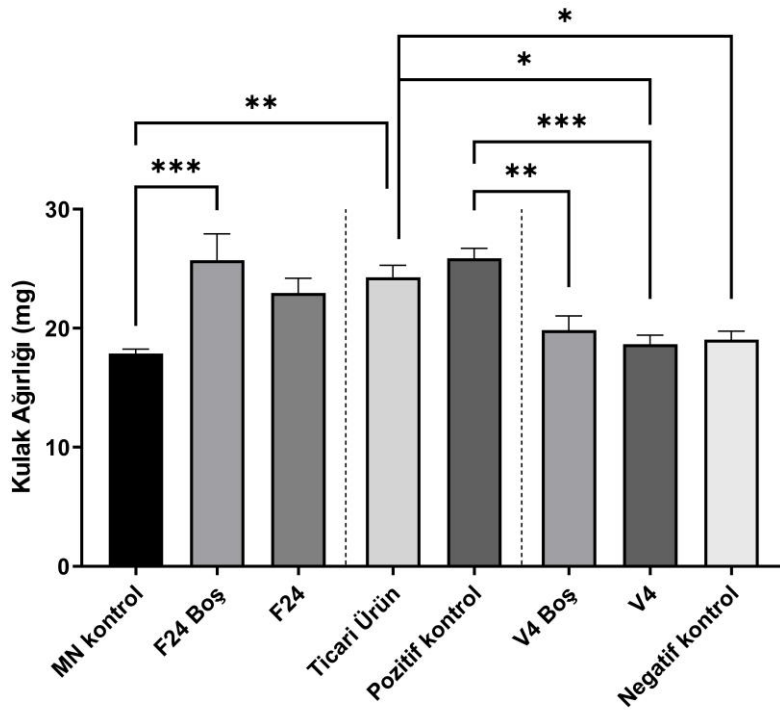
Ortalama ± SH, n=6



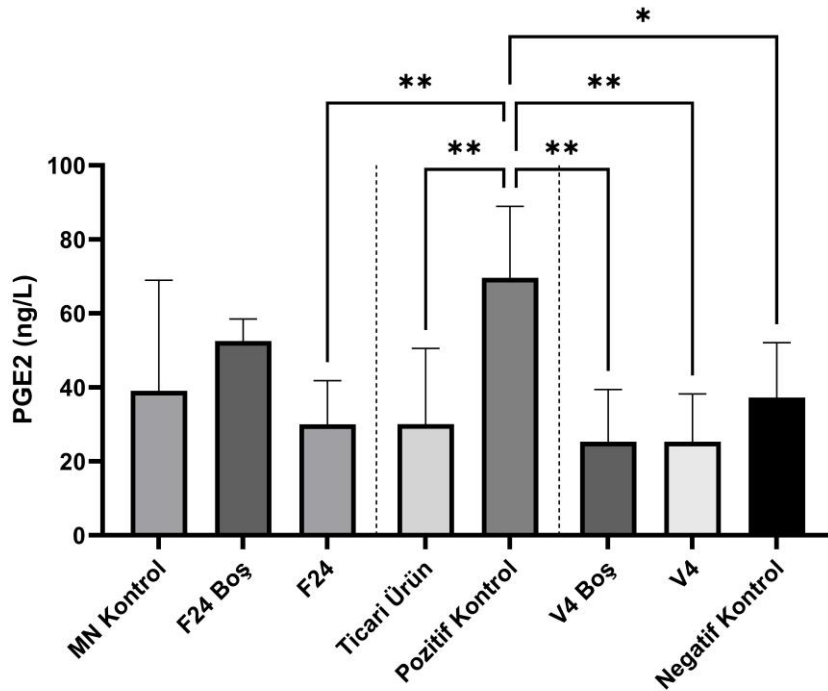
Şekil 4.67. Tüm grupların Kulak Kalınlığı-Zaman grafiklerinin EAA değerleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)



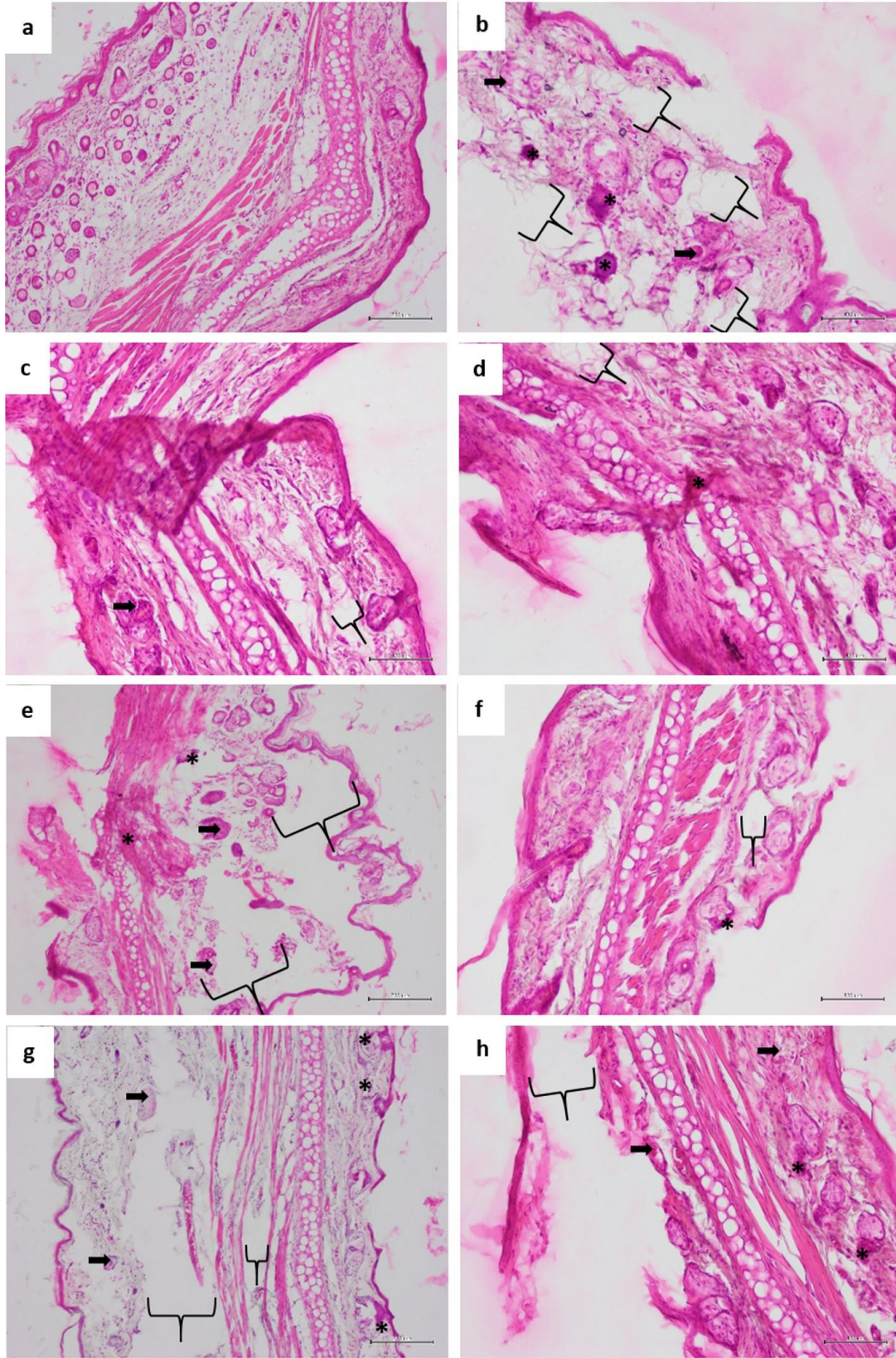
Şekil 4.68. Tüm grupların ödem kalınlığı inhibisyon yüzdeleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$)



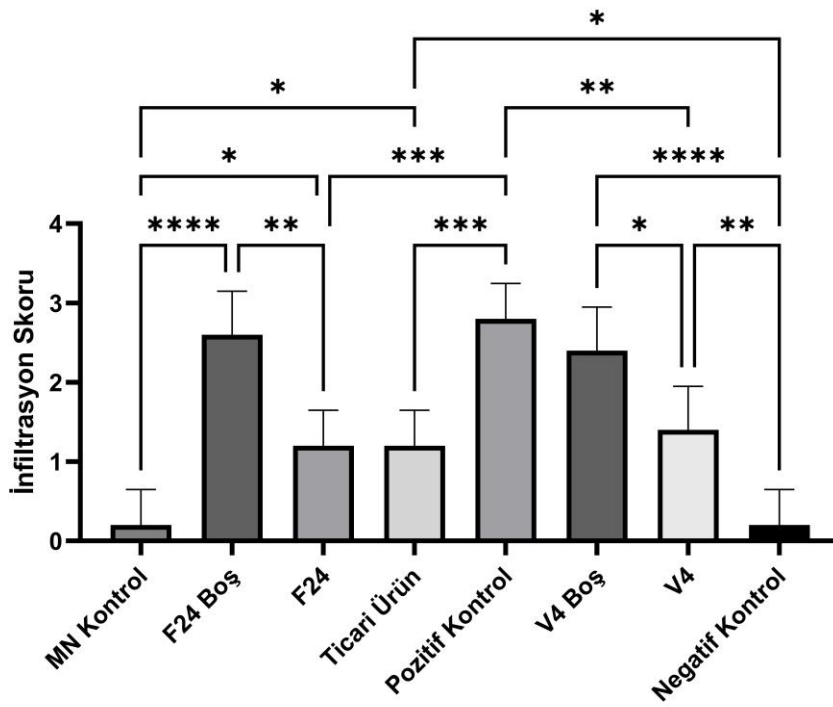
Şekil 4.69. Tüm grupların sakrifikasyon sonrası alınan kulak dokularının ağırlıkları (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$)



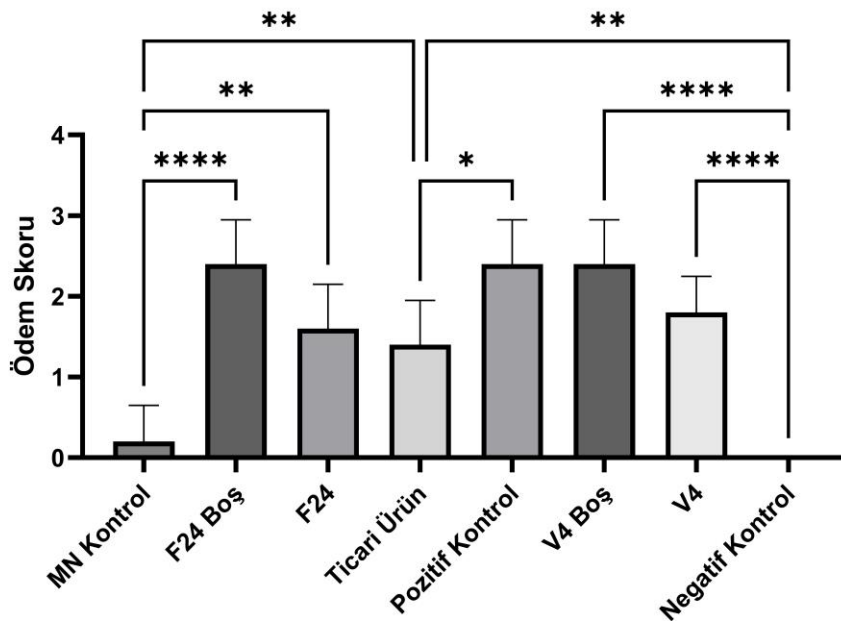
Şekil 4.70. Tüm grupların sakrifikasyon sonrası alınan dokulardaki PGE2 düzeyleri (Ortalama $\pm$ SS, n=6) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$)



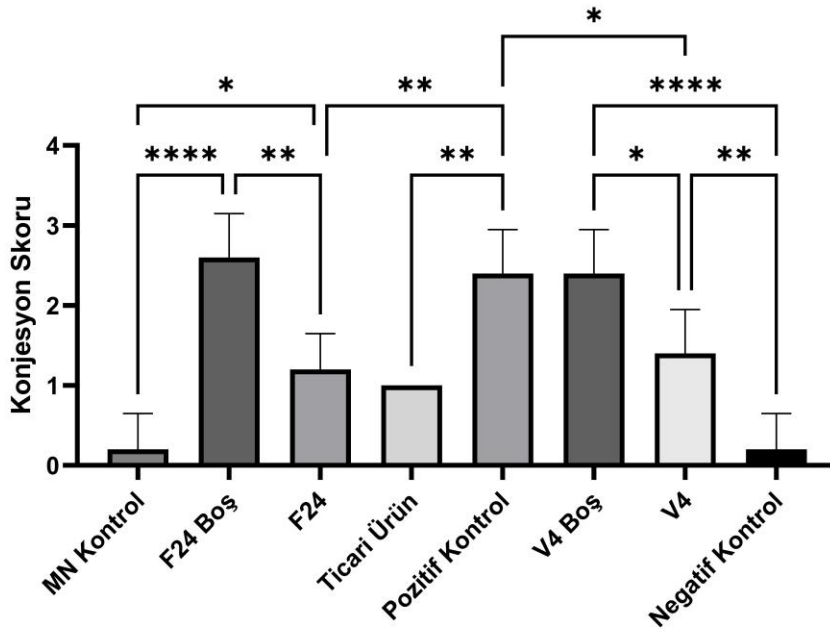
Resim 4. 6. (a) negatif kontrol, (b) pozitif kontrol, (c) MN kontrol, (d) ticari ürün, (e) F24 Boş, (f) F24, (g) V4 Boş ve (h) V4 gruplarına ait doku kesiti mikrografları (*: mononükleer infiltrasyon alanlar, { : ödematoz alanlar, →: konjestif damar yapıları, ölçü çubuğu: 100 μ m)



Şekil 4.71. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası mononükleer hücre infiltrasyonu skorları (Ortalama $\pm$ SS, n=5) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, **** $p<0,0001$)



Şekil 4.72. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası ödem skorları (Ortalama $\pm$ SS, n=5) (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$, **** $p<0,0001$)



Şekil 4.73. Tüm grupların histolojik inceleme sonrası damar konjesyonu skorları (Ortalama ± SS, n=5) (*: p<0,05, **: p<0,01, ****p<0,0001)

Çizelge 4.44. Kulak kalınlığı-zaman grafiklerinin EAA'sı, ödem kalınlığı inhibisyon yüzdeleri, kulak ağırlıkları ve PGE2 seviyeleri

Gruplar	EAA (mm.dk)	Ödem İnhibisyonu (%)	Kulak Ağırlığı (mg)	PGE2 (ng/L)
Negatif Kontrol	0,05 ± 0,56	-	19,1 ± 1,7	37,2 ± 14,9
Pozitif Kontrol	7,34 ± 2,78	-	25,9 ± 2,1	39,1 ± 29,9
MN Kontrol	0,06 ± 0,4	-	17,9 ± 0,8	69,6 ± 19,3
Ticari Ürün	7,65 ± 1,61	19,6 ± 16,4	24,3 ± 2,2	30 ± 20,5
F24 Boş	6,91 ± 2,28	40,1 ± 13,6	25,7 ± 4,9	52,5 ± 6
F24	5,27 ± 1,93	52,2 ± 13,2	23 ± 2,8	30 ± 11,9
V4 Boş	7,08 ± 0,94	-4,9 ± 13,9	19,8 ± 3	25,3 ± 14,2
V4	6,34 ± 1,96	26 ± 31,5	18,7 ± 1,8	25,3 ± 12,9

Ortalama ± SS, n=6

5. TARTIŞMA

5.1. Diklofenak Sodyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

5.1.1. Diklofenak sodyumun çözünürlük çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında, diklofenak sodyumun 25°C’de distile su ortamındaki çözünürlüğü $18,98 \pm 0,17$ mg/mL olarak bulunmuştur. 25°C ve 37°C’de pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki çözünürlük değerleri sırasıyla, $9,24 \pm 0,14$ ve $14,50 \pm 1,31$ mg/mL olarak bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi’nde, diklofenak sodyumun distile su ortamında 25°C’deki çözünürlüğünün “Az çözünür” olduğu bildirilmiştir (Avrupa Farmakopesi 8.0). Çözünürlük tablosuna göre “az çözünür” 10 – 33 mg/mL’ye karşılık gelmektedir. Avrupa Farmakopesi verileri ile 25°C’de distile su ortamında yapılan çözünürlük çalışmasının sonuçları tutarlı bulunmuştur.

Literatürde diklofenak sodyumun 25°C’deki pH-çözünürlük profili belirlenmiş ve pH 7’deki çözünürlüğünün 9,19 mg/mL olduğu bildirilmiştir (Pobudkowska ve Domańska, 2014). Literatürdeki veriler, pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 25°C’de yapılan çözünürlük çalışmasının sonuçlarıyla tutarlı bulunmuştur.

37°C’de, pH 7,4 fosfat tamponunda yapılan çözünürlük çalışmaları, in vitro ve ex vivo çalışmalarda sink koşulun sağlanıp sağlanmadığının belirlemesi amacıyla yapılmıştır. Sink koşul, etkin maddenin ortamdaki çözünürlüğünün, formülasyona yüklenen etkin madde miktarının en az 3 katı kadar olması durumu olarak tanımlanmıştır (Y. Zhou ve Wu, 2002). Salım çalışmalarında ve ex vivo çalışmalarda kullanılacak formülasyonların en fazla 2,1 mg etkin madde içereceği göz önünde bulundurulduğunda sink koşulun 37°C’de rahatlıkla sağlanabileceği görülmüştür (Olası en küçük salım ortamı hacmi 2,5 mL’dir).

5.1.2. Diklofenak sodyumun FTIR analizi

Diklofenak sodyumun FTIR spektrumu alınarak etkin maddenin saflığı değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu analiz etkin maddenin yardımcı maddeler ile olan geçimliliğinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Tez kapsamında kullanılan diklofenak sodyumun, 3380 cm^{-1} ’de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} ’de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm^{-1}

¹'de -C-Cl piki, 1000-1350 cm⁻¹'de -CN grubuna ait olan pikleri, literatürde yer alan FTIR spektrumlarıyla uyumlu bulunmuştur (Aiello, Borges, Romeira, Miranda, Arruda ve diğerleri, 2014; Öztürk ve diğerleri, 2020).

5.1.3. Diklofenak sodyumun DSC analizi

Diklofenak sodyumun DSC analizi yapılarak etkin maddenin saflığı değerlendirilmiştir. Bu analiz, etkin maddenin yardımcı maddeler ile olan geçimliliğinin değerlendirilmesinde de kullanılmıştır. Diklofenak sodyum numunesine ait termogramda yaklaşık 283°C'de endotermik erime piki gözlenmiştir. Bulunan bu sonuç, literatürde verilmiş diklofenak sodyum DSC termogramları ile uyumlu bulunmuştur (Arany, Papp, Zichar, Csontos, Elek ve diğerleri, 2020; Swain ve diğerleri, 2015).

5.2. Diklofenak Sodyumun Kısa Süreli Stabilitésinin Belirlenmesi

Mikroiğne formülasyonlarının termal çapraz bağlama işlemi, mikroiğnelerin 24 saat boyunca 80°C'de bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Termal çapraz bağlamanın, PEG üzerindeki serbest hidroksil grupları ile Gantrez S97 üzerinde bulunan serbest karboksil gruplarının esterifikasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Donnelly ve diğerleri, 2014). Bu süreç boyunca uygulanan yüksek sıcaklığın, etkin maddenin stabilitesini nasıl etkilediğinin belirlenmesi için, 24 saat boyunca 80°C'de bekletilen toz haldeki etkin maddeden örnekler alınarak miktar tayini yapılmış ve 24 saat sonunda DSC ile erime derecesinde değişim olup olmadığı kontrol edilmiştir. 24 saat boyunca etkin maddenin miktarında herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Ayrıca DSC termogramında da değişiklik gözlenmemiştir. Literatürde diklofenak sodyumun katı hal termal degradasyon kinetiğinin 0. derece kinetiğe göre gerçekleştiği bildirilmiştir. Literatürden elde edilen bilgiye göre, diklofenak sodyum 80°C'de yaklaşık 1 hafta boyunca raf ömrünü koruyabilmektedir (Cwiernia ve diğerleri, 1999).

5.3. Diklofenak Sodyumun Analiz Yöntemleri ve Validasyonları

5.3.1. Diklofenak sodyumun farklı ortamlardaki dalga boyu absorbans taraması

Diklofenak sodyumun, hem UV-Visible spektrofotometrede hem de HPLC'de analiz yöntemleri geliştirilirken, etkin maddenin UV sahada gösterdiği maksimum dalga boyunun

belirlenmesi amacıyla UV-Visible spektrofotometre cihazı ile dalga boyu taraması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında kullanılan HPLC'nin UV detektöre sahip olması ve dalga boyu tarama özelliğinin bulunmamasıdır. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyunun kullanılması LOD ve LOQ değerlerini minimize etmektedir. Bu durum düşük konsantrasyonlu örneklerin analiz edilebilmesini sağlamaktadır.

Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında görülen maksimum absorbans değeri 276 nm'de elde edilmiştir. Bulunan bu değer literatürce desteklenmektedir (Al-Hamadani ve Al-Edresi, 2022; Al-Obaidi, Mohammed ve Al, 2018). pH 7,4 fosfat tamponu ile distile su ortamlarında maksimum absorbans görülen dalga boyunun değişmemesinin nedeninin, her iki ortam için de çözücünün su olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Maksimum absorbansın görüldüğü dalga boyunun değişiminin iyonik güçten çok pH değişimi ile ilgili olduğu bilinmektedir. Diklofenak sodyumun çok düşük pH değerlerinde dalga boyunda değişim olabileceği bildirilmiştir (Bucci, Magri ve Magri, 1998). Ancak tez çalışmaları kapsamında düşük pH'larda bir çalışma yapılmamış ve analiz yöntemi geliştirilmemiştir.

Diklofenak sodyumun metanol ortamında maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu 282 nm olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer literatür ile uyumlu bulunmuştur (Hasan, Hossain, Sultana, Shueb ve Nahar, 2017). Farklı solvanlarda görülen farklı dalga boyları, çözücünün dielektrik sabiti, çözünen ile çözücü arasındaki polarite farkı, hidrojen bağı sayısı gibi etkileşim faktörlerinden kaynaklanmaktadır (Zakerhamidi, Ghanadzadeh ve Moghadam, 2012).

5.3.2. UV-Visible spektrofotometre ile analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Diklofenak sodyumun UV-Visible spektrofotometre ile distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında analiz metodu gerçekleştirilmiştir. Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için elde edilen kalibrasyon denklemleri sırasıyla $y=0,0327x - 0,0003$ ve $y=0,0323x + 0,0027$ olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemler ICH Q2(R2) kılavuzuna göre valide edilmiştir. Her iki ortam için hesaplanan r^2 değerine göre doğrusalılıkları değerlendirilmiştir. 0-1 aralığında değer alabilen r^2 değeri, doğrusal regresyon modellerinde, bağımsız değişken tarafından tanımlanan

bağımlı değişkenlerdeki varyasyon oranını ifade eder (D. Zhang, 2017). r^2 değerlerinin 1 olması, derişim ile absorbands değerleri arasındaki ilişkinin lineer olduğunu göstermektedir.

UV-Visible spektrofotometre ile geliştirilen analiz yöntemleri, mikroiğne formülasyonlarının in vitro çalışmaları için kullanılmış olup, mikroiğne formülasyonlarını oluşturan yardımcı maddelerin varlığındaki seçicilikler değerlendirilmiştir. Yardımcı maddelerin çözeltileri her iki ortam için 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonun seçilmesindeki temel neden, ortamda çözünmüş yardımcı madde miktarının yüksek olması durumunda bile yöntemin seçici olup olmadığının kontrol edilmek istenmesidir. Analizlerde yardımcı maddelerin, etkin maddenin maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu olan 276 nm’de absorbands vermediği görülmüştür.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluk validasyonu kapsamında, konsantrasyonu bilinen örneklerin analiziyle aynı değerlerin elde edilip edilemediği değerlendirilmiştir. Bu amaçla hesaplanan %geri elde değerleri %97-103 aralığında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin deney içi kesinlik çalışmaları kapsamında, arka arkaya yapılan analizlerin birbirine yeterince yakın olduğunu göstermek amacıyla yapılan ölçümlerin bağıl standart sapması %2’den küçük bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin deneyler arası kesinlik çalışmalarında, farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerin tutarlılığının belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümlerin bağıl standart sapması %2’den küçük bulunmuştur.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kullanılan Eş. 3.1 ve Eş. 3.2’deki standart sapma değerleri olarak kalibrasyon aralığındaki en küçük konsantrasyona sahip örneğin standart sapması kullanılmıştır. Bu yaklaşım ICH Q2(R2) kılavuzunda tanımlanmış yaklaşımlardan biridir.

Analitik işlem validasyonlarının stabilite çalışmaları kapsamında, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ile hazırlanmış analiz örneklerinin 5, 25 ve 40°C’de en az 48 saate kadar dayanıklılıklarını koruyabildikleri belirlenmiştir. Distile su ortamında 25°C’de bekletilen örneğin %2’den fazla bağıl sapma göstermesinin (%2,11) deneysel hatadan kaynaklandığı

düşünülmektedir. Çünkü daha yüksek bir sıcaklık olan 40°C’de 48 saate kadar stabil oldukları tespit edilmiştir.

5.3.3. Kromatografik yöntem kullanılarak analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Diklofenak sodyumun HPLC ile distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamlarında analiz metodu geliştirilmiştir. Distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamları için elde edilen kalibrasyon denklemleri sırasıyla $y=41,445x - 1,6031$, $y=10,475x - 1,626$ ve $y=38,547x - 0,0766$ olarak bulunmuştur.

Her üç ortam için geliştirilen analiz yöntemleri ICH Q2(R2) kılavuzuna göre valide edilmiştir. Tüm ortamlar için geliştirilen yöntemlerin r^2 değeri 0,9999 olarak bulunmuştur. Bu değer kalibrasyon grafiklerinin doğrusal olduğunu göstermiştir.

pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamları, hem mikroiğne formülasyonlarının hem de esnek veziküler sistem formülasyonlarının in vitro ve ex vivo çalışmaları için kullanılmıştır. Bu nedenle tüm yardımcı maddeler için her iki ortamdaki seçicilik değerlendirilmiştir. Ayrıca metanolün çözücü olarak kullanıldığı deri ekstraksiyon çalışması için deri ekstresinin seçiciliği değerlendirilmiştir. Tüm kromatogramlardaki alıkonma zamanlarının diklofenak sodyumdan farklı olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerinin diklofenak sodyum için seçici olduğu saptanmıştır.

Geliştirilen HPLC analiz yöntemlerin doğruluk validasyonu kapsamında hesaplanan %geri elde değerleri %97-103 aralığında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları kapsamında yapılan ölçümlerin bağıl standart sapması %2’den küçük bulunmuştur.

Stabilite validasyonları kapsamında metanol ortamında hazırlanmış analiz örneklerinin 5, 25 ve 40°C’de en az 48 saate kadar, distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamında hazırlanmış analiz örneklerinin en az 72 saate kadar dayanıklılıklarını koruyabildikleri belirlenmiştir.

Sağlamlık validasyonu kapsamında farklı molariteye sahip pH 7,4 fosfat tamponları kullanılarak, iyonik gücün analiz yöntemi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Analiz yönteminin geliştirildiği 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu yerine daha düşük molariteye sahip tamponların kullanılmasının analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

5.4. Mikroigne Formülasyonlarının Geliştirilmesi

5.4.1. Mikroigne formülasyonlarının 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak üretim yönteminin geliştirilmesi

Mikroigne formülasyonlarının tasarımı için öncelikle anakalıbın tasarlanması gerekmektedir. Geliştirilmesi planlanan mikroigne formülasyonları için önemli parametrelerden biri mikroignelerin boyutlarıdır. Tez kapsamında geliştirilen formülasyonların aktinik keratoz tedavisine yönelik olması planlanmıştır. Aktinik keratoz hastalığı epidermiste bulunan keratinositlerin farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (de Oliveira ve diğerleri, 2019). Mikroigne formülasyonlarına yüklenen diklofenak sodyumun epidermiste lokal etki oluşturması istenmektedir. Formülasyonlara yüklenecek etkin maddenin sistemik dolaşıma en az düzeyde geçip, deri içerisinde maksimum düzeyde kalmasının sağlanması için toplam deri kalınlığını aşmayacak yükseklikte mikroignelerin tasarlanması gerekmektedir. İnsan derisinin kalınlığı 2-5 mm aralığında olup, epidermal kalınlık 50-300 μm aralığında olabilmektedir (Oltulu, İnce, Kökbudak, Fındık ve Kılınç, 2018). Derinin esnek yapısı, üretim yönteminden ve kalıplamadan kaynaklanan kayıplar göz önünde bulundurularak, yaklaşık 500 μm uzunluğa sahip bir mikroigne formülasyonunun ölü ve canlı epidermise rahatlıkla girerek, hastalığın gerçekleştiği bu bölgede etkin madde salımı yapabileceği öngörülmüştür. Bu nedenle, anakalıp üretiminde 500 μm iğne yüksekliğinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Mikroigne formülasyonlarının etki gösterebilmesi için, uygulandığı deriyi delmesi gerekmektedir. Bunun için mikroignelerin mekanik dayanıklılıkları önemli bir parametredir. Mikroigne formülasyonlarının yükseklik-taban çapı oranı mekanik dayanıklılıkları üzerinde oldukça etkilidir. Literatürde, yükseklik taban çapı oranının 2:1 olmasının maksimum mekanik dayanıklılık için önemli olduğu vurgulanmıştır (Gittard, Chen, Xu, Ovsianikov, Chichkov ve diğerleri, 2013). Tez çalışması için 500 μm iğne yüksekliğine sahip olması

planlanan mikroiğneler için bu oran dikkate alındığında, 250 μm taban çapının gerekli olduğu belirlenmiştir.

Mikroiğne formülasyonlarının şekli, uygulandığı deriyi delebilmesi açısından bir diğer önemli parametredir. Literatürde koni ve piramit şekli başta olmak üzere çeşitli şekillerde mikroiğne tasarımları yapılmıştır (Davidson, Al-Qallaf ve Das, 2008). Koni şeklinde mikroiğnelerin deriyi delmek için daha az kuvvete ihtiyaç duydukları bildirilmiştir (Pere, Economidou, Lall, Ziraud, Boateng ve diğerleri, 2018). Mekanik özelliklerinin yanında üretilebilirlikleri de göz önünde bulundurularak koni şeklinde mikroiğnelerin elde edilmesi planlanmıştır.

Tez çalışmasında, mikroiğne anakalibının geliştirilmesi için SLA 3 boyutlu yazıcı kullanılmıştır. SLA 3 boyutlu yazıcı kullanılmasıdaki temel neden, yazdırma çözünürlüğünün ışın temelli olmayan diğer 3 boyutlu baskı teknolojilerine göre oldukça yüksek olmasıdır. Işın temelli olmayan teknolojilere örnek olarak birleştirmeli yağma modeli (FDM), seçici lazer sinterleme (SLS), multi jet füzyon (MJF) verilebilir (Prabhakar, Saravanan, Lenin, Mayandi ve Ramalingam, 2021). FDM prensibine dayanan üç boyutlu yazıcılar, bir polimerik flamenti eriterek 3 eksenle şekillendiren cihazlardır. Ancak mikrometrik düzeyde şekillendirme yapamamaktadır. Bu nedenle, mikroiğne üretimi için 2 basamaklı üretim metotları geliştirilmiştir. İki basamaklı üretim yönteminde, kaba halde oluşturulan noktacıların çözücü içerisinde daldırılarak iğne yapısında şekillendirilmesi amaçlanmıştır (Luzuriaga, Berry, Reagan, Smaldone ve Gassensmith, 2018). SLS ve MJF yöntemlerinin ise sırasıyla 100 ve 80 μm çözünürlüğe sahip olup, mikroiğne üretimi için yeterli hassasiyete sahip olmadıkları bildirilmiştir (Al-Nimry ve Daghmash, 2023).

Işın temelli 3 boyutlu yazdırma teknolojileri ise SLA, doğrudan ışık projeksiyonu (DLP), sürekli sıvı arayüz üretimi (CLIP) olarak sıralanabilir. SLA 3 boyutlu baskı yöntemi kullanımı en yaygın olan ışın temelli yöntemdir. Çalışma mekanizması, UV ışık ile kürlenebilir (polimerizasyon sonrası sertleşebilen) reçine içerisinde yer alan bir platform üzerine, 450 nm UV lazer ışını ile iki boyutlu görselin yazdırılması ve bu platformun Z ekseninde yükselerek her bir katmanın üst üste gelmesi ile üç boyutlu cismin ortaya çıkması şeklindedir. Bu yöntemde yazdırma çözünürlüğünü belirleyen parametreler, lazer ışın çapı ve Z ekseninde yukarı doğru yapılan hareketin mesafesidir. Bu iki parametre üzerinde rahatlıkla kontrol sağlanabildiği için SLA 3 boyutlu yazıcılar 25 μm çözünürlüğe kadar

inebilmektedir. Bu durum, mikroiğneler gibi mikrometrik düzeyde kompleks tasarımların üretilmesine imkan tanımaktadır (Al-Nimry ve Daghmash, 2023; Krieger ve diğerleri, 2019).

SLA 3 boyutlu yazıcılarda, mikrometrik düzeylerde tasarlanan cisimlerin, tasarlanan (girdi) ve elde edilen (çıkı) boyutları arasında farklılık gözlemlenmektedir. Girdi ve çıkı boyutları arasındaki farklılığın temel sebebinin UV lazer yoğunluğunun Gauss dağılımına benzer bir dağılım göstermesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Lazer ışınının kenarlarının merkeze göre daha az ışık yoğunluğuna sahip olması, kürlenmenin gerçekleşmediği alanların oluşmasına neden olabilmektedir. Bu durum, koni şeklinden dolayı dikey düzlemde giderek küçülen katmanların üst kısmında daha fazla kürlenmeyen alan oluşmasına ve beklenenden daha kısa konilerin meydana gelmesine sebep olmaktadır (Krieger ve diğerleri, 2019; Sun, Fang, Wu ve Zhang, 2005). Daha yüksek taban çapına sahip tasarımlarda girdi/çıkı boyutları oranının daha yüksek bulunması, bu teoriyi desteklemektedir (Bkn. Bölüm 4.4.1).

SLA 3 boyutlu yazıcı olarak kullanılan Formlabs Form 3'ün ışın çapının 85 μm olduğu bilinmekle beraber, 30 μm boyutuna kadar koni uçlarının olduğu gözlenmiştir. Bu durumun Gauss dağılımına benzer olan ışık yoğunluğu dağılımı sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, üretilen solid mikroiğneler arasından yaklaşık 500 μm yükseklik ve 250 μm taban çapına sahip olan tasarım anakalı olarak seçilmiştir.

Mikroiğne formülasyonlarının üretilmesi için anakalıptan hareketle negatif mikroiğne kalıplarının üretilmesi gerekmektedir. Anakalıptan hareketle mikroiğne kalıplarının üretimi için çeşitli kalıplama yöntemleri literatürde kullanılmıştır (Han ve diğerleri, 2007; Kim ve diğerleri, 2012; McAllister, Wang, Davis, Park, Canatella ve diğerleri, 2003). PDMS esnek yapısı, gaz geçirgenliği, dayanıklılığı, biyogeçimli olması gibi avantajları sayesinde mikroiğne üretiminde en çok kullanılan kalıp materyalidir (Miranda, Souza, Sousa, Ribeiro, Castanheira ve diğerleri, 2021). Tez kapsamında üretilen silikon mikroiğne kalıpları gıda sınıfı PDMS kullanılarak elde edilmiştir.

5.4.2. Mikroiğne formülasyonlarının hazırlanması

Mikroiğne formülasyonlarının hazırlanması amacıyla Donnelly ve diğerlerinin geliştirdiği yöntem kullanılmıştır (Donnelly ve diğerleri, 2014). Kalıp dolumu için doğrudan dolum

yöntemi ve ardından santrifüj işlemi tercih edilmiştir. Literatürde kalıp dolumu ve hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için çeşitli yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Bunlar vakum, basınç ya da sıcaklık uygulanması şeklinde olabilmektedir (Aldawood ve diğerleri, 2021; Nejad ve diğerleri, 2018). Vakum uygulanması yöntemi, üretim metodunun geliştirilmesi sırasında denenmiş ancak santrifüj kuvveti ile daha iyi sonuçlar alındığından dolayı tercih edilmemiştir.

Mikroiğne formülasyonları, PEG ve Gantrez S97 arasında, yüksek sıcaklıkta gerçekleşen esterifikasyon reaksiyonunun sonucunda çapraz bağlanmıştır. PEG üzerinde bulunan serbest hidroksil sayısı ve Gantrez S97 üzerinde bulunan serbest karboksil sayısı, çapraz bağlanma seviyesini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kullanılacak PEG molekül ağırlığı belirlenirken sabit molar oran korunacak şekilde Gantrez S97-PEG oranı belirlenmiştir (Singh, McCarron, Woolfson ve Donnelly, 2009). Kullanılacak PEG molekül ağırlığının belirlendiği F1, F2 ve F3 formülasyonları arasından en yüksek mekanik dayanıklılık ($p<0,01$) ve şişme indeksine sahip ($p<0,05$) olan F2 formülasyonu seçilmiş ve sonraki formülasyonlar için temel alınmıştır. Bu formülasyonda PEG1500 kullanılmış ve farklı polimerlerin etkisinin incelendiği F4, F5 ve F6 formülasyonları F2 formülasyonundan türetilmiştir. Bu formülasyonlar arasında şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık açısından istatistiksel olarak fark gözlenmemesine karşın, en yüksek şişme indeksi ve en yüksek ikinci mekanik dayanıklılık verilerinin elde edildiği F5 formülasyonu temel alınmıştır. F5 formülasyonunda bulunan polikarbofilin ileri aşamalarda geliştirilen mikroiğne formülasyonlarına eklenmesi kararlaştırılmıştır. Bu aşamada, PVA içeren F4 formülasyonunun mekanik dayanıklılık ortalaması F5'ten daha yüksek, şişme indeksi ortalaması ise daha düşük bulunmuştur ($p>0,05$). F4 formülasyonunda kullanılan PVA, şişme indeksini düşürmesi nedeniyle tercih edilmemiştir. Şişme indeksindeki azalmanın temel nedeninin PVA molekülü üzerinde bulunan serbest hidroksil gruplarının, Gantrez S97 ile çapraz bağlanma reaksiyonuna dahil olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Huang, Liu, Tseng ve Chen, 2023).

Hyaluronik asitin deride etkin madde tutulumunu artırmasına yönelik literatürden elde edilen bilgiler dahilinde, optimum formülasyonlarda yer alması planlanmıştır (Cilurzo ve diğerleri, 2014; Franzé ve diğerleri, 2018). Ancak hyaluronik asitin çapraz bağlama seviyesini değiştireceği bilindiğinden dolayı, seçilecek diğer polimerlerin (PEG1500 ve polikarbofil)

etkisinin net olarak gözlenebilmesi için F1-F6 formülasyonlarına eklenmemiştir. Kullanılacak hyaluronik asit miktarı deneysel tasarım ile belirlenmiştir.

Deneysel tasarım aşamasında bir yanıt yüzey modeli olan BBD kullanılmıştır. BBD tasarımı merkezi kompozit tasarıma göre daha az sayıda deneme gerektirdiği için tercih edilmiştir (Mahmoud ve McConville, 2023). BBD üç seviyeli bir tasarım olup (-1, 0, 1), çok değişkenli deneysel süreçlerin minimum sayıda deneme yapılarak, bağımlı değişkenler ile matematiksel olarak ilişkilendirilebilmesini sağlar. Ayrıca, ikinci dereceden matematiksel ilişkiyi açıklayabilmesi ve model uyum eksikliğini hesaplayabilmesi avantajlarına sahiptir (Ferreira, Bruns, Ferreira, Matos, David ve diğerleri, 2007).

BBD kullanılarak Gantrez S97, polikarbofil ve hyaluronik asit yüzdelерinin şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık üzerindeki etkisi incelenmiştir. Her iki bağımlı değişken için lineer matematiksel modelin uygun olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$).

Şişme indeksi üzerinde bağımsız değişkenlerin etkinliği incelendiğinde, hyaluronik asit yüzdesindeki artışın doğrusal olarak şişme indeksini azalttığı belirlenmiştir ($p < 0,01$). Diğer bağımsız değişkenlerin ise şişme indeksi üzerinde etkisi bulunamamıştır ($p > 0,01$). Gantrez S97 ve PEG1500 oranının sabit tutulup, tek bir değişken olarak tanımlanması nedeniyle Gantrez S97/PEG1500 yüzdesinin şişme indeksi üzerinde etkisi değerlendirilmemiştir (Singh ve diğerleri, 2009). Polikarbofilin yüksek pH değerlerinde kendi kendine şişme özelliği olduğu bilinmektedir. Ancak hazırlanan polimer karışımlarının içerisinde Gantrez S97 ve hyaluronik asit gibi asidik yapıdaki polimerlerin bulunması, ortamın pH değerini düşürmekte ve polikarbofilin şişme özelliğini azaltmaktadır. Bu durum polikarbofilin şişme indeksi üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmamasına neden olmaktadır (Zhu, Zhai, Zhang, Leng ve Ding, 2013). Hyaluronik asit miktarındaki artışın şişme indeksini azaltmasındaki temel neden, hyaluronik asit molekülü üzerinde serbest hidroksil ve karboksil grupları bulundurması ve Gantrez S97 ile PEG1500 arasında gerçekleşen çapraz bağlanma reaksiyonuna katılarak çapraz bağlanma seviyesini artırmasıdır (Trombino, Servidio, Curcio ve Cassano, 2019).

Mekanik dayanıklılık üzerinde bağımsız değişkenlerin etkinliği incelendiğinde, Gantrez S97 yüzdesindeki artışın doğrusal olarak mekanik dayanıklılığı artırdığı belirlenmiştir ($p < 0,01$). Diğer bağımsız değişkenlerin ise şişme indeksi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi

bulunamamıştır. Ancak Şekil 4.18 incelendiğinde hyaluronik asit yüzdesindeki artışın da mekanik dayanıklılığı etkilediği görülmektedir ($p>0,01$). Gantrez S97 yüzdesindeki artışın en etkili faktör olmasının nedeni, mikroiğne formülasyonunun kuru ağırlığının %84-97'sinin Gantrez S97 ve PEG1500'ün toplam kütesinden meydana gelmesidir. Bu iki polimerin miktarındaki artış doğrudan mikroiğne formülasyonlarının toplam kütesini ve kalınlığını etkilemektedir. Hyaluronik asitin mekanik dayanıklılık üzerindeki etkisi, belirgin olmamakla birlikte, mikroiğne formülasyonlarının çapraz bağlanma seviyesi ile ilgilidir. Çapraz bağlanma seviyesinin hidrojellerin mekanik dayanıklılıklarını artırdıkları bildirilmiştir (Spanheimer, Katrakova-Krüger, Altenhofer ve Valtchev, 2023). Polikarbofil miktarının, mekanik dayanıklılık üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, deneysel tasarım sürecinde kullanılan polikarbofil miktarlarının, toplam polimer ağırlığına oranının çok düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bağımsız değişkenler olan şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık parametrelerinin tahmin edilen ve deneysel olarak elde edilen sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durum, geliştirilen deneysel tasarımın uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

5.5. Mikroiğne Formülasyonlarının Karakterizasyonları

5.5.1. Polimer karışımlarının reolojik özellikleri

Mikroiğne formülasyonlarının üretiminde, polimer karışımlarının viskozitelerinin mikroiğne oluşumunu etkilediği bildirilmiştir. Tomono, yaptığı çalışmada kitosan laktat mikroiğnelerin üretimi için farklı viskozitelerin etkisini incelemiştir. Farklı viskoziteler ile delikli, çözünabilir, kaplanmış gibi farklı mikroiğne formülasyon türleri elde ederek viskozitenin önemini vurgulamıştır (Tomono, 2019). Bu nedenle, tez çalışması kapsamında viskozitenin mikroiğne oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Polimer karışımlarının artan akış hızında viskozitelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum tüm polimer karışımlarının psödoplastik akış gösterdiğini düşündürmektedir. Ostwald de Waale Power Law eşitliği ile yapılan doğrusallaştırma işlemi sonucunda elde edilen n değerlerinin, F3 formülasyonu hariç tüm formülasyonlarda 1'den küçük olduğu görülmüştür. n değerinin 1'den küçük olması, akış tipinin psödoplastik olduğunu doğrulamaktadır. K değeri akışa karşı olan direnci gösteren bir parametredir (Kapadia ve

diğerleri, 2022). F1, F2 ve F3 polimer karışımları kıyaslandığında PEG molekül ağırlığı arttıkça K değerlerinde de artış görülmüştür. BBD kapsamında üretilen F7-F21 polimer karışımlarında, Gantrez S97 ve hyaluronik asitin, K değeri üzerindeki etkili faktörler olduğu belirlenmiştir. Optimum formülasyonlar olarak belirlenen F22, F23 ve F24'ün polimer karışımlarında ise hyaluronik asit miktarı ile K değerleri arasında pozitif ilişki olduğu gözlenmiştir. Tüm formülasyonlardaki K değerlerinin artışı göz önünde bulundurulduğunda, polimer konsantrasyonlarındaki ve molekül ağırlıklarındaki artışın, akışa karşı olan direnci artırdığı görülmektedir. Polimer konsantrasyonu ve polimer uzunluğundaki artış, polimerler tarafından oluşturulan ağ yapısının sıkılığının artmasına neden olmaktadır. Bu durum, dispersiyon ortamıyla polimer ağının etkileşimini artırmakta ve akışa karşı olan direnci yükseltmektedir (Yorke ve Amin, 2021).

Tüm polimer karışımları ile mikroiğne formülasyonlarının üretimi başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Kullanılan üretim metodunun, çalışılan oranlar dahilinde polimer karışımlarının reolojik özelliklerinden bağımsız olarak mikroiğne oluşumunu sağlayabildiği belirlenmiştir.

5.5.2. Polimer karışımlarının PDMS ile temas açısı tayini

Mikroiğne formülasyonlarının üretiminde, polimer karışımlarının PDMS ile oluşturduğu temas açıları, silikon kalıptaki iğne deliklerinin dolması için önemli bir parametredir. PDMS hidrofobik bir materyal olup, su ile yaptığı temas açısının $105-110^\circ$ arasında olduğu bildirilmiştir (Ruben, Elisa, Leandro, Victor, Gloria ve diğerleri, 2017). Bu değer, sulu sistemler kullanılarak, PDMS kalıplar ile düzgün mikroiğne oluşturulamayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, literatürde PDMS ile üretilen silikon kalıpların hidrofilikleştirilerek, sulu polimer karışımlarının iğne deliklerini doldurmasının sağlandığı yöntemler mevcuttur (Jokinen, Suvanto ve Franssila, 2012; Nejad ve diğerleri, 2018).

Hazırlanan polimer karışımlarının PDMS ile oluşturduğu temas açıları değerlendirildiğinde, aralarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Tüm polimer çözeltilerinin PDMS ile oluşturduğu temas açısı 90° 'nin altında bulunmuştur. Bu durumun, kullanılan polimerlerin su ile PDMS arasındaki ara yüzey gerilimini azalması nedeniyle meydana geldiği düşünülmüştür. Benzer mantıkla hyaluronik asit, PVA, HPMC, PEG gibi polimerlerin,

silikon bazlı kontakt lenslerin ıslanabilirliğini artırmak için kullanıldığı bilinmektedir (Chang, Liu, Lin, Lu, Chou ve diğerleri, 2021; Korogiannaki, Zhang ve Sheardown, 2017).

Tüm polimer karışımları ile mikroigne formülasyonlarının üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, kullanılan üretim metodunun, polimer karışımlarının PDMS ile yaptığı temas açısından bağımsız olarak mikroigne oluşumunu sağlayabileceği belirlenmiştir.

5.5.3. DSC analizi

Diklofenak sodyumun erime derecesinin 280°C civarlarında olduğu Avrupa Farmakopesi’nce bildirilmiştir (Avrupa Farmakopesi 8.0). Tez çalışması kapsamında elde edilen saf diklofenak sodyum numunesine ait termogramda yaklaşık 283°C’de gözlenen pik, endotermik erime pikidir. Bu bulgu, Avrupa Farmakopesi ile uyumlu bulunmuştur. Gantrez S97’ye ait termogramda, 157°C’de gözlenen pik, karboksilik asit gruplarının birbiri arasında anhidr bağı oluşturmaları nedeniyle meydana gelmiştir (Carcamo-Martinez, Dominguez-Robles, Mallon, Raman, Cordeiro ve diğerleri, 2020). Gantrez S97 ve diklofenak sodyumun fiziksel karışımında her iki maddeye ait pikler mevcut olup aralarında etkileşim meydana gelmediği sonucuna varılmıştır. PEG1500’e ait yaklaşık 50°C’de gözlenen pik, PEG1500’ün endotermik erime pikidir. Diklofenak sodyum ve PEG1500’ün fiziksel karışımında ise diklofenak sodyuma ait pik kaybolmuştur. Bunun nedeninin, sıvı hale geçen PEG1500’ün diklofenak sodyumu çözmesi olabileceği düşünülmüştür (Cwiernia, 2013). Hyaluronik asit termogramında 250°C’de yer alan ekzotermik pik polisakkarit iskeletin dekompozisyonunu göstermektedir (Ijaz, Sohail, Usman Minhas, Khan, Hussain ve diğerleri, 2022). Hyaluronik asit ve diklofenak sodyumun fiziksel karışımında ise hyaluronik asite ait dekompozisyon piki gözlenirken, etkin maddeye ait pik kaybolmuştur. Bu durumun, diklofenak sodyum-PEG1500 karışımında gözlenen durum ile benzer nedenden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Polikarbofilin 245°C’deki belirsiz endotermik termal degradasyon piki karakteristik olup, diklofenak sodyum ile olan fiziksel karışımında da gözlenmiştir. Bu karışımında, diklofenak sodyum endotermik erime pikini korumuştur (Pendekal ve Tegginamat, 2012).

Sonuç olarak diklofenak sodyumun, Gantrez S97 ve polikarbofil ile etkileşmediği DSC çalışmaları ile belirlenmiştir. Ancak erime dereceleri diklofenak sodyumdan daha düşük olan PEG1500 ve hyaluronik asitin, diklofenak sodyum ile geçimliliği değerlendirilememiştir.

DSC çalışmaları kapsamında, optimum mikroiğne formülasyonlarının çapraz bağlama öncesi ve sonrası DSC termogramları da elde edilmiştir. Mikroiğne formülasyonlarında diklofenak sodyuma ait erime piki gözlemlenememiştir. Bunun nedeninin diklofenak sodyumun oransal olarak Gantrez S97 gibi polimerlere kıyasla çok az bulunması olabileceği düşünülmüştür. Formülasyonların iskelet polimeri olan Gantrez S97'ye ait pik gözlemlenebilirken, diğer bileşenlere ait pikler, diklofenak sodyuma benzer şekilde Gantrez S97'ye oranla az bulunmaları nedeni ile kaybolmuştur.

Çapraz bağlanma sonrası ortaya çıkan polimerler arası ester bağları DSC yöntemi ile saptanamamıştır. Bu durumun, FTIR analizinde görüldüğü üzere (Bkz. Bölüm 4.5.4), çapraz bağlanan molekül miktarının serbest karboksil ve hidroksil taşıyan molekül miktarına oranla çok az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

5.5.4. FTIR analizi

Literatüre göre saf diklofenak sodyum, 3380 cm^{-1} 'de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} 'de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm^{-1} 'de $-\text{C}-\text{Cl}$ piki, $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ 'de $-\text{CN}$ grubuna ait olan pikler meydana getirmektedir (Öztürk ve diğerleri, 2020). Mikroiğneleri oluşturan yardımcı maddeler ile diklofenak sodyumun fiziksel karışımlarına ait FTIR spektrumları incelendiğinde, diklofenak sodyumun 3380 cm^{-1} 'deki sekonder amin pikinin; Gantrez S97, hyaluronik asit ve polikarbofilde bulunan, 3000 cm^{-1} merkezli geniş karboksilik asit hidroksili ve PEG1500'de bulunan serbest hidroksil pikleri nedeniyle görülemediği düşünülmüştür (Larraneta, Henry, Irwin, Trotter, Perminova ve Donnelly, 2018; Manju ve Sreenivasan, 2011; Park, Daksha, Lee, Woo ve Chang, 2008; Zafar, Kiani, Raza, Rauf, Chaudhery ve diğerleri, 2020). Ancak 2000 cm^{-1} 'in aşağısında kalan dalga sayılarındaki karbonil ve $-\text{C}-\text{Cl}$ pikleri görülmüştür. Parmakizi bölgesinde yer alan piklerde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiş olması nedeni ile tüm polimerlerin, diklofenak sodyum ile geçimli olduğu sonucuna varılmıştır.

Optimum mikroiğne formülasyonlarının çapraz bağlama öncesi ve sonrası FTIR spektrumları elde edilmiştir. 1700 cm^{-1} 'de bulunan pikler, formülasyonların büyük bir kısmını oluşturan Gantrez S97'ye ait karboksil gruplarındaki serbest karbonil yapılarından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.27'de gösterilen ve yuvarlak içerisine alınmış 1780 cm^{-1} 'de yer alan pikler, çapraz bağlama işleminden sonra ortaya çıkmıştır. Bu piklerin, Gantrez S97'nin asit grupları ile PEG1500 ve hyaluronik asitte yer alan hidroksil gruplarının esterifikasyonu sonucu oluşan ester karbonillerine ait olduğu değerlendirilmiştir (Larraneta ve diğerleri, 2015).

5.5.5. Şişme indeksi

Kullanılacak polimerlerin belirlenme aşamasında geliştirilen F1-F6 ve deneysel tasarım aşamasında geliştirilen F7-F20 mikroiğne formülasyonlarının şişme indeksi sonuçları Bölüm 5.4.2'de tartışılmıştır.

Optimum mikroiğne formülasyonlarının zamana karşı şişme indekslerindeki değişim incelendiğinde, şişmenin 60 dakikada plato düzeyine ulaştığı belirlenmiştir. Formülasyonların içerdikleri hyaluronik asit miktarına göre, kendi ağırlıklarının 10-25 katına kadar su tutabildikleri görülmüştür ($p<0,05$). Şişme indeksi-Zaman grafiklerinin ilk 60 dakikasının doğrusallaştırılması için şişme indeksi- $\ln(\text{zaman})$ grafikleri oluşturulmuş ve hyaluronik asit miktarındaki artış ile şişme hızının azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedeni, Bölüm 5.4.2.'de tartışıldığı üzere, çapraz bağlanma seviyesindeki artış ile ilişkilidir.

Polimer yapısı ve oranının, mikroiğnelerin şişme indeksi üzerindeki etkisi farklı çalışmalarda incelenmiştir. Turner ve diğerleri yaptıkları bir çalışmada mikroiğne formülasyonları üretmek için PVME ve PEG kullanmışlardır. 2:1 oranında PVME:PEG kullanarak geliştirdikleri mikroiğnelerin şişme indeksinin 6 saatte maksimum noktasına ulaşarak ağırlığının 10 katına kadar su tuttuğu, 4:3 oranında geliştirilen mikroiğnelerin ise şişme indeksinin 48 saatte maksimum noktasına ulaşarak ağırlığının 8 katına kadar su tuttuğu belirlenmiştir. Kullanılan PEG oranındaki artışın, mikroiğnelerin çapraz bağlanma seviyesini artırdığı bildirilmiştir (Turner, Laabei, Li, Estrela ve Leese, 2023). Literatürde elde edilen şişme kapasitesi ve hızının, tez kapsamında geliştirilen optimum mikroiğne formülasyonlarından farklı bulunmasının nedeninin, farklı oranda ve molekül ağırlığına sahip PEG kullanılması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

5.5.6. Mekanik dayanıklılık

Kullanılacak polimerlerin belirlenme aşamasında geliştirilen F1-F6 ve deneysel tasarım aşamasında geliştirilen F7-F20 mikroiğne formülasyonlarının mekanik dayanıklılık sonuçları Bölüm 5.4.2’de tartışılmıştır.

Optimum mikroiğne formülasyonlarının mekanik dayanıklılıkları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak F22, F23 ve F24 formülasyonlarının hyaluronik asit miktarındaki artış ile birlikte mekanik dayanıklılık ortalamalarının artışı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bölüm 5.4.2’de tartışılan deneysel tasarım aşamasında da benzer bir sonuca varılmıştır.

Literatürde deriyi delmek için gerekli kuvvetin en az $3,18 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ olması gerektiği bildirilmiştir (Makvandi, Kirkby, Hutton, Shabani, Yiu ve diğerleri, 2021). Yapı analiz cihazı ile iğne başına düşen mekanik dayanıklılık (N), F22, F23 ve F24 formülasyonları için sırasıyla, $3,64 \pm 0,74$, $3,73 \pm 0,79$ ve $4,17 \pm 0,86 \text{ N}$ olarak bulunmuştur. Mikroiğne formülasyonlarında bulunan her bir iğnenin yüzey alanının yaklaşık olarak $1,9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ olduğu hesaplanmıştır. Bu değer, mikroskop görüntülerinden hareketle hesaplanmış teorik bir değerdir. Mekanik dayanıklılık değerlerinin yüzey alanlarına bölünmesi sonucunda, mikroiğne formülasyonlarının kırılma kuvvetinin $150\text{-}200 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ arasında olduğu hesaplanmıştır. Bu değer, deriyi delmek için uygulanması gereken kuvvetin çok üstündedir. Buna göre, mikroiğne formülasyonlarının deriyi rahatlıkla delebileceği sonucuna varılmıştır.

5.5.7. Etkin madde miktar tayini

Optimum mikroiğne formülasyonlarında yapılan etkin madde miktar tayini çalışmalarının sonucunda, tüm mikroiğne formülasyonlarına yüklenen etkin madde oranı %100-103 aralığında bulunmuştur. Avrupa farmakopesi’nin “Dozaj Birimi Tekdüzeliliği (Uniformity of Dosage Units)” başlığı altında, tek ünite katı dozaj şekilleri için belirlenmiş formüle göre; F22, F23 ve F24 için “kabul değerleri” (Acceptance Criteria) sırasıyla %3,48, %1,39 ve %1,10 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin, Avrupa Farmakopesi’nde belirlenen %0-15 aralığında olması nedeniyle formülasyonların tekdüze olduğu söylenebilmektedir (Avrupa Farmakopesi 8.0).

5.5.8. Optik mikroskop ile morfolojik inceleme

Optimum mikroiğne formülasyonlarının optik mikroskop ile yapılan morfolojik incelemesinde taban çapı ve uç çaplarının, ana kalıbın taban çapı ve uç çapı değerleri ile istatistiksel olarak farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Ancak iğne yükseklikleri kıyaslandığında, ana kalıbın iğne yüksekliğinden daha kısa olduğu gözlenmiştir ($p<0,01$). Bu durumun, termal çapraz bağlanma işlemi sırasında (80°C , 24 saat) meydana gelen büzülmeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu işlem sırasında meydana gelen hacim azalmasının, hem mikroiğne formülasyonlarının nem kaybetmesi hem de çapraz bağlanma nedeniyle bölgesel moleküler diziliminin değişmesi nedeni ile olduğu düşünülmüştür (Goycoolea, Heras, Aranaz, Galed, Fernández-Valle ve Argüelles-Monal, 2003; Maitra ve Shukla, 2014).

5.5.9. SEM ile morfolojik inceleme

Optimum mikroiğne formülasyonlarının SEM görüntülerinde SLA 3 boyutlu yazıcının Z eksenindeki hareketinden kaynaklanan “testere” paterni gözlenebilmektedir. Tüm formülasyonlardaki iğnelerin 7-9 katmandan oluştuğu belirlenmiştir. Her bir katman kalınlığının yaklaşık $50\ \mu\text{m}$ boyutunda olduğu optik mikroskop ile yapılan incelemede belirlenmiştir. Bu durumda iğne yüksekliklerinin $350\text{-}450\ \mu\text{m}$ aralığında olduğu hesaplanmaktadır. Optik mikroskop ile yapılan ölçümler ile bu sonuç paralellik göstermektedir.

“Testere” paterni, literatürde yer alan SLA 3 boyutlu yazıcı ile elde edilen mikroiğnelerde de gözlenmektedir. Farklı 3 boyutlu yazıcılar ve üretim parametreleri ile katman kalınlıklarının $25\ \mu\text{m}$ 'ye kadar inebileceği bildirilmiştir (Krieger ve diğerleri, 2019).

5.5.10. Ex vivo deri delme çalışmaları

Herbiri 25 adet iğneden oluşan optimum mikroiğne formülasyonlarının ex vivo deri delme çalışması sonucunda, delme derinliği $F24>F23>F22$ olarak elde edilmiştir ($p<0,05$). Bu durumun mekanik dayanıklılık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. F24'ün en fazla katı materyal içeren ve en yüksek çapraz bağlanma seviyesine sahip formülasyon olması mekanik dayanımını artırmış; buna bağlı olarak daha az plastik deformasyona uğrayarak,

deriye daha fazla penetre olmasını sağlamış olabilir. Literatürde mekanik dayanıklılık ile deriyi delme derinliğinin arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Xiu, Gao, Liu ve Ma, 2022).

5.5.11. Stabilite çalışmaları

Stabilite çalışmaları kapsamında, in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen F24 formülasyonunun etkin madde yüzdesi, şişme indeksi ve mekanik dayanıklılık verileri incelenmiştir. Etkin madde yüzdesinin, başlangıç yüzdesine göre 5 ve 25°C’de anlamlı bir değişikliğe uğramadığı belirlenmiştir. 40°C için 6. ayda etkin madde yüzdesindeki azalma anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). Ancak bu değer %90’ın üzerinde olması nedeni ile stabilitesini koruduğu söylenebilmektedir (FDA Guidance for Industry, 2008).

Şişme indeksi değerinin, 5 ve 25°C için, başlangıç değerinden anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Ancak 40°C’de yapılan stabilite çalışmasında, şişme indeksinin 3. ay verilerindeki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Literatürde, 80°C’den daha düşük sıcaklıklarda da çapraz bağlama işleminin devam ettiği bildirilmiştir (Myat, Aung, Ngawhirunpat, Rojanarata, Opanasopit ve Patrojanasophon, 2020). Şişme indeksi, doğrudan çapraz bağlanma seviyesi ile ilişkilidir (Bkn. Bölüm 4.5.5.). Buna göre, 40°C’de yapılan stabilite çalışmaları boyunca Gantrez S97, PEG1500 ve hyaluronik asitin dahil olduğu termal çapraz bağlanma işleminin devam ettiği düşünülmüştür. Ancak 6. ay verilerinde elde edilen sonuçlar bu durumu desteklememektedir. 6. ayda görülen beklenmeyen değişikliğin, bu süreç boyunca 40°C ve %75 bağıl nem ortamında bulunan örneklerin termal çapraz bağlanma reaksiyonlarının devam etmesinin yanında, higrotermal degradasyona uğrayarak, toplam çapraz bağlanma seviyesinde gerçekleşen azalmanın sonucunda olabileceği düşünülmüştür (Y. Chen, Zhang, Li, An, Liang ve diğerleri, 2024).

Mekanik dayanıklılık ve ağırlık verilerinin, 5, 25 ve 40°C için 6 ay boyunca değişiklik göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$).

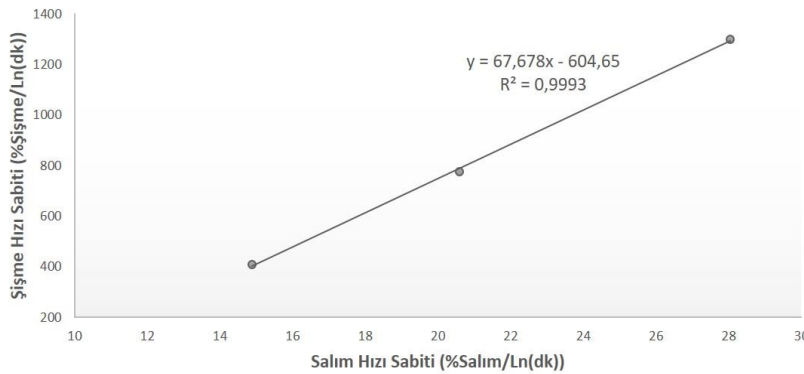
3 farklı sıcaklık için 1., 3., ve 6. aylarda çekilen dijital kamera görüntülerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Sonuç olarak, stabilite kabinlerinde bekletilen mikroiğne formülasyonlarının oda sıcaklığında en az 6 ay boyunca incelenen özelliklerini koruyabildiği bulunmuştur. 12 aylık stabilitesinin değerlendirilebilmesi için çalışmalar devam ettirilmektedir.

5.6. Mikroiğne Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

5.6.1. Beher yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

Optimum mikroiğne formülasyonlarının beher yöntemi ile gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında, tüm formülasyonlardan etkin madde çıkışının 2 saatte tamamlandığı belirlenmiştir. Salım profillerinin doğrusallaştırılması için, salımın gerçekleştiği ilk 2 saatin %Salım-Ln(Zaman) grafikleri oluşturulmuştur. Doğrusallaştırılmış profillerin eğiminden hareketle hesaplanan salım hızı sabitlerinin, şişme hızı sabitleri ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.1). Şişme indeksi arttıkça etkin madde salımı kolaylaşmıştır. Şişme indeksi ile çapraz bağlanma derecesinin doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Donnelly ve diğerleri, 2014; Tunçel ve diğerleri, 2024; Xue, Champ ve Huglin, 2001). Tez çalışması kapsamında formülasyonların çapraz bağlanma derecesinin artmasıyla şişme özelliğinin azalması ve dolayısıyla salım hızının azalması söz konusu olmuştur. Ayrıca bu ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır.



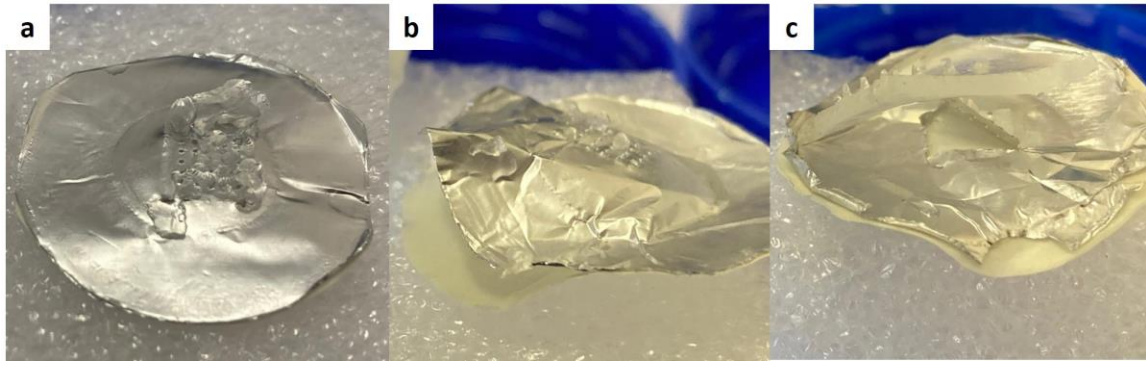
Şekil 5.1. Şişme hızı sabiti ile salım hızı sabitleri arasındaki lineer ilişki

Literatürde, hidrojellerin şişme hızı ile salım hızının paralellik gösterdiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Mali ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, moksifloksazin yüklenmiş, karboksimetil selüloz (CMC) temelli ve sitrik asit ile çapraz bağlanmış bir dizi hidrojel formülasyonu geliştirilmiştir. Şişme hızları ve salım hızlarının paralellik gösterdiği ve her iki parametrenin de çapraz bağlanma seviyesi ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Mali, Dhawale, Dias,

Dhane ve Ghorpade, 2018). Benzer şekilde, Golomb ve diğerleri, geliştirdikleri PDMS matristen etkin madde çıkışının doğrudan şişme derecesi ile orantısal olduğunu bildirmişlerdir (Golomb, Fisher ve Rahamim, 1990).

5.6.2. Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım çalışmaları

Optimum mikroigne formülasyonlarının Franz difüzyon hücresi yöntemi ile gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında, salınan etkin madde yüzdesi, tüm formülasyonlar için %4-8 aralığında bulunmuştur. Optimum mikroigne formülasyonlarından 2. saate kadar gerçekleşen salımların hız sabitleri $F_{22} > F_{23} > F_{24}$ olarak saptanmıştır. Bu değerlerin, mikroigne formülasyonlarının şişme indeksleri ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Temel olarak 2. saate kadar suyun sisteme difüzyonunun (şişme) salımı kontrol ettiği, sonrasında ise sadece etkin maddenin salım ortamına difüzyonunun salımı kontrol ettiği düşünülmüştür. Şişme indeksi çalışmalarında, şişmenin 60 dakikada plato düzeyine ulaştığı belirlenmiştir (Bkz. Bölüm 4.5.5.). Ancak Franz difüzyon hücresi yöntemi ile gerçekleştirilen salım çalışmasında, alıcı bölmeden mikroigne içerisine sıvı difüzyonunun gerçekleştiği yüzey alanı çok daha azdır. Bu durum şişmenin plato düzeyine ulaşma süresini artırmış ve yaklaşık olarak 2 saate çıkartmış (salım profilinden hareketle) olabilir. Literatürde, yüzey alanının şişme hızını doğrudan etkilediği bildirilmiştir (Rizwan, Rubina Gilani, Iqbal Durani ve Naseem, 2021). 2. saatten sonra şişmenin tamamlandığı varsayıldığında, şişme ile birlikte mekanik dayanımı azalan formülasyonların iğnelerinin alüminyum folyo üzerinde bulunan deliklere sığmayarak kopması ya da hidrojel kütlesinin hacim artışı ile birlikte esnek olmayan alüminyum folyo tarafından sıkıştırılarak yukarıya doğru hareket etmesi söz konusu olabilir. Salım çalışma esnasında her iki olay da göz ile tespit edilememiştir. Ancak çalışma sonrasında incelenen hidrojellerde hem eksik iğne hem de yukarı yönlü olarak yükselmiş hidrojel kütlesi olduğu gözlenmiştir (Resim 5.1.). Sonuç olarak, 2. saate kadar gerçekleşen ilk aşamada salımın şişme mekanizması ile gerçekleştiği, şişmenin tamamlandığı ikinci aşamada ise alüminyum folyo üzerinde oluşan sabit yüzey alanına sahip iğne deliklerinden, etkin maddenin intrinsik difüzyonu ile salımın gerçekleştiği tahmin edilmektedir.



Resim 5.1. Franz yöntemi ile in vitro salım çalışmaları sonunda (a) F22, (b) F23 ve (c) F24 formülasyonlarının görüntüsü

Optimum mikroiğne formülasyonlarının tüm verileri birlikte değerlendirilerek (birince ve ikinci aşama) salım mekanizmaları incelendiğinde, Peppas-Sahlin kinetiğine uyduğu belirlenmiştir. Peppas-Sahlin kinetiğinin genel denklemi Eşitlik 4.1’de verilmiştir. Peppas-Sahlin genel denkleminde $\frac{M_t(t)}{M_\infty}$, zamana bağlı salınan etkin madde fraksiyonunu; $k_1 t^n$, ilacın Fick difüzyonunun etkin madde salım miktarına katkısını; $k_2 t^{2n}$, polimer matrisinin şişme hızının etkin madde salım miktarına katkısını ifade eder. Peppas-Sahlin kinetiği, Korsmeyer-Peppas denkleminin farklı olarak hem Fick difüzyonunun hem de şişmenin etkisinin incelendiği bir modeldir (Caccavo, 2019; Colpo, Pigatto, Brizuela, Aragón ve dos Santos, 2018). Bu modelin daha yüksek uyum göstermesinin nedeninin, alıcı faz ile temas yüzey alanının çok küçük olması dolayısıyla şişmeye bağlı salımın belirli bir noktaya kadar baskın olması ve devamında salımın sabit yüzey alanından Fick difüzyonunun baskın etkisiyle devam etmesi olduğu düşünülmektedir.

Bölüm 5.6.1.’de, şişme hızı sabiti ile beher yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım çalışmasından elde edilen salım hızı sabiti arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu belirlenmiştir. Beher yönteminde salım ortamının mikroiğne formülasyonlarının tüm yüzeyine temas ettiği ve şişme etkisi ile salımın kısa bir sürede tamamlandığı görülmektedir. Öte yandan, Franz difüzyon hücresi yönteminde salım ortamı ile olan temas yüzey alanının çok kısıtlı olması, toplam salım miktarının çok az olmasına neden olmuştur.

F24 formülasyonunun, matrisin silindirik şekilli olduğu kabul edilen silindirik Peppas-Sahlin kinetiğine daha çok uyduğu gözlenmiştir. F22 ve F23 formülasyonlarının ise matrisin düzlemsel olduğu varsayılan düzlemsel Peppas-Sahlin kinetiğine daha iyi uyum sağladığı belirlenmiştir. İğne yüzeyinden difüzyonun silindirik modele uyduğu ve şişmenin ardından

oluşan sabit yüzey alanlı düz matristen difüzyonun düzlemsel modele uyduğu varsayıldığında, F24 formülasyonunun iğnelerinin, F22 ve F23'ten daha uzun süre şeklini koruduğunu söylemek mümkündür. Bu durum, yukarıda bahsedilen yüksek şişme hızı gösteren formülasyonların, alüminyum folyo üzerindeki deliklere daha erken bir sürede sığmadığı için iğnelerin kopmasının ya da hidrojinin yukarı doğru hareketinin daha erken meydana gelmesi teorisini desteklemektedir.

5.7. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Geliştirilmesi

5.7.1. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yönteminin geliştirilmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretimi için film hidrasyon metodu kullanılmıştır. Film hidrasyon metodu, organik solvanda çözünmüş lipid ve/veya sürfaktan çözeltilerinin bir balon içerisinde uçurulması ve balon cidarında oluşan filmin su fazı ile faz geçiş sıcaklığının üzerinde hidrate edilerek çok katmanlı veziküler sistemlerin elde edilmesi prensibine dayanır (Thabet, Elsabahy ve Eissa, 2022). Bu aşamada elde edilen çok katmanlı ve polidispers veziküler sistem dispersiyonlarını tek katmanlı hale getirmek veya dispersiyonların KB ve PDI değerlerini azaltmak için ultrasonikasyon, ekstrüzyon, homojenizasyon gibi yöntemler kullanılır (Patil ve Jadhav, 2014).

Film hidrasyon yöntemindeki işlem basamaklarının amaca uygun olarak optimize edilmesi gerekmektedir. Çizelge 3.6'da V1 olarak tanımlanan formülasyon kullanılarak, esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretim yöntemi optimize edilmiştir. Bölüm 4.7.1'de belirtilen 9 farklı işlemin sonucunda en küçük KB ve PDI değeri, 3 dakika prob sonikasyon (3 saniye açık-kapalı döngüleri) ardından 10'ar kez 0,4 ve 0,2 μm por çapına sahip polikarbonat membranlardan ekstrüzyon sonucunda elde edilmiştir. Bu üretim yöntemi, tüm esnek veziküler sistem formülasyonlarının üretimi için standart olarak uygulanmıştır. Bu yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Andra, Pammi, Bhatraju ve Ruddaraju, 2022; Shah, Dhawan, Holm, Nagarsenker ve Perrie, 2020).

Literatürde ekstrüzyon ve sonikasyon yöntemlerinin birbirlerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir. Sonikasyon işlemi daha kolay ve hızlı bir işlem olup basınç dalgaları sayesinde kaba dispersiyonları daha küçük parçalara dönüşmesini sağlamaktadır. Ekstrüzyon işlemi tekdüze ve tek katmanlı veziküler sistemlerin üretimi için

daha uygun olup zaman alıcı, zahmetli ve pahalı bir işlemdir (Cho, Hwang, Solandt ve Frank, 2013). Tez çalışması kapsamında, kaba haldeki veziküler sistem dispersiyonlarının daha kolay bir şekilde ekstrüde edilebilmesini sağlamak için öncelikle sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Ardından tekdüze ve tek tabakalı bir veziküler sistem dispersiyonu elde edebilmek için ekstrüzyon uygulanmıştır.

5.7.2. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması amacıyla Bölüm 4.7.1’de geliştirilme süreci ayrıntılı olarak anlatılan üretim yöntemi kullanılmıştır. Esnek veziküler sistemlerin temelini oluşturan lipid çifte tabakanın oluşturulması amacıyla Lipoid S100 kullanılmıştır. Lipoid S100, katalog bilgisine göre %94’ten fazla soya lesitini içermektedir. Soya lesitininin, yumurta lesitinine göre daha az doymuş yapıya sahip olduğu bilinmektedir (J. Li, Wang, Zhang, Wang, Huang ve diğerleri, 2015). Daha az doymuş yapıya sahip olması faz geçiş sıcaklığını azaltmakta, oksidasyon direncini ve dolayısıyla stabilitesini düşürmektedir. Bunun yanında, hazırlanan lipozomal formülasyonların membran akışkanlığını artırmakta ve daha küçük KB değerine sahip olmasını sağlamaktadır. Ayrıca deride olduğu gibi, kesecik boyutlarından daha küçük por boyutuna sahip membranlardan geçebilmesini sağlamaktadır (F. Song, Yang, Wang ve Tian, 2022).

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının hazırlanması sırasında membran stabilizasyonunun sağlanabilmesi amacıyla kolesterol kullanılmıştır. Literatürde, 2:1 fosfolipid:kolesterol oranının kullanıldığı durumlarda en stabil formülasyonların elde edildiği bildirilmiştir (Briuglia ve diğerleri, 2015; Gregoriadis ve Davis, 1979; Needham ve Nunn, 1990). Bu literatürler temel alınarak Lipoid S100:kolesterol oranının 2:1 olarak sabit tutulmasına ve tüm formülasyonlarda bu oranın kullanılmasına karar verilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen formülasyonların aktinik keratoz tedavisine yönelik olması planlanmıştır. Bu nedenle, veziküler sistemlerde epidermal tutulumu artırdığına yönelik çeşitli çalışmalar bulunan Transcutol CG’nin formülasyonlara eklenmesine karar verilmiştir (Manca, Manconi, ve diğerleri, 2013; Manconi ve diğerleri, 2011).

Literatürde, oleik asitin hem epidermal tutulumu hem de enkapsülasyon etkinliğini artırdığına yönelik veriler olması nedeniyle optimum formülasyonlardan birinin oleik asit

içeren formülasyonlardan seçilmesi planlanmıştır (Zakir, Vaidya, Goyal, Malik ve Vyas, 2010).

Epidermal etkin madde birikimini artırdığı bilinen bir diğer madde ise hyaluronik asittir. Kesecik membran akışkanlığını azalttığı bilinmesine karşın, hedeflenen dokunun deri olması nedeniyle optimum formülasyonlardan birinin hyaluronik asit içeren formülasyonlardan seçilmesi planlanmıştır (Cilurzo ve diğerleri, 2014; Franzé ve diğerleri, 2018; Witting, Boreham, Brodewolf, Vavrova, Alexiev ve diğerleri, 2015).

5.8. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.8.1. DSC analizi

Diklofenak sodyum numunesine ait termogramda yaklaşık 283°C’de endotermik erime piki gözlenmiştir. Lipoid S100 %94’ten fazla soya lesitininden meydana gelmektedir. Faz dönüşüm sıcaklığı 55-65°C arasında olduğu bilinmesine karşın, mevcut skalada gözlemlenemeyecek kadar küçük bir pik oluşturmaktadır (Londoño ve diğerleri, 2019). Diklofenak sodyumun Lipoid S100 ile fiziksel karışımında etkin maddenin endotermik erime pikinin kaybolduğu görülmektedir. Bu durumun diklofenak sodyumun lipid matrisinde dağılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (A. Zafar, Alruwaili, Imam, Yasir, Alsaidan ve diğerleri, 2022). Kristal yapıya sahip olduğu bilinen kolesterolün endotermik erime piki yaklaşık 150°C’de gözlenmiştir (Alyami, Abdelaziz, Dahmash ve Iyire, 2020). Kolesterol ile diklofenak sodyumun fiziksel karışımı incelendiğinde, 150°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda eriyik duruma geçen kolesterol, diklofenak sodyumu çözerek moleküler dağılım oluşturmuş ve diklofenak sodyumun spesifik endotermik pikini kaybetmesine neden olmuştur (Akbari, Saeedi, Morteza-Semnani, Hashemi, Babaei ve diğerleri, 2022). Optimum formülasyonların sıvı formda olması nedeni ile DSC termogramları elde edilememiştir. Sonuç olarak, yardımcı maddelerin spesifik termogramlarında belirgin bir değişiklik olmadığından etkin madde ile geçimsizlik problemi yaşanmayacağı öngörülmüştür.

5.8.2. FTIR analizi

Diklofenak sodyuma ait FTIR spekturumunda, 3380 cm^{-1} 'de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} 'de karboksil grubundan gelen karbonil piki, 750 cm^{-1} 'de -C-Cl piki, $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ 'de –CN grubuna ait olan pikler görülmektedir (Öztürk ve diğerleri, 2020). Diklofenak sodyumun, hem Lipoid S100 hem de kolesterol ile olan fiziksel karışımları incelendiğinde, 3380 cm^{-1} 'de sekonder amin piki, 1570 cm^{-1} 'de karboksil grubundan gelen karbonil piki ve 750 cm^{-1} 'de -C-Cl piki rahatlıkla görülebilmektedir. Transcutol CG ve oleik asit ile olan fiziksel karışımlarda, diklofenak sodyumun düşük transmittans gösterdiği 3380 cm^{-1} 'deki sekonder amin pikinin ve $1000\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ 'de –CN grubuna ait olan piklerin net olarak görülememesine karşın, 1570 cm^{-1} 'deki karbonil ve 750 cm^{-1} 'de -C-Cl piki görülebilmektedir. Saf oleik asite ait FTIR spektrumunda görülen, $984\text{-}1464\text{ cm}^{-1}$ dalga sayılarındaki O-H gerilimi ve 1282 cm^{-1} 'deki C-O gerilimi; Transcutol CG'de bulunan $1070\text{-}1114\text{ cm}^{-1}$ 'deki C-O gerilimi şiddetli pikler oluşturduğundan, diklofenak sodyumdaki –CN grubuna ait piklerin görülmesini zorlaştırmaktadır. Diklofenak sodyumun 3380 cm^{-1} 'deki sekonder amin pikinin ise, benzer dalga sayısında geniş pikleri olduğu bilinen hidroksil (Transcutol CG'nin fonksiyonel grubu) ve karboksil (oleik asitin fonksiyonel grubu) grupları nedeniyle gözlenemeyeceği tahmin edilmektedir. (Ibarra, Melendres, Almada, Burboa, Taboada ve diğerleri, 2015; Ibrahim, Abdallah, El-Megrab ve El-Nahas, 2018). Sonuç olarak, etkin maddenin spesifik FTIR spektrumunda belirgin bir değişim olmadığından yardımcı maddeler ile geçimsizlik problemi yaşanmayacağı değerlendirilmiştir.

5.8.3. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının kesecik boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçümü

Üretilen esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB, PDI ve ZP değerleri DLS prensibi ile çalışan partikül boyutu ölçüm yöntemi ile belirlenmiştir. DLS prensibi, disperse haldeki partikül, kesecik ya da damlacığın, üzerine gönderilen belirli bir dalga boyundaki lazer ışığını saçarak, dedektörler tarafından saçılan ışığın yoğunluğunun ölçülmesi şeklinde özetlenebilir. Disperse olan tanecik, gönderilen lazer ışınının dalga boyunun 10^3 'da 1^3 'inden küçükse “Rayleigh dağılımı”, büyükse “anizotropik Mie dağılımı” gözlenmektedir. Rayleigh dağılımında saçılan ışık, gelen lazer ışınının açısından bağımsız olarak gözlenirken, Mie dağılımında ise gelen lazer ışınının açısı, dağılım açısını değiştirmektedir. Tanecikten saçılan ışığın yoğunluğunun ölçülmesinin ardından, cihaz yazılımı tarafından bir

dizi karmaşık matematiksel işlem uygulanarak, taneciklerin ortalama boyutları ve boyut dağılımları hesaplanmaktadır.

ZP ölçümü, taneciklerin elektrik alandaki hareket hızlarının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Tanecikler elektrik alanda hareket ederken gönderilen lazer ışını farklı bir frekansta dağılmaktadır. Frekans değişimi taneciğin hareket hızı ile orantılı olarak gerçekleşmektedir. Bu olay “Doppler değişimi” olarak tanımlanmıştır. Ölçülen frekans değişimi, dağılım ortamının dielektrik sabiti, viskozitesi ve elektrik alan kuvvetinin de dahil edildiği bir dizi karmaşık matematiksel işlem ile ZP değeri hesaplanmaktadır (Bhattacharjee, 2016).

Geliştirilen esnek veziküler sistem formülasyonlarının KB değerleri incelendiğinde, Transcutol CG oranı ve toplam lipid (fosfolipid + kolesterol) miktarının anlamlı bir etkisi bulunamamıştır ($p>0,05$) (V1, V2, V3, V4 ve V5). Oleik asit (V6, V7) ve hyaluronik asit (V8, V9) eklenen tüm formülasyonlarda, V4 formülasyonuna göre anlamlı şekilde KB değerinin arttığı gözlenmiştir. Tallo ve diğerleri, yaptığı çalışmada oleik asitin fosfatidilkoline göre oranı arttıkça, lipid çifte tabakaya katılarak KB değerini artırdığını bildirmişlerdir (Tallo, Moner, De Cabo, Cocera ve Lopez, 2018). Benzer şekilde hyaluronik asitin veziküler sistem formülasyonlarına eklenmesi durumunda damlacık boyutunu artırdığına dair bulgular literatürde mevcuttur. Hyaluronik asitin membran lipidleri ile etkileşmesinin bir sonucu olarak KB değerinde değişim olabileceği bildirilmiştir (Tian, Liu, Li, Garamus ve Zou, 2018; Wallenwein, Weigel, Hofhaus, Dhakal, Schatton ve diğerleri, 2022). Hyaluronik asitin kesecik içerisindeki sulu bölgeye girerek KB’yi artırması da söz konusu olabilir. V8 ve V9 arasındaki anlamlı KB farkı bu durumu desteklemektedir ($p<0,0001$).

Geliştirilen esnek veziküler sistem formülasyonlarının PDI değerleri incelendiğinde, Transcutol CG ve toplam lipid miktarının anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ($p>0,05$). Oleik asitin PDI değerini düşürerek daha homojen formülasyonlar elde edilmesini sağladığı, hyaluronik asitin ise daha yüksek PDI değerine sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Literatürde, oleik asitin kesecik boyut dağılımını azalttığına dair benzer sonuçlar bildirilmiş olup, bu durumun membran akışkanlığını artırmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Pinilla, Reque ve Brandelli, 2020; Pinilla, Thys ve Brandelli, 2019).

Geliştirilen esnek veziküler sistem formülasyonlarının ZP değerleri incelendiğinde oleik asit ve hyaluronik asitin ZP değerlerini negatif yönde artırdığı görülmektedir ($p<0,05$). Transcutol CG'nin etkisinin incelendiği V1, V2 ve V3 formülasyonlarından V1 ve V2 arasında anlamlı bir fark gözlenirse de, daha yüksek miktarda Transcutol CG içeren V3 formülasyonu ile fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Transcutol CG'nin noniyonik bir kosolvan olduğu değerlendirildiğinde ZP üzerinde herhangi bir etkisinin olması beklenmemektedir. V1 ve V2 formülasyonları arasındaki farklılığın deneysel varyasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir ($p<0,05$). Benzer şekilde, Manconi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada Transcutol P kullanılmış ve Transcutol P'nin formülasyonların ZP değerleri üzerinde anlamlı etkisi bulunamamıştır (Manconi ve diğerleri, 2011). Oleik asitin ZP değerini negatif yönde yükseltmesinin nedeninin, lipid çifte tabaka yapısına katılması ve üzerinde bulundurduğu serbest karboksil grupları sayesinde yüzeydeki negatif yükü artırmasıdır (Pinilla ve diğerleri, 2020). Hyaluronik asitin ZP değeri üzerindeki etkisinin, kesecik yüzeyine adsorbe olarak, üzerinde taşıdığı karboksil grupları ile negatif yükü artırması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Nokhodi, Nekoei ve Goodarzi, 2022).

5.8.4. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi

Esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE% değerleri indirekt metot kullanılarak belirlenmiştir. İndirekt metodun uygulanması için membran filtre ile ayrılmış iki hazneye sahip santrifüj tüpleri kullanılmıştır. Bu tüplere literatürde “santrifüj filtresi” ismi verilmektedir. Santrifüj filtrelerinin proteinleri saflaştırmadaki etkinliğinin tartışmalı olduğu, ancak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile süpernatandaki ilacı ayırmak için verimli sistemler olduğu bildirilmiştir. Bu yöntem nanoilaç taşıyıcı sistemler ile yapılan çok sayıda araştırmalarda kullanılmıştır (Elzoghby, Mostafa, Helmy, ElDemellawy ve Sheweita, 2017; Johnsen, Brandtzaeg, Vehus, Roberg-Larsen, Bogoeva ve diğerleri, 2016; Yalçın ve diğerleri, 2022).

Geliştirilen esnek veziküler sistem formülasyonlarının EE% değerleri incelendiğinde, Transcutol CG ve oleik asitin anlamlı bir etkisi bulunmazken ($p>0,05$), toplam lipid miktarının anlamlı bir şekilde EE%'yi artırdığı belirlenmiştir. Toplam lipid miktarının etkisinin incelendiği V3, V4 ve V5 formülasyonlarından, V4 ve V5 arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). En düşük toplam lipid miktarına sahip V3 formülasyonunun EE%

değeri V4 ve V5'e göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,0001$). EE% değerinin belirli bir noktaya kadar artıp devamında sabit kalmasının nedeninin, lipid çifte tabakanın etkin madde doygunluğu açısından üst limitine yaklaşması olduğu düşünülmektedir. Levy ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, kurkumin yüklü lipozomların ilaç/lipid oranının yüksek olması durumunda EE% değerinin azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedenin ilacın lipid içerisindeki maksimum çözünürlüğüne ulaşmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Levy, Yu, Estevez, Mao, Liu ve diğerleri, 2021). Bu durum, oleik asit eklenmesi durumunda da EE% değerinin değişmemesi sonucunu desteklemektedir. Hyaluronik asit eklenmesi durumunda, V4 ve V8 formülasyonları arasında meydana gelen EE% değerindeki azalmanın, ölçüm varyasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir ($p<0,05$). Daha yüksek miktarda hyaluronik asitin kullanıldığı V9 formülasyonunun V4 ile fark oluşturmaması, bu düşünceyi desteklemektedir. Literatürde, hyaluronik asitin yüzey modifikasyonuna katılması nedeniyle kesecik içerisindeki madde miktarı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Franzé ve diğerleri, 2018; Mansoori, Mohammadi, Abedi-Gaballu, Abbaspour, Ghasabi ve diğerleri, 2020).

5.8.5. Karakterizasyon verilerine göre optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının belirlenmesi amacıyla, tüm yardımcı maddelerin karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda sadece temel yardımcı maddelerin kullanıldığı bir adet formülasyonun, ayrıca epidermal tutulumu artırdığı bilinen bir adet oleik asit içeren ve bir adet hyaluronik asit içeren formülasyonun optimum olarak belirlenmesi planlanmıştır (Witting ve diğerleri, 2015; Zakir ve diğerleri, 2010).

İlk aşamada geliştirilen V1, V2 ve V3 formülasyonlarında Transcutol CG miktarının etkisi incelemiştir. Bölüm 5.8.3'te tartışıldığı üzere, Transcutol CG'nin KB, PDI ve EE% üzerinde etkisinin bulunmadığı, ZP üzerindeki etkisinin ise deneysel varyasyondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Literatürde, Transcutol CG'nin, lipid çifte tabaka yapısına katılarak "kenar aktivatörü" görevi göreceği ve formülasyonun elastikliğini artıracığı bildirilmiştir (Mura, Manconi, Valenti, Sinico, Vila ve Fadda, 2011). Ayrıca epidermal tutulumu artırdığı bilinmektedir (Manconi ve diğerleri, 2011). Buradan hareketle en yüksek Transcutol CG

içeriğine sahip olan V3 formülasyonu seçilmiştir. Toplam lipid miktarının etkisi bu formülasyon temel alınarak değerlendirilmiştir.

Toplam lipid miktarının değerlendirilmesi amacıyla V3, V4 ve V5 formülasyonları kıyaslanmıştır. Toplam lipid miktarının KB, PDI ve ZP üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. EE% değeri üzerindeki etkisi Bölüm 5.8.4'te tartışılmıştır. Lipid miktarının belirli bir seviyenin üzerinde EE% değerini değiştirmemesinin yanında, yüksek lipid kullanımının maliyet ve üretim açısından olumsuz etkileri değerlendirilerek V4 formülasyonu optimum formülasyonlardan biri olarak belirlenmiştir. Oleik asit ve hyaluronik asitin etkisi, V4 formülasyonu temel alınarak geliştirilen V6, V7, V8 ve V9 formülasyonları ile değerlendirilmiştir.

Oleik asitin karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisinin incelendiği V4, V6 ve V7 formülasyonlarından, yüksek oleik asit içeriğine sahip V7'nin V4'e göre anlamlı şekilde PDI değerinin düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Aynı zamanda ZP değerinin negatif yönde artışa neden olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Oleik asitin karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisi Bölüm 5.8.3'te tartışılmıştır. Oleik asit içeren formülasyonlar arasında en düşük PDI'ya ve en yüksek ZP değerine sahip olan V7 optimum formülasyonlardan biri olarak belirlenmiştir.

Hyaluronik asitin karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkisi V4, V8 ve V9 formülasyonları ile değerlendirilmiştir. Hyaluronik asitin formülasyon parametreleri üzerindeki etkisi Bölüm 5.8.3 ve Bölüm 5.8.4'te tartışılmıştır. V8 formülasyonunun PDI ($p<0,05$) ve KB ($p<0,0001$) değerleri açısından V9'a göre daha iyi performansa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle optimum formülasyonlardan biri olarak V8 formülasyonu seçilmiştir.

Özetle, formülasyonların temel bileşenleri olan Lipoid S100, kolesterol, Transcutol CG'den meydana gelen V4 formülasyonu, fazladan oleik asit içeren V7 formülasyonu ve hyaluronik asit içeren V8 formülasyonu optimum formülasyonlar olarak belirlenmiştir.

5.8.6. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının reolojik özellikleri

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının (V4, V7, V8) viskoziteleri değerlendirilmiştir. Viskozitenin, veziküler sistem formülasyonlarında uzun süreli stabilite, salım ve sürülebilirlik gibi özellikleri etkilediği bilinmektedir (Abdellatif ve Tawfeek, 2016; Karaz ve Senses, 2023). Beklenildiği üzere, esnek veziküler sistem formülasyonlarının artan akış hızında viskozitelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum tüm veziküler sistem formülasyonlarının non-newtonian akış gösterdiğini düşündürmektedir. Ostwald de Waale Power Law eşitliği ile yapılan doğrusallaştırma işlemi sonucunda elde edilen n değerlerinin 1'den küçük olduğu belirlenmiştir. n değerinin 1'den küçük olması, akış tipinin psödoplastik olduğunu doğrulamaktadır. n değeri ile birlikte kayma hızının sabit tutulması durumunda, K değerinin akışa karşı olan direnci doğrudan ifade ettiği bildirilmiştir (Kapadia ve diğerleri, 2022). K değerleri sırasıyla $V8 > V7 > V4$ olarak bulunmuştur. V8 formülasyonunun K değerinin belirgin şekilde yüksek olması, hyaluronik asit polimerinin, polimerik ağ oluşturarak dispersiyon ortamı viskozitesini artırmasından kaynaklanmaktadır (Yorke ve Amin, 2021). Bilindiği gibi, akışa karşı direncin yüksek olması sürülebilme özelliğini azaltırken, deri üzerindeki kalıcılığı artırmaktadır (Siemiradzka, Dolinska ve Ryszka, 2020; Szulc-Musiol, Dolinska, Kolodziejska ve Ryszka, 2017). V7 formülasyonunun V4 formülasyonuna göre daha yüksek K değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak V4 ve V7 formülasyonlarının K değerleri arasındaki fark, V8 ve V7 formülasyonlarının K değerleri ile arasında olan farka göre oldukça azdır. Elde edilen verilerin aksine, oleik asitin veziküler sistemlerin membran akışkanlığını artırarak, sistem viskozitesini azaltması beklenmektedir (F. Song ve diğerleri, 2022). Ancak oleik asitin, kolesterole benzer olarak lipid çift tabaka yapısına katılması ve tabaka dansitesini artırması, viskozitede artış gözlenmesine neden olabilir (Choi, Kang, Yang, Kim, Kwak ve diğerleri, 2023).

5.8.7. Morfolojik analiz

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının TEM görüntüleri incelendiğinde, tüm formülasyonların düzgün yuvarlak şekle ve 100-200 nm arası kesecik boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. TEM analizinde ölçülen boyutlar ile DLS yöntemi ile bulunan KB değerleri birbirine benzer bulunmuştur. Kesecik yapısını oluşturan dış lipid katmanının görüntülenmesi amacı ile etkin maddesiz veziküler sistemler üretilmiş ve görüntülemeleri yapılmıştır. Ancak etkin madde içermeyen formülasyonların kontrastının çok düşük olması

net görüntü alınmasını engellemiştir (Franken, Boekema ve Stuart, 2017). Bunun yanında V7 formülasyonu etkin madde içermeden elde edilememiş, hidrate edilme aşamasında faz ayrıştığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin oleik asitin düşük pH değerlerinde protonize olarak, elektriksel itme kuvvetini kaybetmesi ve lipid çifte tabakayı destabilize etmesi olduğu düşünülmektedir (de Oliveira, Rosilio, Lesieur, Bourgaux, Couvreur ve diğerleri, 2000; F. Zhang, Lin, Shao, Yu ve Zang, 2013). Diklofenak sodyum, pKa değeri yaklaşık 4 olan zayıf bazik bir moleküldür. Bu nedenle çözündüğü nötr veya asidik ortamın pH değerini yükseltmektedir (Adeyeye ve Li, 1990). Soya lesitininin pKa değerinin 0,8 olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla ortam nötr veya bazik pH'ını azalttığı bilinmektedir (Moncelli, Becucci ve Guidelli, 1994). Bu durumda, diklofenak sodyum gibi ortamı nötralize edebilecek bir molekül eklenmediğinde, oleik asit varlığında lipid çifte tabakanın oluşmaması beklenen bir sonuçtur.

5.8.8. Esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon (esneklik) katsayılarının belirlenmesi

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının deformasyon katsayıları $V4 > V7 > V8$ şeklinde bulunmuştur. Deformasyon katsayısının hesaplanması için kullanılan yöntem Eş. 3.6'da verilmiştir. Eşitliğin paydasında yer alan zaman faktörü ve dolayısıyla deformasyon katsayısı doğrudan formülasyon viskozitesinden etkilenmektedir (Mui, Chow ve Hope, 2003). Bu durum, V7 ve V8 formülasyonlarının viskozite değerleri ile ilişkili olarak düşük deformasyon katsayısı elde edilmesine neden olmuş olabilir (Bkn. Bölüm 4.8.6). Literatürde, hyaluronik asitin veziküler sistem lipid membranının akışkanlığını azalttığına ve sertliğini artırdığına, dolayısıyla deforme olabilirliğini azalttığına dair bulgular yer almaktadır (Franzé ve diğerleri, 2018; Witting ve diğerleri, 2015). Bu durum elde edilen sonuçlar ile tutarlıdır. Ancak oleik asitin membran akışkanlığını, dolayısıyla deformasyon katsayısını artırması beklenmektedir (Pinilla ve diğerleri, 2020; Pinilla ve diğerleri, 2019). Bu durum elde edilen sonuçlar ile uyumluluk göstermemektedir. Bu nedenle, viskozite sonuçlarına benzer olarak, oleik asitin lipid çifte tabaka yapısına katılarak tabaka dansitesini artırması ve bu durumun daha az deforme olabilir keseciklerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmüştür (Choi ve diğerleri, 2023).

5.8.9. Stabilite çalışmaları

Stabilite çalışmaları kapsamında, in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen V4 formülasyonunun etkin madde yüzdesi, KB, PDI, ZP ve EE% verileri incelenmiştir. Etkin madde yüzdesinin, başlangıç yüzdesine göre 25°C ve 40°C’de önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ($p<0,01$). 5°C’de yapılan stabilite çalışmasının 1. ayında etkin madde yüzdesinin azaldığı belirlenmiş olsa da ($p<0,05$), 3. ve 6. ayda yapılan ölçümlerin istatistiksel olarak farklılık göstermemesi ($p>0,05$), 1. aydaki farklılığın ölçümsel hatadan kaynaklandığını göstermektedir. 25 ve 40°C’de yapılan stabilite çalışmalarının 1. ve 3. ayında, etkin madde miktarında belirgin olarak düşüş meydana gelmiştir ($p<0,05$). Sulu çözelti ya da süspansiyon formundaki diklofenak sodyumun hızlandırılmış stabilite koşullarında (40°C, %75 bağıl nem) 3 ay boyunca stabil olduğu bilinmektedir (Ahuja ve diğerleri, 2009; Donnelly ve diğerleri, 2010). Etkin madde miktarındaki azalmanın mikrobiyolojik üremeden ya da veziküler sistemleri oluşturan bileşenlerden gelebilecek anyonların diklofenak sodyum degradasyonunu hızlandırmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

KB değerinin başlangıç değerine göre, 5°C için 6 ay boyunca, 25°C için 3 ay boyunca anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Ancak 40°C’de yapılan stabilite çalışmasının 3. ayında, belirgin şekilde KB değerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).

PDI verilerinin 5°C için 6 ay boyunca ve 25°C için 3 ay boyunca değişiklik göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Ancak 40°C’de yapılan stabilite çalışmasının 3. ayında, belirgin şekilde PDI değerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Yüksek sıcaklıkta PDI ve KB değerlerindeki artışın, dispersiyon halindeki kesciklerin agregasyon/koagülasyona uğramasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Rehman, Ahmad, Parveen, Zakir, Khan ve Han, 2023; Sopyan ve Gozali, 2020).

ZP değerlerinin, 5°C için 6 ay boyunca değişiklik göstermediği ($p>0,05$), ancak 40°C’de yapılan stabilite çalışmasının 1. ayından itibaren artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,001$). 25°C’de yapılan stabilite çalışmasının 1. ayında ZP değerinin azaldığı belirlenmiş olsa da ($p<0,001$), 3. ayda yapılan ölçümlerin istatistiksel olarak farklılık göstermemesi ($p>0,05$), 1. aydaki farklılığın ölçümsel hatadan kaynaklandığını göstermektedir. ZP değerinin 40°C’deki artışının, sürfaktan özellikli moleküllerin dekompozisyonu veya iyonik

karakterdeki molekülerin ortaya çıkışı nedeniyle meydana geldiği değerlendirilmiştir (Li ve Lu, 2016; Yalçın ve diğerleri, 2022).

EE% verilerinin, 5°C için 3 ay boyunca değişiklik göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Ancak 5°C’de yapılan stabilite çalışmasının 6. ayında belirgin şekilde EE% değerinin azaldığı, 25°C için 3. ayda ve 40°C için 1. ayda ise belirgin şekilde EE% değerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,0001$). 40°C’de yapılan stabilite çalışmasının 3. ayında, gözle görülür şekilde bozulan V4 formülasyonundan EE% değeri için örnek elde edilememiştir. Bu durum, kaba dispersiyon haline dönüşen V4 formülasyonunun santrifüj filtre membranını tıkamamasından kaynaklanmaktadır. 25°C’de yapılan stabilite çalışmasının 3. ayında gözlenen EE% artışının, etkin madde yüzdesinin %50’nin altına inmesi ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Ortamdaki etkin maddenin azalması sonucunda, partiyon katsayısı yaklaşık 1,27 olan diklofenak sodyumun lipid fazında ulaştığı doygunluk seviyesini koruyarak su fazında azalma gösterdiği tahmin edilmektedir (Maurya ve Murthy, 2014). 40°C’de yapılan stabilite çalışmasında görülen yüksek EE% değerinin, lipidteki çözünürlüğünün sudaki çözünürlüğünden daha yüksek olduğu bilinen diklofenak sodyumun, yüksek sıcaklık etkisi ile lipidteki çözünürlüğünün artması sonucunda su fazındaki etkin maddenin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diklofenak sodyumun yüksek çözünürlüğe sahip olduğu solvanlarda, sıcaklık artışı ile birlikte daha fazla çözünürlük artışı gösterdiği bildirilmiştir (Žilnik, Jazbinšek, Hvala, Vrečer ve Klamt, 2007).

25°C ve 40°C’de yapılan stabilite çalışmalarının 6. ayındaki örnekler mikrobiyolojik üreme nedeni ile analiz edilememiştir.

5.9. Esnek Veziküler Sistem Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının in vitro salım çalışmalarında, 24 saatin sonunda salınan etkin madde yüzdesi V4, V7, V8, etkin madde çözeltisi ve ticari ürün için sırasıyla; $62,4 \pm 5,5$, $54,0 \pm 8,2$, $93,1 \pm 11,6$, $95,0 \pm 2,0$ ve $98,5 \pm 8,3$ olarak bulunmuştur. V4 ve V7 formülasyonlarında 6. saatin sonunda, salım hızı belirgin şekilde azalmıştır. V8 formülasyonunun salım hızında belirgin bir değişiklik meydana gelmemiştir. Etkin madde çözeltisinden ve ticari üründen gerçekleşen salım 2. saatte tamamlanmıştır.

V4 ve V7 formülasyonundan etkin madde çıkışının V8'e göre daha az gerçekleşmesinin nedeninin etkin maddenin partiyon katsayısı, Transcutol CG ve oleik asit ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bölüm 5.8.9'da belirtildiği üzere, diklofenak sodyumun Log(P) değeri yaklaşık 1,27'dir (Maurya ve Murthy, 2014). Bu durum, diklofenak sodyumun lipidteki çözünürlüğünün sudaki çözünürlüğünden daha fazla olduğunu göstermektedir. Diklofenak sodyumun, tüm veziküler sistem formülasyonlarında yer alan Transcutol CG'deki çözünürlüğünün çok yüksek olduğu bilinmektedir (Shazly, Haq ve Shakeel, 2014). Ayrıca oleik asitin, karboksil grupları nedeniyle ortam pH değerini düşürmesi söz konusudur. Diklofenak sodyumun asidik pH'larda, sulu faz çözünürlüğünün çok azaldığı bildirilmiştir (Pobudkowska ve Domańska, 2014). V4 formülasyonunda Transcutol CG'deki yüksek çözünürlük ve V7 formülasyonunda hem Transcutol CG'deki yüksek çözünürlük hem non-iyonizasyon etkisi göz önünde bulundurulduğunda diklofenak sodyumun sulu faza geçiş hızının belirli bir süreden sonra sifıra yaklaşması beklenen bir durumdur. V7 formülasyonunda salınan madde miktarının, V4 formülasyonuna göre daha az olması, bu düşünceyi desteklemektedir.

V8 formülasyonunda yer alan hyaluronik asitin, oleik asite benzer şekilde diklofenak sodyumun non-iyonizasyonuna sebep olması beklenmektedir. Veziküler sistemin lipid çifte tabaka yapısına katılan ya da çevresini saran hyaluronik asitin, uzun zincirli ve hidrofilik yapısı ile formülasyon hidrofobitesini azalttığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, verici kompartmanda yer alan veziküler sistem dispersiyonunun sulu fazında hyaluronik asit varlığı nedeniyle anyonik bir polimerik ağ yapısı oluşturmaktadır. Diklofenak sodyumun pKa değerinin yaklaşık olarak 4 olduğu bilinmektedir (Adeyeye ve Li, 1990). Bu durumda, diklofenak sodyumun daha fazla iyonize olarak yüksek çözünürlük gösterebileceği alıcı kompartmana difüzyonunun devam etmesi olası bir durumdur.

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının salım mekanizmaları incelendiğinde, V4 ve V7 formülasyonlarının Weibull kinetiğine, V8 formülasyonunun ise Higuchi kinetiğine uyduğu belirlenmiştir. Weibull ve Higuchi kinetiklerinin genel eşitlikleri sırasıyla, Eş. 5.1 ve Eş. 5.2'de verilmiştir.

$$M = M_0 \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^{\beta}}{\alpha}} \right] \quad (5.1)$$

$$M_t/M_0 = K_H \sqrt{t} \quad (5.2)$$

Weibull eşitliğindeki M salınan etkin madde miktarını, M_0 toplam etkin madde miktarını, T gecikme süresini, t zamanı göstermektedir. Higuchi eşitliğindeki M_t/M_0 t anındaki salım oranını, K_H Higuchi sabitini, t zamanı göstermektedir.

Weibull kinetiğinin genel denkleminde bulunan β değeri salım grafiğinin şeklini belirlerken, α değeri salım hızına bağlı olarak zaman eksenini boyunca eğri uzunluğunu tanımlayan bir zaman sabitidir. β değerinin 1'den büyük olması sigmoidal, 1'den küçük olması parabolik, 1'e eşit olması eksponansiyel şeklin oluşmasını sağlamaktadır. β değeri, literatürde olası salım mekanizmalarını açıklamak için kullanılmıştır. $\beta \leq 0,75$ için Fick difüzyonunun, $0,75 < \beta < 1$ için Fick difüzyonunun yanında şişme indeksi gibi başka bir mekanizmanın dahil olduğu ikili salım mekanizmalarının, $\beta > 1$ için ikiden fazla mekanizmanın dahil olduğu kompleks salım mekanizmalarının salım üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Corsaro, Neri, Mezzasalma ve Fazio, 2021). V4 ve V7 formülasyonlarının β değerleri sırasıyla 0,5 ve 0,45 olarak bulunmuştur. Her iki formülasyondan etkin madde salımı Fick difüzyonu ile gerçekleşmiştir. Literatürde birçok lipozomal formülasyonun, Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer-Peppas genel eşitliğindeki n değerinin 0,45'ten düşük olması durumunda) ve Higuchi modelleri ile açıklanmış Fick difüzyonu mekanizması ile etkin madde salımı gerçekleştirdiği bildirilmiştir (A. Jain ve Jain, 2016; Pentak, Ploch-Jankowska, Zieba ve Kozik, 2022). V8 formülasyonunun Higuchi kinetiğine uyum göstermesi nedeniyle Fick difüzyon mekanizması ile etkin madde salımı gerçekleştirdiği söylenebilmektedir. Higuchi kinetiği polimerik matristen etkin madde salımını açıklamak için kullanılan bir kinetik modeldir (Merchant, Shoaib, Tazeen ve Yousuf, 2006). V8 formülasyonundaki hyaluronik asit nedeniyle, salımın matris kinetiğine uygun şekilde gerçekleşmesi söz konusudur. Bhuvaneswari ve diğerleri, rutin nanopartikülleri hyaluronik asitle kapladıklarında, etkin madde salımının Higuchi kinetiğine uygun şekilde gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Bhuvaneswari ve Kumudha, 2024). Aynı zamanda V8 formülasyonunun dispersiyon ortamında bulunan hyaluronik asitin polimerik ağ yapısı oluşturarak bir hidrojel gibi davranması ve kesecikler içerisinden difüze olan ilacın polimerik matristen geçerek alıcı kompartmana ulaşması söz konusu olabilir. Bu durumda salımın matris kinetiğine uygun şekilde gerçekleşmesi mantıklı görünmektedir (K. Chen, Chen, Han ve Fu, 2020).

5.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Optimum mikroiğne ve veziküler sistem formülasyonlarının hücre kültürü çalışmalar kapsamında yapılan MTT sitotoksosite sonuçlarına göre, diklofenak sodyum içeren ve içermeyen tüm formülasyonların saf diklofenak sodyuma benzer şekilde %75-80 aralığında hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir. Literatürden elde edilen bilgilere göre mikroiğne üretiminde kullanılan yardımcı maddelerin düşük sitotoksositeye sahip olduğu bilinmektedir. Etkin madde içermeyen mikroiğne formülasyonlarının %80 hücre canlılığı göstermesi literatürle tutarlılık göstermektedir (Caló, Barros, Ballamy ve Khutoryanskiy, 2016; Zerbinati, Lotti, Monticelli, Rauso, Gonzalez-Isaza ve diğerleri, 2018). F24 formülasyonu hariç, etkin madde içeren ve içermeyen mikroiğne formülasyonlarının arasında sitotoksosite açısından önemli bir farkın bulunmaması, etkin maddeden kaynaklanan toksisitenin enkapsülasyon nedeniyle azaldığını düşündürmektedir ($p>0,05$). F24 formülasyonunun ise diğer mikroiğnelere göre daha düşük hücre canlılığına neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Bu durumun deneysel hatalardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Etkin madde yüklü esnek veziküler sistem formülasyonlarının saf etkin maddeye göre daha yüksek sitotoksosite gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,0001$). Etkin madde içermeyen veziküler sistem formülasyonlarının ise saf etkin maddeden daha az sitotoksik oldukları gözlenmiştir ($p<0,0001$). Mikroiğnelerde görülen durumun aksine, etkin madde yüklü veziküler sistemlerde hem formülasyondan hem etkin maddeden kaynaklanan sitotoksosite gözlenmiştir. Bu durum, daha önceki çalışmalarda nano boyutlu veziküler sistemlerin hücre içerisine pasif veya aktif olarak alınması şeklinde açıklanmıştır (Alrbyawi ve diğerleri, 2022; Farooq ve diğerleri, 2021).

Sonuç olarak, tüm formülasyonların ISO 10993-5:2009(E) standartlarına göre %70'in üzerinde canlılık gösterdiği ve sitotoksik olarak kabul edilmediği belirlenmiştir (Arany ve diğerleri, 2020).

5.11. Ex Vivo Deriden Geçiş ve Deride Birikim Çalışmaları

Ex vivo deriden geçiş ve deride birikim çalışmaları kapsamında, optimum mikroiğne formülasyonları ve esnek veziküler sistemlerin sıçan derisinden alıcı faza geçen etkin madde yüzdeleri, deride kalan etkin madde yüzdeleri ve permeabilite katsayıları belirlenmiştir.

Aktinik keratoz hastalığının deri dokusunda gerçekleşmesi nedeniyle dokuda kalan etkin madde yüzdesi, *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilecek formülasyonun belirlenmesinde en kritik parametre olarak değerlendirilmiştir. Alıcı faza geçen etkin madde yüzdesi ise sistemik dolaşıma geçen etkin madde miktarını temsil etmesi nedeni ile olumsuz bir parametre olarak kabul edilmiştir.

Alıcı faza ulaşan etkin madde yüzdeleri kıyasalandığında, optimum mikroiğne formülasyonları arasında F24 formülasyonunun en fazla alıcı faza madde geçişini sağlayan formülasyon olduğu belirlenmiştir. Diğer mikroiğne formülasyonlarına göre istatistiksel farklılık F23 için anlamlı ($p<0,05$), F22 için anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). F22 ve F24 arasında anlamlı farklılık bulunmamasının nedeni, Bölüm 4.6.2’de tartışıldığı üzere şişme hızı ile ilişkilendirilebilir. Mikroiğnelerin uygulama sırasında, derinin bariyer özelliklerini azalttığı bilinmektedir (Bkn. Bölüm 5.5.10). F22 formülasyonunun F24 formülasyonuna göre hızlı şişmesi, iğnelerin oluşturdukları deliklerden daha hızlı çıkmasına sebep olabilir. Bu durumda, F24 formülasyonu deri ile daha uzun süre temas kurduğundan, daha çok etkin maddenin alıcı faza geçişini sağlamış olabilir (S. Wang, Kara ve Krishnan, 1998). Ancak şişmenin hızlı olması, aynı zamanda daha fazla etkin maddenin salınması anlamına gelmektedir (Mali ve diğerleri, 2018). F22’nin F24’e yakın etkin madde geçişi sağlaması, bu nedenle gerçekleşmiş olabilir.

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının arasında anlamlı bir fark gözükmezken, en yüksek geçiş oranı V8 formülasyonu ile elde edilmiştir ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da, V8 formülasyonunun diğer veziküler sistemlere göre daha fazla madde geçişini sağlamasının, Bölüm 5.9’da tartışıldığı üzere iyonik etkileşimlere bağlı olarak fazla etkin madde salmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ticari üründen alıcı faza geçen etkin madde oranı tüm formülasyonlara göre yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ticari ürünün ve etkin madde çözeltisinin şişme aşaması ya da difüzyon hızını azaltan bir nano yapıya sahip olmaması (lipid çifte tabaka gibi), ticari üründen etkin madde moleküllerinin hızla deriye girmesine, deri içinde difüzlenmesine ve dolayısıyla alıcı faza daha fazla madde geçişi sağlamasına neden olabilir (Maritim, Boulas ve Lin, 2021; Thang, Chien ve Cuong, 2023). Aynı zamanda, hyaluronik asit içeren ticari ürünün, V8 formülasyonuna benzer olarak iyonik etkileşimler dolayısıyla daha fazla madde geçişini sağlaması ya da kimyasal penetrasyon artırıcı olarak kullanılan propilen glikol

içermesi nedeniyle etkin madde geçişini artırması, etkin madde çözeltisi ile olan permeasyon farkını açıklayabilir.

Dokuda kalan etkin madde yüzdeleri kıyaslandığında, optimum mikroığne formülasyonlarından F24 ile belirgin şekilde daha fazla miktarda etkin maddenin deri içerisinde biriktiğı belirlenmiştir ($p<0,05$). F24 formülasyonunun deride yüksek miktarda etkin madde birikimi sağlaması, bariyer fonksiyonu azalmış deri bölgeleri ile olan temas süresinin daha uzun olmasıyla açıklanabilir (Bkn. Bölüm 5.6.2) (Krishnaiah, Yang, Hunt ve Khan, 2014). Ayrıca F24'ün yüksek hyaluronik asit içeriğı, diklofenak sodyumun non-iyonize formda kalmasına neden olarak, alıcı bölmedeki sulu faza göre daha fazla lipofilik yapıya sahip olan deride birikmesine olanak sağlayabilir (N. Li, Wu, Jia, Zhang, Tan ve Zhang, 2012).

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarından V4 formülasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın en fazla dokuya etkin madde taşınımını sağlayan veziküler sistem formülasyonu olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Bunun nedeninin, V4 formülasyonunun yüksek elastisitesi sayesinde dokuya geçmesi ve Transcutol CG içeriğinin doku lipidleri ile etkileşerek formülasyonun dokuda kalmasını sağlaması olduğu düşünülmüştür (Manconi ve diğerleri, 2011). V4 formülasyonundan alıcı faza geçen etkin madde yüzdesi %5, dokuda kalan etkin madde yüzdesi %40 civarlarındayken, V8 formülasyonunda bu değerler sırasıyla yaklaşık %10 ve %35'tir. Herhangi bir difüzyon kısıtlayıcı faktör içermeyen diklofenak sodyum çözeltisinde ve etkin maddenin rahatça difüze olabileceğı sulu bir polimerik matristen oluşan ticari üründe, alıcı faza geçen ve dokuda kalan etkin madde yüzdelерinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Bu durum, V4 formülasyonundaki etkin maddenin bir kısmının veziküler sistem içerisinde kalarak, formülasyon ile birlikte dokuda birikim yaptığını düşündürmüştür. V8 formülasyonunda bu etkinin minimal düzeyde kaldığı, etkin maddenin veziküler sistemlerden hızlıca salınarak, serbest difüzyonunun da etkisi ile alıcı faza daha fazla miktarda geçtiğı değerlendirilmiştir. V7 formülasyonunun hem düşük elastisiteye sahip olması, hem de yüksek hidrofobitesi nedeniyle etkin madde salımının yavaşlatması (Bkn. Bölüm 5.9), hem alıcı fazda hem de dokuda daha az etkin madde bulunmasına neden olmuş olabilir.

Etkin madde çözeltisi ve ticari üründe gözlenen aşırı varyasyon nedeniyle, in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen F24 ve V4 formülasyonlarının, çözelti ve piyasa preparatı ile arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Permeabilite katsayısı, etkin maddenin doku gibi heterojen yapıdaki bir ortamın birim alanından geçiş hızını tanımlayan bir parametredir. Dokunun ilgili molekülün difüzyonuna karşı gösterdiği direnci tanımlar. Permeabilite katsayısı arttıkça, difüzyona karşı gösterilen direnç azalmaktadır. Deneyler arasında ortaya çıkan, yüzey alanlarından ve verici faz konsantrasyonundan kaynaklanan varyasyonların elimine edilerek etkin maddenin geçişinin değerlendirilmesini sağlar (Chiou, 1996; Timur, Usta ve Teksin, 2022).

Optimum mikroiğne formülasyonlarının permeabilite katsayıları kıyaslandığında, F24 formülasyonunun F22 formülasyonundan daha yüksek permeabilite katsayısına sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Bu durumun, yukarıda tartışıldığı üzere bariyer fonksiyonu azalmış bölgelerle temas süresi ilişkili olduğu düşünülmektedir. Aralarında anlamlı fark bulunmasa da, F23 formülasyonunun F22 formülasyonundan daha fazla permeabilite katsayısına sahip olması temas süresi teorisini desteklemektedir ($p>0,05$).

Optimum esnek veziküler sistem formülasyonlarının permeabilite katsayıları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, değer olarak V4 ve V7 formülasyonlarının permeabilite katsayıları çok yakın olup, V8 formülasyonunun permeabilite katsayısı diğer veziküler sistemlere göre yüksek bulunmuştur. Bölüm 5.9’da tartışılan nedenlerden dolayı, etkin maddenin V8 formülasyonunda daha yüksek miktarda çıkış göstermesi bu veriyi desteklemektedir.

Ticari ürün ile in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen formülasyonlar arasında anlamlı fark gözlenmezken, etkin madde çözeltisinin permeabilite katsayısı anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Bu durum, çözeltiden etkin madde salımını engelleyecek hiçbir polimerik matris ya da kesecik yapısı olmamasından kaynaklanmaktadır.

5.12. İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen formülasyonlar ex vivo çalışmaların sonuçlarına göre belirlenmiştir. Optimum mikroiğne formülasyonlarından F24 ve optimum

esnek veziküler sistem formülasyonlarından V4, deri dokusunda en fazla etkin madde birikimini sağlayan formülasyonlardır. Aktinik keratoz hastalığının deride gelişen bir hastalık olduğu göz önünde bulundurularak, dokuda en fazla birikim sağlayan bu formülasyonlar in vivo çalışmalarda kullanılmıştır.

İn vivo çalışmalar kapsamında, formülasyonlar sıçan kulaklarına uygulanmış ve 24 saat boyunca kulak üstünde kalması sağlanmıştır. 24. saatin sonunda formülasyonlar sıçan kulaklarından uzaklaştırılmış ve ksilen uygulanmıştır. Ksilen uygulamasını takiben, her 15 dakikada bir kez olmak üzere kulak kalınlıkları ölçülmüştür. 1 saatin sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek kulak dokuları alınmıştır. Alınan kulak dokularının ağırlıkları ölçülmüş, PGE2 düzeyleri belirlenmiş ve histolojik inceleme gerçekleştirilmiştir.

Ksilen uygulanması sonrasında, pozitif kontrol grubu hariç, diğer tüm gruplarda 15 dakikada kulak ödeminin maksimum noktasına ulaştığı belirlenmiştir. Tüm gruplarda, ödem kalınlığındaki azalma doğrusal olarak gerçekleşmiştir. Literatürde buna benzer sonuçlar yer almaktadır. Singsai ve diğerleri farelerde ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modeli oluşturmuşlardır. Kulak kalınlığının 1 saat boyunca doğrusal olarak azaldığını bildirmişlerdir (Singsai, Charoongchit, Chaikaew, Boonma, Fhanjaksai ve Chaisatan, 2020). Ksilen uygulanması sonrasında, pozitif kontrol grubunun maksimum kulak kalınlığı 30 dakikada $0,16 \pm 0,061$ mm olurken; V4 Boş ve F24 Boş gruplarında maksimum kalınlık 15 dakikada sırasıyla $0,162 \pm 0,025$ mm ve $0,17 \pm 0,062$ mm olmuştur. Kulak kalınlıkları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamasına karşın dokunun ksilene karşı gösterdiği reaksiyondaki farklılığın boş formülasyonların deri geçirgenliğini artırması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Ödem kalınlığının azalma hızı, Kulak ödemi kalınlığı-Zaman grafiğinin 15. dakikası ve sonraki noktalarına lineer regresyon uygulanarak belirlenmiştir. Lineer regresyon sonucunda elde edilen eğim değerleri ödem azaltma hızını, X ekseninin kesim noktası ise teorik olarak tedavinin tamamlandığı ve kulak kalınlığının başlangıçtaki değerine döndüğü zaman noktasını ifade etmektedir. Regresyon sonucunda elde edilen verilere göre, ticari ürününün F24 ve V4'e göre daha hızlı ödem azaltıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ticari ürün daha hızlı ödem azaltıcı etki gösterse de, F24 formülasyonunun X eksenini kestiği noktanın (dokuyu normal kalınlığına döndürme süresi) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ancak V4 formülasyonunun, hem ödem azaltma hızı ticari ürüne göre daha düşük, hem de X eksenini

kestiği nokta daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, ticari ürün, F24 ve V4 tedavi gruplarındaki ödem azalma hızı, herhangi bir tedavi uygulanmayan pozitif kontroldeki ödem azalma hızının, sırasıyla 4,27, 3,28 ve 1,95 katı olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrole kıyasla ödemli kulağın normal/sağlıklı duruma dönmesi için gerekli süre, ticari ürün, F24 ve V4 gruplarında sırasıyla, 2,88, 3,10 ve 1,94 kat daha azdır.

Ticari ürünün ödem azaltma hızının yüksek olmasının, 15. dakikadaki yüksek ödem yüzdesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Ticari ürün uygulanan grupta ksilen uygulaması sonrası daha fazla ödem oluşumu gözlenmiştir. Bunun nedeninin ticari ürünün, deri lipidleri ile etkileşime girerek penetrasyonu artırdığı bilinen propilen glikolü yüksek miktarda içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Carrer, Alonso, Pont, Zanuy, Cordoba ve diğerleri, 2020). Deney başlangıcında gözlenen yüksek ödem ve ardından hızlı ödem azalması, hem ksilen hem de diklofenak sodyumun artan penetrasyonu ile ilişkili olabilir. Fucina ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer bir durum gözlemlenmiştir. Kroton yağı ile oluşturulan kulak ödemi modelinde, yüksek düzeyde propilen glikol içeren bir bazla tedavi edilen kontrol grubunda daha fazla ödem görülmüştür (Fucina, Rocha, da Silva, Hoepers, Ferreira ve diğerleri, 2016).

EAA değeri, kulak ödeminin süresi ve şiddetinin birlikte değerlendirilmesini sağlayan bir parametredir (Yuan ve diğerleri, 2024). EAA değerinin yüksek olması ödem süresi ve şiddetinin yüksek olması anlamına gelmektedir. Dolayısıyla minimum değere sahip olması istenmektedir. Ksilen uygulanan tüm grupların EAA değerinin, MN kontrol ve negatif kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Ksilen uygulanan grupların (pozitif kontrol, ticari ürün, F24 Boş, F24, V4 Boş ve V4) EAA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak F24 formülasyonunun, MN kontrole göre olan istatistiksel farkının ($p<0,05$), F24 Boş ve ticari ürünün MN kontrole göre olan istatistiksel farkından ($p<0,0001$) daha düşük olduğu gözlenmiştir. V4'ün ise, negatif kontrole göre istatistiksel farkının ($p<0,01$), V4 Boş ve ticari ürünün negatif kontrole göre olan istatistiksel farkından ($p<0,001$) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum geliştirilen F24 ve V4 formülasyonlarının, ticari ürüne göre daha fazla ödem azaltma etkisine sahip olduğunu göstermektedir. EAA parametresi açısından F24 ve V4 formülasyonları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olmasına karşın, F24'ün V4'e göre daha düşük EAA değerine sahip olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

%İnhibisyon-Zaman grafiğinde, istatistiksel olarak anlamsız bulunsada, F24 formülasyonunun uygulandığı grupta, tüm zaman noktaları için en yüksek inhibisyon gözlenmiştir ($p>0,05$). Ayrıca 60. dakikadaki %inhibisyon değerleri kıyaslandığında, V4 Boş formülasyonuna karşı anlamlı şekilde fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). V4 formülasyonunun 45 ve 60. dakikalarda ortalama %inhibisyon değerinin ticari ürün ile çok yakın olduğu görülmüştür ($p>0,05$). %İnhibisyon parametresi için F24'ün V4 ve ticari ürüne göre daha etkili olduğu, V4 ve ticari ürünün birbirine karşı üstünlük göstermediği belirlenmiştir.

Sakrifikasyon sonrası alınan kulak dokularının ağırlıkları kıyaslanmıştır. Ticari ürünün uygulandığı gruptaki kulak ağırlıkları ile MN kontrol ve negatif kontrol gruplarındaki kulakların ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken ($p<0,05$), F24'ün MN kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde, V4 ile negatif kontrol arasında anlamlı bir fark oluşmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). F24, ticari ürün ve V4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız olmasına karşın ($p>0,05$), ortalama olarak kulak ağırlıkları ticari ürün>F24>V4 şeklinde bulunmuştur. Bu parametre için V4, F24 ve ticari ürüne göre daha etkili bulunurken, F24 de ticari ürüne göre daha etkili bulunmuştur.

PGE2, deri dokusundaki başlıca inflamatuvar mediatörlerden birisi olup, ksilen uygulamasını takiben PGE2 seviyesinin yükseldiği bilinmektedir. PGE2, çeşitli diğer medyatörlerin etkisiyle birlikte kulak dokusunda vazodilatasyona ve şişmeye neden olmaktadır (Lim, Bak, Park, Ku, Lee ve diğerleri, 2020; K. Sun, Song, Jia, Yin, Zou ve diğerleri, 2018). İnflamatuvar yanıtın yanı sıra, deri ile ilgili meydana gelen çok sayıdaki patolojik durumda (kanser, yaşlanma, UV ışığına maruz kalma vb.) PGE2 görev almaktadır (Fuller, 2019). PGE2, COX yolağı ile sentezlenen bir mediatördür. Bu durum göz önünde bulundurularak, bir COX-2 inhibitörü olan diklofenak sodyum yüklü formülasyonların aktinik keratozdaki terapötik etkinliğinin PGE-2 düzeyi incelenerek değerlendirilebileceği düşünülmüştür (Thomas, Herranz, Cruz ve Parodi, 2019). Sakrifikasyon sonrası alınan kulak dokularında yapılan PGE2 analizi sonucunda F24, V4 ve ticari ürünün uygulandığı gruplarda, MN kontrol ve negatif kontrol gruplarına benzer PGE2 düzeyinin ölçüldüğü belirlenmiştir ($p>0,05$). Yani model oluşturulmayan gruplar ile PGE2 seviyesi benzer bulunmuştur. F24, V4 ve ticari ürünün uygulandığı gruplarda, pozitif kontrol grubuna göre PGE2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüş meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,01$). Bu parametre için

F24, V4 ve ticari ürün gruplarının birbirine karşı üstünlük kuramadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Histolojik analiz kapsamında incelenen mikrograflara göre negatif kontrol ve MN kontrol gruplarında normal histolojik düzenlenmeye uygun olarak, ince, çok katlı ve yassı keratinize epitel katmanları arasında devamlılık gösteren elastik kıkırdak tabakası ve deri altı düzensiz bağ dokusu gözlenmiştir (Kawamata, Ozawa, Hashimoto, Kurose ve Shinohara, 2003). Bu düzenli yapılanma, pozitif kontrol grubunda belirgin şekilde bozulma göstermiştir. F24 Boş ve V4 Boş grupları, pozitif kontrole benzer şekilde belirgin ödemli alanlara, mononükleer hücre infiltrasyonuna ve konjestif damarlara sahiptir. Diğer gruplarda (Ticari ürün, F24 ve V4) normal histolojik düzende patolojik değişiklikler mevcut olmasına rağmen pozitif kontrole oranla skorlarda azalma izlenmiştir. Sonuç olarak, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve konjesyon skorlarına göre F24 formülasyonu, ticari ürüne benzer performans gösterirken, V4 formülasyonu daha az etkili bulunmuştur. Soliman ve diğerleri, geliştirdikleri deksketoprofen tremetamol içeren invazomların anti-inflamatuvar etkinliğini değerlendirmek için ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modeli geliştirmişlerdir. Histopatolojik incelemelerinde, pozitif kontrol gruplarında inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem ve damar konjesyonu meydana geldiğini belirtmişlerdir. Tedavi gruplarında ise bu bulguların azaldığını bildirmişlerdir (Soliman ve diğerleri, 2023). Tez çalışması kapsamında yapılan histolojik incelemelerin sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Yüksek varyasyon nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiş olsa da, tüm değerlendirmelerde F24 Boş grubunun pozitif kontrole göre ödemi ve ilişkili parametreleri azalttığını gösteren verilerin bulunması dikkat çekicidir. Benzer şekilde MN kontrol grubunun negatif kontrolden daha düşük kulak kalınlığı ve ağırlığına sahip olduğu durumlar da söz konusudur. Benzer sonuçlara literatürde de rastlamak mümkündür. Lee ve diğerleri mikroigneelerin sıçan kulağına uygulanmasının ödem oluşumunu tetikleyip tetiklemediğini incelemişlerdir. Deney sonunda kulak kalınlığının başlangıç noktasının altına indiği gözlenmişlerdir. Mikroignelemenin deney sonrasında herhangi bir iltihaplanma, ödem veya anatomik değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir (B. M. Lee ve diğerleri, 2020). Bu durumun, literatürde “hormesis fenomeni” olarak isimlendirilen olay ile benzerlik gösterdiği düşünülmüştür. Mikroignelemenin, kulak derisinde mikro yaralanmalara neden olarak ön koşullandırma sağlayacağı, böylece ksilen ile ödem oluşumunun inflamatuvar etkisini

azaltmış olabileceği değerlendirilmiştir (Xu, Takashi, Liang, Chen, Yuan ve Fan, 2022; Yang, Liu, Xu, Ma ve Zhou, 2021).

Ex vivo çalışmalarda, F24'ün ticari ürün ve V4 formülasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın, deride daha az miktarda diklofenak sodyum birikimi sağladığı görülmüştür ($p>0,05$) (Bkz. Bölüm 4.11.). Ancak in vivo çalışmalarda, F24'ün V4 formülasyonuna göre birçok parametrede daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun, diklofenak sodyumun yanında hyaluronik asitten kaynaklanan anti-inflamatuvar etkinlik nedeniyle de görülebileceği düşünülmüştür. Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin, toll-benzeri reseptör-4 (TLR-4) ile etkileşerek anti-inflamatuvar etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Yoon, Kim, Ahn, Choi, Kim ve diğerleri, 2019). Ayrıca düşük molekül ağırlıklı hyaluronik asitin, farklı durumlarda inflamasyonu tetiklediği ya da baskıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Salathia, Gigliobianco, Casadidio, Di Martino ve Censi, 2023). Bu durum aynı zamanda, etkin madde içermeyen F24 formülasyonunun uygulandığı F24 Boş grubunda görülen düşük ödemin nedenini açıklayabilir.

İn vivo çalışmalarda, herbir parametre için saptanan standart sapma değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum istatistiksel farklılığın saptanmasını ve sağlıklı bir kıyaslama yapılmasını zorlaştırmıştır. Fizyolojik koşulların yanında, etik kaygılar dolayısıyla kullanılan hayvan sayısının sınırlı olmasının bu duruma neden olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda, daha doğru sonuçlar ve sağlıklı kıyaslamaların yapılmasına olanak vereceği düşünülen aktinik keratoz hayvan modeli, fiziksel ve finansal kısıtlamalar nedeniyle bu tez çalışması kapsamında oluşturulamamıştır. Yine de, akut cilt inflamasyonu modeli olan ksilen ile indüklenmiş kulak ödemi modeli, tez çalışması kapsamında geliştirilen formülasyonların kıyaslanabilmesi için yeterli veriyi sağlamıştır. Daha kesin bir sonuca varılabilmesi için hastalık modeli üzerinde çalışılması ve hayvan sayısının artırılması gerekli olacaktır.

Tüm sonuçlar dikkate alındığında, V4 formülasyonunun EAA ve kulak ağırlığı parametrelerinde, F24 formülasyonunun EAA, kulak ağırlığı ve %İnhibisyon parametrelerinde ticari ürüne göre üstünlüklerinin olduğu gözlenmiştir. F24 ve V4 kıyaslandığında F24, ödem azalma hızı, EAA, %inhibisyon, infiltrasyon skoru, ödem skoru ve konjesyon skorunda daha başarılı performansa sahipken; V4 sadece kulak ağırlığı parametresinde daha etkili bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında geliştirilen hem

mikroiğne hem de esnek veziküler sistem formülasyonlarının, aktinik keratoz tedavisinde klinik olarak kullanımı bulunan ticari jel preparatı ile benzer/daha yüksek etkinlik gösterme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, aktinik keratoz tedavisinde kullanılmak üzere diklofenak sodyum içeren polimerik mikroigne formülasyonu ve esnek veziküler sistem formülasyonu geliştirilmiştir. Etkin madde ve formülasyonların karakterizasyon, optimum formülasyonların in vitro salım, ex vivo deriden geçiş ve birikim, hücre kültürü çalışmalarına ve in vivo çalışmalara ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Diklofenak sodyumun 25°C için distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarındaki çözünürlüğü sırasıyla $18,98 \pm 0,17$ ve $9,24 \pm 0,14$ mg/mL olarak bulunmuştur. 37°C için pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki çözünürlüğü ise $14,50 \pm 1,31$ mg/mL olarak bulunmuştur. Buna göre in vitro salım çalışmalarında sink koşulun sağlandığı belirlenmiştir. Katı haldeki etkin madde, 80°C’de 24 saat boyunca stabilitesini korumuştur.
- Diklofenak sodyumun HPLC için distile su, pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamlarında; UV-Visible spektrofotometre için distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında analiz yöntemleri geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Etkin maddenin, 4, 25 ve 40°C’de pH 7,4 fosfat tamponu ve distile su ortamlarında 72 saat boyunca stabil kaldığı gözlenmiştir.
- Mikroigne formülasyonlarının üretimi için kalıp tasarımı gerçekleştirilmiş, yaklaşık 500 µm yükseklik ve 250 µm taban çapına sahip silikon mikroigne kalıpları üretilmiştir.
- Yapılan tüm çalışmalar sonucunda mikroigne formülasyonlarından %20 Gantrez S97, %1,125 PEG1500, %1 hyaluronik asit, %0,1 polikarbofil ve %0,35 diklofenak sodyum içeren F24 formülasyonu seçilmiştir. Esnek veziküler sistem formülasyonlarından 125 mg Lipoid S100, 62,5 mg kolesterol, 30 mg Transcutol CG ve 20 mg diklofenak sodyum içeren V4 formülasyonu seçilmiştir.
- Optimum mikroigne formülasyonları üzerinde polimer karışımlarının viskozitesi, polimer karışımlarının PDMS ile yaptığı temas açısı, DSC, FTIR, şişme indeksi, mekanik dayanıklılık, etkin madde miktar tayini, morfolojik inceleme ve deriyi delebilmeye karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. F24’ün polimer karışımının psödoplastik akış gösterdiği ($n < 0,5$ ve $K = 31210 \text{ (dyn.sn/cm}^2\text{)}^n$) ve PDMS’yi ıslatabildiği ($70,22 \pm 10,36^\circ$) belirlenmiştir. DSC ve FTIR çalışmalarında, etkin madde ile yardımcı maddelerin geçimsizlik göstermediği belirlenmiştir. Çapraz bağlama işlemi sonrası

mikroiğnelerde meydana gelen kimyasal değişimler FTIR ile tespit edilmiştir. F24'ün deriyi delebilecek mekanik dayanıklılığa sahip olduğu ($4,17 \pm 0,86$ N/iğne) ve şişme indeksinin $\%1220 \pm 99$ olduğu belirlenmiştir. Morfolojik incelemede mikroiğne formülasyonlarının istenilen boyutlara ($445,3 \pm 27,4$ µm yükseklik ve $238,9 \pm 15,6$ µm taban çapı) sahip olduğu belirlenmiştir. F24'ün, sıçan derisini yaklaşık 300 µm derinliğe kadar delebildiği gözlenmiştir.

- Beher yöntemine göre in vitro salım çalışmalarında etkin madde salım hızının çapraz bağlama seviyesi ile doğrusal olarak azaldığı belirlenmiştir. F24'ten salımın 4 saatte tamamlandığı ve salım hız sabitinin $14,9 \text{ \%}/\text{Ln}(\text{dk})$ olduğu belirlenmiştir. Franz yönteminde, F24'ten salım hız sabitleri ilk 2 saat için $0,91 \text{ \%}/\text{Ln}(\text{dk})$, 2-24. Saat arası için $0,0017 \text{ \%}/\text{dk}$ olarak bulunmuştur. Etkin madde salımının 2. saate kadar şişme kontrollü, 2. saatten sonra ise sabit yüzey alanından difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. F24 formülasyonundan 24 saatin sonunda yaklaşık %5 etkin madde salımı gerçekleşmiştir.
- Optimum esnek veziküler sistem formülasyonları üzerinde DSC, FTIR, etkin madde miktar tayini, kesecik boyutu, PDI, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği, viskozite, morfolojik analiz ve deformasyon katsayısı analizleri gerçekleştirilmiştir. V4 formülasyonunun kesecik boyutu $99,8 \pm 2,2$ nm, PDI değeri $0,182 \pm 0,008$ 'in altında, zeta potansiyel değeri $-27,20 \pm 0,44$ mV'nin altında ve enkapsülasyon etkinlikleri $71,00 \pm 0,66$ bulunmuştur. DSC ve FTIR çalışmalarında, etkin madde ve yardımcı maddelerin geçimsizlik göstermediği belirlenmiştir. V4 formülasyonunun psödoplastik akış gösterdiği belirlenmiştir ($n < 0,5$ ve $K = 6691 \text{ (dyn.sn/cm}^2\text{)}^n$). Morfolojik analizde V4 formülasyonunun yuvarlak şekle sahip olduğu belirlenmiştir. V4'ün deformasyon katsayısı $30,41 \pm 1,71$ µL/dk olarak belirlenmiştir.
- İn vitro salım çalışmalarında V4 formülasyonu 24 saatte yaklaşık %60 etkin madde salımı gerçekleştirmiştir.
- HaCaT hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında optimum mikroiğne ve esnek veziküler sistem formülasyonlarının %70'ten fazla hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir. Formülasyonların sitotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır.
- Ex vivo deriden geçiş ve deride birikim çalışmalarında, F24'ün yüzde dokuda kalan ve permeabilite katsayısı değerleri sırasıyla $\%17,7 \pm 3,7$ ve $0,029 \pm 0,013$ cm/saat olarak bulunmuştur. V4'ün yüzde dokuda kalan ve permeabilite katsayısı değerleri ise sırasıyla

$40,7 \pm 5,2$ ve $0,140 \pm 0,108$ cm/saat olarak bulunmuştur. Ticari jel preparatı için bu değerler $35,3 \pm 23,2$ ve $0,124 \pm 0,082$ cm/saat olarak belirlenmiştir.

- Stabilité çalışmaları kapsamında, F24 formülasyonunun 5, 25 ve 40°C’de etkin madde miktarını, şişme indeksini, mekanik dayanıklılığını ve morfolojik özelliklerini 6 ay boyunca koruyabildiği belirlenmiştir. V4 formülasyonunun ise 5°C’de etkin madde miktarı, kesecik boyutu, PDI, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerlerini 3 aya kadar koruyabildiği belirlenmiştir.
- İn vivo çalışmalarda F24, V4, ticari ürün ve boş formülasyonların ödem azaltma kapasiteleri çeşitli parametreler ile değerlendirilmiştir. V4 formülasyonunun EAA ve kulak ağırlığı parametrelerinde, F24 formülasyonunun ise EAA, kulak ağırlığı ve %inhibisyon parametrelerinde ticari ürüne göre üstünlüklerinin olduğu gözlenmiştir. F24 ve V4 kıyaslandığında F24, ödem azalma hızı, EAA, %inhibisyon, infiltrasyon skoru, ödem skoru ve konjesyon skorunda daha başarılı performansa sahipken; V4 sadece kulak ağırlığı parametresinde daha etkili bulunmuştur. Değerlendirilen parametrelerde en iyi performansa sahip olan formülasyon “✓” işareti ile gösterilmiştir.

Gruplar	EAA (mm.dk)	Ödem İnhibisyonu (%)	Kulak Ağırlığı (mg)	PGE2 (ng/L)	İnfiltrasyon Skoru	Ödem Skoru	Konjesyon Skoru
Ticari Ürün						✓	✓
F24	✓	✓			✓		
V4			✓	✓	✓		

Tez çalışması kapsamında geliştirilen F24 kodlu mikroiğne ve V4 kodlu esnek veziküler sistem formülasyonlarının, aktinik keratoz tedavisinde klinik olarak kullanımı bulunan ticari jel preparatı ile benzer/daha yüksek etkinlik gösterme olasılığına sahip oldukları belirlenmiştir. Mikroiğne formülasyonlarına ait çalışmalar derlenerek, “Development and optimization of hydrogel-forming microneedles fabricated with 3d-printed molds for enhanced dermal diclofenac sodium delivery: a comprehensive in vitro, ex vivo, and in vivo study” başlığı ile araştırma makalesi olarak yayınlanmış ve literatüre katkı sağlanmıştır (Tunçel ve diğerleri, 2024).

Tez çalışması kapsamında gözlenen bazı problemler ve çözüm önerileri aşağıda sıralanmıştır:

- Hidrojel oluşturuıcı mikroiğnelerde, çözünebilir mikroiğnelere göre daha yüksek yükleme kapasitesi olmasına karşın, interstisyel sıvının difüzyonunun çok yavaş olması nedeni ile salınan miktar düşük olabilmektedir. Dolayısıyla, potent maddelerin yüklenmesi önerilmektedir.
- Mikroiğne formülasyonlarının üretilmesi için fazla sayıda polimer kullanımı etkin madde çözünürlüğünü olumsuz etkileyebilmektedir. Etkin maddenin çözünmüş halde olmaması, formülasyon homojenliğini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle az sayıda polimer kullanımı önerilmektedir.
- Veziküler sistem formülasyonlarında, kesecik yapısı ve boyutunun değiştirilmesi için ekstrüzyon yöntemi, sonikasyona göre daha homojen sonuçlar sağlamaktadır. Ancak ekstrüzyon işlemi zor ve zaman alıcı bir işlemdir. Bu nedenle sonikasyon işlemi ile olabilecek en homojen ve küçük boyuta sahip keseciklerin elde edilmesi, sonrasında ekstrüzyon yapılması önerilmektedir.
- Ex vivo deriden geçiş ve deride kalan etkin madde çalışmalarında yüksek varyasyon gözlenmiştir. Bu durumun, tek bir sıçandan alınan derinin tüm ex vivo çalışmalar için yeterli olmaması nedeni ile farklı hayvanlardan alınan deri dokularının kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Deri dokularının alındığı hayvanlar başka bir çalışmanın negatif kontrol grubuna aittir. Bu nedenle hayvanların ağırlık, yaş ve deri dokusunun durumu konusunda yeterli kontrol sağlanamamıştır. Bu varyasyonun önüne geçmek için, tek bir hayvana ait deri dokusu kullanılmalıdır. Doku büyüklüğünün yeterli olmaması durumunda ise deri dokusu kullanılacak hayvanların ağırlık, yaş ve deri durumlarının aynı olmasına dikkat edilmesi önerilmektedir.
- Mikroiğne formülasyonlarının primer ambalajlanması için cepli blisterlerin kullanımı önerilmektedir. Cep boyutları, mikroiğne formülasyonunun tabanına yapışık halde bulunan adhezif bantın dahil olduğu alan kadar olmalıdır. Plastik ve alüminyumdan meydana gelen blisterlerdeki ceplere mikroiğnelerin yerleştirilmesi ile mekanik kuvvet, nem gibi faktörlerden minimum düzeyde etkilenmesi sağlanabilir. Sekonder ambalaj için karton kutu gibi opak materyallerin kullanımı söz konusu olabilir.
- Dermal amaçlı kullanılan ve sıvı formda bulunan esnek veziküler sistemler için primer ambalajın damlalıklı bir cam şişenin kullanılması önerilmektedir. Formülasyon viskozitesinin düşük olması nedeni ile damlalık kullanılması, hasta tarafından

uygulamayı kolaylaştırır. Sekonder ambalaj için karton kutu gibi opak materyallerin kullanımı söz konusu olabilir.





KAYNAKLAR

- Abdellatif, A. A. and Tawfeek, H. M. (2016). Transfersomal nanoparticles for enhanced transdermal delivery of clindamycin. *AAPS Pharmscitech*, 17, 1067-1074.
- Abu-Huwaij, R., Alkarawi, A., Salman, D., and Alkarawi, F. (2023). Exploring the use of niosomes in cosmetics for efficient dermal drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 28(7), 708-718.
- Adeyeye, C. M. and Li, P.-K. (1990). Diclofenac sodium. In *Analytical profiles of drug substances*. Elsevier, pp. 123-144.
- Ahuja, M., Dhake, A. S., Sharma, S. K., and Majumdar, D. K. (2009). Stability studies on aqueous and oily ophthalmic solutions of diclofenac. *Yakugaku Zasshi*, 129(4), 495-502.
- Aielo, P. B., Borges, F. A., Romeira, K. M., Miranda, M. C. R., Arruda, L. B. d., L Filho, P. N., Drago, B. d. C., and Herculano, R. D. (2014). Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. *Materials Research*, 17, 146-152.
- Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Hashemi, S. M. H., Babaei, A., Eghbali, M., Mohammadi, M., Rostamkalaei, S. S., Asare-Addo, K., and Nokhodchi, A. (2022). Innovative topical niosomal gel formulation containing diclofenac sodium (niofenac). *Journal of Drug Targeting*, 30(1), 108-117.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., and Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
- Akomeah, F., Nazir, T., Martin, G. P., and Brown, M. B. (2004). Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(2-3), 337-345.
- Al-Hamadani, M. H. and Al-Edresi, S. (2022). Formulation and characterization of hydrogel of proniosomes loaded diclofenac sodium. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 12(1), 132-136.
- Al-Nimry, S. S. and Daghmash, R. M. (2023). Three dimensional printing and its applications focusing on microneedles for drug delivery. *Pharmaceutics*, 15(6), 1597.
- Al-Obaidi, Z. M. J., Mohammed, H. R., and Al, A. A. E. (2018). The employment of standard addition method for the UV spectrophotometric assay of diclofenac alkaline salts in variant pharmaceutical dosage forms. *Journal of Global Pharma Technology*, 10(11s), 377-338.

- Alam, P., Imran, M., Gupta, D. K., and Akhtar, A. (2023). Formulation of transliposomal nanocarrier gel containing strychnine for the effective management of skin cancer. *Gels*, 9(10), 831.
- Aldawood, F. K., Andar, A., and Desai, S. (2021). A comprehensive review of microneedles: types, materials, processes, characterizations and applications. *Polymers (Basel)*, 13(16), 2815.
- Alrbyawi, H., Boddu, S. H. S., Poudel, I., Annaji, M., Mita, N., Arnold, R. D., Tiwari, A. K., and Babu, R. J. (2022). Cardiolipin for enhanced cellular uptake and cytotoxicity of thermosensitive liposome-encapsulated daunorubicin toward breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11763.
- Alyami, H., Abdelaziz, K., Dahmash, E. Z., and Iyire, A. (2020). Nonionic surfactant vesicles (niosomes) for ocular drug delivery: development, evaluation and toxicological profiling. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102069.
- Amasya, G., Aksu, B., Badilli, U., Onay-Besikci, A., and Tarimci, N. (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 563, 110-121.
- Andra, V., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L., and Ruddaraju, L. K. (2022). A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. *Bionanoscience*, 12(1), 274-291.
- Anyasor, G. N. and Ijituyi, O. H. (2018). Formulated hexane fraction of *Costus afer* leaves balm suppressed xylene induced topical inflammation in rat model. *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7(2), 54-60.
- Arany, P., Papp, I., Zichar, M., Csontos, M., Elek, J., Regdon, G., Jr., Budai, I., Beres, M., Gesztelyi, R., Feher, P., Ujhelyi, Z., Vasvari, G., Haimhoffer, A., Fenyvesi, F., Varadi, J., Miklos, V., and Bacskey, I. (2020). In vitro tests of fdm 3d-printed diclofenac sodium-containing implants. *Molecules*, 25(24), 5889.
- Arcuri, D., Ramchatesingh, B., Lagace, F., Iannattone, L., Netchiporouk, E., Lefrancois, P., and Litvinov, I. V. (2023). Pharmacological agents used in the prevention and treatment of actinic keratosis: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4989.
- Aslan, M., Ozturk, S., Shahbazi, R., Bozdemir, Ö., Zeybek, N. D., Vargel, İ., Eroğlu, İ., and Ulubayram, K. (2024). Therapeutic targeting of siRNA/anti-cancer drug delivery system for non-melanoma skin cancer. Part I: Development and gene silencing of JAK1siRNA/5-FU loaded liposome nanocomplexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 203, 114432.

- Avadhani, K. S., Manikkath, J., Tiwari, M., Chandrasekhar, M., Godavarthi, A., Vidya, S. M., Hariharapura, R. C., Kalthur, G., Udupa, N., and Mutalik, S. (2017). Skin delivery of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage. *Drug Delivery*, 24(1), 61-74.
- Babaie, S., Bakhshayesh, A. R. D., Ha, J. W., Hamishehkar, H., and Kim, K. H. (2020). Invasome: a novel nanocarrier for transdermal drug delivery. *Nanomaterials (Basel)*, 10(2), 341.
- Badhe, R. V., Adkine, D., and Godse, A. (2021). Development of polylactic acid and bovine serum albumin-layered-coated chitosan microneedles using novel bees wax mould. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3), 367-375.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., and Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257-262.
- Benfeldt, E. (2012). Skin and transdermal drug delivery: advantages and challenges. In *Microdialysis in Drug Development*. Springer, pp. 127-142.
- Benson, H. A. E., Grice, J. E., Mohammed, Y., Namjoshi, S., and Roberts, M. S. (2019). Topical and transdermal drug delivery: from simple potions to smart technologies. *Current Drug Delivery*, 16(5), 444-460.
- Berman, B. and Cockerell, C. J. (2013). Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(1), S10-S19.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release*, 235, 337-351.
- Bhuvaneswari, S. S. and Kumudha, D. (2024). Enhancing the absorption of rutin and effective cancer management through hyaluronic acid functionalized nanoparticles. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 16(4), 208-217.
- Birchall, J., Coulman, S., Pearton, M., Allender, C., Brain, K., Anstey, A., Gateley, C., Wilke, N., and Morrissey, A. (2005). Cutaneous DNA delivery and gene expression in ex vivo human skin explants via wet-etch micro-fabricated micro-needles. *Journal of Drug Targeting*, 13(7), 415-421.
- Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., and Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231-242.

- Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., and Akomeah, F. K. (2006). Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Delivery*, 13(3), 175-187.
- Brunner, M., Dehghanyar, P., Seigfried, B., Martin, W., Menke, G., and Muller, M. (2005). Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 60(5), 573-577.
- Bucci, R., Magri, A., and Magri, A. (1998). Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 362, 577-582.
- Caccavo, D. (2019). An overview on the mathematical modeling of hydrogels' behavior for drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 175-190.
- Caló, E., Barros, J., Ballamy, L., and Khutoryanskiy, V. V. (2016). Poly (vinyl alcohol)–Gantrez® AN cryogels for wound care applications. *RSC advances*, 6(107), 105487-105494.
- Carcamo-Martinez, A., Dominguez-Robles, J., Mallon, B., Raman, M. T., Cordeiro, A. S., Bell, S. E. J., Larraneta, E., and Donnelly, R. F. (2020). Potential of polymeric films loaded with gold nanorods for local hyperthermia applications. *Nanomaterials (Basel)*, 10(3), 582.
- Carcamo-Martinez, A., Mallon, B., Dominguez-Robles, J., Vora, L. K., Anjani, Q. K., and Donnelly, R. F. (2021). Hollow microneedles: a perspective in biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 599, 120455.
- Carrer, V., Alonso, C., Pont, M., Zanuy, M., Cordoba, M., Espinosa, S., Barba, C., Oliver, M. A., Marti, M., and Coderch, L. (2020). Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Archives of Dermatological Research*, 312(5), 337-352.
- Chacko, I. A., Ghate, V. M., Dsouza, L., and Lewis, S. A. (2020). Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195, 111262.
- Chang, W.-H., Liu, P.-Y., Lin, M.-H., Lu, C.-J., Chou, H.-Y., Nian, C.-Y., Jiang, Y.-T., and Hsu, Y.-H. H. (2021). Applications of hyaluronic acid in ophthalmology and contact lenses. *Molecules*, 26(9), 2485.
- Chaves, P., Garrido, M., Oliver, J., Perez-Ruiz, E., Barragan, I., and Rueda-Dominguez, A. (2023). Preclinical models in head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 128(10), 1819-1827.

- Chen, B. Z., Ashfaq, M., Zhang, X. P., Zhang, J. N., and Guo, X. D. (2018). In vitro and in vivo assessment of polymer microneedles for controlled transdermal drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 26(8), 720-729.
- Chen, K., Chen, X., Han, X., and Fu, Y. (2020). A comparison study on the release kinetics and mechanism of bovine serum albumin and nanoencapsulated albumin from hydrogel networks. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1291-1300.
- Chen, Y., Zhang, X., Li, S., An, D., Liang, H., Li, B., and Li, J. (2024). Effect of water-induced changes in molecular structure and vapor pressure on the heterogeneous hygrothermal degradation of konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 150, 109651.
- Chetty, P., Choi, F., and Mitchell, T. (2015). Primary care review of actinic keratosis and its therapeutic options: a global perspective. *Dermatology and Therapy*, 5(1), 19-35.
- Chiou, W. L. (1996). New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 24(4), 433-442.
- Cho, N. J., Hwang, L. Y., Solandt, J. J. R., and Frank, C. W. (2013). Comparison of extruded and sonicated vesicles for planar bilayer self-assembly. *Materials (Basel)*, 6(8), 3294-3308.
- Choi, S., Kang, B., Yang, E., Kim, K., Kwak, M. K., Chang, P. S., and Jung, H. S. (2023). Precise control of liposome size using characteristic time depends on solvent type and membrane properties. *Scientific Reports*, 13(1), 4728.
- Ciernik, I. F., Krayenbuhl, B. H., and Carbone, D. P. (1996). Puncture-mediated gene transfer to the skin. *Human Gene Therapy*, 7(8), 893-899.
- Cilurzo, F., Vistoli, G., Gennari, C. G., Selmin, F., Gardoni, F., Franze, S., Campisi, M., and Minghetti, P. (2014). The role of the conformational profile of polysaccharides on skin penetration: the case of hyaluronan and its sulfates. *Chemistry & Biodiversity*, 11(4), 551-561.
- Colpo, J. C., Pigatto, C., Brizuela, N., Aragón, J., and dos Santos, L. A. (2018). Antibiotic and anesthetic drug release from double-setting α -TCP cements. *Journal of materials science*, 53(10), 7112-7124.
- Cordeiro, A. S., Tekko, I. A., Jomaa, M. H., Vora, L., McAlister, E., Volpe-Zanutto, F., Nethery, M., Baine, P. T., Mitchell, N., McNeill, D. W., and Donnelly, R. F. (2020). Two-Photon polymerisation 3d printing of microneedle array templates with versatile designs: application in the development of polymeric drug delivery systems. *Pharmaceutical Research*, 37(9), 174.

- Cordery, S. F., Pensado, A., Chiu, W. S., Shehab, M. Z., Bunge, A. L., Delgado-Charro, M. B., and Guy, R. H. (2017). Topical bioavailability of diclofenac from locally-acting, dermatological formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1-2), 55-64.
- Corsaro, C., Neri, G., Mezzasalma, A. M., and Fazio, E. (2021). Weibull modeling of controlled drug release from ag-pma nanosystems. *Polymers (Basel)*, 13(17), 2897.
- Cui, F., Zhang, L., Zheng, J., and Kawashima, Y. (2004). A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14(6), 435-439.
- Cwiernia, B. (2013). Effect of water soluble carrier on dissolution profiles of diclofenac sodium. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(4), 721-726.
- Cwiernia, B., Hladon, T., and Stobiecki, M. (1999). Stability of diclofenac sodium in the inclusion complex with beta-cyclodextrin in the solid state. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(11), 1213-1218.
- Dathathri, E., Lal, S., Mittal, M., Thakur, G., and De, S. (2020). Fabrication of low-cost composite polymer-based micro needle patch for transdermal drug delivery. *Applied Nanoscience*, 10, 371-377.
- Davidson, A., Al-Qallaf, B., and Das, D. B. (2008). Transdermal drug delivery by coated microneedles: Geometry effects on effective skin thickness and drug permeability. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(11), 1196-1206.
- De Martino, S., Battisti, M., Napolitano, F., Palladino, A., Serpico, L., Amendola, E., Martone, A., De Girolamo, P., Squillace, A., Dardano, P., De Stefano, L., and Dello Iacono, S. (2022). Effect of microneedles shape on skin penetration and transdermal drug administration. *Biomaterials Advances*, 142, 213169.
- de Oliveira, E. C., da Motta, V. R., Pantoja, P. C., Ilha, C. S. d. O., Magalhaes, R. F., Galadari, H., and Leonardi, G. R. (2019). Actinic keratosis—review for clinical practice. *International journal of dermatology*, 58(4), 400-407.
- de Oliveira, M. C., Rosilio, V., Lesieur, P., Bourgaux, C., Couvreur, P., Ollivon, M., and Dubernet, C. (2000). pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. *Biophysical chemistry*, 87(2-3), 127-137.
- Dianzani, C., Conforti, C., Giuffrida, R., Corneli, P., di Meo, N., Farinazzo, E., Moret, A., Magaton Rizzi, G., and Zalaudek, I. (2020). Current therapies for actinic keratosis. *International Journal of Dermatology*, 59(6), 677-684.
- Dodds, A., Chia, A., and Shumack, S. (2014). Actinic keratosis: rationale and management. *Dermatology and Therapy*, 4(1), 11-31.

- Donnelly, R. F., Majithiya, R., Singh, T. R., Morrow, D. I., Garland, M. J., Demir, Y. K., Migalska, K., Ryan, E., Gillen, D., Scott, C. J., and Woolfson, A. D. (2011). Design, optimization and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. *Pharmaceutical Research*, 28(1), 41-57.
- Donnelly, R. F., McCrudden, M. T., Zaid Alkilani, A., Larrañeta, E., McAlister, E., Courtenay, A. J., Kearney, M.-C., Singh, T. R. R., McCarthy, H. O., and Kett, V. L. (2014). Hydrogel-forming microneedles prepared from “super swelling” polymers combined with lyophilised wafers for transdermal drug delivery. *Plos one*, 9(10), e111547.
- Donnelly, R. F., Pascuet, E., Ma, C., and Vaillancourt, R. (2010). Stability of diclofenac sodium oral suspensions packaged in amber polyvinyl chloride bottles. *Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 63(1), 25-30.
- Dragicevic, N., Atkinson, J. P., and Maibach, H. I. (2015). Chemical penetration enhancers: classification and mode of action. In *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: modification of the stratum corneum*. Springer, pp. 11-27.
- Economidou, S. N., Lamprou, D. A., and Douroumis, D. (2018). 3D printing applications for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(2), 415-424.
- Ekiz, Ö. (2016). Epitelyal Prekanseröz Lezyonlar/Epithelial Precancerous Lesions. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, 7(28), 46-55.
- El-Sayed, N., Vaut, L., and Schneider, M. (2020). Customized fast-separable microneedles prepared with the aid of 3D printing for nanoparticle delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154, 166-174.
- Elias, P. M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(2), 183-200.
- Elmets, C. A., Ledet, J. J., and Athar, M. (2014). Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(10), 2497-2502.
- Elzoghby, A. O., Mostafa, S. K., Helmy, M. W., ElDemellawy, M. A., and Sheweita, S. A. (2017). Multi-reservoir phospholipid shell encapsulating protamine nanocapsules for co-delivery of letrozole and celecoxib in breast cancer therapy. *Pharmaceutical Research*, 34(9), 1956-1969.
- Farooq, M. A., Xinyu, H., Jabeen, A., Ahsan, A., Seidu, T. A., Kutoka, P. T., and Wang, B. (2021). Enhanced cellular uptake and cytotoxicity of vorinostat through encapsulation in TPGS-modified liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199, 111523.

- Fecker, L. F., Stockfleth, E., Braun, F. K., Rodust, P. M., Schwarz, C., Kohler, A., Leverkus, M., and Eberle, J. (2010). Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(8), 2098-2109.
- Fecker, L. F., Stockfleth, E., Nindl, I., Ulrich, C., Forschner, T., and Eberle, J. (2007). The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *British Journal of Dermatology*, 156 Suppl 3(s3), 25-33.
- Feng, X., Li, G. Y., Ramier, A., Eltony, A. M., and Yun, S. H. (2022). In vivo stiffness measurement of epidermis, dermis, and hypodermis using broadband Rayleigh-wave optical coherence elastography. *Acta Biomaterialia*, 146, 295-305.
- Fernandez Figueras, M. T. (2017). From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31 Suppl 2, 5-7.
- Ferreira, S. L., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., da Silva, E. G., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., and dos Santos, W. N. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
- Franken, L. E., Boekema, E. J., and Stuart, M. C. (2017). Transmission electron microscopy as a tool for the characterization of soft materials: application and interpretation. *Advanced Science*, 4(5), 1600476.
- Franzé, S., Marengo, A., Stella, B., Minghetti, P., Arpicco, S., and Cilurzo, F. (2018). Hyaluronan-decorated liposomes as drug delivery systems for cutaneous administration. *International journal of pharmaceutics*, 535(1-2), 333-339.
- Fucina, G., Rocha, L. W., da Silva, G. F., Hoepers, S. M., Ferreira, F. P., Guaratini, T., Cechinel Filho, V., Lucinda-Silva, R. M., Quintao, N. L., and Bresolin, T. M. (2016). Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2465-2474.
- Fuller, B. (2019). Role of PGE-2 and other inflammatory mediators in skin aging and their inhibition by topical natural anti-inflammatories. *Cosmetics*, 6(1), 6.
- Gaikwad, S. S., Zanje, A. L., and Somwanshi, J. D. (2024). Advancements in transdermal drug delivery: A comprehensive review of physical penetration enhancement techniques. *International Journal of Pharmaceutics*, 652, 123856.
- Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715-1731.

- Gaviria Agudelo, C. and Restrepo, L. M. (2022). Human skin cancer: an overview of animal, ex vivo, and in vitro models. *Current Dermatology Reports*, 11(3), 168-177.
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., and Meyerholz, D. K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary Pathology*, 50(6), 1007-1015.
- Gittard, S. D., Chen, B., Xu, H., Ovsianikov, A., Chichkov, B. N., Monteiro-Riviere, N. A., and Narayan, R. J. (2013). The effects of geometry on skin penetration and failure of polymer microneedles. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 27(3), 227-243.
- Golomb, G., Fisher, P., and Rahamim, E. (1990). The relationship between drug release rate, particle size and swelling of silicone matrices. *Journal of controlled release*, 12(2), 121-132.
- Goycoolea, F. M., Heras, A., Aranaz, I., Galed, G., Fernández-Valle, M. E., and Argüelles-Monal, W. (2003). Effect of chemical crosslinking on the swelling and shrinking properties of thermal and pH-responsive chitosan hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 612-619.
- Gregoriadis, G. and Davis, C. (1979). Stability of liposomes invivo and invitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 89(4), 1287-1293.
- Guillot, A. J., Martínez-Navarrete, M., Garrigues, T. M., and Melero, A. (2023). Skin drug delivery using lipid vesicles: A starting guideline for their development. *Journal of controlled release*, 355, 624-654.
- Gulati, M., Grover, M., Singh, M., and Singh, S. (1998). Study of azathioprine encapsulation into liposomes. *Journal of microencapsulation*, 15(4), 485-494.
- Hadley, G., Derry, S., and Moore, R. A. (2006). Imiquimod for actinic keratosis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6), 1251-1255.
- Hamman, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine drugs*, 8(4), 1305-1322.
- Han, M., Hyun, D.-H., Park, H.-H., Lee, S. S., Kim, C.-H., and Kim, C. (2007). A novel fabrication process for out-of-plane microneedle sheets of biocompatible polymer. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(6), 1184.
- Hao, Y., Chen, Y., He, X., Yang, F., Han, R., Yang, C., Li, W., and Qian, Z. (2020). Near-infrared responsive 5-fluorouracil and indocyanine green loaded MPEG-PCL nanoparticle integrated with dissolvable microneedle for skin cancer therapy. *Bioactive Materials*, 5(3), 542-552.

- Hao, Y., Li, W., Zhou, X., Yang, F., and Qian, Z. (2017). Microneedles-based transdermal drug delivery systems: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13(12), 1581-1597.
- Hasan, M., Hossain, M., Sultana, A., Shoeb, M., and Nahar, N. (2017). Evaluation of diclofenac by UV-vis spectrophotometer in some locally produced tablets. *Dhaka University Journal of Science*, 65(2), 163-165.
- Heaphy, M. R., Jr. and Ackerman, A. B. (2000). The nature of solar keratosis: a critical review in historical perspective. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(1 Pt 1), 138-150.
- Huang, S. M., Liu, S. M., Tseng, H. Y., and Chen, W. C. (2023). Effect of citric acid on swelling resistance and physicochemical properties of post-crosslinked electrospun polyvinyl alcohol fibrous membrane. *Polymers (Basel)*, 15(7), 1738.
- Ianzez, M., Fleury, L. F., Jr., Miot, H. A., and Bagatin, E. (2013). Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(4), 585-593.
- Ibarra, J., Melendres, J., Almada, M., Burboa, M. G., Taboada, P., Juárez, J., and Valdez, M. A. (2015). Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. *Materials Research Express*, 2(9), 095010.
- Ibrahim, T. M., Abdallah, M. H., El-Megrab, N. A., and El-Nahas, H. M. (2018). Upgrading of dissolution and anti-hypertensive effect of Carvedilol via two combined approaches: self-emulsification and liquisolid techniques. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(6), 873-885.
- Ijaz, U., Sohail, M., Usman Minhas, M., Khan, S., Hussain, Z., Kazi, M., Ahmed Shah, S., Mahmood, A., and Maniruzzaman, M. (2022). Biofunctional hyaluronic acid/kappa-carrageenan injectable hydrogels for improved drug delivery and wound healing. *Polymers (Basel)*, 14(3), 376.
- Indermun, S., Luttge, R., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., Modi, G., and Pillay, V. (2014). Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release*, 185, 130-138.
- Ingrole, R. S. J., Azizoglu, E., Dul, M., Birchall, J. C., Gill, H. S., and Prausnitz, M. R. (2021). Trends of microneedle technology in the scientific literature, patents, clinical trials and internet activity. *Biomaterials*, 267, 120491.
- Inoue, D., Furubayashi, T., Tanaka, A., Sakane, T., and Sugano, K. (2020). Quantitative estimation of drug permeation through nasal mucosa using in vitro membrane permeability across Calu-3 cell layers for predicting in vivo bioavailability after intranasal administration to rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 149, 145-153.

- Jadhav, S. T., Salunkhe, V. R., Bhinge, S. D., Honmane, S. M., and Jadhav, A. S. (2024). Development and evaluation of imiquimod-loaded nanoemulsion-based gel for the treatment of skin cancer. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 93.
- Jain, A. and Jain, S. K. (2016). In vitro release kinetics model fitting of liposomes: an insight. *Chemistry and Physics of Lipids*, 201, 28-40.
- Jain, A. K., Lee, C. H., and Gill, H. S. (2016). 5-Aminolevulinic acid coated microneedles for photodynamic therapy of skin tumors. *Journal of Controlled Release*, 239, 72-81.
- Jain, S., Jain, V., and Mahajan, S. (2014). Lipid based vesicular drug delivery systems. *Advances in Pharmaceutics*, 2014(1), 574673.
- Jang, D., Tang, J., Schwendeman, S. P., and Prausnitz, M. R. (2022). Effect of surface interactions on microsphere loading in dissolving microneedle patches. *ACS Applied Materials & Interfaces Journal*, 14(26), 29577-29587.
- Jansen, M. H. E., Kessels, J., Nelemans, P. J., Kouloubis, N., Arits, A., van Pelt, H. P. A., Quaedylied, P. J. F., Essers, B. A. B., Steijlen, P. M., Kelleners-Smeets, N. W. J., and Mosterd, K. (2019). Randomized trial of four treatment approaches for actinic keratosis. *The New England Journal of Medicine*, 380(10), 935-946.
- Jiao, Q., Yue, L., Zhi, L., Qi, Y., Yang, J., Zhou, C., and Jia, Y. (2022). Studies on stratum corneum metabolism: function, molecular mechanism and influencing factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(8), 3256-3264.
- Johnsen, E., Brandtzaeg, O. K., Vehus, T., Roberg-Larsen, H., Bogoeva, V., Ademi, O., Hildahl, J., Lundanes, E., and Wilson, S. R. (2016). A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120, 106-111.
- Jokinen, V., Suvanto, P., and Franssila, S. (2012). Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers. *Biomicrofluidics*, 6(1), 16501-1650110.
- Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., and Egawa, G. (2019). The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 19-30.
- Kahraman, E., Gungor, S., and Ozsoy, Y. (2017). Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(11), 967-985.
- Kaliszewski, M., Kwasny, M., Juzeniene, A., Juzenas, P., Graczyk, A., Ma, L. W., Iani, V., Mikolajewska, P., and Moan, J. (2007). Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester after storage under different conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 87(2), 67-72.

- Kapadia, W., Qin, N., Zhao, P., Phan, C. M., Haines, L., Jones, L., and Ren, C. L. (2022). Shear-thinning and temperature-dependent viscosity relationships of contemporary ocular lubricants. *Translational Vision Science and Technology*, 11(3), 1.
- Karaz, S. and Senses, E. (2023). Liposomes under shear: structure, dynamics, and drug delivery applications. *Advanced NanoBiomed Research*, 3(4), 2200101.
- Karewicz, A. (2014). Polymeric and liposomal nanocarriers for controlled drug delivery. In *Biomaterials for Bone Regeneration*. Elsevier, pp. 351-373.
- Kathuria, H., Handral, H. K., Cha, S., Nguyen, D. T. P., Cai, J., Cao, T., Wu, C., and Kang, L. (2021). Enhancement of skin delivery of drugs using proposome depends on drug lipophilicity. *Pharmaceutics*, 13(9), 1457.
- Kawamata, S., Ozawa, J., Hashimoto, M., Kurose, T., and Shinohara, H. (2003). Structure of the rat subcutaneous connective tissue in relation to its sliding mechanism. *Archives of Histology and Cytology*, 66(3), 273-279.
- Khallaf, R. A., Salem, H. F., and Abdelbary, A. (2016). 5-Fluorouracil shell-enriched solid lipid nanoparticles (SLN) for effective skin carcinoma treatment. *Drug Delivery*, 23(9), 3452-3460.
- Khan, S. U., Ullah, M., Saeed, S., Saleh, E. A. M., Kassem, A. F., Arbi, F. M., Wahab, A., Rehman, M., ur Rehman, K., and Khan, D. (2024). Nanotherapeutic approaches for transdermal drug delivery systems and their biomedical applications. *European Polymer Journal*, 112819.
- Kim, J. D., Kim, M., Yang, H., Lee, K., and Jung, H. (2013). Droplet-born air blowing: novel dissolving microneedle fabrication. *Journal of Controlled Release*, 170(3), 430-436.
- Kim, Y. C., Park, J. H., and Prausnitz, M. R. (2012). Microneedles for drug and vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), 1547-1568.
- Kincl, M., Meleh, M., Veber, M., and Vrecer, F. (2004). Study of physicochemical parameters affecting the release of diclofenac sodium from lipophilic matrix tablets. *Acta Chimica Slovenica*, 51(3), 409-425.
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., and Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Korodi, T., Bukowski, K., and Lachmann, B. (2012). Evaluation of a short stability-indicating HPLC method for diclofenac sodium gels. *Pharmazie*, 67(12), 980-983.
- Korogiannaki, M., Zhang, J., and Sheardown, H. (2017). Surface modification of model hydrogel contact lenses with hyaluronic acid via thiol-ene "click" chemistry for enhancing surface characteristics. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(4), 446-462.

- Kraisit, P., Limmatvapirat, S., Nunthanid, J., Sriamornsak, P., and Luangtana-Anan, M. (2017). Preparation and characterization of hydroxypropyl methylcellulose/polycarbophil mucoadhesive blend films using a mixture design approach. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 65(3), 284-294.
- Krieger, K. J., Bertollo, N., Dangol, M., Sheridan, J. T., Lowery, M. M., and O'Cearbhaill, E. D. (2019). Simple and customizable method for fabrication of high-aspect ratio microneedle molds using low-cost 3D printing. *Microsystems & Nanoengineering*, 5(1), 42.
- Krishnaiah, Y. S., Yang, Y., Hunt, R. L., and Khan, M. A. (2014). Cold flow of estradiol transdermal systems: influence of drug loss on the in vitro flux and drug transfer across human epidermis. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 73-80.
- Kulkarni, D., Gadade, D., Chapaitkar, N., Shelke, S., Pekamwar, S., Aher, R., Ahire, A., Avhale, M., Badgule, R., and Bansode, R. (2023). Polymeric microneedles: an emerging paradigm for advanced biomedical applications. *Scientia Pharmaceutica*, 91(2), 27.
- Kumar, S. V., Sasmal, D., and Pal, S. C. (2008). Rheological characterization and drug release studies of gum exudates of *Terminalia catappa* Linn. *AAPS Pharmscitech*, 9(3), 885-890.
- Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.-J., and Fluhr, J. (2009). The tape stripping procedure—evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 317-323.
- Lai-Cheong, J. E. and McGrath, J. A. (2013). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 41(6), 317-320.
- Larraneta, E., Henry, M., Irwin, N. J., Trotter, J., Perminova, A. A., and Donnelly, R. F. (2018). Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1194-1205.
- Larraneta, E., Lutton, R. E., Brady, A. J., Vicente-Perez, E. M., Woolfson, A. D., Thakur, R. R., and Donnelly, R. F. (2015). Microwave-assisted preparation of hydrogel-forming microneedle arrays for transdermal drug delivery applications. *Macromolecular Materials and Engineering*, 300(6), 586-595.
- Larraneta, E., Stewart, S., Fallows, S. J., Birkhauer, L. L., McCrudden, M. T., Woolfson, A. D., and Donnelly, R. F. (2016). A facile system to evaluate in vitro drug release from dissolving microneedle arrays. *International Journal of Pharmaceutics*, 497(1-2), 62-69.

- Lebwohl, M., Swanson, N., Anderson, L. L., Melgaard, A., Xu, Z., and Berman, B. (2012). Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. *The New England Journal of Medicine*, 366(11), 1010-1019.
- Lee, B. M., Lee, C., Lahiji, S. F., Jung, U. W., Chung, G., and Jung, H. (2020). Dissolving microneedles for rapid and painless local anesthesia. *Pharmaceutics*, 12(4), 366.
- Lee, K. J., Jeong, S. S., Roh, D. H., Kim, D. Y., Choi, H. K., and Lee, E. H. (2020). A practical guide to the development of microneedle systems - In clinical trials or on the market. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118778.
- Lee, S., McAuliffe, D. J., Kollias, N., Flotte, T. J., and Doukas, A. G. (2001). Permeabilization and recovery of the stratum corneum in vivo: the synergy of photomechanical waves and sodium lauryl sulfate. *Lasers in Surgery and Medicine*, 29(2), 145-150.
- Lee, W. R., Shen, S. C., Kuo-Hsien, W., Hu, C. H., and Fang, J. Y. (2003). Lasers and microdermabrasion enhance and control topical delivery of vitamin C. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(5), 1118-1125.
- Lee, W. R., Shen, S. C., Lai, H. H., Hu, C. H., and Fang, J. Y. (2001). Transdermal drug delivery enhanced and controlled by erbium:YAG laser: a comparative study of lipophilic and hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, 75(1-2), 155-166.
- Levy, E. S., Yu, J., Estevez, A., Mao, J., Liu, L., Torres, E., Leung, D., and Yen, C. W. (2021). A systematic approach for liposome and lipodisk preclinical formulation development by microfluidic technology. *AAPS Journal*, 23(6), 111.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., and Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 10(2), 81-98.
- Li, N., Wu, X., Jia, W., Zhang, M. C., Tan, F., and Zhang, J. (2012). Effect of ionization and vehicle on skin absorption and penetration of azelaic acid. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38(8), 985-994.
- Li, P.-H. and Lu, W.-C. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 53, 218-224.
- Li, R., Zhang, L., Jiang, X., Li, L., Wu, S., Yuan, X., Cheng, H., Jiang, X., and Gou, M. (2022). 3D-printed microneedle arrays for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 350, 933-948.
- Lim, H. J., Bak, S. G., Park, E. J., Ku, S. K., Lee, S., Lee, S. W., Lee, K. M., Lee, S. J., and Rho, M. C. (2020). Retrofractamide C Derived from Piper longum alleviates xylene-induced mouse ear edema and inhibits phosphorylation of ERK and NF-kappaB in LPS-induced J774A.1. *Molecules*, 25(18), 4058.

- Londoño, C. A., Rojas, J., Yarce, C. J., and Salamanca, C. H. (2019). Design of prototype formulations for in vitro dermal delivery of the natural antioxidant ferulic acid based on ethosomal colloidal systems. *Cosmetics*, 6(1), 5.
- Lopez-Pinto, J. M., Gonzalez-Rodriguez, M. L., and Rabasco, A. M. (2005). Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(1), 1-12.
- Lumpkin, E. A. and Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, 445(7130), 858-865.
- Lutton, R. E., Moore, J., Larrañeta, E., Ligett, S., Woolfson, A. D., and Donnelly, R. F. (2015). Microneedle characterisation: the need for universal acceptance criteria and GMP specifications when moving towards commercialisation. *Drug delivery and translational research*, 5, 313-331.
- Luzuriaga, M. A., Berry, D. R., Reagan, J. C., Smaldone, R. A., and Gassensmith, J. J. (2018). Biodegradable 3D printed polymer microneedles for transdermal drug delivery. *Lab on a Chip*, 18(8), 1223-1230.
- Maarouf, M., Kromenacker, B. W., Brucks, E. S., Hendricks, A., and Shi, V. Y. (2020). Reducing unpleasant side effects of topical 5-Fluorouracil treatment for actinic keratosis: a randomized controlled trial. *Dermatologic Therapy*, 31(2), 175-179.
- Mahmoud, B. S. and McConville, C. (2023). Box-behnken design of experiments of polycaprolactone nanoparticles loaded with irinotecan hydrochloride. *Pharmaceutics*, 15(4), 1271.
- Maitra, J. and Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25-31.
- Makvandi, P., Kirkby, M., Hutton, A. R. J., Shabani, M., Yiu, C. K. Y., Baghbantaraghdari, Z., Jamaledin, R., Carlotti, M., Mazzolai, B., Mattoli, V., and Donnelly, R. F. (2021). Engineering microneedle patches for improved penetration: analysis, skin models and factors affecting needle insertion. *Nanomicro Letters*, 13(1), 93.
- Mali, K., Dhawale, S., Dias, R., Dhane, N., and Ghorpade, V. (2018). Citric acid crosslinked carboxymethyl cellulose-based composite hydrogel films for drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4).
- Manca, M. L., Manconi, M., Falchi, A. M., Castangia, I., Valenti, D., Lampis, S., and Fadda, A. M. (2013). Close-packed vesicles for diclofenac skin delivery and fibroblast targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 609-617.

- Manca, M. L., Zaru, M., Manconi, M., Lai, F., Valenti, D., Sinico, C., and Fadda, A. M. (2013). Glycosomes: a new tool for effective dermal and transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 66-74.
- Manconi, M., Caddeo, C., Sinico, C., Valenti, D., Mostallino, M. C., Biggio, G., and Fadda, A. M. (2011). Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 27-35.
- Mangalathillam, S., Rejinold, N. S., Nair, A., Lakshmanan, V. K., Nair, S. V., and Jayakumar, R. (2012). Curcumin loaded chitin nanogels for skin cancer treatment via the transdermal route. *Nanoscale*, 4(1), 239-250.
- Manian, M., Jain, P., Vora, D., and Banga, A. K. (2022). Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. *Pharmaceutics*, 14(9), 1892.
- Manju, S. and Sreenivasan, K. (2011). Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 318-325.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Abedi-Gaballu, F., Abbaspour, S., Ghasabi, M., Yekta, R., Shirjang, S., Dehghan, G., Hamblin, M. R., and Baradaran, B. (2020). Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 6817-6830.
- Maritim, S., Boulas, P., and Lin, Y. (2021). Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 592, 120051.
- Martin, G. M. (2011). Impact of interval and combination therapies on the management of actinic keratosis: review and clinical considerations. *Journal of Dermatological Treatment*, 22(5), 288-297.
- Masuda, H., Kimura, M., Nishioka, A., Kato, H., and Morita, A. (2019). Dual wavelength 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy using a novel flexible light-emitting diode unit. *Journal of Dermatological Science*, 93(2), 109-115.
- Matharoo, N., Mohd, H., and Michniak-Kohn, B. (2024). Transferosomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 16(1), e1918.
- Maurya, A. and Murthy, S. N. (2014). Pretreatment with skin permeability enhancers: importance of duration and composition on the delivery of diclofenac sodium. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(5), 1497-1503.

- McAllister, D. V., Wang, P. M., Davis, S. P., Park, J.-H., Canatella, P. J., Allen, M. G., and Prausnitz, M. R. (2003). Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13755-13760.
- McCourt, C., Dolan, O., and Gormley, G. (2014). Malignant melanoma: a pictorial review. *Ulster Medical Journal*, 83(2), 103-110.
- McKnight, G., Shah, J., and Hargest, R. (2022). Physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 40(1), 8-12.
- McLafferty, E., Hendry, C., and Farley, A. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard (through 2013)*, 27(3), 35.
- Menon, G. K., Cleary, G. W., and Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3-9.
- Merchant, H. A., Shoaib, H. M., Tazeen, J., and Yousuf, R. I. (2006). Once-daily tablet formulation and in vitro release evaluation of cefpodoxime using hydroxypropyl methylcellulose: a technical note. *AAPS Pharmscitech*, 7, E178-E183.
- Miranda, I., Souza, A., Sousa, P., Ribeiro, J., Castanheira, E. M. S., Lima, R., and Minas, G. (2021). Properties and applications of pdms for biomedical engineering: a review. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(1), 2.
- Mitragotri, S. and Kost, J. (2004). Low-frequency sonophoresis: a review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(5), 589-601.
- Moncelli, M. R., Becucci, L., and Guidelli, R. (1994). The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. *Biophysical Journal* 66(6), 1969-1980.
- Mouez, M. A., Nasr, M., Abdel-Mottaleb, M., Geneidi, A. S., and Mansour, S. (2016). Composite chitosan-transfersomal vesicles for improved transnasal permeation and bioavailability of verapamil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Pt A), 591-599.
- Mui, B., Chow, L., and Hope, M. J. (2003). Extrusion technique to generate liposomes of defined size. In *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 3-14.
- Mura, S., Manconi, M., Valenti, D., Sinico, C., Vila, A. O., and Fadda, A. M. (2011). Transcutol containing vesicles for topical delivery of minoxidil. *Journal of Drug Targeting*, 19(3), 189-196.
- Murthy, S. N. (1999). Magnetophoresis: an approach to enhance transdermal drug diffusion. *Pharmazie*, 54(5), 377-379.

- Myat, Y. Y., Aung, N. N., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Opanasopit, P., and Patrojanasophon, P. (2020). Fabrication and evaluation of thermally crosslinked Gantrez S-97 microneedle arrays. *Key Engineering Materials*, 859, 39-44.
- N'Da, D. D. (2014). Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules*, 19(12), 20780-20807.
- Nadri, M. H., Salim, Y., Basar, N., Yahya, A., and Zulkifli, R. M. (2014). Antioxidant activities and tyrosinase inhibition effects of *Phaleria macrocarpa* extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(3), 107-111.
- Nagarkar, R., Singh, M., Nguyen, H. X., and Jonnalagadda, S. (2020). A review of recent advances in microneedle technology for transdermal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 59, 101923.
- Nakhat, P. D., Kondawar, A. A., Rathi, L. G., and Yeole, P. G. (2008). Development and in vitro evaluation of buccoadhesive tablets of metoprolol tartrate. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(1), 121-124.
- Needham, D. and Nunn, R. S. (1990). Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal*, 58(4), 997-1009.
- Nejad, H. R., Sadeqi, A., Kiaee, G., and Sonkusale, S. (2018). Low-cost and cleanroom-free fabrication of microneedles. *Microsystems & nanoengineering*, 4(1), 1-7.
- Nelson, C. G. (2011). Diclofenac gel in the treatment of actinic keratoses. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 7, 207-211.
- Netscher, D. T. and Spira, M. (2004). Basal cell carcinoma: an overview of tumor biology and treatment. *Plastic and reconstructive surgery*, 113(5), 74e-94e.
- Neubert, T. and Lehmann, P. (2008). Bowen's disease - a review of newer treatment options. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(5), 1085-1095.
- Ng, K. W. and Lau, W. M. (2015). Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: drug manipulation strategies and vehicle effects*, 3-11.
- Nokhodi, F., Nekoei, M., and Goodarzi, M. T. (2022). Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles as targeted-carrier of tamoxifen against MCF7 and TMX-resistant MCF7 cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 33(2), 24.
- Nouh, A. T., Abd El-Gawad, A. H., and Guda, T. K. (2010). Stability, bioavailability, and ulcerative activity of diclofenac sodium-mastic controlled release tablets. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 4(2), 93-99.

- Oh, Y. C., Jeong, Y. H., Cho, W. K., Ha, J. H., Gu, M. J., and Ma, J. Y. (2015). Anti-inflammatory and analgesic effects of pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1232-1251.
- Oltulu, P., Ince, B., Kokbudak, N., Findik, S., and Kilinc, F. (2018). Measurement of epidermis, dermis, and total skin thicknesses from six different body regions with a new ethical histometric technique. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 26(2), 56-61.
- Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., and Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: a promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 12(9), 855.
- Öztürk, A. A., Namlı, İ., Güleç, K., and Kıyan, H. T. (2020). Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: formulation, characterization and in vivo HET-CAM analysis. *Microvascular research*, 130, 103991.
- Park, J. Y., Daksha, P., Lee, G. H., Woo, S., and Chang, Y. (2008). Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications. *Nanotechnology*, 19(36), 365603.
- Patil, Y. P. and Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8-18.
- Pellacani, G., Peris, K., Guillen, C., Clonier, F., Larsson, T., Venkata, R., and Puig, S. (2015). A randomized trial comparing simultaneous vs. sequential field treatment of actinic keratosis with ingenol mebutate on two separate areas of the head and body. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(11), 2192-2198.
- Pendekal, M. S. and Tegginamat, P. K. (2012). Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application. *Daru*, 20(1), 67.
- Pentak, D., Ploch-Jankowska, A., Zieba, A., and Kozik, V. (2022). The advances and challenges of liposome-assisted drug release in the presence of serum albumin molecules: The Influence of Surrounding pH. *Materials (Basel)*, 15(4), 1586.
- Pere, C. P. P., Economidou, S. N., Lall, G., Ziraud, C., Boateng, J. S., Alexander, B. D., Lamprou, D. A., and Douroumis, D. (2018). 3D printed microneedles for insulin skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(2), 425-432.
- Piccirillo, G., Bochicchio, B., Pepe, A., Schenke-Layland, K., and Hinderer, S. (2017). Electrospun poly-l-lactide scaffold for the controlled and targeted delivery of a synthetically obtained Diclofenac prodrug to treat actinic keratosis. *Acta Biomaterialia*, 52, 187-196.

- Pierre, M. B. R. and dos Santos Miranda Costa, I. (2011). Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Archives of Dermatological Research*, 303, 607-621.
- Pillon, A., Gomes, B., Vandenberghe, I., Cartron, V., Cebe, P., Blanchet, J. C., Sibaud, V., Guilbaud, N., Audoly, L., Lamant, L., and Kruczynski, A. (2017). Actinic keratosis modelling in mice: A translational study. *Plos one*, 12(6), e0179991.
- Pinilla, C. M. B., Reque, P. M., and Brandelli, A. (2020). Effect of oleic acid, cholesterol, and octadecylamine on membrane stability of freeze-dried liposomes encapsulating natural antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 599-610.
- Pinilla, C. M. B., Thys, R. C. S., and Brandelli, A. (2019). Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 72-78.
- Pireddu, R., Schlich, M., Marceddu, S., Valenti, D., Pini, E., Fadda, A. M., Lai, F., and Sinico, C. (2020). Nanosuspensions and microneedles roller as a combined approach to enhance diclofenac topical bioavailability. *Pharmaceutics*, 12(12), 1140.
- Pobudkowska, A. and Domańska, U. (2014). Study of pH-dependent drugs solubility in water. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(1), 115-126.
- Prabhakar, M. M., Saravanan, A., Lenin, A. H., Mayandi, K., and Ramalingam, P. S. (2021). A short review on 3D printing methods, process parameters and materials. *Materials Today: Proceedings*, 45, 6108-6114.
- Prasad, L. K. and Smyth, H. (2016). 3D Printing technologies for drug delivery: a review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(7), 1019-1031.
- Prausnitz, M. R. and Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261-1268.
- Proksch, E., Brandner, J. M., and Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072.
- Quinten, T., De Beer, T., Remon, J., and Vervaet, C. (2011). Overview of injection molding as a manufacturing technique for pharmaceutical application. *Injection molding: process, design and application*. New York: Nova, 1-42.
- Ramadan, S., Guo, L., Li, Y., Yan, B., and Lu, W. (2012). Hollow copper sulfide nanoparticle-mediated transdermal drug delivery. *Small*, 8(20), 3143-3150.
- Ramadan, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., and Donnelly, R. F. (2022). Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(4), 758-791.

- Rao, Y. F., Chen, W., Liang, X. G., Huang, Y. Z., Miao, J., Liu, L., Lou, Y., Zhang, X. G., Wang, B., Tang, R. K., Chen, Z., and Lu, X. Y. (2015). Epirubicin-loaded superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for transdermal delivery: cancer therapy by circumventing the skin barrier. *Small*, 11(2), 239-247.
- Raza, K., Singh, B., Mahajan, A., Negi, P., Bhatia, A., and Katare, O. P. (2011). Design and evaluation of flexible membrane vesicles (FMVs) for enhanced topical delivery of capsaicin. *Journal of Drug Targeting*, 19(4), 293-302.
- Rehman, F., Ahmad, W., Parveen, N., Zakir, S. K., Khan, S., and Han, C. (2023). The catalytic degradation of the inflammatory drug diclofenac sodium in water by Fe²⁺/persulfate, Fe²⁺/peroxymonosulfate and Fe²⁺/H₂O₂ processes: a comparative analysis. *Water*, 15(5), 885.
- Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 65-77.
- Richard, C., Cassel, S., and Blanzat, M. (2021). Vesicular systems for dermal and transdermal drug delivery. *RSC advances*, 11(1), 442-451.
- Richter, W. F. and Jacobsen, B. (2014). Subcutaneous absorption of biotherapeutics: knowns and unknowns. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1881-1889.
- Rizwan, M., Rubina Gilani, S., Iqbal Durani, A., and Naseem, S. (2021). Materials diversity of hydrogel: Synthesis, polymerization process and soil conditioning properties in agricultural field. *Journal of Advanced Research*, 33, 15-40.
- Romanovsky, A. A. (2014). Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta physiologica*, 210(3), 498-507.
- Röwert-Huber, J., Patel, M., Forschner, T., Ulrich, C., Eberle, J., Kerl, H., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2007). Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *British Journal of Dermatology*, 156(s3), 8-12.
- Ruben, B., Elisa, M., Leandro, L., Victor, M., Gloria, G., Marina, S., Mian K, S., Pandiyan, R., and Nadhira, L. (2017). Oxygen plasma treatments of polydimethylsiloxane surfaces: effect of the atomic oxygen on capillary flow in the microchannels. *Micro & Nano Letters*, 12(10), 754-757.
- Sabri, A. H., Cater, Z., Gurnani, P., Ogilvie, J., Segal, J., Scurr, D. J., and Marlow, M. (2020). Intradermal delivery of imiquimod using polymeric microneedles for basal cell carcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*, 589, 119808.
- Salathia, S., Gigliobianco, M. R., Casadidio, C., Di Martino, P., and Censi, R. (2023). Hyaluronic Acid-Based Nanosystems for CD44 Mediated Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7286.

- Sartawi, Z., Blackshields, C., and Faisal, W. (2022). Dissolving microneedles: Applications and growing therapeutic potential. *Journal of Controlled Release*, 348, 186-205.
- Šentjurs, M., Vrhovnik, K., and Kristl, J. (1999). Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of controlled release*, 59(1), 87-97.
- Serra-Guillen, C., Nagore, E., Llombart, B., Sanmartin, O., Requena, C., Calomarde, L., and Guillen, C. (2018). A 12-Day Course of Imiquimod 5% for the Treatment of Actinic Keratosis: Effectiveness and Local Reactions. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*, 109(3), 248-253.
- Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., and Perrie, Y. (2020). Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154-155, 102-122.
- Shakouri, A., Parvan, R., Adljouy, N., and Abdolalizadeh, J. (2020). Purification of hyaluronidase as an anticancer agent inhibiting CD44. *Biomedical Chromatography*, 34(1), e4709.
- Sharma, M. R., Werth, B., and Werth, V. P. (2011). Animal models of acute photodamage: comparisons of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c mice. *Photochemistry and Photobiology*, 87(3), 690-698.
- Shazly, G. A., Haq, N., and Shakeel, F. (2014). Solution thermodynamics and solubilization behavior of diclofenac sodium in binary mixture of Transcutol-HP and water. *Pharmazie*, 69(5), 335-339.
- Siemiradzka, W., Dolinska, B., and Ryszka, F. (2020). Development and study of semi-solid preparations containing the model substance corticotropin (acth): convenience application in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(8), 1824.
- Siler-Marinkovic, S., Dragicevic, N., and Maibach, H. (2016). Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement. *JB Metzler*, 15-38.
- Silver, F. H., Seehra, G. P., Freeman, J. W., and DeVore, D. (2002). Viscoelastic properties of young and old human dermis: a proposed molecular mechanism for elastic energy storage in collagen and elastin. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(8), 1978-1985.
- Simoes, M. C. F., Sousa, J. J. S., and Pais, A. (2015). Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer Letters*, 357(1), 8-42.
- Sinani, G., Durgun, M. E., Cevher, E., and Özsoy, Y. (2023). Polymeric-Micelle-Based delivery systems for nucleic acids. *Pharmaceutics*, 15(8), 2021.

- Singh, T. R. R., McCarron, P. A., Woolfson, A. D., and Donnelly, R. F. (2009). Investigation of swelling and network parameters of poly (ethylene glycol)-crosslinked poly (methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels. *European Polymer Journal*, 45(4), 1239-1249.
- Singsai, K., Charoongchit, P., Chaikaew, W., Boonma, N., Fhanjaksai, P., and Chaisatan, K. (2020). Antilipoxygenase and anti-inflammatory activities of streblus asper leaf extract on xylene-induced ear edema in mice. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2020(1), 3176391.
- Sintov, A. C., Krymberk, I., Daniel, D., Hannan, T., Sohn, Z. e., and Levin, G. (2003). Radiofrequency-driven skin microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. *Journal of controlled release*, 89(2), 311-320.
- Sober, A. J. and Burstein, J. M. (1995). Precursors to skin cancer. *Cancer*, 75(2 Suppl), 645-650.
- Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014(1), 498276.
- Soliman, S. M., Teaima, M. H., Rashwan, K. O., Ali, B. M., Jasti, B. R., El-Nabarawi, M. A., and Abd El-Halim, S. M. (2023). The deleterious effect of xylene-induced ear edema in rats: Protective role of dexketoprofen trometamol transdermal invasomes via inhibiting the oxidative stress/NF-kappaB/COX-2 pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, 631, 122525.
- Sonavane, G., Tomoda, K., Sano, A., Ohshima, H., Terada, H., and Makino, K. (2008). In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 1-10.
- Song, F., Yang, G., Wang, Y., and Tian, S. (2022). Effect of phospholipids on membrane characteristics and storage stability of liposomes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 81, 103155.
- Song, X., Zhang, Y., Tang, Z., and Du, L. (2024). Advantages of nanocarriers for basic research in the field of traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 19(2), 237-245.
- Sopyan, I. and Gozali, D. (2020). A review: a novel of efforts to enhance liposome stability as drug delivery approach. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6).
- Spanheimer, V., Katrakova-Krüger, D., Altenhofer, P., and Valtchev, K. (2023). Evaluation of the suitability of different methods for determination of the crosslink density in highly filled EPDM compounds. *Journal of Polymer Research*, 30(1), 24.

- Stanley, P. L., Steiner, S., Havens, M., and Tramposch, K. M. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology*, 4(4), 262-271.
- Steeb, T., Koch, E. A. T., Wessely, A., Wiest, L. G., Schmitz, L., Berking, C., and Heppt, M. V. (2021). Chemical peelings for the treatment of actinic keratosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 35(3), 641-649.
- Sun, C., Fang, N., Wu, D., and Zhang, X. (2005). Projection micro-stereolithography using digital micro-mirror dynamic mask. *Sensors and Actuators A: Physical*, 121(1), 113-120.
- Sun, K., Song, X., Jia, R., Yin, Z., Zou, Y., Li, L., Yin, L., He, C., Liang, X., Yue, G., Cui, Q., and Yang, Y. (2018). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of water extract of galla chinensis in vivo models. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018(1), 6784032.
- Svedman, P., Lundin, S., Hoglund, P., Hammarlund, C., Malmros, C., and Pantzar, N. (1996). Passive drug diffusion via standardized skin mini-erosion; methodological aspects and clinical findings with new device. *Pharmaceutical Research*, 13(9), 1354-1359.
- Swain, R. P., Nagamani, R., and Panda, S. (2015). Formulation, in vitro characterization and stability studies of fast dispersing tablets of diclofenac sodium. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(7), 094-102.
- Szulc-Musiol, B., Dolinska, B., Kolodziejska, J., and Ryszka, F. (2017). Influence of plasma on the physical properties of ointments with quercetin. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 67(4), 569-578.
- Tallo, K., Moner, V., De Cabo, M., Cocera, M., and Lopez, O. (2018). Vesicular nanostructures composed of oleic acid and phosphatidylcholine: Effect of pH and molar ratio. *Chemistry and Physics of Lipids*, 213, 96-101.
- Thabet, Y., Elsabahy, M., and Eissa, N. G. (2022). Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods*, 199, 9-15.
- Thakur, R. R., Tekko, I. A., Al-Shammari, F., Ali, A. A., McCarthy, H., and Donnelly, R. F. (2016). Rapidly dissolving polymeric microneedles for minimally invasive intraocular drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, 6(6), 800-815.
- thang, n. h., chien, t. b., and cuong, d. x. (2023). polymer-based hydrogels applied in drug delivery: an overview. *Gels*, 9(7), 523.

- Thomas, G. J., Herranz, P., Cruz, S. B., and Parodi, A. (2019). Treatment of actinic keratosis through inhibition of cyclooxygenase-2: Potential mechanism of action of diclofenac sodium 3% in hyaluronic acid 2.5%. *Dermatologic Therapy*, 32(3), e12800.
- Tian, Z., Liu, J., Li, N., Garamus, V. M., and Zou, A. (2018). Hyaluronic acid-coated liposome for active targeting on CD44 expressing tumors. *Journal of Nanoparticle Research*, 20, 1-10.
- Timur, B., Usta, D. Y., and Teksin, Z. S. (2022). Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the in vitro lipolysis-permeation model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 77, 103797.
- Todd, P. A. and Sorkin, E. M. (1988). Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, 35(3), 244-285.
- Tomono, T. (2019). A new way to control the internal structure of microneedles: a case of chitosan lactate. *Materials Today Chemistry*, 13, 79-87.
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., and Eliaz, M. (2000). Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of controlled release*, 65(3), 403-418.
- Treffel, P., Panisset, F., Humbert, P., Remoussenard, O., Bechtel, Y., and Agache, P. (1993). Effect of pressure on in vitro percutaneous absorption of caffeine. *Acta Dermato-Venereologica*, 73(3), 200-202.
- Trombino, S., Servidio, C., Curcio, F., and Cassano, R. (2019). Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(8), 407.
- Tucak, A., Sirbubalo, M., Hindija, L., Rahic, O., Hadziabdic, J., Muhamedagic, K., Cekic, A., and Vranic, E. (2020). Microneedles: characteristics, materials, production methods and commercial development. *Micromachines (Basel)*, 11(11), 961.
- Tuncel, E., Tort, S., Han, S., Yucel, C., and Tirnaksiz, F. (2024). Development and optimization of hydrogel-forming microneedles fabricated with 3d-printed molds for enhanced dermal diclofenac sodium delivery: a comprehensive in vitro, ex vivo, and in vivo study. *Drug Delivery and Translational Research*, 1-30.
- Turner, J. G., Laabei, M., Li, S., Estrela, P., and Leese, H. S. (2023). Antimicrobial releasing hydrogel forming microneedles. *Biomaterials Advances*, 151, 213467.
- Turner, J. G., White, L. R., Estrela, P., and Leese, H. S. (2021). Hydrogel-Forming Microneedles: Current Advancements and Future Trends. *Macromolecular Bioscience*, 21(2), e2000307.

- Uhlenhake, E. E. (2013). Optimal treatment of actinic keratoses. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 29-35.
- Umeyor, C. E., Shelke, V., Pol, A., Kolekar, P., Jadhav, S., Tiwari, N., Anure, A., Nayak, A., Bairagi, G., and Agale, A. (2023). Biomimetic microneedles: Exploring the recent advances on a microfabricated system for precision delivery of drugs, peptides, and proteins. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 103.
- Venuganti, V. V. K. and Perumal, O. P. (2009). Poly (amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(7), 2345-2356.
- Vilcea, A. M., Stoica, L. E., Andreiana, B. C., Mirea, C. S., Tenea Cojan, T. S., Vilcea, I. C., and Margaritescu, C. (2024). Immunoexpression of Ki67, P16 and Beta-catenin in precursor lesions of cutaneous squamous cell carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 65(1), 19-25.
- Wallenwein, C. M., Weigel, V., Hofhaus, G., Dhakal, N., Schatton, W., Gelperina, S., Groeber-Becker, F. K., Dressman, J., and Wacker, M. G. (2022). Pharmaceutical development of nanostructured vesicular hydrogel formulations of rifampicin for wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 16207.
- Walters, K. A. and Roberts, M. S. (2002). The structure and function of skin. In *Dermatological and transdermal formulations*. CRC press, pp. 19-58.
- Wang, B., Zhang, S., Zhao, X., Lian, J., and Gao, Y. (2022). Preparation, characterization, and in vivo evaluation of levonorgestrel-loaded thermostable microneedles. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(4), 944-956.
- Wang, Q., Yao, G., Dong, P., Gong, Z., Li, G., Zhang, K., and Wu, C. (2015). Investigation on fabrication process of dissolving microneedle arrays to improve effective needle drug distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66, 148-156.
- Wang, S., Kara, M., and Krishnan, T. R. (1998). Transdermal delivery of cyclosporin-A using electroporation. *Journal of Controlled Release*, 50(1-3), 61-70.
- Weaver, J. C., Vaughan, T. E., and Chizmadzhev, Y. (1999). Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(1), 21-39.
- Williams, A. C. and Barry, B. W. (2012). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 128-137.
- Witting, M., Boreham, A., Brodewolf, R., Vavrova, K., Alexiev, U., Friess, W., and Hedtrich, S. (2015). Interactions of hyaluronic acid with the skin and implications for the dermal delivery of biomacromolecules. *Molecular Pharmaceutics Journal*, 12(5), 1391-1401.

- Wu, L., Park, J., Kamaki, Y., and Kim, B. (2021). Optimization of the fused deposition modeling-based fabrication process for polylactic acid microneedles. *Microsystems & Nanoengineering*, 7(1), 58.
- Xiu, X., Gao, G., Liu, Y., and Ma, F. (2022). Drug delivery with dissolving microneedles: Skin puncture, its influencing factors and improvement strategies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76, 103653.
- Xu, H., Takashi, E., Liang, J., Chen, Y., Yuan, Y., and Fan, J. (2022). Effect of heat shock preconditioning on pressure injury prevention via hsp27 upregulation in rat models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8955.
- Xue, W., Champ, S., and Huglin, M. B. (2001). Network and swelling parameters of chemically crosslinked thermoreversible hydrogels. *Polymer*, 42(8), 3665-3669.
- Yalcin, T. E., Tuncel, E., Yucel, C., and Tirnaksiz, F. (2022). Nanoemulsions containing megestrol acetate: development, characterization, and stability evaluation. *AAPS Pharmscitech*, 23(5), 142.
- Yang, X., Liu, R., Xu, Y., Ma, X., and Zhou, B. (2021). The mechanisms of peripheral nerve preconditioning injury on promoting axonal regeneration. *Neural Plasticity*, 2021(1), 6648004.
- Yeung, H., Baranowski, M. L., Swerlick, R. A., Chen, S. C., Hemingway, J., Hughes, D. R., and Duszak, R., Jr. (2018). Use and cost of actinic keratosis destruction in the medicare part b fee-for-service population, 2007 to 2015. *JAMA Dermatology*, 154(11), 1281-1285.
- Yoon, J. Y., Kim, D. W., Ahn, J. H., Choi, E. J., Kim, Y. H., Jeun, M., and Kim, E. J. (2019). Propofol suppresses lps-induced inflammation in amnion cells via inhibition of NF-kappaB activation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(3), 301-309.
- Yorke, K. and Amin, S. (2021). High performance conditioning shampoo with hyaluronic acid and sustainable surfactants. *Cosmetics*, 8(3), 71.
- Yousef, H., Alhajj, M., and Sharma, S. (2017). Anatomy, skin (integument), epidermis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Yu, Z., Meng, X., Zhang, S., Chen, Y., Zhang, Z., and Zhang, Y. (2021). Recent progress in transdermal nanocarriers and their surface modifications. *Molecules*, 26(11), 3093.
- Yuan, Z., Miao, L., Zhang, S., Li, H., Li, G., and Zhang, G. (2024). The role of acid-sensing ion channels in monosodium urate-induced gouty pain in mice. *Pflügers Archiv*, 476(1), 101-110.

- Yue, Y., Zhao, D., and Yin, Q. (2018). Hyaluronic acid modified nanostructured lipid carriers for transdermal bupivacaine delivery: In vitro and in vivo anesthesia evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 813-820.
- Zafar, A., Alruwaili, N. K., Imam, S. S., Yasir, M., Alsaidan, O. A., Alquraini, A., Rawaf, A., Alsuwayt, B., Anwer, M. K., Alshehri, S., and Ghoneim, M. M. (2022). Development and optimization of nanolipid-based formulation of diclofenac sodium: in vitro characterization and preclinical evaluation. *Pharmaceutics*, 14(3), 507.
- Zafar, H., Kiani, M. H., Raza, F., Rauf, A., Chaudhery, I., Ahmad, N. M., Akhtar, S., and Shahnaz, G. (2020). Design of enzyme decorated mucopermeating nanocarriers for eradication of H. pylori infection. *Journal of Nanoparticle Research*, 22, 1-21.
- Zakerhamidi, M., Ghanadzadeh, A., and Moghadam, M. (2012). Solvent effects on the UV/visible absorption spectra of some aminoazobenzene dyes. *Chemical Science Transactions*, 1(1), 1-8.
- Zakir, F., Vaidya, B., Goyal, A. K., Malik, B., and Vyas, S. P. (2010). Development and characterization of oleic acid vesicles for the topical delivery of fluconazole. *Drug Delivery*, 17(4), 238-248.
- Zerbinati, N., Lotti, T., Monticelli, D., Rauso, R., Gonzalez-Isaza, P., D'Este, E., Calligaro, A., Sommatitis, S., Maccario, C., Mocchi, R., Lotti, J., Wollina, U., Tchernev, G., and Franca, K. (2018). In vitro evaluation of the biosafety of hyaluronic acid peg cross-linked with micromolecules of calcium hydroxyapatite in low concentration. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(1), 15-19.
- Zhan, B., Wang, J., Li, H., Xiao, K., Fang, X., Shi, Y., and Jia, Y. (2024). Ethosomes: a promising drug delivery platform for transdermal application. *Chemistry*, 6(5), 993-1019.
- Zhang, D. (2017). A coefficient of determination for generalized linear models. *The American Statistician*, 71(4), 310-316.
- Zhang, F., Lin, G., Shao, W., Yu, Y., and Zang, L. (2013). Pharmacokinetics and tissue distribution of vinorelbine bitartrate after intravenous administration of liposomal and injectable formulations. *Journal of dispersion science and technology*, 34(10), 1334-1341.
- Zhang, X., Wang, Y., He, X., Yang, Y., Chen, X., and Li, J. (2024). Advances in microneedle technology for biomedical detection. *Biomaterials Science*, 12(20), 5134-5149.
- Zhou, X., Hao, Y., Yuan, L., Pradhan, S., Shrestha, K., Pradhan, O., Liu, H., and Li, W. (2018). Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review. *Chinese Chemical Letters*, 29(12), 1713-1724.

- Zhou, Y. and Wu, X. Y. (2002). Theoretical analyses of dispersed-drug release from planar matrices with a boundary layer in a finite medium. *Journal of Controlled Release*, 84(1-2), 1-13.
- Zhu, Z., Zhai, Y., Zhang, N., Leng, D., and Ding, P. (2013). The development of polycarbophil as a bioadhesive material in pharmacy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 218-227.
- Žilnik, L. F., Jazbinšek, A., Hvala, A., Vrečer, F., and Klamt, A. (2007). Solubility of sodium diclofenac in different solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 261(1-2), 140-145.
- Zuccari, G., Baldassari, S., Alfei, S., Marengo, B., Valenti, G. E., Domenicotti, C., Ailuno, G., Villa, C., Marchitto, L., and Caviglioli, G. (2021). D-alpha-tocopherol-based micelles for successful encapsulation of retinoic acid. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(3), 212.



EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.11.2021-E.208686



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-208686
Konu : Değerlendirme ve Onay

09.11.2021

Sayın Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Figen TIRNAKSIZ, Serdar TORT, Sevtap HAN ve Emre TUNÇEL'den oluşan, G.Ü.ET-21.075 kod numaralı ve "*Aktinik Keratoz Tedavisi İçin Diklofenak Sodyum İçeren Mikroigne ve Kesecik Sistemlerin Geliştirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.075 and entitled "*Development of Microneedle and Vesicular Systems Containing Diclofenac Sodium for the Treatment of Actinic Keratosis*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 30

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSAC6YZ7B8

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>



Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (Devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.11.2021-E.200606

GAZİ ÜNİVERSİTESİ**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ**

TOPLANTI TARİHİ : 15/10/2021		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TUNÇEL, Emre
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri :
Medeni hali :
e-mail :
Telefon :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Farmasötik Teknoloji A.B.D.	
Lisans	Gazi Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	
Lise	Fethiye-Kemal Mumcu Anadolu Lisesi	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2024-Devam ediyor	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Eczacı
2019-2024	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Tunçel E, Tort S, Han S, Yücel Ç, Tırnaksız F. Development and optimization of hydrogel-forming microneedles fabricated with 3d-printed molds for enhanced dermal diclofenac sodium delivery: a comprehensive in vitro, ex vivo, and in vivo study. *Drug Delivery and Translational Research*. 2024 Oct 25. doi: 10.1007/s13346-024-01728-1. Epub ahead of print. PMID: 39455506.
- Yalcin TE, Tuncel E, Yucel C, Tirnaksiz F. Nanoemulsions Containing Megestrol Acetate: Development, Characterization, and Stability Evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2022 May 10;23(5):142. doi: 10.1208/s12249-022-02289-7. PMID: 35538251.
- Tuğcu-Demiröz F, Saar S, Kara AA, Yıldız A, Tunçel E, Acartürk F. Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021 Jun 1;161:105801. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105801. Epub 2021 Mar 7. PMID: 33691155.
- Çulcu, Ö., Tunçel, E., İlbasmış Tamer, S., & Tırnaksız, F. F., (2020). Characterization of Thermosensitive Gels for the Sustained Delivery of Dexketoprofen Trometamol for Dermal Applications. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute - GUHES*, vol.2, no.2.
- Ongun, M., Tunçel, E., Kodan, E., Tuğcu Demiröz, F. N., & Tırnaksız, F. F., (2020). Development and Characterization of Mucoadhesive-Thermosensitive Buccal Gel Containing Metronidazole for the Treatment of Oral Mucositis. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol.44, no.3, 517-539.

Sözlü Bildiriler

- Tunçel Emre,Tort Serdar,Tırnaksız Fahriye Figen (2024). Development of Elastic Vesicle Systems Containing Diclofenac Sodium and In Vitro/Ex Vivo Evaluation. 21st International Pharmaceutical Technology Symposium, 76-77. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Tunçel Emre, Tort Serdar, Tirnaksiz Fahriye Figen (2022). Development Of Hydrogel-Forming Microneedles Containing Diclofenac Sodium Using Microneedle Molds Obtained By Sla 3d Printing Technology. IPTS 2022 – 20th International Pharmaceutical Technology Symposium (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)
- Tuğcu Demiröz Fatma Nur, Yıldız Ayşegül, Kara Adnan Altuğ, Tunçel Emre, Saar Sinem,

Acartürk Füsün (2019). Development of Benzydamine Loaded Nanofiber Formulations for Vaginal Controlled Drug Release. 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Poster Bildirileri

- Tunçel Emre, Tort Serdar, Tırnaksız Fahriye Figen (2022). Development and Evaluation of Composite Hydrogel-Forming Microneedles Containing Diclofenac Sodium. FIGON DMD & EUFAPS Annual Meeting 2022, 55-55. (Özet Bildiri/Poster)
- Tunçel Emre, Tort Serdar, Tırnaksız Fahriye Figen (2021). Evaluation and Fabrication of Dissolving PVA-Diclofenac sodium Microneedles. 3rd. International Gazi Pharma Symposium Series, 120-120. (Özet Bildiri/Poster)
- Tuğcu Demiröz Fatma Nur, Tunçel Emre, Yılmaz Aysel, Kara Adnan Altuğ, Yetkin Ceren, Ongun Melike (2019). Development and Characterization of Emulsion/Emulgel Formulations Which Contain Different Oil Phases for Topical Delivery. 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences (Tam Metin Bildiri/Poster)
- Çulcu Özlem, Tunçel Emre, İlbasmış Tamer Sibel, Tırnaksız Fahriye Figen (2019). The effect of viscosity and temperature on in vitro release of dexketoprofen trometamol from poloxamer and propylene glycol gel formulations. 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences (Tam Metin Bildiri/Poster)
- Tort Serdar, Yıldız Ayşegül, Tuğcu Demiröz Fatma Nur, Tunçel Emre, Acartürk Füsün (2018). Preparation and Characterization of Nanofibers Containing Ornidazole for Buccal Application. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (Özet Bildiri/Poster)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

