

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VÜCUT ORGANLARINA HEDEFLEME AMACIYLA HAZIRLANAN MİTOMİSİN-
C YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMLERİN ORGANİZMADA BİYODAĞILIMININ
İNCELENMESİ**

Farmasötik Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Mustafa KOTMAKCHIEV

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülten Kantarcı

İZMİR

2009

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VÜCUT ORGANLARINA HEDEFLEME AMACIYLA HAZIRLANAN MİTOMİSİN-
C YÜKLÜ TAŞIYICI SİSTEMLERİN ORGANİZMADA BİYODAĞILIMININ
İNCELENMESİ**

Farmasötik Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Mustafa KOTMAKCHIEV

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülten Kantarcı

İZMİR

2009

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

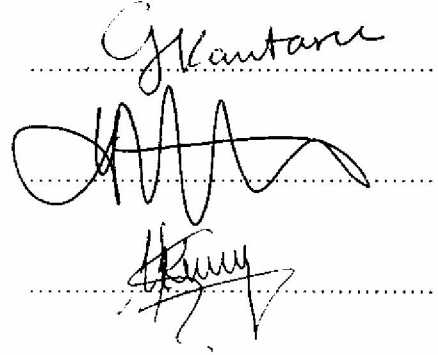
(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Gülten Kantarcı

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Gökhan Ertan

Üye : Doç.Dr. Makbule Aşıkoğlu

The image shows three handwritten signatures in black ink, each written on a horizontal dotted line. The first signature is 'G. Kantarcı', the second is 'Gökhan Ertan', and the third is 'Makbule Aşıkoğlu'.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 04.09.2009

ÖNSÖZ

Her zaman ve her konuda, desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarım esnasında pratik ve teorik birikimiyle bana yol gösteren, yüksek lisans projemin planlanmasından tamamlanmasına kadar her aşamasında sonsuz desteği olan danışmanım, Sayın Doç. Dr. Gülten Kantarcı'ya,

Çalışmalarım esnasında manevi desteklerinden faydalandığım, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof.Dr. Zeki Topçu'ya ve Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Devrim Demir Dora'ya ve Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalında doktora ve yüksek lisans yapan akadaşılarım; Sevil Zencir, Hasan Akbaba, Pakize Cantürk, Esra Öztürk'e,

Deneylerimin karakterizasyon kısmını gerçekleştirmek için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki olanaklardan yararlanmamı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Tamer Güneri'ye ve bilgi birikimiyle yanımda olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Gökhan Ertan'a ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki emeği geçen tüm Öğretim Üyeleri ile Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Mitomisin C maddesinin işaretlenmesinde ve radyoaktif görüntüleme çalışmalarında bilgi ve birikimleriyle tezime değerli katkıları olan Radyofarmasi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Makbule Aşıkoğlu ile Radyofarmasi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Ecz. Derya İlem'e,

Çalışmalarımın in vitro salım kısmını kendi laboratuvarlarında gerçekleştirmeme olanak sağlayan Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Levent Kırılmaz ile Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi, Sayın Dr. Emel Öykü Çetin'e,

Farmakognozi Anabilim Dalı olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Prof.Dr. Bijen Kuvak’a ve kırılim indisi mlerinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Hüsniye Saęlam’a,

E.. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı olanaklarından yararlanmamızı sağlayan ve gama kamera görüntülerinin çekilmesi esnasında bilgi ve birikimleriyle katkıda bulunan E.. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hayal zkılı’a ve emeği geçen Anabilim Dalı alışanlarına,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman manevi desteği ve yardımları ile yanımda olan arkadaşım Zft Celil’e

Hayatım boyunca beni desteklemiş olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İzmir 2009-08-26

Ecz. Mustafa Kotmakchiev

GİRİŞ VE AMAÇ

BÖLÜM I. TEORİK BİLGİLER

I.1. Mitomisin C	2
I.1.1. Mitomisin C'nin kısa tanımı.....	2
I.1.2. Mitomisinin etki mekanizması ve farmakokinetiği.....	3
I.1.2.1. Etki mekanizması.....	3
I.1.2.2. Farmakokinetik	5
I.1.3. Mitomisin C'nin klinikte kullanıldığı durumlar	7
I.1.3.1. Mesane kanseri	7
I.1.3.2. Meme kanseri.....	7
I.1.3.3. Serviks kanseri.....	7
I.1.3.4. Kolorektal ve anal kanser	8
I.1.3.5. Mide kanseri.....	8
I.1.3.6. Baş-boyun kanserleri.....	8
I.1.3.7. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri.....	9
I.1.3.8. Pankreas kanseri.....	9
I.1.3.9. Konjunktival melanoma.....	10
I.1.4. Mitomisin C'nin toksisitesi.....	10
I.1.4.1. Hematolojik toksisite.....	10
I.1.4.2. Sindirim sistemi.....	10
I.1.4.3. Deri ve mukozalar.....	11
I.1.4.4. Akciğerler.....	11
I.1.4.5. Sinir sistemi.....	11
I.1.4.6. Üro-genital sistem.....	12
I.1.4.7. Kardiyovasküler sistem.....	12

I.2. Mikroemülsiyonlar.....	12
I.2.1. Mikroemülsiyonların genel tanımı.....	12
I.2.2. Mikroemülsiyonların termodinamik özellikleri.....	13
I.2.3. Mikroemülsiyonların sınıflandırılması.....	14
I.2.3.1. Yapılarına göre sınıflandırma.....	14
I.2.3.2. Winsor sınıflandırması.....	15
I.2.4. Sürfaktanlar (Yüzey Etkin Maddeler, YEM).....	16
I.2.4.1. Sürfaktanların sınıflandırılması.....	17
I.2.4.2. Sürfaktan seçiminde dikkate alınması gereken parametreler.....	18
I.2.4.2.1. Hidrofil – Lipofil Denge (HLB).....	19
I.2.4.2.2. Kritik Paketleme Parametresi (KPP) (Critical Packing Parameter (CPP), P_c, veya sadece paketleme parametresi).....	20
I.2.4.2.3. Faz dönüşüm sıcaklığı (PIT).....	21
I.2.5. Mikroemülsiyonların tanımlanması.....	22
I.2.5.1. Faz diyagramları.....	22
I.2.5.2. Polarize ışık mikroskopisi.....	24
I.2.5.3. Dar Açılı X-ışını Saçılımı (SAXS).....	24
I.2.5.4. Elektriksel iletkenlik ölçümleri.....	25
I.2.5.5. Damlacık özelliklerinin ve boyutlarının belirlenmesi.....	25
I.2.5.5.1. Dinamik ışık saçılımı (DLS, Photon Correlation Spectroscopy (PCS)).....	26
I.2.6. Mikroemülsiyonların kullanım alanları.....	27
I.2.6.1. Mikroemülsiyonların tıp ve eczacılık alanı dışındaki	

uygulamaları.....	27
I.2.6.1.1. Çevrebilimi.....	27
I.2.6.1.2. Yakıt olarak.....	27
I.2.6.1.3. Ziraat alanında kullanım.....	27
I.2.6.1.4. Gıda alanında kullanım.....	28
I.2.6.1.5. Malzeme biliminde kullanımı.....	28
I.2.6.1.6. Analitik uygulamalar.....	28
I.2.6.1.7. Biyoteknolojide uygulamaları.....	28
I.2.6.1.8. Diğer kullanım alanları.....	28
I.2.6.2. Mikroemülsiyonların eczacılık alanında uygulamaları.....	28
I.2.6.2.1. Oral yoldan uygulanan mikroemülsiyon formülasyonları.....	29
I.2.6.2.2. Parenteral yoldan uygulanan mikroemülsiyon formülasyonları.....	29
BÖLÜM II DENEYSEL KISIM.....	30
II.1. Materyal ve metod.....	30
II.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	30
II.1.2. Kullanılan araç-gereçler.....	30
II.1.3. Kullanılan deney hayvanları.....	30
II.2. Pratik çalışmalar.....	31
II.2.1. Mitomisin C'nin UV-spektroskopisiyle standart eğri çizimi.....	31
II.2.1.1. Seçicilik tayini.....	31
II.2.1.2. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması.....	31
II.2.1.2.1. Ölçüm sınırlarının tayini.....	31
II.2.1.2.2. Analitik yöntem validasyonu.....	31

II.2.1.2.2.1. Doğrusallık.....	31
II.2.1.2.2.2. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik.....	32
II.2.1.2.2.3. Kesinlik.....	32
II.2.2. Mitomisin C'nin Yağ/Su dağılım katsayısının tayini.....	32
II.2.3. Mitomisin C'nin ince tabaka kromatografisi (İTK) ile incelenmesi	33
II.2.4. Mikroemülsiyon formülasyonları.....	34
II.2.4.1. Önformülasyon çalışmaları.....	34
II.2.4.1.1. Mikroemülsiyon formülasyonlarının yağ fazı	34
II.2.4.1.2. Mikroemülsiyon formülasyonlarının sürfaktan karışımı.....	34
II.2.4.2. Mikroemülsiyon önformülasyonları ve faz diyagramlarının hazırlanması.....	35
II.2.5. Karakterizasyon çalışmaları için mikroemülsiyonların seçilmesi	35
II.2.6. Mikroemülsiyonların stabilitelerinin incelenmesi.....	36
II.2.6.1. Santrifüjleme testi.....	36
II.2.6.2. Sıcaklık değişimi.....	36
II.2.6.3. Saklama stabilitesi.....	36
II.2.7. Mikroemülsiyonların karakterizasyonu.....	39
II.2.7.1. Viskozite Ölçümü.....	39
II.2.7.2. pH ölçümü.....	39
II.2.7.3. Elektriksel iletkenlik ölçümü.....	39
II.2.7.4. Kırılma indisi ölçümü.....	39

II.2.7.5. Damlacık boyutunun ölçülmesi.....	39
II.2.8. İn vitro salım çalışması.....	40
II.2.8.1. İn vitro salım çalışması için mitomisin C yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması.....	40
II.2.8.1.1. Fındık yağı ile geliştirilen Y/S mikroemülsiyon formülasyonu.....	40
II.2.8.1.2. Soya yağı ile geliştirilen Y/S mikroemülsiyon formülasyonu.....	40
II.2.8.2. İn vitro salım çalışmasının tasarımı.....	40
II.2.9. Mitomisin C'nin formülasyondaki stabilitesinin test edilmesi.....	41
II.2.9.1. Mitomisin C'nin distile sudaki çözeltisinin stabilitesinin test edilmesi.....	41
II.2.9.2. Mitomisin C'nin y/s mikroemülsiyondaki stabilitesinin test edilmesi.....	41
II.2.10. Mitomisin C'nin radyoaktif işaretlenmesi.....	41
II.2.11. In vivo çalışma.....	41
II.2.11.1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları.....	41
II.2.11.2. Tavşanların anestezi işlemi.....	42
II.2.11.3. Mitomisin C dozunun hesaplanması.....	42
II.2.11.4. İn vivo denemelerde kullanılan formülasyonun seçilmesi.....	42
II.2.11.5. Deney hayvanlarına formülasyonların uygulanması.....	42
II.3. İstatistiksel çalışma.....	43
BÖLÜM III BULGULAR.....	44

III.1. Mitomisinin UV-Spektroskopisi ile tayinine ilişkin bulgular.....	44
III.1.1. Seçicilik tayini ile ilgili bulgular.....	44
III.1.2. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması ile ilgili bulgular.....	44
III.1.2.1. Ölçüm sınırlarının tayini ile ilgili bulgular.....	44
III.1.2.2. Analitik yöntem validasyonu.....	46
III.1.2.2.1. Doğrusallık ile ilgili bulgular.....	46
III.1.2.2.2. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik ile ilgili bulgular.....	46
III.1.2.2.3. Kesinlik ile ilgili bulgular.....	47
III.2. Yağ/su Dağılım katsayısı tayinine ilişkin bulgular.....	47
III.3. İnce tabaka kromatografisine ilişkin bulgular.....	48
III.4. Y/S tipi mikroemülsiyon formülasyonlarının faz diyagramları.....	48
III.4.1. Fındık yağı ile elde edilen Y/S tipi mikroemülsiyonların faz diyagramları.....	48
III.4.2. Soya yağı ile elde edilen Y/S tipi mikroemülsiyonların faz diyagramları.....	48
III.5. Karakterizasyon için mikroemülsiyon formülasyonlarının seçimi.....	51
III.5.1. Fındık yağlı Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içeriği... 	51
III.5.2. Soya yağlı Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içeriği.....	51
III.6. İn vitro salım çalışması için seçilen mikroemülsiyonların karakterizasyonuna ilişkin bulgular.....	52
III.6.1. Viskozite, pH, elektriksel iletkenlik ve kırılma indisi ile ilişkin bulgular.....	52
III.6.2. Akış özellikleri ile ilgili bulgular.....	52
III.6.2.1. Fındık yağlı Y/S mikroemülsiyonun akış özellikleri ile	

ilgili bulgular.....	52
III.6.2.2. Soya yağı Y/S mikroemülsiyonun akış özellikleri ile ilgili bulgular.....	53
III.6.3. Kırılma indisi ölçümüne ilişkin bulgular.....	53
III.6.3.1. Yağların kırılma indisleri.....	53
III.6.3.2. Sürfaktanların ve sürfaktan karışımlarının kırılma indisleri.....	53
III.6.4. Damlacık boyutu ve polidispersite ölçümlerine ilişkin bulgular	54
III.7. Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilitesine ilişkin bulgular.....	54
III.8. Mitomisin mikroemülsiyonlardan ve sulu çözeltiden salımına ilişkin bulgular.....	54
III.9. Mitomisin C'nin formülasyondaki stabilitesine ilişkin bulgular.....	54
III.9.1. Mitomisin C'nin distile sudaki çözeltisinin stabilitesinin test edilmesi.....	54
III.9.2. Mitomisin C'nin y/s mikroemülsiyonlardaki stabilitesinin test edilmesi.....	55
III.10. İstatistiksel analize ait bulgular.....	56
III.11. İn vivo denemelere ilişkin bulgular.....	57
BÖLÜM IV TARTIŞMA	63
BÖLÜM V SONUÇ VE ÖNERİLER	69
ÖZET.....	70
ABSTRACT	71
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	72

ETİK KURUL ONAYI	91
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa No**

Şekil 1. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı, IUPAC tarafından belirlenen kimyasal adı ve bazı fizikokimyasal özellikleri.....	2
Şekil 2. Mitomisin C'nin redüktif aktivasyonu sonucunda DNA ile bağlanmasının şematik olarak gösterilmesi.....	5
Şekil 3. Y/S ve S/Y mikroemülsiyonların şematize edilmiş görünümü ve komponentleri.....	13
Şekil 4. Mikroemülsiyonların Winsor tiplerine göre tüplerde oluşturdıkları değişik fazlar.....	16
Şekil 5. Sürfaktan molekülünün şematik yapısı.....	17
Şekil 6. Sürfaktan molekülünün kritik paketlenme parametresini hesaplamada kullanılan fiziksel parametreler.....	20
Şekil 7. Sürfaktan moleküllerinin oluşturduğu değişik misel yapıları.....	22
Şekil 8. Bir mikroemülsiyonun üçlü faz diyagramı	23
Şekil 9. Dinamik Işık Saçılım yöntemi ile elde edilen hidrodinamik çap.....	27
Şekil 10. İTK'da sabit faz olarak kullanılan plakların ebatları ve işaretlenmesi.....	33
Şekil 11. Mitomisin C'nin 400-200nm arasındaki spektrumu.....	44
Şekil 12. Mitomisin C'nin farklı konsantrasyonlarda 400-300 nm dalga boyları arasında oluşturduğu pikler.....	45
Şekil 13. mitomisin C ile ilgili doğru grafiği ve denklemi.....	46
Şekil 14. Yöntemin doğruluğunu gösteren grafik.....	47
Şekil 15. Fındık yağı ile denenen Y/S-tipi mikroemülsiyon faz diyagramı	49
Şekil 16. Soya yağı ile denenen Y/S-tipi mikroemülsiyon faz diyagramı.....	50
Şekil 17. Fındık yağlı mikroemülsiyonun (FM3) akış özelliği.....	53

Şekil 18. Soya ve fındık yağlı mikroemülsiyon formülasyonlarında Mitomisin C'nin % salım profilleri.....	55
Şekil 19. Mitomisin C'nin sulu çözeltide dört farklı sıcaklıktaki stabilitesi.....	55
Şekil 20. Sulu çözelti ve mikroemülsiyon formülasyonundan 1 hafta bekletme sonrası yapılan salın profili.....	56
Şekil 21. Mitomisin C eklendikten sonra ME formülasyonundaki damlacık büyüklüklerinin artış nedeninin şematize edilmiş şekli.....	65
Görüntü 1. Kontrol amaçlı uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C çözeltisi ile elde edilen film.....	58
Görüntü 2. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (1. tavşan).....	59
Görüntü 3. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (2. tavşan).....	60
Görüntü 4. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (3. tavşan).....	61
Görüntü 5. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile 2. saatte elde edilen film (1. tavşan).....	62

TABLÖLAR DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1. Mitomisin C ile yapılmış bazı klinik araştırmalarda elde edilmiş olan farmakokinetik veriler.....	6
Tablo 2. Farmasötik formülasyon geliştirilmesinde kullanılan bazı sürfaktanların HLB değerleri.....	19
Tablo 3. Y/S tipi mikroemülsiyon oluşturmada kullanılan sürfaktan karışımları ve hesaplanan HLB değerleri.....	34
Tablo 4. Fındık yağı ile mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmasında denenmiş formülasyonlar.....	37
Tablo 5. Soya yağı ile mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmasında denenmiş formülasyonlar.....	38
Tablo 6. Mitomisin örneklerinin farklı konsantrasyonlarında okunan absorban ve $\lambda_{\max}$ değerleri.....	45
Tablo 7. UV spektroskopi cihazının örnekler arası ve ölçümler arası doğruluk ve kesinliğini teyid etmek için alınan ölçümler.....	46
Tablo 8. Mitomisin C'nin yağ/su dağılım katsayılarının hesaplanmasında kullanılan veriler.....	47
Tablo 9. İnce tabaka kromatografisinde farklı çözücülerde mitomisin C'nin Rf değerleri.....	48
Tablo 10. Y/S tipi fındık yağlı mikroemülsiyon noktaları	49
Tablo 11. Y/S tipi soya yağlı mikroemülsiyon noktaları.....	50
Tablo 12. Karakterizasyon çalışmaları için seçilen fındık yağlı mikroemülsiyon.....	51

Tablo 13. Soya yağı ile hazırlanan Y/S formülasyonların viskozite, pH ve damlacık büyüklük değerleri.....	51
Tablo 14. Mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozite iletkenlik, pH ve kırılma indisi değerleri.....	52
Tablo 15. Mikroemülsiyonlarda kullanılan yağların kırılma indisleri.....	53
Tablo 16. Mikroemülsiyonlarda kullanılan sürfaktanların ve sürfaktan karışımlarının kırılma indisleri.....	53
Tablo 17. Mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyu ve polidispersite indeks değerleri.....	54

GİRİŞ VE AMAÇ

Mitomisin-C, *Streptomyces caespitosus*'dan izole edilen ve birçok kanser türünde antineoplastik etkinliği kanıtlanmış bir antibiyotiktir. Hücre döngüsünün herhangi bir evresine özgü olmaksızın etkinliğini gösterir. Organizmada hipoksik koşullarda aktivasyon sonucu meydana gelen mono- ve bi-fonksiyonel metabolitleri nükleik asitlere bağlanma özelliğine sahiptir.

Farmakokinetik açıdan bakıldığında mitomisin C intravenöz olarak verildikten sonra, geniş bir dağılım hacmine sahip olup uygulama dozuna bağlı olarak 48 - 120 dakika gibi kısa bir plazma yarılanma ömrüne sahiptir.

Mikroemülsiyonlar berrak, termodinamik olarak dayanıklı, üç veya daha fazla maddenin karışımı ile elde edilen sistemlerdir. Kimya, çevrebilimi ve eczacılık gibi alanlarda oldukça yaygın bir şekilde araştırılmışlardır. Mikroemülsiyonlar hazırlanmalarının kolaylığı, birçok etkin maddeyi çözebilmeleri ve uzun süren stabiliteleri ile ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek için oldukça elverişlidirler. Ayrıca birçok yoldan ilaç uygulanmasına olanak sağlarlar.

Bu çalışmanın amacı mitomisin-C'nin çeşitli mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanarak bu formülasyonlara yüklenmesi ve taşıyıcı sistemdeki ilacın radyoaktif yöntemlerle işaretlenerek organizmadaki dokulara hedeflenmesinin izlenmesidir.

Çalışmamızda ilaç taşıyıcı sistem olarak mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanarak bu formülasyona yüklenen mitomisin-C'nin biyolojik yarılanma ömrünün uzatılması, terapötik özelliklerinin artırılması ve toksik etkilerinin minimize edilerek organ ve dokulara hedeflenmesi düşünülmüştür.

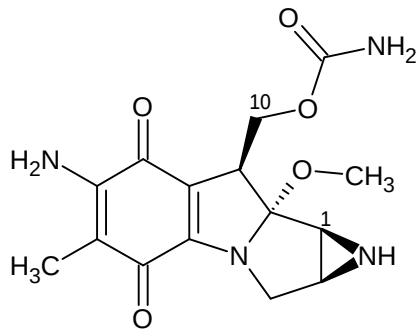
BÖLÜM I

TEORİK BİLGİLER

I.1. Mitomisin C

I.1.1. Mitomisin C'nin kısa tanımı

Mitomisin C (MMC), 1950'li yıllarda *Streptomyces caespitosus* mikroorganizmasının fermentasyon ortamında Japon bilim adamlarınca keşfedilmiş bir antitümör antibiyotiktir. MMC'nin kimyasal formülü ve kimyasal ismi, bazı fizikokimyasal parametreleriyle birlikte Şekil 1'de gösterilmektedir [159]. MMC'nin memeli hücreleri üzerinde bir dizi özgü etkisi bulunmaktadır. Bunların arasında DNA sentezinin özgü inhibisyonu, apoptoz uyarımı, mutajenez, kardeş kromatid değişimleri, genetik rekombinasyon ve DNA onarım mekanizmalarının uyarılması gibi etkiler sayılabilir. Bu etkilerinden faydalanarak bu tür süreçlerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca MMC klinikte yaygın bir şekilde antitümöral olarak kullanılan bir ilaçtır [136]. Mitomisin için kullanılan çeşitli semboller ve eşdeğer isimlendirmeler şöyledir: MMC, NSC-26980, Mutamycin, Mytozytrex, 7-Amino-9 α -methoxymitosane v.b.



Mitomisin C

IUPAC adı: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4]pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

MA:..... 334.327 g/mol

Erime derecesi:..... 360°C

Madde hali:..... katı

Suda çözünürlük:..... 8.43 mg/ml

Çözünürlük: Suda orta derecede, metanol, aseton, butil asetat ve sikloheksanonda çözünür. (**LogP:**-1.6)

Şekil 1. Mitomisin C'nin kimyasal yapısı, IUPAC tarafından belirlenen kimyasal adı ve bazı fizikokimyasal özellikleri.

Dünyadaki mitomisin C üreticileri arasında şınlar sayılabilir : A.G. Scientific Inc., ABD; Hebei Xingang Pharmaceutical Co., Ltd., Çin; Hubei HONCH Pharmaceutical Co.,Ltd., Çin; Kyowa Hakko Kogyo, Japonya; Fluka, Almanya. Türkiye'ye MMC Kyowa Hakko Kogyo ürünü olarak Onko Koçsel Ltd. tarafından 2, 10 ve 20 mg'lık flakonlarda liyofilize toz şeklinde ithal edilmektedir.

I.1.2. Mitomisinin etki mekanizması ve farmakokinetiği

I.1.2.1. Etki mekanizması

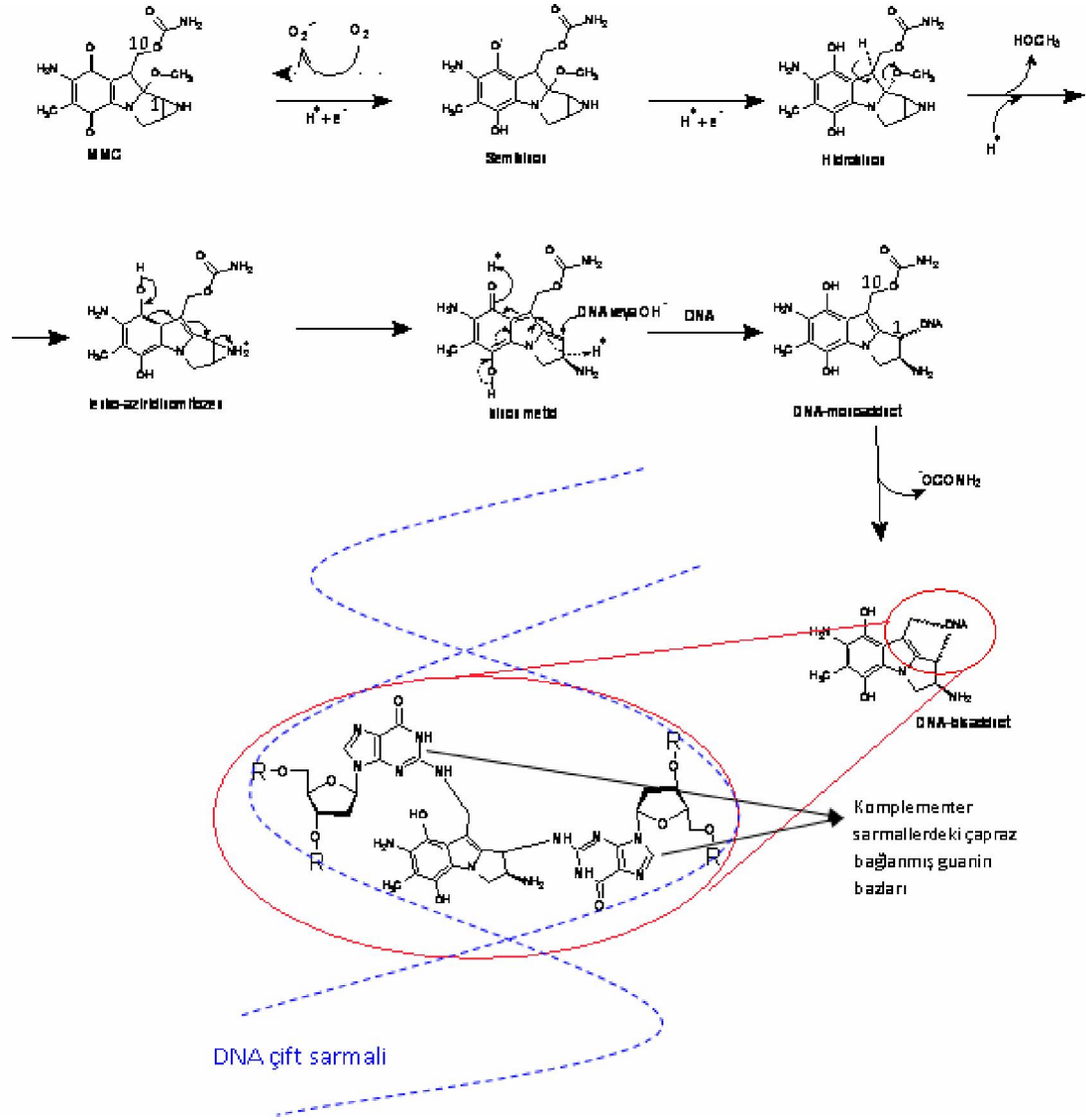
MMC'nin DNA'ya bağlanarak polimerizasyonu engellediği ve böylece hücrelerin çoğalmasını durdurarak antitümör etki gösterdiği tespit edilmiştir. *B.subtilis* ve *E.coli* üzerinde yapılmış olan bir çalışmada bu maddenin in vitro ortamda DNA'yı alkilleyebilmesi için ortama hücre lizatlarının eklenmesi gerektiği bulunmuştur [69]. Daha sonraları yapılan çalışmalarda MMC'nin DNA ile reaktif hale gelebilmesi için kimyasal veya enzimatik olarak aktive edilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda aktivasyonunun daha yüksek seviyede olduğu ve sitotoksik etkisinin de daha kuvvetli olduğu gösterilmiştir. Bu koşullarda aktive edilen MMC Şekil 1'de gösterilen 1. ve 10. konumlarından DNA komplementer sarmallerindeki guanin bazları ile bağ oluşturarak sitotoksik etkisini gösterdiği bulunmuştur [39, 47, 76, 104, 126, 137]. DT-diyaforaz isimli bir enzimin MMC'yi aktive edici etkisini inceleyen bir çalışmada ise, MMC'nin bu enzim tarafından aktive edilmesinin, oksijen bağımlı olmasından ziyade pH bağımlı olduğu göstermiştir [120]. Yine bir başka çalışmada MMC'nin pH-bağımlı aktivitesi oksijenli ortamda EMT6 hücreleri üzerinde araştırılmış, denenen üç farklı pH'dan (5.7, 6.4 ve 7.5) en asidik olan koşullarda, ortamda oksijen bulunmasına rağmen hücreler üzerinde sitotoksik etki gözlenmiştir [77]. İndirgenmiş olan MMC'nin oksidatif koşullarda tekrar inaktif hale yükseltgenerek DNA ile çok düşük

seviyelerde çapraz bağlanmalar oluşturduğu bulunmuş ve bu, oksijenlenme seviyesi düşük olan tümörlerle normal hücreler arasında etki farklılığı açısından açıklayıcı bir unsur olmuştur [112]. Oksijenli ortamda MMC'ye direnç kazanmış Çin Hamster Over hücrelerinin (CHO) redüktan enzimleri eksprese eden plazmit DNA ile transforme edildiği bir çalışmada transformasyondan sonra bu hücrelerin tekrar MMC'ye duyarlı hale geldiği gözlenmiştir [13].

Yukarıda sunulan kısa araştırma özetlerinin sonucunda MMC'nin etkisini en iyi şekilde gösterebilmesi için gereken koşullar şöyle sıralanabilir:

- a) Hipoksik ortam
- b) Düşük pH
- c) MMC'nin indirgenerek aktivasyonunu sağlayacak redüktanlar (hücrelerdeki reduktazlar: NADPH sitokrom P-450 reduktaz, ksantin oksidaz ve DT-diyaforaz gibi) [13, 104, 120]
- d) Ortamda olabildiğince az miktarda oksidan bulunması gerekir

Bu koşullar sağlandığı zaman çoğu antikanser etkenlerden farklı olarak MMC in vivo olarak bifonksiyonel ve trifonksiyonel alkilleyici metabolitlerine dönüşür. Bu metabolitler hücre döngüsü evrelerinden bağımsız olarak hem hipoksik hem de iyi oksijenlenen hücrelere toksik etki gösterir, ancak hipoksik olanlara karşı toksisitesi daha yüksetir [63]. Bu şekilde aktive edilmiş olan MMC, DNA zincirindeki guanin bazlarına bağlanır ve DNA sentezine ve işlenmesine engel olur. Kimyasal veya enzimatik olarak aktive edilmiş MMC'nin DNA ile oluşturduğu başlıca kovalent bağlı ürünler araştırılmış ve tanımlanmıştır [65, 138, 139]. Şekil 2'de MMC'nin aktivasyonu ve DNA'ya bağlanma basamakları gösterilmektedir [65, 137, 139].



Şekil 2. Mitomisin C'nin redüktif aktivasyonu sonucunda DNA ile bağlanmasının şematik olarak gösterilmesi

I.1.2.2. Farmakokinetik

Araştırmacılara göre MMC çift kompartmanlı farmakokinetik modele uymaktadır [34, 35, 84, 121]. Yani parenteral olarak uygulandıktan sonra MMC, merkezi kompartmandan (plazmadan) hem elimine olmakta, hem de periferik kompartmana dağılmaktadır (α dönemi). Merkezi kompartman ile periferik kompartman arasındaki ilaç dağılımı dengeye ulaştığı zaman, ilacın plazmadan uzaklaşma hızında düşme

meydana gelir (β dönemi). Bu dönemde ilacın periferik kompartmana dağılıma işlemi dengeye ulaştığından ve elimine edilme işlemi devam ettiğinden plazmadaki konsantrasyonu daha yavaş azalmaktadır [4].

Tablo 1’de MMC ile yapılmış olan klinik denemelerden elde edilen farmakokinetik parametrelerden bazıları gösterilmektedir. Tablo 1’de de görüldüğü gibi araştırmacılar uygulama yolunu (i.v., i.a., i.p.), uygulama rejimini (tek ilaç olarak veya başka bir antikanser ilaçla birlikte) ve tekrar edilen uygulamanın, ilacın farmakokinetik parametrelerine etkisini araştırmışlardır. Bu sonuçların ortalama değerlerine bakıldığında bunlardan ilacın biyolojik yarı ömrü ($t_{1/2}$) ve dağılım hacmiyle (V_d) ilgili olanlar birbirine yakın sonuçlar vermektedir. Eğri altında kalan alan (EAA) ve vücut klirensi (Cl_{tot}) ise daha heterojen bir dağılım göstermektedir. Literatürde bildirilen veriler ele alınarak mitomisin’in ortalama biyolojik yarılanma ömrünün 48,9 dk olduğu hesaplanmaktadır.

Tablo 1. Mitomisin C ile yapılmış bazı klinik araştırmalarda elde edilmiş olan farmakokinetik veriler.

Uygulama rejimi	$t_{1/2}$ (dk)	V_d (Litre)	AUC (μ g.saat/Litre)	Cl_{tot} (Litre/saat)	Kaynak
Tek ilaç i.v. bolus	50	22	631	18	Den Hartigh J. et al. 1983
Kombine i.v. bolus	42	25	457	28	
Tek ilaç i.v. infüzyon	41	36	416	37	
Kombine i.a. bolus*	50-54	22-24	1105-1063	18-18	
Tek ilaç iv bolus 1.uygulama	43	23.6	446	22.4	Lankelma J. et al. 1988
Tek ilaç iv bolus 2.uygulama	40	27.6	364	33.1	
Kombine iv 1.uygulama	51	26	500	22.6	
Kombine iv 2.uygulama	55	30.7	458	27.2	
Tek ilaç (iv-ia belirtilmemiş)	50	-	1100	-	Dennis I.F. et al. 1993
Kombine (iv-ia belirtilmemiş)	50	-	1100	-	
PVA ve nişasta mikroküreleriyle embolizasyon + i.a. MMC	50.4-59.8	21.9-22.9	1472-1448	45.42-45.36	Rump A.F.E. et al. 2002
Ortalama	48.9 $\pm$ 5.7 %RSD 11.66	25.6 $\pm$ 4.2 %RSD 16.41	812 $\pm$ 395 %RSD 48.65	28.6 $\pm$ 9.9 %RSD 34.62	

I.1.3. Mitomisin C'nin klinikte kullanıldığı durumlar

Mitomisin C farklı kanser türlerinin tedavisinde değişik başarı oranları ile uzun yıllardan beri tek başına veya diğer antikanser ilaçlarla kombine edilerek kullanılmaktadır [16, 34, 63, 68]. Keşfedilmesini takip eden yıllarda oldukça geniş spektrumda kanserlerin tedavisinde kullanılmış olmasına rağmen günümüze doğru yaklaştıkça endike edildiği durumlar azaltılmıştır. MMC'in klinikte kullanıldığı durumlar Bradner tarafından derlenip yayınlanmıştır [16]. Bunların kısa özetleri şöyledir:

I.1.3.1. Mesane kanseri

Mesane kanseri tedavisinde hem sistemik, hem de lokal intra vesikal olarak uygulanan MMC'nin doksorubisinden daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. İntravesikal olarak uygulandığında kan dolaşımına geçen MMC miktarının çok az olduğu bulunmuş olup, daha yüksek dozlarda uygulamanın mümkün olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, erken evrede mesane kanseri tedavisi için intravesikal MMC'nin en etkin ilaç olabileceği bildirilmiştir.

I.1.3.2. Meme kanseri

Meme kanseri tedavisinde MMC'nin hem ilk, hem de sürdürme tedavilerinde tek ilaç olarak etkinliğinin az olduğu ve antrasiklinler ve vinka alkaloidleri gibi diğer antikanser ilaçlarla kombine edildiği zaman etkinliğinin arttığı gösterilmiştir.

I.1.3.3. Serviks kanseri

MMC'nin ilerlemiş serviks kanserinde kullanılmasının bir vinka alkaloidi (vinkristin, vindesin gibi) ve/veya cisplatin ile kombine edilerek daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu kombinasyonlar içinde MMC'nin rolü tam olarak belirlenmiş değildir.

I.1.3.4. Kolorektal ve anal kanser

Bu kanser olgularında tek kemoterapötik olarak MMC, tek dozluk bolus uygulama (bir defada hızlı bir şekilde verme) veya infüzyon şeklinde uygulama (belirli bir zaman zarfı içinde yavaş yavaş verme) bulmuştur. Ancak, diğer ilaçlarla kombine edilerek kullanıldığı zaman (özellikle 5-fluorourasil (5-FU) ve radyasyon ile birlikte) % 70'lere varan pozitif cevapla daha iyi sonuçlar elde edildiği bulunmuştur. Hepatik arter infüzyonu şeklinde de MMC+5-FU kombinasyonları denenmiş, bu şekilde ileride gelişebilecek karaciğer metastazlarının daha düşük sıklıkla seyrettiği gözlenmiştir.

I.1.3.5. Mide kanseri

Mide kanserinde tek ilaç olarak kullanıldığı zaman % 30 gibi bir sağaltım sağlayan MMC'nin en yaygın olarak uygulandığı kombinasyonu 5-FU+Adriamisin+MMC (FAM)'dır. Bu kombinasyonla tek ilaca göre daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (ortalama % 37). FAM tedavisine cis-platinin de eklenmesi ve ilaçların uygulama şekillerinde değişiklik yapılması ile tedaviye yanıtın daha da iyileştiği gözlenmiştir. FAM tedavisi ilerlemiş gastrik kanser ameliyat sonrası destek tedavisinde uygulandığında hastaların total yaşam süresini uzatmada ve hastalığın geri dönmesini önlemede hastalık derecesine bağlı olarak farklı seviyelerde iyileşme gözlenmiştir [81].

I.1.3.6. Baş-boyun kanserleri

Radyasyon tedavisi ile birlikte kullanıldığı zaman sadece MMC uygulamasına oranla daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Radyoterapi+MMC rejimine 5-FU eklendiğinde %64 gibi bir yanıt alınmış ancak sonraları yapılan denemelerde bu sonuçları destekleyen bulgular elde edilememiştir. Yanıt elde edilmesi için yüksek dozlarda MMC uygulanmasından dolayı yüksek hematotoksisite ile karşılaşmıştır.

Bunun yerine *cis*-platin+5-FU+MMC verildiğinde ve MMC'nin dozu düşürülerek uygulandığında % 73 gibi yüksek bir tedavi yanıtı elde edildiği bulunmuştur. Radyoterapi ile birlikte MMC+bleomisin uygulaması ile yine yüksek yanıt elde edildiği gözlenmiştir. Ancak, radyasyondan ve bleomisinden ileri geldiği tahmin edilen toksisitenin yüksek olduğu bildirilmiştir. MMC+doksorubisin+*cis*-platin ile başlatılan ve 5-FU ile sürdürülen bir tedavide ise, yan etki olarak oluşan mukozitin hafifletilmesi amaçlanmıştır. Başlangıç tedavisine %94 gibi oldukça yüksek bir yanıt alınmış ancak sürdürme 5-FU rejiminde yüksek miyelosüpresyon gözlenmiştir.

I.1.3.7. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde MMC'nin tek ilaç olarak kullanıldığı durumlarda %20 - %50 arasında olumlu yanıt elde edilmiştir. En yaygın olarak kullanılan kombinasyon tedavisi MMC + vinka alkaloidi + *cis*-platin (MVP)'dir. En iyi sonuçlar *cis*-platin dozunun yüksek olduğu rejimlerde elde edilmiştir. MVP tedavisi ile semptomatik iyileşmenin yüksek olduğu ancak, hayatta kalma süresinde iyileşme olmadığı bildirilmiştir. Bu tedavinin şiddetli yan etkilerinden kaynaklanan morbiditenin yüksek olduğu bildirilmiştir. MMC + gemsitabin + vinorelbin ile yapılan faz I/II denemede tedavinin iyi tolere edildiği ve iyi sonuç alındığı (%45) bildirilmiştir.

I.1.3.8. Pankreas kanseri

Pankreas kanseri tedavisinde MMC'nin tek ilaç olarak kullanılmasının düşük etkinlikle sonuçlandığı ortaya konmuştur. Kombinasyon tedavisi olarak kullanılmış olan rejimlerden FAM ve streptozosin + MMC + 5-FU ile iyi sonuçlar elde edilmiştir ancak hastaların hayatta kalma sürelerinde iyileşme gözlenmemiştir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda ise bu rejimlerle elde edilen cevap düzeylerine ulaşamamıştır.

MMC'nin pankreas kanseri tedavisinde kullanılan rejimlerdeki rolü tam olarak açıklanamamıştır.

I.1.3.9. Konjunktival melanoma

Mitomisin C'nin konjunktiva melanomu tedavisinde primer terapi ve yardımcı terapi olarak etkinliği test edilmiştir. %0.04'lük çözelti halinde günde dört defa uygulana MMC'nin 28 günlük tedaviden sonra melanoma kitlelerinde önemli derecede azalma tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kullandıkları dozda mitomisin C uygulamasının tüm hastalarda geçici keratokonjonktivit oluşumuna neden olduğunu gözlemişler ancak bunun klinik olarak önemsiz olduğu yorumunu getirmişlerdir [33, 44].

I.1.4. Mitomisin C'nin toksisitesi

I.1.4.1. Hematolojik toksisite

MMC'nin en yaygın ve belirgin toksisitesi kemik iliği baskılanmasıdır. Genellikle ilaç uygulamasından sonra gecikmeli olarak meydana geldiği ve kümülatif olarak şiddetlendiği bildirilmiştir [107]. 5-FU ile birlikte uygulandığı bir tedavi rejiminde kombinasyon tedavisinin tek ilaç tedavisinden daha ağır kemik iliği baskılanması ile seyrettiği bildirilmiştir [18]. Önceden başka ilaçlarla veya radyasyon ile tedavi edilen hastalarda ve kanama bozuklukları ile trombositopeni görülen hastalarda dikkatle kullanılması gerektiği bildirilmiştir. İntravesikal uygulamalarda kemik iliği baskılanması nadir gözlenen bir durum olarak bildirilmiştir [63].

I.1.4.2. Sindirim sistemi

Genellikle intravenöz uygulamadan sonra bulantı ve kusma meydana gelmektedir. Bulantıların hafif seyrettiği, ancak uygulamadan sonra 1-2 gün sürdüğü bildirilmiştir. Karın ağrısı, diyare, anoreksi ve kanlı kusmuk da meydana

gelebilmektedir [63]. MMC ve cis-platin kombinasyon terapisinin incelendiği bir çalışmada hastaların 1/3'ünde şiddetli gastrointestinal toksisite gözlemlendiği bildirilmiştir [148]. MMC uygulamasından sonra karaciğerde doza bağımlı venöz tıkanıklık gözlenmiştir ve bunun sonucunda MMC'nin doz kısıtlayıcı faktörleri arasına alınması önerilmiştir [53].

I.1.4.3. Deri ve mukozalar

Uygulama bölgesine ağrı, tromboflebit ve şiddetli doku harabiyeti MMC tedavisinde gözlenen sık yan etkilerdendir. Çok ağır durumlarda deri nakli yapılması gerekebileceği bildirilmiştir [63]. Topikal ve intravenöz MMC uygulamasının yara iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyen bir araştırmada MMC'nin i.v. yolla uygulanmasının skar doku oluşumunu artırarak daha şiddetli dokun harabiyetine neden olduğu, topikal olarak uygulandığında ise yara iyileşmesini geciktirici etki oluşturduğu bildirilmiştir [118].

I.1.4.4. Akciğerler

MMC tedavilerinde %10'dan az sıklıkla ağır interstisyer pnömonit gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu durumun önüne geçebilmek için yüksek dozda kortikosteroid uygulanması ve MMC'nin derhal kesilmesi gerekmektedir. Nadir olarak bronkospazm ve pulmoner fibrozis bildirilmiştir. MMC'nin toksik etkilerinden hemolitik üremik sendrom sonucu akciğer ödemi gelişebilmektedir [63].

I.1.4.5. Sinir sistemi

MMC'nin sinir sistemi üzerine toksik etkileri yorgunluk, güçsüzlük, letarji, baş ağrısı, parestezi, konfüzyon gibi nadir görülen etkilerdir. Hemolitik üremik sendrom sonucunda nörolojik bozukluklar meydana gelebilmektedir [63].

I.1.4.6. Üro-genital sistem

Üro-genital sistem üzerindeki en ağır toksisite hemolitik üremik sendromdur. Bunun, genellikle 60mg/m^2 'den fazla olan dozlarda gözleendiği ve hastaların %50'sinde mortalite ile sonuçlandığı [140] ve bu durumun, plazma ürünleri uygulanması ile şiddetlenebileceği bildirilmiştir. Hemolitik üremik sendromun mikroanjiyopatik hemolitik anemi sonucu meydana geldiğini gösteren çalışmalarda [114, 117, 130, 143] pulmoner ve kardiyovasküler sekonder toksik etkiler de meydana geldiği bildirilmiş ve renal fonksiyonların değerlendirilmesiyle MMC uygulamasının erken kesilmesinin durumun kötüleşmesini önleyebileceği bildirilmiştir.

I.1.4.7. Kardiyovasküler sistem

MMC'nin kardiyovasküler sistem üzerindeki toksik etkisi genellikle doksorubisin ile birlikte verildiği zaman doksorubisinin toksisitesini artırmasıdır [20, 144]. Hemolitik üremik sendrom sonucu hipertansiyon gelişebilmektedir.

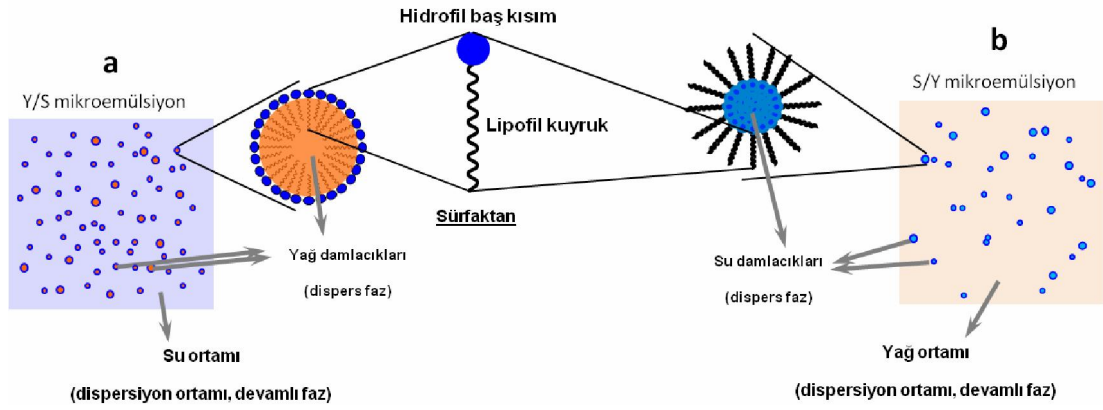
I.2. Mikroemülsiyonlar

I.2.1. Mikroemülsiyonların genel tanımı

Mikroemülsiyonlar (ME), birbiriyle karışmayan en az iki sıvı fazdan birinin, çeşitli yardımcı maddeler (sümfaktanlar ve ko-sümfaktanlar) sayesinde diğeri içinde dağıtılmasıyla elde edilen homojen görünümlü, saydam ya da yarısaydam olan dispers sistemlerdir [109]. Dispers faz damlacıklarının boyutu 8-10 nm'den 150-200 nm'ye kadar değişebilmektedir. Makroemülsiyonlardan farklı olarak, kinetik stabilitelerinin olmamasına rağmen belirgin termodinamik stabiliteye sahiptirler [92,128]. Şekil 3'de görüldüğü gibi bir y/s tipi mikroemülsiyonda devamlı faz olan su fazı içinde yağ damlacıkları dağılarak dispers fazı oluşturmaktadır [85] .

I.2.2. Mikroemülsiyonların termodinamik özellikleri

Normalde birbiriyle karışmayan su ve yağ sıvıları, aralarında minimum yüzey alanı oluşturacak şekilde fazlarına ayrışırlar. Yani bir kap içerisinde bulunan iki sıvı arasındaki değme alanı sadece ayrıışan iki fazın arasında bulunan alandan ibaret olur. Böylece sistemin serbest enerjisi minimum seviyede tutulmaya çalışılır. Yağ fazından su fazına doğru damlacıkların oluşmasıyla birlikte, birim kütle başına düşen yüzeyler arası alan artacaktır ve bu nedenle de sistemin serbest enerjisi artacaktır.



Şekil 3. Y/S (a) ve S/Y (b) mikroemülsiyonların şematize edilmiş görünümü ve bileşenleri. Kolaylık açısından, sürfaktan molekülü her iki tip mikroemülsiyon için ortak olarak gösterilmiştir.

Termodinamik olarak da, kapalı bir sistemin kararlı olabilmesi için serbest enerjisinin olabildiğince düşük değerde tutulması gerekmektedir [92]. O zaman su fazı içine dağıtılan yağ damlacıkları, suyla aralarında oluşan alanı azaltmak için bir araya gelip yeniden bütün bir yağ fazı oluşturma eğiliminde olacaklardır. Eğer oluşan damlacıkların uzun süre kararlı olarak tutulması istenirse uygulanması gereken bazı

işlemler, yüzey etkin maddelerin (sümfaktanların) kullanımına dayanmaktadır. Mikroemülsiyonların kendiliğinden oluşabilmesi için serbest enerjinin negatif veya yeterli derecede düşük olması gerekir. Yüzeyler arası gerilim ile serbest enerji arasındaki ilişki formül 1’de gösterildiği gibi tanımlanmıştır [92, 109]:

$$\Delta G = \Delta A\gamma_{o/w} - T\Delta S \quad (\text{Formül 1})$$

Burada ΔG karışımın serbest enerjisi, $\gamma_{o/w}$ yağ/su arayüzeyindeki gerilimi temsil etmektedir (γ_i olarak da gösterilir), ΔS belli sıcaklıkta (T) dispersiyon süreciyle ilgili konfigürasyon entropisi, ΔA ise mikroemülsiyon oluşuktan sonra ve oluşmadan önceki yüzeyler arası alanların farkını temsil etmektedir. Oluşacak ΔA her zaman pozitif bir değerde olacağından yüzeyler arası gerilimin yeterince düşük değerde tutulması ($\gamma_i < 10^{-3}$ gibi), mikroemülsiyon oluşumu için ön koşuldur. Sümfaktanların buradaki görevi, su-yağ yüzeyleri arası alana adsorbe olarak yüzeyler arası gerilimi azaltan bir kuvvet (π) yaratmaktır. Bunun gerilim üzerine etkisi formül 2’deki gibidir [66,109]:

$$\gamma_i = \gamma_{(o/w)a} - \pi \quad (\text{Formül 2})$$

$\gamma_{(o/w)a}$: sümfaktanını yağ ve su fazları arasında adsorbsiyonu dengelendikten sonraki su – yağ arayüzeyinin gerilimi

Formül 2’deki γ_i Formül 1’de yerine konunca, azalan gerilim ile birlikte sistemin serbest enerjisinde de azalma olacağı açıktır.

I.2.3. Mikroemülsiyonların sınıflandırılması

I.2.3.1. Yapılarına göre sınıflandırma

Dispersiyon ortamı ve dispers fazların yapıları itibarı ile mikroemülsiyonlar temel olarak üç grupta toplanabilmektedir:

- 1) Y/S tipi mikroemülsiyonlar** - Sulu ortamda dağılmış yağ damlacıklarından oluşurlar. Lipofil ilaç moleküllerinin sulu ortamda çözünürlüğünün

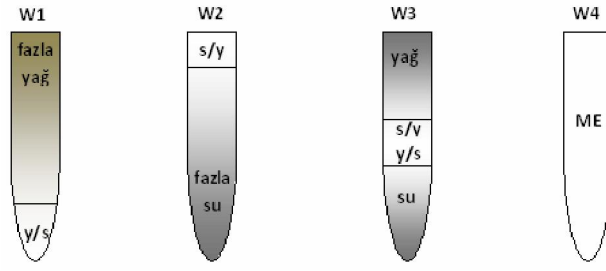
arttırılması ve böylece değişik faydalar elde etmeyi amaçlayan preklinik ve klinik çalışmalarda ele alınmışlardır [11, 17, 94, 101, 135].

2) S/Y tipi mikroemülsiyonlar - Yağ ortamında dağılmış su damlacıklarından oluşurlar. Suda çözünür ilaçların p.o. ve i.m. tatbik için uygun şekilde formüle edilip in-vivo koşullarda stabilitesinin arttırılması ve ilacın uzun süreli salımının sağlanması gibi amaçlara yönelik çalışmalarda kullanılmışlardır [22, 30, 70, 71, 99, 153].

3) Devamlı mikroemülsiyonlar- Birbiri içinde, nanometrik boyutlarda bir ağ gibi dağılan su ve yağ fazlarından oluşurlar. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların formüle edilmesinde ve in-vivo uygulanmasına yönelik çalışmalarda ele alınmışlardır [146,151].

1.2.3.2. Winsor sınıflandırması

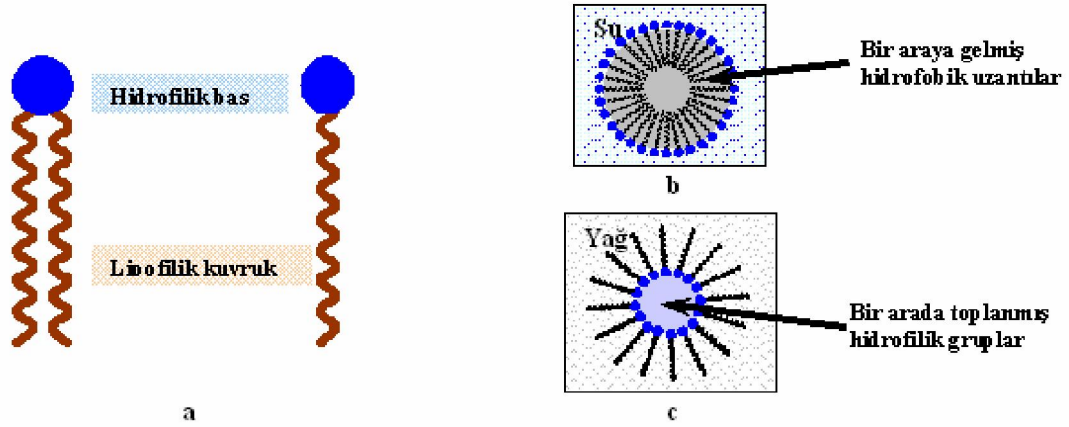
Karışım komponentlerinin oranlarına bağlı olarak meydana gelen değişik mikroemülsiyon sistemleri Winsor Tipleri şeklinde de sınıflandırılmıştır (W1, W2, W3, W4 gibi). Bunlardan Winsor tip1-mikroemülsiyonlar (W1) oluştukları kap içerisinde dibe toplanan y/s mikroemülsiyon kısmı ve üst tarafta kalan fazla yağ ortamının dengedeki halidir. Winsor tip2-mikroemülsiyonlar (W2) üstte s/y mikroemülsiyonu ile altta fazla su ortamının dengede olduğu sistemlerdir. Winsor tip3-mikroemülsiyonlar (W3) üstte toplanan yağ fazı ile altta toplanan su fazı arasında lokalize olan ve bu fazlarla dengede olan s/y ve y/s mikroemülsiyon karışımıdır. Son tip olan Winsor tip4-mikroemülsiyonlar (W4) saydam tek faz görünümlü mikroemülsiyon sistemleridir. Şekil 4’de bunlar şematize edilmiştir [108,109].



Şekil 4. Mikroemülsiyonların Winsor tiplerine göre tüplerde oluşturdukları değişik fazlar.

1.2.4. Sürfaktanlar (Yüzey Etkin Maddeler, YEM)

Sürfaktanlar hidrofilik ve lipofilik olmak üzere iki kısımdan oluşan, amfifil molekül yapısına sahip maddelerdir. Genellikle hidrofilik bir baş kısmı ve lipofilik bir kuyruk kısmına sahip oldukları kabul edilmektedir (Şekil 5a). Molekül üzerinde suya ilgiyi sağlayan bölgede genellikle hidroksil, fosfat, tiyol, karboksil gibi suyla etkileşebilen ve iyonize olabilen kimyasal gruplar bulunmaktadır. Birbirinde çözünmeyen yağ ve su sıvılarından oluşan bir karışıma katıldıklarında her iki faza da ilgi gösterdiklerinden dolayı bunlar, su ve yağ arayüzeyine adsorbe olma özelliğine sahiptirler. Bu arayüzeyde monomoleküler bir tabaka oluşturan bu amfifiller yüzeyler arası gerilimin azalmasına neden olmakta ve sistemin serbest enerjisini de azaltmaktadır. Böylece yapısına katıldıkları mikroemülsiyonların fazla enerji uygulaması gerektirmeden, kolayca oluşmalarını ve uzun süre stabil kalmalarını sağlarlar.



Şekil 5. Sürfaktan molekülünün şematik yapısı (a); b- sulu ortamda misel; c- yağlı ortamda ters misel [96].

Yüzey aktif maddeler sulu ve yağlı sıvılardan tek bir tanesine katıldıklarında değişik şekillerde kendiliğinden oluşan molekül toplulukları (miseller) meydana getirirler. Sulu ortama bırakılan sürfaktan moleküllerinin hidrofobik kuyruk kısımları, suyla teması en aza indireyecek şekilde bir araya gelir ve sadece baş bölgelerini açıkta bırakarak misel denen yapıları oluştururlar (Şekil 5b). Yağ ortamına bırakıldıklarında ise bu defa lipofilik kısımlarını ortamla etkileşime sunacak şekilde birleştirip hidrofil baş kısımlarını yağ ortamından gizlemeye çalışırlar. Bu şekilde oluşturdukları yapılara da ters miseller denir (Şekil 5c).

1.2.4.1. Sürfaktanların sınıflandırılması

Sürfaktanlar hidrofil kısımlarının taşıdığı yüke göre başlıca dört sınıfa ayrılarak sınıflandırılmıştır: anyonik, katyonik, noniyonik ve zwitteriyonik (çift kutuplu) olarak sınıflandırılırlar [28]:

- *Anyonik sürfaktanlar:* Hidrofilik kısımları negatif yüklü kimyasal gruplar taşır. Bunlara örnek olarak karboksil, sülfonat, sülfat gibi gruplar verilebilir. (Örn: Sodyum stearat, kalsiyum oleat, sodyum lauril sülfat)

- *Katyonik sürfaktanlar*: Hidrofilik kısımları katerner amonyum grubu gibi pozitif yüklü gruplar içeren sürfaktanlar. (Örn: Setrimonyum bromür, Heksadesilpiridin-yum klorür)
- *Noniyonik sürfaktanlar*: Polarize olmayan hidrofil gruplar içeren baş kısmına sahip sürfaktanlar. (Örn: PEG-stearatlar, Tween'ler, Span'lar)
- *Zwitteriyonik sürfaktanlar*: Bu tip sürfaktanların baş kısımları hem negatif hem de pozitif yük taşımaktadır. Sulfobetainler bunlara örnektir. (Örn: Setil alkol, Stearik asit)

Sürfaktanlar arasında noniyonik olanlar, yüklü olanlara oranla daha az toksik olduğundan farmasötik formülasyonlarda (özellikle de parenteral olarak uygulananlarda) kullanıma en uygun olanlardır.

I.2.4.2. Sürfaktan seçiminde dikkate alınması gereken parametreler

Amfifillerin mikroemülsiyon oluşturmak amacıyla kullanılmasında göz önünde bulundurulması gereken üç özellikleri vardır. Bunlardan birincisi moleküllerin bağlı polaritesinin bir göstergesi olan hidrofil – lipofil denge (Hydrophile – Lipophile Ballance, kısaca HLB olarak gösterilmekte); ikincisi sürfaktan moleküllerinin geometrik parametrelerini kullanarak hesaplanan ve oluşacak mikroemülsiyonlardaki partikül şekli ve yüzey eğimleri hakkında bilgi veren Kritik Paketleme Parametresidir (KPP) (Critical Packing Parameter, CPP); ve üçüncüsü de Faz Değişim Sıcaklığı (FDS) (Phase Inversion Temperature, PIT) veya HLB Sıcaklığı olarak da tanımlanan ve sürfaktanın normal sıcaklıkta su ile yağ fazına olan ilgisinin, sıcaklık artışına bağlı olarak tersine döndüğü noktayı temsil etmekte olan bir parametredir.

I.2.4.2.1. Hidrofil – Lipofil Denge (HLB)

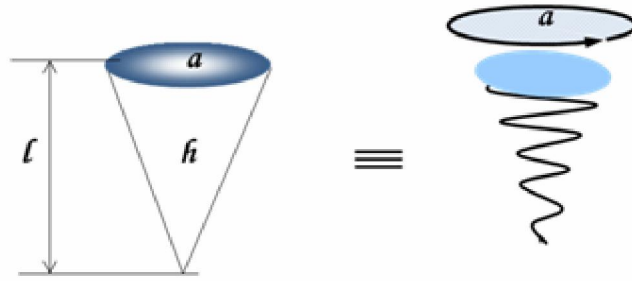
Süpfaktanların HLB değeri Griffin tarafından 1949 yılında sunulan ve molekülün yapısı hakkında bilgi vermekten çok molekülün değışik çözücülerdeki çözünürlük oranı hakkında bilgi veren ve süpfaktanın kullanım alanlarının göstergesi olan bir parametredir. Süpfaktan moleküllerinin yapısal özellikleri (esterlerin sabunlaşma sayısı, yağ asitlerinin asit sayısı, oksietilen gruplarının sayısı, polioller) gözönünde bulundurularak HLB hesaplanmasında değışik yöntemler uygulanmış ve uyumlu sonuçlar vermişlerdir [27, 46, 55, 56, 58, 100]. İlaç taşıyıcı sistem geliştirmede kullanılan bazı süpfaktanların HLB değeri Tablo 2’de verilmiştir. Daha başka süpfaktanların HLB değeri ve bazı yağların emülsiyon oluşturmak için gerektirdikleri HLB değeri Griffin [55] ve Guo ile ark. [58] tarafından verilmiştir.

Tablo 2. Farmasötik formülasyon geliştirilmesinde kullanılan bazı süpfaktanların HLB değeri.

Süpfaktan adı	HLB
Polioksietilen (20) sorbitan monostearat (Tween® 60)	14.9
Polioksietilen (20) sorbitan monooleat (Tween® 80)	15
Polioksietilen (20) sorbitan monolaurat (Tween® 20)	16.7
Sorbitan trioleat (Span® 85)	1.8
Sorbitan monooleat (Span® 80)	4.3
Sorbitan monolaurat (Span® 20)	8.6
Fosfatidilkolin (lesitin)	~ 4
Polietylenglikol-6 gliseril monooleat (Labrafil M1944 CS®)	3-4
Polietylenglikol-6 gliseril linoleat (Labrafil M2125 CS®)	3-4
Polietylenglikol-8 gliseril kaprilat/kaprat (Labrasol®)	14
Kaprilik/kaprik asitin mono-digliseritleri (Capmul MCM®)	5.5-6
Poliglikolize gliseritler (Labrafac CM 10®)	10
Gliseril monokaprilat/kaprat	7.5
Polioksietilen-25 hidrojene hint yağı (HECO25, Simulsol 1292)	10.8
Polioksietilen-40 hidrojene hint yağı (HECO40, Simulsol 1293)	13.6
Polioksietilen-60 hidrojene hint yağı (HECO60, Simulsol 1294)	15.3

I.2.4.2.2. Kritik Paketleme Parametresi (KPP) (Critical Packing Parameter (CPP), P_c , veya sadece paketleme parametresi)

Bu parametre sürfaktan moleküllerinin geometrik değerleri (uzunluk, hacim, genişlik) göz önünde bulundurularak hesaplanır ve üç boyutlu yapıları hakkında bir tahmin sağlar. Bundan yararlanılarak kullanılacak sürfaktanın oluşturacağı misel türleri ve buna bağlı olarak da oluşturacağı mikroemülsiyon türü tahmin edilebilir [85, 133]. Şekil 6'da sürfaktanların KPP'sinin hesaplanmasında kullanılan fiziksel parametreleri gösterilmektedir. Bu parametrelerle Formül 3'deki gibi KPP hesabı yapılır.



Şekil 6. Sürfaktan molekülünün kritik paketleme parametresini hesaplanmasında kullanılan fiziksel parametreler. a – hidrofilik kısmın yüzey alanı; h – hidrofobik kuyruğun molar hacmi; l – sürfaktan molekülünün uzunluğu

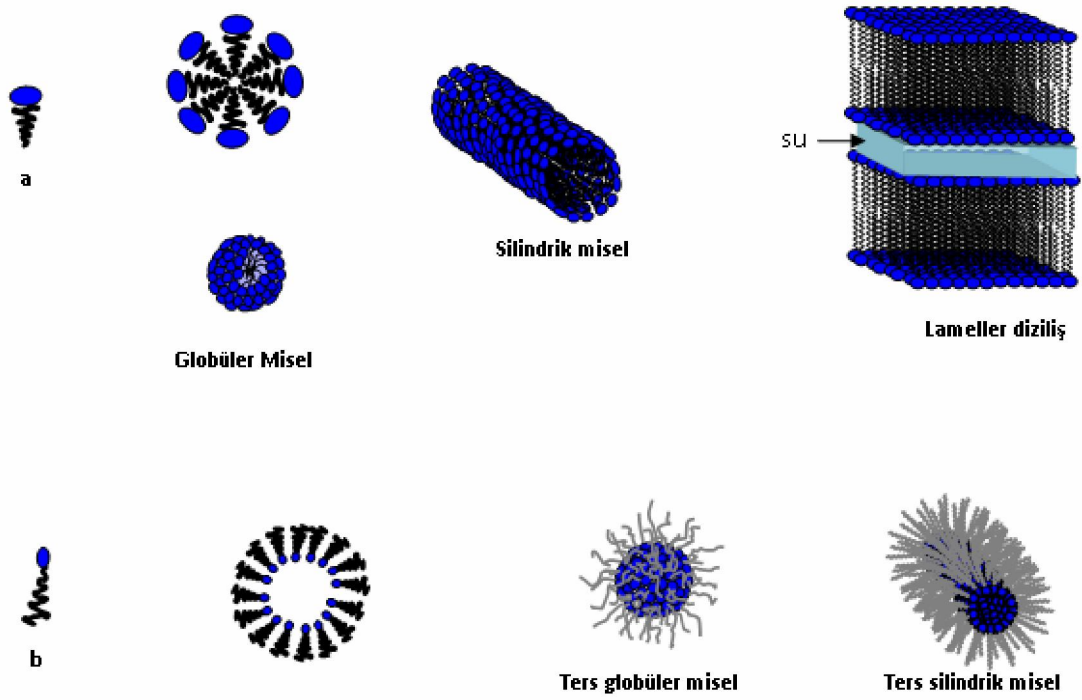
$$P_c = \frac{h}{a \cdot l} \quad (\text{Formül 3})$$

Şekil 7'de yüzey etkin maddelerin fiziksel yapılarına bağlı olarak, hidrofilik (Şekil 7a) veya hidrofobik ortamda (Şekil 7b) oluşturdukları kümelenme şekilleri şematize edilmiştir. Hidrofilik ortamda moleküller kuyruk kısımlarını bir araya getirerek, hidrofobik ortamda ise baş kısımlarını bir araya toplayarak misel oluştururlar.

Paketleme parametresinin hesaplanması için gerekli bilgiler sürfaktanların KPP değeri hesaplanıp uygun formülasyon için sürfaktan seçiminde kolaylık sağlanabilir. KPP değerlerine göre sürfaktanların oluşturabileceği miseller de şöyledir: $\leq 1/3$ -globüler, $1/3-1/2$ - silindrik, $1/2-1$ - akışkan çift sürfaktan tabakalı kesecikler, ~ 1 -düzlemsel çift tabaka dizilişi, ~ 2 - ters silindrik, ~ 3 - ters globüler dizilişi [85, 133].

I.2.4.2.3. Faz dönüşüm sıcaklığı (PIT)

Faz dönüşüm sıcaklığı özellikle polioksietilen türevi noniyonik sürfaktanlarla çalışılırken önem kazanmaktadır. Bu sürfaktanların tanımlanmış faz diyagramları sıcaklığa son derece bağımlıdır. Bu nedenle bu sürfaktanlarla stabilize edilmiş sistemlerin spesifik faz değişim sıcaklıkları vardır. Sıcaklık değişimiyle sürfaktanın yağ ve su fazına olan ilgisi değişebilir ve bu da mikroemülsiyon alanının genişlemesine veya daralmasına neden olabilir. Ortamda bulunan elektrolitler, kullanılan yağ tipi, sürfaktan ve kosürfaktan tipi, PIT sıcaklığının değerini değiştirebilmektedir [85]. Bu özellikten faydalanarak Anton N. ve ark. [6] nanoemülsiyon ve nanokapsül elde etmişlerdir.



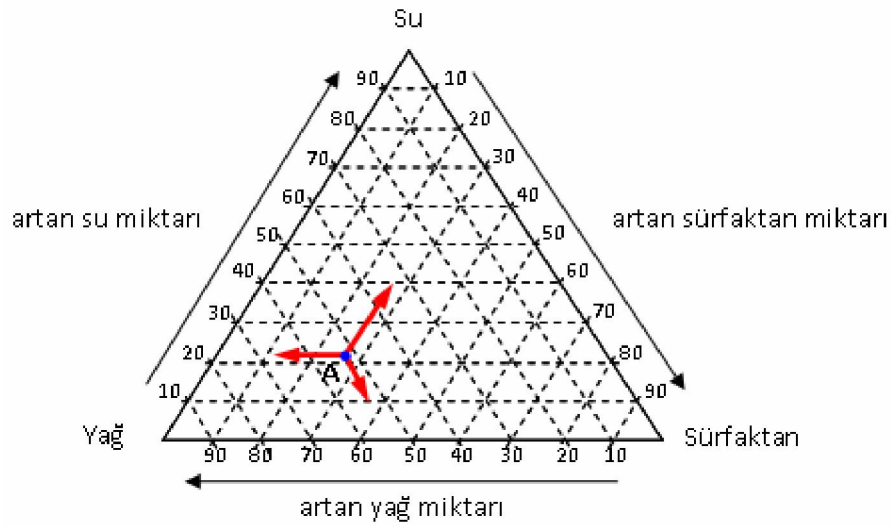
Şekil 7. Sürfaktan moleküllerinin oluşturduğu değişik misel yapıları. a- geniş polar baş kısmına sahip sürfaktan molekülü ve oluşturduğu misel türleri, b- küçük polar kısımlı sürfaktan molekülleri ve karşılık gelen miseller.

I.2.5. Mikroemülsiyonların tanımlanması

I.2.5.1. Faz diyagramları

Bir mikroemülsiyonun tanımlanmasına ilk önce faz diyagramının incelenmesiyle başlanır. Bu amaçla su, yağ ve sürfaktan (veya sürfaktan-kosürfaktan karışımı) olmak üzere, formülasyonun üç temel bileşenini temsil eden üçlü faz diyagramları kullanılır. Bir mikroemülsiyonun faz diyagramı Şekil 8'de görüldüğü gibidir. Üçgenin herbir köşesi sistem komponentlerinden birinin %100 olduğu noktayı temsil etmektedir. A noktasındaki bileşenlerin oranları, ok işaretlerinin uzatılmasıyla üçgenin kenarlarından tespit edilir.

Faz diyagramlarının hazırlanmasındaki amaç, kullanılan maddelerin mikroemülsiyon oluşturmak için gereken optimal karışımlarını belirlemektir. Bunun farmasötik olarak önemi de bileşime girecek olan sürfaktan miktarını uygun bir seviyede tutmaya yarayacak olmasıdır. Yani mikroemülsiyon oluşturmaya yetecek minimum sürfaktan konsantrasyonunu belirlemek için yardımcı olmaktadır.



Şekil 8. Bir mikroemülsiyonun üçlü faz diyagramı.

Üçlü faz diyagramlarından elde edilen bilgilerden faydalanarak mikroemülsiyon damlacıklarının hacimsel olarak kapladıkları kısım (damlacıkların fraksiyonu) (Φ) hesaplamaları Formül 4 ve 5'deki gibidir [12], ve bunlar damlacıkların difüzyon katsayılarını hesaplamada kullanılır [129].

$$\text{S/Y mikroemülsiyonu için:} \quad \Phi_s = \frac{V_{H_2O} + V_{surf.}}{V_{tot.}} \quad (\text{Formül 4})$$

$$\text{Y/S mikroemülsiyonu için:} \quad \Phi_y = \frac{V_o + V_{surf.}}{V_{tot.}} \quad (\text{Formül 5})$$

Diyagram üzerinde tanımlanan karışımların hangi fazlardan oluştuğunu (lameller, sıvı kristal, mikroemülsiyon, hekzagonal fazlar gibi) belirlemek üzere görsel olarak elde edinilen bilgiler yeterli olmamaktadır. Bu bigilere ek olarak polarize ışık mikroskopisi, elektriksel iletkenlik ölçümleri ve dar ve geniş açılı X-ışını saçılımı (Small/Wide-Angle X-ray Scattering, SAXS/WAXS) teknikleri kullanılarak faz diyagramlarının tam kompozisyonu tanımlanabilmektedir [5, 14, 21, 37, 72, 145].

1.2.5.2. Polarize ışık mikroskopisi

Polarize ışık mikroskopisi mikroemülsiyon çalışmalarında görsel olarak berrak olan karışımların gerçekten de mikroemülsiyon olup olmadığını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Mikroemülsiyonlar gibi izotropik materyaller polarize ışık altında incelendikleri zaman, polarize ışığın farklı yönlerde kırılmasına neden olmadıklarından incelenen alan tamamen karanlık olarak gözlenir. Bu durum söz konusu olduğu zaman mikroemülsiyonun oluştuğu kanısına varılır. Tam tersine, eğer gözlem alanında karanlık alanın içinde parlak alanların veya haç benzeri parlak şekillerin izlenmesi durumunda hekzagonal faz veya sıvı kristallerden oluşan bir sistem elde edildiği kanaatine varılır [21, 37, 72].

1.2.5.3. Dar Açılı X-ışını Saçılımı (SAXS)

Angelico ve ark. [5] SAXS tekniğini, lesitin/su/siklohekzan karışımlarının faz diyagramını tanımlamak için kullanmışlardır. Bu teknik sayesinde, polarize ışık mikroskopisi ve NMR incelemelerinden elde ettikleri destekleyici veriler ile üçlü faz diyagramında değişik fazları karakterize ederek fazlar arası sınırları tesbit etmişlerdir [5,145].

I.2.5.4. Elektriksel iletkenlik ölçümleri

Mikroemülsiyon çalışmalarında iletkenlik ölçümüne örnek olarak Boonme ve arkadaşlarının çalışması verilebilir [14]. Mikroemülsiyona eklenen su miktarı arttıkça belli bir noktaya kadar karışımın konduktivitesinin düşük değerlerde seyrettiğini ve bu noktadan sonra önemli ölçüde artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bunu da, yağ-devamlı olan karışımın su-devamlı hale gelmesi (faz dönüşümü, yani w/o tip ME → o/w tip ME geçişi) şeklinde yorumlamışlardır.

I.2.5.5. Damlacık özelliklerinin ve boyutlarının belirlenmesi

Mikroemülsiyonlarda damlacıkları incelemede kullanılan yöntemler genel olarak iki ana grupta toplanmakta [83], ancak son yıllarda bunlara yeni teknikler de eklenmektedir. Bunlar da kendi içlerinde alt gruplara bölünmektedir:

- I. Elektron Mikroskopisi
 - Dondurup kırarak inceleme
 - Doğrudan inceleme
- II. Saçılma yöntemleri
 - Dar açılı x-ışını saçılımı
 - Dar açılı nötron saçılımı
 - Statik Işık Saçılımı
 - Dinamik Işık Saçılımı
- III. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

Bu yöntemler arasında elektron mikroskopisi ilk kullanılanlardandır ve son zamanlarda pek tercih edilmeyen bir yöntemdir. NMR tekniği ise bu alanda daha yeni uygulama bulan bir yöntemdir.

Mikroemülsiyonlarda damlacık çaplarını tayin etmede ışık saçılım yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların arasında Statik Işık Saçılımı (Static Light

Scattering, SLS) (aynı zamanda Total Intensity Light Scattering (TILS) olarak da bilinmektedir [14]), Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) (aynı zamanda foton korrelasyon spektroskopisi (Photon Correlation Spectroscopy, PCS) olarak da bilinmektedir [1, 2, 51]), Dar Açılı Nötron Saçılımı (Small Angle Neutron Scattering, SANS) [51, 129] ve bunların değişik modifikasyonları bulunmaktadır. Ayrıca incelenen örneklerin mikroyapısını aydınlatmak için (moleküler çözelti, damlacıklar veya devamlı fazlardan mı oluştuğunu kesin olarak tayin etmek amacı ile) nükleer manyetik NMR teknikleri de kullanılmaktadır [145]. Bu yöntemlerden sadece DLS aşağıda kısaca açıklanmıştır.

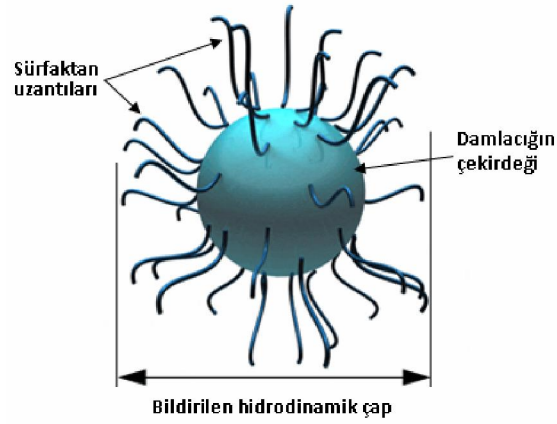
1.2.5.5.1. Dinamik ışık saçılımı (DLS, Photon Correlation Spectroscopy (PCS))

Damlacık boyutu ve özelliklerinin incelenmesinde kullanılan yöntemlerden DLS’de, incelenen maddenin (molekül, partikül veya damlacık) dispersiyon ortamındaki Brown hareketlerinden dolayı uygulanan lazer ışını şiddetinde meydana gelen dalgalanmalardan faydalanılır. Işık şiddetindeki bu değişimlerin incelenmesi ile Brown hareketlerinin hızı elde edilir ve Stokes-Einstein eşitliği (Formül 6) kullanılarak bu hız, incelenen partikül, damlacık veya moleküllerin boyutlarını hesaplamada kullanılır [2, 133, 160]. Bu yöntemle (sadece mikroemülsiyonlar için söylersek) damlacıkların hidrodinamik çapları elde edilir, yani damlacıkların sadece çekirdek kısımları değil de, sürfaktanların da katkısı ile elde edilen çap hakkında bilgi edinilmektedir (Şekil 9) [160].

Stokes-Einstein eşitliği:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Formül 6})$$

Burada, k_B – Boltzmann sabiti, T – sıcaklık, η – ortamın viskozitesi, D – difüzyon sabiti ve R_H – hidrodinamik çapı temsil etmektedir.



Şekil 9. Dinamik Işık Saçılım yöntemi ile elde edilen hidrodinamik çap [160].

I.2.6. Mikroemülsiyonların kullanım alanları

Mikroemülsiyonların uygulama bulduğu alanları kısaca şu şekilde sıralanabilir:

I.2.6.1. Mikroemülsiyonların tıp ve eczacılık alanı dışındaki uygulamaları

I.2.6.1.1. Çevre bilimi

Çevre biliminde ME'lar toprağa karışmış ve başka yollarla geri elde edilemeyen yağ atıklarının işlenmesinde kullanılırlar. Ayrıca, çevresel iyileştirme ve detoksifikasyonda kullanılmaktadırlar [36, 123].

I.2.6.1.2. Yakıt olarak

ME'ların yakıt olarak kullanımına dayanan çalışmalar 1980'lere kadar dayanmaktadır. Bu konuyla ilgili patentler alınmıştır [31, 64, 125]. Mikroemülsiyon yakıtları ile yanma esnasında meydana gelen karbon monoksit ve azot oksit gazlarının emisyon oranını düşürme avantajı vardır [108].

I.2.6.1.3. Ziraat alanında kullanım

ME'lar pestisid ve herbisitler gibi maddelerin taşınması amacıyla ziraat alanında kullanım bulmaktadır. Pestisit taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiş mikroemülsiyon sistemlerin patentleri de alınmıştır [97,103].

I.2.6.1.4. Gıda alanında kullanım

Değişik vitaminlerin, yağların ve bazı biyoaktif maddelerin gıdalara katılmasında mikroemülsiyonlar yaygın olarak kullanılırlar [43, 45, 49]. Bu alanda da yine patent çalışmaları yapılmıştır [26, 40].

I.2.6.1.5. Malzeme biliminde kullanımı

Mikroemülsiyonlar değişik mikroporlu yapıların, membranların ve nanopartiküllerin sentezinde ara basamak işlevi görmektedirler [10, 87 - 89, 115, 116, 150, 155, 157].

I.2.6.1.6. Analitik uygulamalar

Analitik kimya alanında mikroemülsiyon formülasyonlarından değişik maddelerin saflaştırılması, oktanol-su dağılım katsayılarının tayini ve karışımlardaki maddelerin teşhisi için faydalanılır [19, 61, 80, 93]. Bunlar eczacılıkta da uygulama bulan kullanımlardır.

I.2.6.1.7. Biyoteknolojide uygulamaları

Mikroemülsiyonlar biyoteknoloji alanında enzim ve peptid immobilizasyonu için, enzimatik reaksiyon ortamı olarak ve ayırma işlemlerinde kullanım bulmaktadırlar [50, 108, 131].

I.2.6.1.8. Diğer kullanım alanları

Kaydırıcı, yağ kırıcı ve korozyon önleyici olarak, tekstil üretiminde kaplama ve cilalama işlemlerinde ve deterjan olarak kullanım bulurlar [108].

I.2.6.2. Mikroemülsiyonların eczacılık alanında uygulamaları

Eczacılıkta mikroemülsiyonlar ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmede kullanılmaktadır. Bunlar uygulama yoluna göre ayrıldığında şu sınıflandırma yapılabilmektedir:

I.2.6.2.1. Oral yoldan uygulanan mikroemülsiyon formülasyonları

Oral yoldan ilaç uygulanmasında mikroemülsiyonlar etkin maddelerin mide asitlerine ve enzimlere karşı stabilitesinin artırılması, çözünürlüklerinin iyileştirilmesi ve böylece absorpsiyonlarının ve biyoyararlanımlarının artırılması [15, 24, 30, 50, 79, 96, 127], farklı çözünürlükteki ilaçların tek formülasyonda verilebilmesini sağlamak [3] amacıyla denenmiştir.

I.2.6.2.2. Parenteral yoldan uygulanan mikroemülsiyon formülasyonları

Parenteral yolla ilaçların mikroemülsiyon formülasyonları olarak uygulanmasındaki amaçlar şu şekilde sıralanabilmektedir: i) ilaç maddelerinin çözünürlüğünün artırılması ve parenteral yolla vermeye uygun formülasyon geliştirilmesi, ii) stabilitelerinin artırılması, iii) farmakokinetik parametrelerinin iyileştirilmesi, iv) ilaçların organizmada özgül bölgelere hedeflendirilmesi, v) uygulama yolunun değiştirilmesi, vi) etkinliklerinin artırılması, vii) toksisitelerinin azaltılması. Literatürde parenteral yolla uygulama için yapılmış olan araştırmalarda intravenöz [32, 78, 99, 105, 122, 146, 156], intraperitoneal [32,59], intranazal [32, 86, 119, 147, 154], topikal [12,29] transdermal [23, 32, 70, 71, 141] ve oküler [32, 57, 73, 142] uygulama için mikroemülsiyonlar tasarlanmıştır. Parenteral mikroemülsiyonlar üzerine kapsamlı derlemeler Date ve Nagersenker [32] ve Gupta ve Moulik [60] tarafından yapılmıştır. Yazarlar uygun yardımcı maddelerin seçilmesi ile geciktirilmiş salım ve uzun kan dolaşımı gibi özelliklere sahip ve biyolojik olarak geçimli olan mikroemülsiyonların geliştirilmesinin mümkün olduğu şeklinde bir sonuca varmışlardır.

BÖLÜM II

DENEYSEL KISIM

II.1. Materyal ve metod

II.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Soya Lesitini (%90 fosfatidilkolin) (L)	Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya
Tween® 80 (T80)	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Etanol (%99.9) (E), aseton, metanol, kloroform ve n-oktanol (anhydrous, %99+)	Sigma-Aldrich Co Inc., Almanya
Fındık yağı (FY)	Çotanak, Ordu, Türkiye
Soya (SY)	Küçükbay Yağ Sanayi A.Ş., İzmir, Türkiye
Mitomisin C (MMC) (10mg MMC + 240mg NaCl)	Kyowa Hakko Kogyo, Tokyo, Japonya
NaCl	Atabay Kimya San. Ve Tic. A.Ş., İstanbul
^{99m}TcO₄⁻ (sodyum tuzu)	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir
Anestezik madde (Alfamine)	Alfasan International, Woerden, Hollanda
İTK plakları – Silicag Gel 60 F 254 plate	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya

Tüm çalışmalarda distile su kullanılmıştır.

II.1.2. Kullanılan araç-gereçler

Spektrofotometre - Shimatzu UV-1208	Shimatzu Co., Tokyo, Japonya
Etüv - Nüve FN 400	Nüve Temel Laboratuvar Cihazları, Ankara, Türkiye
Manyetik karıştırıcı - Ika-Labortechnik RCT basic ve Vorteks karıştırıcı - MS1 minishaker	IKA® -Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Almanya
Plate çalkalayıcı- Jake und Kunkel shaker KS501D	
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, İngiltere
Viskozimetre - Brookfield DV-III+ Programmable Viscometer	Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, ABD
Konduktometre - Jenway 4071	Bibby Scientific Ltd T/As Jenway, Essex, İngiltere
Diyaliz membranı - spectra/por® (M.W. Cut off 12,000-14,000)	Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, ABD
Şırınga ucu filtre - Sartorius ministar single use syringe filter	Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
Santrifüj - Spectrafuge 7M	Labnet International, Edison, NJ, ABD
Refraktometre – Atago® NAR-1T Liquid	Atago Co., Ltd., Tokyo, Japonya
Liyofilizatör - Christ® Alpha 1-2 LD plus Freeze dryer	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Almanya
Görüntüleme cihazı – Toshiba Digital Gamma Camera GCA 602A	Toshiba Co., Tokyo, Japonya

II.1.3. Kullanılan deney hayvanları

Çalışmanın in vivo deneme aşamasında deney hayvanı olarak beyaz Yeni Zelanda cinsi tavşanlar kullanılmıştır (ağırlık: 2 kg, cinsiyet: erkek).

II.2. Pratik çalışmalar

II.2.1. Mitomisin C'nin UV-spektroskopisiyle standart eğri çizimi

II.2.1.1. Seçicilik tayini

Mitomisin C 1mg/ml olacak şekilde distile su çözeltisi hazırlandı ve bu stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak UV-spektrometrede absorbansları ölçüldü. Cihazın MMC'ye seçiciliğini temin etmek için öncelikle MMC'nin UV spektrumunda hangi dalga boyunda maksimum absorbans verdiğini bulmak üzere, maddenin 10 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisi hazırlanarak, 400–200 nm arasında spektrumu alındı. Daha sonraki ölçümlerde burada tespit edilen ve MMC'ye özgül olan maksimum absorbans dalga boyu ($\lambda_{\max}$) kullanıldı.

II.2.1.2. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması

II.2.1.2.1. Ölçüm sınırlarının tayini

Kullanılan aletin MMC'yi kantitatif olarak tespit edebildiği en düşük ve en yüksek konsantrasyonları bulmak için yapılan bir denemedir. MMC stok çözeltisinden 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15 µg/ml konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı ve 400-300 nm arasında absorbansları okundu. 362 nm'deki ($\lambda_{\max}$) absorbans değeri 0.100 olan çözeltideki konsantrasyon, kantitatif olarak tespit edilebilen en düşük konsantrasyon olarak kabul edildi. Absorbans değeri 1.00'in üstüne çıkan ilk çözeltideki madde konsantrasyonu da kantitatif olarak tespit edilebilen en yüksek konsantrasyon olarak kabul edildi.

II.2.1.2.2. Analitik yöntem validasyonu

II.2.1.2.2.1. Doğrusallık

MMC'nin 1mg/ml stok çözeltisinden 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 µg/ml konsantrasyonlarında bir seri çözelti hazırlandı. 362 nm'de absorbansları ölçüldü.

Konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ile kalibrasyon doğrusu çizildi ve doğru denklemi bulundu.

II.2.1.2.2.2. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik

Doğruluk saptanan değerlerin gerçek değere yakınlığını belirten parametredir. Doğruluğu test etmek için MMC'nin yedi farklı konsantrasyondaki çözeltisinin 362 nm'de ard arda üçer defa absorbansı okutuldu. Kalibrasyon grafiğinde bunların üst üste konması ile absorbansların doğru değere yakınlığı test edildi.

II.2.1.2.2.3. Kesinlik

Kesinlik, belirtilen koşullarda aynı örnek üzerinde alınan ölçümlerin birbirine yakınlığını (tekrarlanabilirliğini) ifade eden bir parametredir. Tekrarlanabilirliği test etmek için belirli konsantrasyonlardaki çözeltilerden ard arda alınan 3'er ölçümün bağıl standart sapmaları hesaplandı (RSD). RSD'nin %2'den az olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

II.2.2. Mitomisin C'nin Yağ/Su dağılım katsayısının tayini

Her yağ (~2ml) 24 saat boyunca bir miktar su ile (0,5ml) dengeye ulaşması için bekletildi. Daha sonra 1mg/ml MMC çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden tüplere birer ml hacimlerde kondu. Su ile dengelenmiş yağlardan tüplere yaklaşık 1'er ml eklendi. Tüpler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 125 rpm de 3 saat boyunca yatay çalkalayıcıda tutuldu. Dengelenmesi için gece boyu bekletildi ve yağ fazları uzaklaştırılarak sulu fazlar temiz eppendorf tüplere aktarıldı. Ölçüm için her tüpten üç ayrı mezüre (10 ml'lik) 0,1'er ml alındı ve 10 ml hacme tamamlandı. Spektroskopik ölçüm 362 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması olarak verildi.

II.2.3. Mitomisin C'nin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile incelenmesi

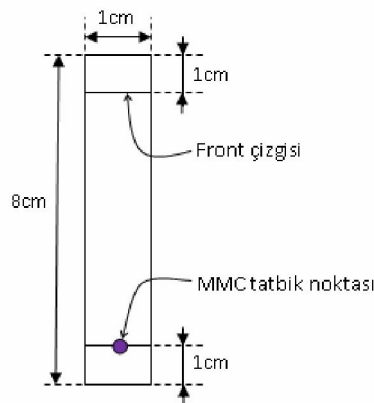
Mitomisin C'nin İTK'da sürüklenme profilinin çıkartılması için Tablo 9'da belirtilen mobil fazlar denendi. Öncelikle 1mg/ml olacak şekilde MMC çözeltisi hazırlandı. Mobil fazlar İTK tanklarına ayrı ayrı 5'er ml kondu ve tank içindeki atmosferin doygunluğa ulaşması için 30 dk kapakları kapalı şekilde bekletildi. Bu esnada Şekil 10'da gösterilen ebatlarda kesilmiş ve işaretlenmiş İTK plaklarına kılcal borular yardımı ile MMC çözeltisi tatbik edildi ve çözücünün uçması için bekletildi. Daha sonra plaklar tankların içine düzgün bir şekilde yerleştirildi ve mobil faz çözgen sınırı (front) çizgisine ulaşana kadar tankların ağzı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında sürüklendi. Denemeler üçer defa tekrarlandı. MMC'nin Rf değerleri Formül 7 kullanılarak hesaplandı.

$$Rf = \frac{S}{F} \quad (\text{Formül 7})$$

Burada;

S – MMC'nin tatbik noktasından sürüklendiği noktaya kadar olan uzaklık

F – Tatbik noktasından çözgen sınır (front) çizgisine kadar olan uzaklık



Şekil 10: İTK'da sabit faz olarak kullanılan plakların ebatları ve işaretlenmesi

II.2.4. Mikroemülsiyon formülasyonları

II.2.4.1. Önformülasyon çalışmaları

II.2.4.1.1. Mikroemülsiyon formülasyonlarının yağ fazı

Y/S tipi mikroemülsiyon oluşturmak için yağ fazı olarak iki tür bitkisel yağ kullanıldı: fındık yağı (FY) ve soya yağı (SY).

II.2.4.1.2. Mikroemülsiyon formülasyonlarının sürfaktan karışımı

Y/S tipi mikroemülsiyon oluşturmak için sürfaktan karışımının HLB'si 8-12 aralığında olacak şekilde hesaplandı (Tablo 3). Lipofilik sürfaktan olarak Lesitin (L) (HLB ~ 4), hidrofilik sürfaktan olarak Tween® 80 (T80) kullanıldı (HLB = 15). Her iki sürfaktan da biyolojik olarak geçimli olmalarından dolayı tercih edildi. Kosürfaktan olarak yine biyolojik olarak geçimli olan etanol (E) kullanıldı. Sürfaktan/kosürfaktan oranı 4:1, 2:1, 1.5:1 olacak şekilde denendi. Sürfaktan karışımlarının HLB değerleri, her sürfaktanın HLB'si ile ağırlıklarının çarpımlarının toplanıp, toplam ağırlığa bölünmesi ile hesaplandı (Formül 8).

$$HLB = \frac{HLB_l \times f_l + HLB_h \times f_h}{f_l + f_h} \quad (\text{Formül 8})$$

Burada HLB_l ve HLB_h – lipofilik ve hidrofilik sürfaktanların HLB değerleri, f_l ve f_h ise lipofilik ve hidrofilik sürfaktanların ağırlıklarıdır.

Tablo 3. Y/S tipi mikroemülsiyon oluşturmada kullanılan sürfaktan karışımları ve hesaplanan HLB değerleri

Tween80/Lesitin oranı	Karışım HLBsi
1.5:1	10.60
2:1	11.33
3:1	12.25

II.2.4.2. Mikroemülsiyon önformülasyonları ve faz diyagramlarının hazırlanması

Mikroemülsiyon formülasyonu hazırlamak için önce gerekli miktar yağ beherde tartıldı. T80 yağ üzerine eklenerek karıştırıldı. L, hesaplı miktar E'de vorteks ile 1000 rpm'de karıştırarak çözüldü, yağ ve T80 karışımı üzerine ilave edildi. Vorteks 1000 rpm de 30 sn. karıştırıldı. Daha sonra karışım manyetik karıştırıcıda 400-600 rpm'de karıştırarak, damla damla distile su ile titre edildi. Karışım 1 gece bekletildi. Oluşan sistemler görsel olarak berraklık açısından değerlendirildi. Tek faz, şeffaf olan sistemler mikroemülsiyon sistemler olabileceği düşünülerek üçgen faz diyagramlarına yerleştirildi ve mikroemülsiyon oluşum alanı çizildi. Önformülasyon çalışmaları intravenöz formülasyonlarda kullanılan %20 yağ oranını aşmayan oranlarda yağ kullanılarak gerçekleştirildi. Denemelerde FY ile hazırlanan örnekler Tablo 4'de verilmektedir. SY ile hazırlanan örnekler Tablo 5'de yer almaktadır.

II.2.5. Karakterizasyon çalışmaları için mikroemülsiyonların seçilmesi

Y/S tipi mikroemülsiyonların seçiminde faz diyagramında mikroemülsiyon alanının ağırlık merkezine yakın olması ve mümkün olduğunca az miktarda Sürfaktan/Kosürfaktan (S/KoS) içermesi ilkeleri izlendi. Hazırlanmalarında öncelikle gerekli miktarda L hesaplı miktarda E içerisinde çözüldü. Daha sonra bunun üzerine gerekli miktar T80 ve yağ eklenerek homojen berrak karışım elde edene kadar karıştırıldı. Son aşamada gerekli miktar su eklendikten sonra örnekler 10 dk karıştırıldı ve dengelenmesi için bir gece bekletildi.

II.2.6. Mikroemülsiyonların stabilitelerinin incelenmesi

II.2.6.1. Santrifüjleme testi

Santrifüjleme testi için her örnekten birer ml kullanıldı. Bunlar eppendorf tüplerine kondu ve 3500 rpm’de 30 dk santrifüjlendi. Sistemler homojenite, faz ayrışımı ve bulanıklık bakımından değerlendirildi. Tamamen berrak olan sistemler santrifüjlemeye dayanıklı olarak kabul edildi. Dayanıklı olan mikroemülsiyonlar sıcaklık değişimi testine tabi tutuldu.

II.2.6.2. Sıcaklık değişimi

Sıcaklık değişiminin mikroemülsiyonlar üzerine etkisini incelemek için santrifüjleme testinde pozitif sonuç alınan örnekler kullanıldı. Bunların herbiri, 30 dk -20°C ’de bekletildikten sonra 15 dk oda sıcaklığında tutuldu. Bu işlem ard arda beş defa tekrarlandı. Sistemler homojenite, faz ayrışımı ve bulanıklık bakımından değerlendirildi. Tamamen berrak olan sistemler sıcaklık değişimlerine dayanıklı olarak kabul edildi.

II.2.6.3. Saklama stabilitesi

Mikroemülsiyonların saklama stabilitesini tanımlamak için faz diyagramlarında berrak alanın ağırlık merkezine yakın noktalardan hazırlanan örnekler ağzı sıkı bir şekilde kapatılmış cam tüplerde, dolap içinde karanlıkta bekletildi. Zamanla bunların görünümünün değişip değişmediği görsel olarak değerlendirildi.

Tablo 4. Fındık yağı ile mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmasında denenmiş formülasyonlar.

HLB	S/KoS	% (a/a)			HLB	S/KoS	% (a/a)		
		Y	S/KoS	Su			Y	S/KoS	Su
11.33	4:1	2,5	30	67,5	11.33	1.5:1	7,5	25	67,5
		5	30	65			7,5	30	62,5
		7,5	30	62,5			7,5	40	52,5
		10	30	60			10	15	75
		15	30	55			10	20	70
		20	30	50			10	25	65
11.33	2:1	6,17	49,32	44,51			10	30	60
		5	20	75			10	40	50
		7,5	20	72,5			15	15	70
		10	20	70			15	20	65
		5	25	70			15	25	60
		4	48	48			15	30	55
11.33	1:1	4	48	48			15	40	45
12.25	1.5:1	2,54	20	77,46			20	15	65
		2,52	25	72,48			20	20	60
		2,46	30	67,54			20	25	55
		5,1	20	74,9			20	30	50
		5,02	25	69,98			20	40	40
		5,24	30	64,76			3,5	56,44	40,06
		7,56	20	72,44			2,6	31,5	65,9
		7,56	25	67,44			2,6	34	63,4
		7,4	30	62,6			2,6	36	61,4
		10,14	20	69,86			2,6	26	71,4
		10,1	25	64,9			2,6	28	69,4
		10,14	30	59,86			3	30	67
10.60	1.5:1	2,48	20	77,52			3,5	30	66,5
		2,52	25	72,48			4	30	66
		2,5	30	67,5			3,6	43,1	53,3
		5,12	20	74,88			6,85	41,1	52,05
		5,28	25	69,72			8,47	33,9	57,63
		5,28	30	64,72			10	30	60
		7,56	20	72,44			2,5	30	67,5
		7,56	25	67,44			5	50	45
		7,48	30	62,52			5	45	50
		10,1	20	69,9			10	40	50
		10,06	25	64,94			6	50	44
		10,12	30	59,88			4,24	42,37	53,39
11.33	1.5:1	4	48	48			3,23	61,39	35,38
		2,5	15	82,5			3,7	56,35	39,95
		2,5	20	77,5			3,7	51,75	44,55
		2,5	25	72,5			4,16	45,92	49,92
		2,5	30	67,5			3,01	46,49	50,5
		2,5	40	57,5			2,5	30	67,5
		5	15	80			3,23	35,38	61,39
		5	20	75			3,7	39,95	56,35
		5	25	70			3,7	44,55	51,75
		5	30	65			4,16	49,92	45,92
		5	40	55			3,01	50,5	46,49
		7,5	15	77,5			2,5	67,5	30
		7,5	20	72,5					

S/KoS - sürfaktan/kosürfaktan karışımının yüzdesi, **Y** - yağın yüzdesi, **KoS** - Etanol

Tablo 5. Soya yağı ile mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmasında denenmiş formülasyonlar

HLB	S/KoS	% (a/a)			S/KoS
		Y	S/KoS	Su	
11.33	1.5:1	2,49	30,28	67,23	Et-OH
		2,94	31,51	65,56	
		3,44	31,24	65,32	
		3,98	30,42	65,61	
		4,48	30,28	65,24	
		2,50	40,00	57,50	
		2,99	40,12	56,89	
		3,53	39,52	56,96	
		4,02	39,64	56,34	
		4,46	40,59	54,95	
		3,50	60,00	36,50	
		3,85	61,46	34,68	
		4,36	61,24	34,40	
		5,00	50,00	45,00	
		7,02	46,15	46,82	
		5,00	60,00	35,00	
		5,00	70,00	25,00	
		2,50	40,00	57,50	
		2,50	35,00	62,50	
		3,43	41,74	54,83	
		5,00	45,00	50,00	
		2,53	49,49	47,98	
		2,94	50,98	46,08	
		3,44	50,79	45,77	
		4,02	49,80	46,18	
		4,97	49,85	45,18	
		2,42	61,24	36,34	
		3,01	59,84	37,15	
		4,30	53,31	42,38	
		3,67	48,67	47,67	
		4,67	48,33	47,00	
		4,33	48,00	47,67	
		3,67	46,00	50,33	
		3,56	45,63	50,81	
		2,50	45,00	52,50	
		3,00	46,00	51,00	
		3,00	45,00	52,00	
		4,00	45,00	51,00	
		4,00	43,00	53,00	
		3,50	42,50	54,00	

II.2.7. Mikroemülsiyonların karakterizasyonu

II.2.7.1. Viskozite Ölçümü

Viskozite ölçümleri $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Örnekler, cihaza ait olan alüminyum tüplere kondu ve 21 no'lu paslanmaz çelik mil kullanılarak farklı döndürme hızlarında viskoziteleri ölçüldü.

II.2.7.2. pH ölçümü

pH ölçümleri $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

II.2.7.3. Elektriksel iletkenlik ölçümü

İletkenlik ölçümleri $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

II.2.7.4. Kırılma indisi ölçümü

Refraktif indis ölçümleri dijital termometreli Atago NAR-1T Liquid refraktometre kullanılarak $25.7\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Ölçümler formülasyonlarda kullanılan soya yağı, fındık yağı ve T80/L/E (1:0.5:1) surfaktan karışımı ile ayrıca T80 ve S85 sürfaktanları üzerinde gerçekleştirildi.

II.2.7.5. Damlacık boyutunun ölçülmesi

Damlacık boyutu ölçümleri Foton-Bağdaştırma Spektroskopisi (*Photon Correlation Spectroscopy (PCS)* veya *Dynamic Light Scattering (DLS)* olarak da bilinmektedir) ile işlem yapan Zeta Sizer Nano ZS cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler için, küçük hacimli tek kullanımlık ölçüm küvetleri kullanıldı. Deney şartları şu şekilde sıralanabilir: ölçüm sıcaklığı 25°C ; lazer ışığının saçılım açısı 173° ; ölçüm sayısı ($n = 3$).

II.2.8. İn vitro salım çalışması

II.2.8.1. İn vitro salım çalışması için mitomisin C yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması

II.2.8.1.1. Fındık yağı ile geliştirilen Y/S mikroemülsiyon formülasyonu

Fındık yağı	0.37g
Lesitin	0.89g
Tween 80	1.78g
Etanol	1.78g
Distile su	5.18g

II.2.8.1.2. Soya yağı ile geliştirilen Y/S mikroemülsiyon formülasyonu

Soya yağı	0.34g
Lesitin	0.83g
Tween 80	1.67g
Etanol	1.67g
Distile su	5.48g

Formülasyon madde II.2.4.2’de belirtilen şekilde hazırlandı ve gece boyu dengelenmesi için bırakıldı. Daha sonra mitomisin C bu formülasyona aktarıldı ve liyofilize tozun çözünmesi için manyetik karıştırıcıda 300rpm’de 10 dakika karıştırıldı. Mikroemülsiyon formülasyonları 1mg/g MMC içerecek şekilde hazırlandı.

II.2.8.2. İn vitro salım çalışmasının tasarımı

İn vitro salım koşulları: Salım çalışması diyaliz tekniği ile gerçekleştirildi (diyaliz tüpleri kullanıldı). Salım ortamı: % 0.9 NaCl (pH 7.4), sıcaklık: 37 °C, salım ortamı 150 ml olarak belirlendi. Salım için alınan formülasyon, bir tarafı kapatılmış olan diyaliz tüpüne kondu ve tam olarak tartıldı (2 g). Tüpün açık olan tarafı kapatıldıktan sonra 37°C’deki salım ortamına kondu ve 300 rpm’de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından örnekler alınarak, spektrofotometre ile 362 nm’de absorbansları okundu ve hemen salım

ortamına geri aktarıldı. Salım çalışması 6 saat boyunca sürdürüldü. Her bir deney en az üç kez tekrarlandı.

II.2.9. Mitomisin C'nin formülasyondaki stabilitesinin test edilmesi

II.2.9.1. Mitomisin C'nin distile sudaki çözeltisinin stabilitesinin test edilmesi

MMC'nin distile sudaki çözeltisi hazırlanarak 1.5 ml'lik beyaz plastik eppendorf tüplerinde +4, +25, +37 ve +60°C'de, karanlıkta bekletildi ve belli zaman aralıklarında spektrofotometrik ölçümleri yapılarak stabilitesine bakıldı. Ölçüm için 100 µl çözelti alınarak, distile su ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 362 nm'de absorbansı ölçüldü. Sonuçlar başlangıçta okunan absorbans değerinin yüzdesi olarak verildi.

II.2.9.2. Mitomisin C'nin Y/S ME'daki stabilitesinin test edilmesi

MMC'nin mikroemülsiyondaki stabilitesi spektrofotometrik analizle saptanamayacağı için MMC fındık yağlı ME formülasyonuna (FM3) yüklenerek 1 hafta süresince +4°C'de bekletilerek in vitro salım çalışması yapıldı ve 1 hafta bekletilmiş MMC çözeltisinden salım değerleri ile karşılaştırıldı.

II.2.10. Mitomisin C'nin radyoaktif işaretlenmesi

MMC ^{99m}Teknesium (^{99m}Tc) ile E.Ü. Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalında işaretlenmiştir.

II.2.11. In vivo çalışma

E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2009-2 sayılı karar ile in vivo çalışma için onay alınmıştır.

II.2.11.1. Çalışmada kullanılan deney hayvanları

MMC'nin biyodağılımı için yapılan görüntüleme çalışmasında 4 adet 2 kg ağırlığında Yeni Zelanda erkek tavşanlar kullanılmıştır.

II.2.11.2. Tavşanların anestezi işlemi

Alfamin (%10) ve Ksilazin (%2) 1:1 oranda karıştırılarak kg başına 1 cc. olacak şekilde 2 cc. i.m. olarak uygulandı.

II.2.11.3. Mitomisin C dozunun hesaplanması

Deney hayvanlarının ortalama 2 kg olduğu durumda hayvan başına uygulanacak ilaç miktarı, 70 kg ağırlığında bir insana tek defada uygulanan ilaç dozu ile (2-10 mg) uyumlu olacak şekilde aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\frac{4mg}{70kg} \times 2kg = 0.12 mg/tavşan$$

II.2.11.4. İn vivo denemelerde kullanılan formülasyonun seçilmesi

Karakterizasyon çalışmaları ve invitro salım çalışmalarının sonuçlarına dayanarak in vivo denemelerde MMC yüklemek için, SM12 numaralı formülasyon, FM3'den daha düşük viskoziteye sahip olması nedeniyle seçildi ve buna radyoaktif işaretli MMC, 1mg/ml konsantrasyonda yüklendi.

II.2.11.5. Deney hayvanlarına formülasyonların uygulanması

Biyodağılım çalışmaları E.Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Birinci tavşana kontrol olarak intravenöz yolla (İ.V.) kulak veninden 0,120 mL radyoaktif işaretlenmiş MMC çözeltisi, diğer 3 tavşana ise radyoaktif işaretli MMC içeren mikroemülsiyon formülasyonu yine aynı hacimde (0,120 mL) verilmiştir. MMC çözeltisi ve MMC mikroemülsiyon formülasyonu 1 mg/1ml MMC içerdiğinden verilen doz 0,120 mg dır. Bu doz, insanlara i.v. yolla uygulanan tedavi dozundan hareketle hesaplanmıştır.

Daha sonra, 15 dk., 30 dk., 1saat, 1.5 saat aralıklarda görüntüleme yapılmış, 2. saatte ise radyoaktif işaretli MMC çözeltisi verilen kontrol tavşanının mesanesinin

boşalması dolayısıyla görüntü alınamamıştır. Radyoaktif işaretli mikroemülsiyon formülasyonu verilmiş tavşanlardan birinin 2. saat için görüntüsü alınarak değerlendirilmiştir.

II.3. İstatistiksel Analiz

Salım değerleri Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi (Repeated Measurement ANOVA) yapılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel önemlilik eşik düzeyi olarak 0.05 alınmıştır.

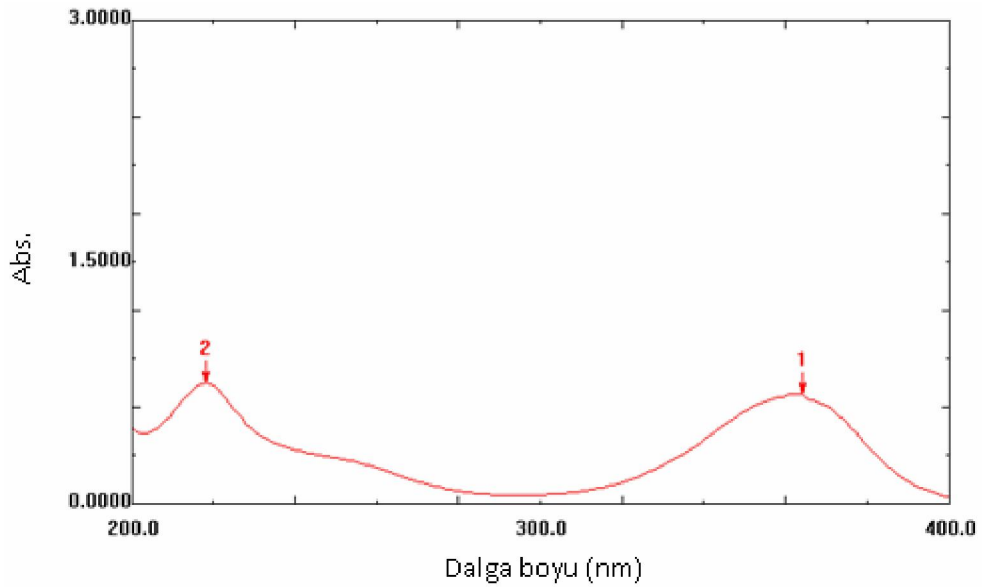
BÖLÜM III

BULGULAR

III.1. Mitomisin UV-Spektroskopisi ile tayinine ilişkin bulgular

III.1.1. Seçicilik tayini ile ilgili bulgular

Mitomisin C'nin 400-200 nm arasındaki absorbans spektrumu şekil 11'de görülmektedir. 1 numaralı pik 362 nm civarında bulunmaktadır, mitomisin maksimum absorbans vermesi gereken bölge burasıdır. Bu nedenle daha sonraki tayinler UV spektrometresi 362 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 11. Mitomisin C'nin 400-200nm arasındaki spektrumu.

III.1.2. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması ile ilgili bulgular

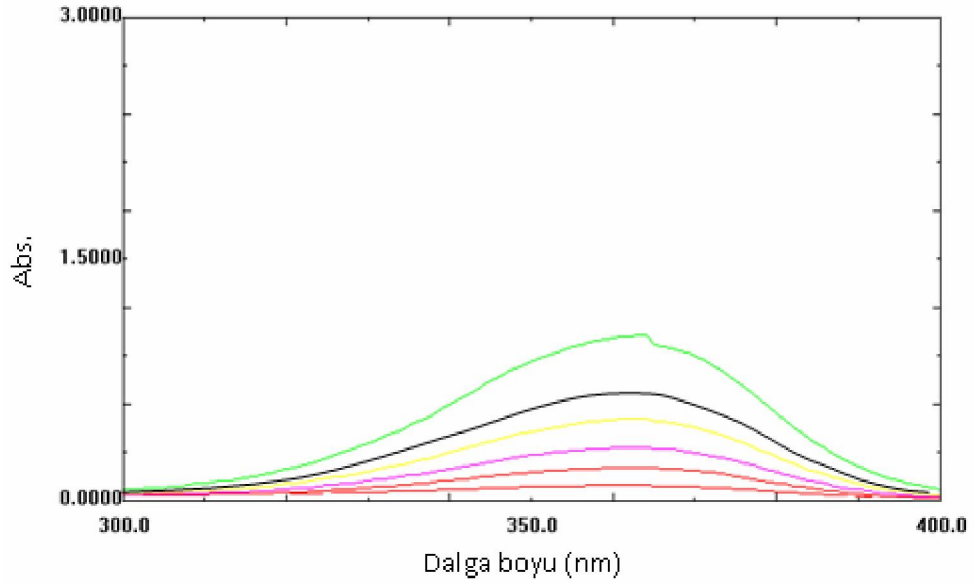
III.1.2.1. Ölçüm sınırlarının tayini ile ilgili bulgular

Maddenin değişik konsantrasyondaki çözeltilerinin verdiği maksimum absorbans değerleri doğrusal olarak artmaktadır (Tablo 6). Maddenin konsantrasyonu 1 µg/ml iken, absorbansı 0,097 dir. Konsantrasyon 15 µg/ml olduğunda ise absorbans

1.026'dır ve oluşan pikin ucunda şekil bozukluğu meydana gelmiştir (şekil 12). Bu nedenle alette okunan minimum ve maksimum MMC konsantrasyonları 1 µg/ml ile 15 µg/ml olarak kabul edilmiştir.

Tablo 6. Mitomisin örneklerinin farklı konsantrasyonlarında okunan absorbans ve $\lambda_{\max}$ değerleri

C (µg/ml)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Abs
1	360	0,097
2	361	0,162
3	362	0,207
5	362	0,332
7,5	363	0,510
10	363	0,684
15	363	1,026

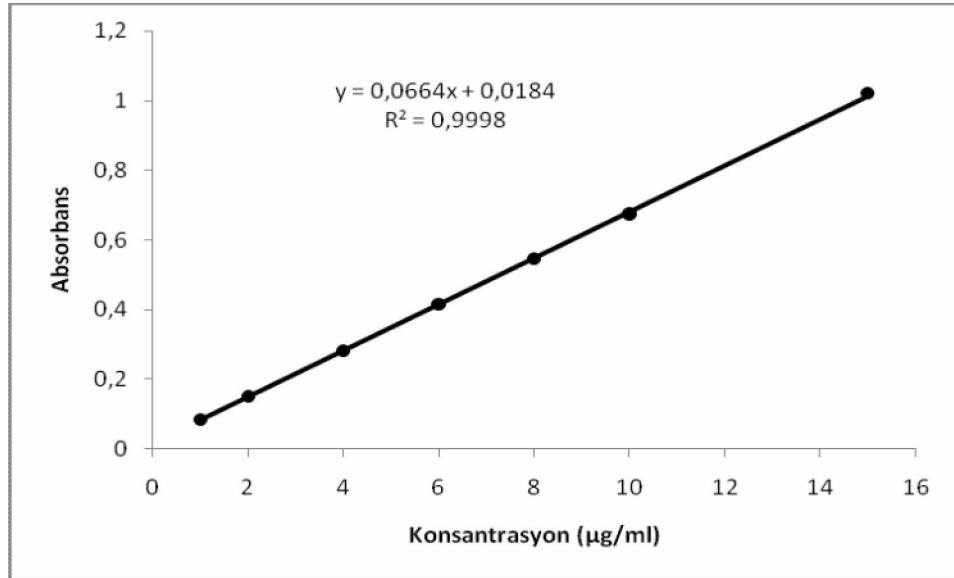


Şekil 12. Mitomisin C'nin farklı konsantrasyonlarda 400-300 nm dalga boyları arasında oluşturduğu pikler

III.1.2.2. Analitik yöntem validasyonu

III.1.2.2.1. Doğrusallık ile ilgili bulgular

Hazırlanan konsantrasyonlardaki MMC çözeltilerinin UV spektrometresindeki doğrusallığı ile ilgili veriler Şekil 13’de verilmiştir. $R^2 = 0,9998$ olarak bulunmuştur.



Şekil 13. Mitomisin C ile ilgili doğru grafiği ve doğru denklemi.

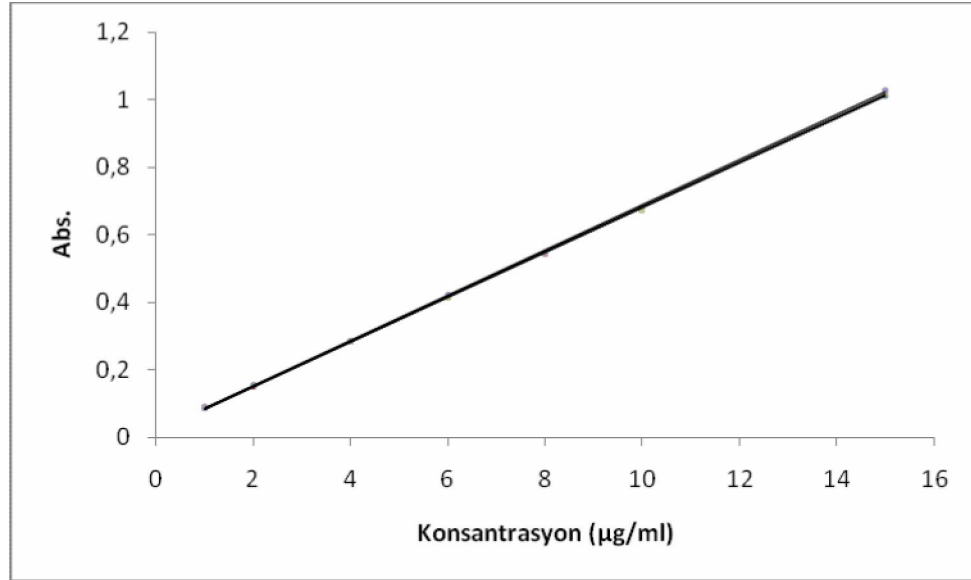
III.1.2.2.2. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik ile ilgili bulgular

Yöntemin doğruluğunu bildiren veriler Tablo 7 ve Şekil 14’de gösterilmektedir.

Doğru denklemi $y = 0,066 x + 0,018$ olarak hesaplanmıştır ($R^2 = 0,999$).

Tablo 7. UV spektroskopi cihazının örnekler arası ve ölçümler arası doğruluk ve kesinliğini doğrulamak için alınan ölçümler.

		Konsantrasyon																				
		1µg/ml örnek no.			2µg/ml örnek no.			4µg/ml örnek no.			6µg/ml örnek no.			8µg/ml örnek no.			10µg/ml örnek no.			15µg/ml örnek no.		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ölçüm no.	1	0,090	0,085	0,086	0,152	0,153	0,153	0,284	0,283	0,285	0,416	0,415	0,421	0,544	0,546	0,547	0,681	0,673	0,671	1,013	1,020	1,026
	2	0,091	0,085	0,086	-	0,153	0,153	0,284	0,283	0,285	0,417	0,415	0,421	0,544	0,545	0,547	0,681	0,673	-	1,013	1,020	1,026
	3	0,091	0,085	0,086	-	0,154	0,153	0,285	0,283	0,285	0,417	0,415	0,421	0,544	0,546	0,547	0,681	0,673	-	1,014	1,020	1,026



Şekil 14. Yöntemin doğruluğunu gösteren grafik.

III.1.2.2.3. Kesinlik ile ilgili bulgular

Üç farklı konsantrasyondaki MMC çözeltisinden ard arda alınan okumaların ortalama bağıl standart sapması 0,326 olarak bulundu.

III.2. Yağ/Su Dağılım katsayısı tayinine ilişkin bulgular

Sulu fazlardan elde edilen absorbans değerleri ve bunlardan elde edilen mitomisin su ve yağdaki konsantrasyonu Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Mitomisin C’nin yağ/su dağılım katsayılarının hesaplanmasında kullanılan veriler

	SD	C _s (µg/ml)	Yağ geçen (µg)	C _y (µg/ml)	%suda	%yağda	SD _{%su}	K _{y/s}
n-oct	0,004032	710,6	224,4	228,2	76,00	24,00	0,690187	0,32
S.Y.	0,005487	926,9	8,017	8,3	99,14	0,86	0,939546	0,01
F.Y.	0,005748	942,9	8,009	8,3	100,0	0,00	0,984255	0,01
Su	0,006083	934,9	-	-	100	-	1,04161	-

SD_{%su} – Sudaki % miktarların standart sapmaları, **K_{y/s}** – yağ/su dağılım katsayısı, **C_s**– sudaki MMC konsantrasyonu, **C_y** – yağdaki MMC konsantrasyonu, **SD** – okutulan absorbans değerlerinin standart sapmaları, **n=3**

III.3. İnce Tabaka Kromatografisine ilişkin bulgular

Mitomisin C'nin tanımlanan koşullarda İTK'da elde edilen Rf değerleri Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9. İnce tabaka kromatografisinde farklı çözücülerde mitomisin C'nin Rf değerleri.

Mobil faz	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf _{ort} ± SD
Aseton	0,63	0,68	–	0,66 ±0,025
MeOH/aseton (5:1)	0,71	0,67	–	0,69 ±0,020
Aseton/MeOH (5:1)	0,69	0,65	0,66	0,67 ±0,021
CHCl ₃ /MeOH (9:1)	0,08	0,13	0,19	0,13± 0,055
MeOH	0,67	0,58	0,67	0,64± 0,052
CHCl ₃ /aseton (5:1)	0	0	0	0,0± 0,00
CHCl ₃	0	0	0	0,0± 0,00
%0.9 NaCl	0,39	0,48	0,52	0,46± 0,067
MeOH/Aseton/Asetik a. (4.5:1:0.5)	0,74	0,7	0,74	0,73± 0,023
Aseton/MeOH/Asetik a. (4.5:1:0.5)	0,83	0,88	–	0,86 ±0,025

III.4. Y/S tipi mikroemülsiyon formülasyonlarının faz diyagramları

III.4.1. Fındık yağı ile elde edilen Y/S tipi mikroemülsiyonların faz diyagramları

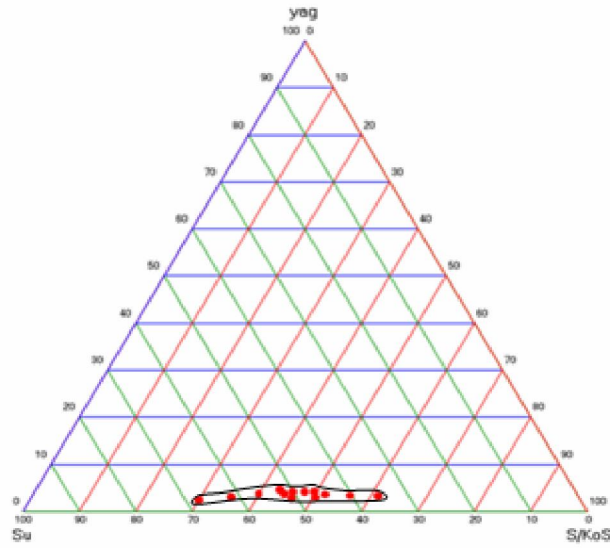
Fındık yağı ile hazırlanan formülasyonlardan tamamen berrak olanlar Tablo 10'da verilmektedir. Şekil 15'de bu formülasyonlar üçgen faz diyagramına yerleştirilmiştir.

III.4.2. Soya yağı ile elde edilen Y/S tipi mikroemülsiyonların faz diyagramları

Soya yağı ile hazırlanan formülasyonlardan tamamen berrak olanlar Tablo 11'de verilmektedir. Şekil 16'da bu formülasyonlar üçgen faz diyagramına yerleştirilmiştir.

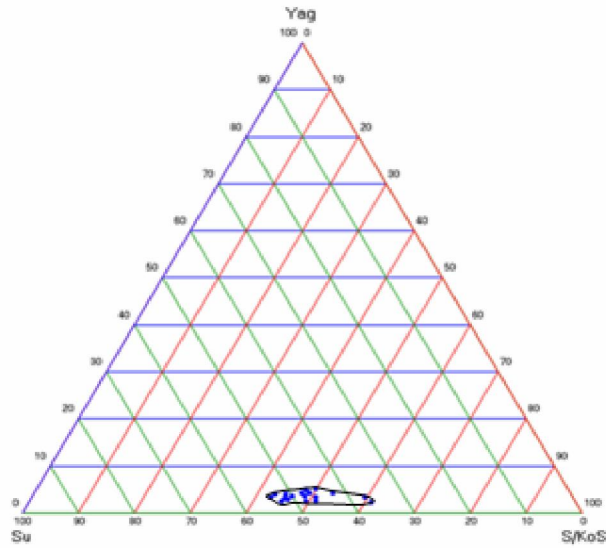
Tablo 10. Y/S tipi fındık yağlı mikroemülsiyon noktaları

Formülasyon	%Yağ	%S/KoS	%Su
FM1	3,23	35,38	61,39
FM2	3,70	39,95	56,35
FM3	3,70	44,50	51,80
FM4	4,16	49,92	45,92
FM5	3,01	50,50	46,50
FM6	2,50	30,00	67,50
FM7	3,23	61,39	35,38
FM8	3,70	56,35	39,95
FM9	3,70	51,75	44,55
FM10	4,16	45,92	49,92
FM11	3,01	46,50	50,50
FM12	4,43	43,48	52,09
FM13	3,50	56,44	40,06

**Şekil 15.** Fındık yağı ile denenen Y/S-tipi mikroemülsiyon faz diyagramı

Tablo 11. Y/S tipi soya yağlı mikroemülsiyon noktaları

Formülasyon	% Yağ	% S/KoS	% Su
SM1	2,53	49,49	47,98
SM2	2,94	50,98	46,08
SM3	3,46	50,62	45,92
SM4	4,02	49,80	46,18
SM5	4,97	49,85	45,18
SM6	2,42	61,24	36,34
SM7	3,01	59,84	37,15
SM8	4,30	53,31	42,38
SM9	3,67	48,67	47,67
SM10	4,67	48,33	47,00
SM11	4,33	48,00	47,67
SM12	3,42	41,74	54,83
SM13	3,67	46,00	50,33
SM14	3,56	45,63	50,81
SM15	2,50	45,00	52,50
SM16	3,00	46,00	51,00
SM17	3,00	45,00	52,00
SM18	4,00	45,00	51,00
SM19	4,00	43,00	53,00
SM20	3,50	42,50	54,00
SM21	2,70	45,80	51,50
SM22	4,14	53,48	42,38
SM23	3,45	54,09	42,46

**Şekil 16.** Soya yağı ile denenen Y/S-tipi mikroemülsiyon faz diyagramı.

III.5. Karakterizasyon için mikroemülsiyon formülasyonlarının seçimi

III.5.1. Fındık yağı Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içeriği

Fındık yağı ile oluşturulan ME’lerden karakterizasyon çalışmaları için seçilen FM3 formülasyonunun içeriği Tablo 12’de belirtilmiştir.

Tablo 12. Karakterizasyon çalışmaları için seçilen fındık yağlı mikroemülsiyon

Formülasyon	M tipi	HLB	Formülasyon Bileşimi		
			%Yağ	%S/KoS	%Su
FM3	Y/S	11.33	3.70	44.50	51.80

III.5.2. Soya yağı Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içeriği

Soya yağı ile hazırlanan ve karakterizasyon için seçilen beş mikroemülsiyon formülasyonu Tablo 13’de yer almaktadır.

Tablo 13. Soya yağı ile hazırlanan Y/S formülasyonların viskozite, pH ve damlacık büyüklük değerleri

		Formülasyonların kısaltmaları					
		SM3	SM23	SM22	SM21	SM12	SM12+ MMC
Formüller % olarak	Yağ	3,46	3,45	4,14	2,7	3,43	3,43
	S/KoS	50,62	54,09	53,48	45,8	41,74	41,74
	Su	45,92	42,46	42,38	51,5	54,83	54,83
Özellikler	pH	6,94	6,98	6,91	6,80	6,95	6,27
	η(cps)	114,95	113,35	117,55	81,3	32,4	25,8
	DS$\pm$ SD	105,7 $\pm 3,09$	63,10 $\pm 6,53$	262,0 $\pm 41,42$	21,42 $\pm 0,2857$	34,65 $\pm 5,858$	57,67 $\pm 3,155$
	PDI$\pm$SD	0,400 $\pm 0,009$	0,443 $\pm 0,036$	0,444 $\pm 0,071$	0,551 $\pm 0,009$	0,358 $\pm 0,044$	0,338 $\pm 0,017$

DS – damlacık boyutu, **SD** – standart sapma, **PDI** – polidispersite indeks

III.6. İn vitro salım çalışması için seçilen mikroemülsiyonların karakterizasyonuna ilişkin bulgular

III.6.1. Viskozite, pH, elektriksel iletkenlik ve kırılma indisi ile ilişkin bulgular

Seçilen formülasyonların elektriksel iletkenlikleri, pH değerleri ve 200 rpm’de ölçülen viskoziteleri Tablo14’de yer almaktadır.

Tablo 14. Mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozite iletkenlik, pH ve kırılma indisi değerleri.

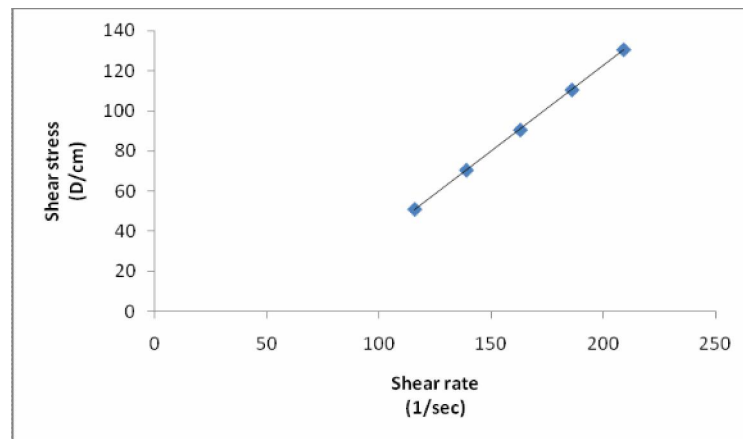
Formülasyon	Viskozite (cps)	pH	İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Kırılma indisi
SM12	32.4 ^a	6.95	38.0	1.383
FM3	46.2 ^b	6.44	41.33	1.387
SM12*	25.8	6.27	10.05×10^3	1.387
FM3*	43.7	6.17	9.41×10^3	1.391

* - %0.1 mitomisin C yüklü mikroemülsiyonlar

III.6.2. Akış özellikleri ile ilgili bulgular

III.6.2.1. Fındık yağı Y/S mikroemülsiyonun akış özellikleri ile ilgili bulgular

FY ile hazırlanmış ME’un akış özelliğini gösteren diyagram Şekil 17’de yer almaktadır. Şekil 17’de görüldüğü gibi FM3 formülasyonu newtonian akış özelliği göstermiştir.



Şekil 17. Fındık yağı mikroemülsiyonun (FM3) akış özelliği

III.6.2.2. Soya yağı Y/S mikroemülsiyonun akış özellikleri ile ilgili bulgular

Soya yağı Y/S emülsiyonun viskozite değeri 250 rpm de 32.4 cps olarak saptanmış, daha düşük rpm. değerlerinde Brookfield DV-III+ Programmable Viscometer ile viskozite değerleri saptanamamıştır. Bu nedenle akış diyagramı çizilememiştir.

III.6.3. Kırılma indisi ölçümüne ilişkin bulgular

III.6.3.1. Yağların kırılma indisleri

Mikroemülsiyonların oluşturulmasında kullanılan yağların ölçülen kırılma indisi değerleri Tablo 15’de yer almaktadır.

Tablo 15. Mikroemülsiyonlarda kullanılan yağların kırılma indisleri

Yağ türü	Kırılma indisi
Fındık	1,469
Soya	1,473

III.6.3.2. Sürfaktanların ve sürfaktan karışımlarının kırılma indisleri

Formülasyonlarda kullanılan sürfaktanların ve bunların karışımlarının kırılma indisleri Tablo16’da yer almaktadır.

Tablo 16. Mikroemülsiyonlarda kullanılan sürfaktanların ve sürfaktan karışımlarının kırılma indisleri

Sürfaktan	Kırılma indisi
T80	1,471
T80/L/E (1:0.5:1)	1,428

III.6.4. Damlacık boyutu ve polidispersite ölçümlerine ilişkin bulgular

Mikroemülsiyonların damlacık boylarının ölçümüne ilişkin veriler ve polidispersite indeks değerleri (PDI) Tablo 17’de verilmiştir.

III.7. Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilitesine ilişkin bulgular

Tüm mikroemülsiyonlar santrifüjlemede ve sıcaklık değişiminde stabil kalmıştır. Faz ayrışması veya bulanıklık meydana gelmemiştir. S/Y tipi mikroemülsiyonlar altı aylık bekletme süresinden sonra da berrak görünümünü korumuş, faz ayrışması veya bulanıklık meydana gelmemiştir. Y/S tipi mikroemülsiyonlar 12 ay gözlenmiştir. Bu formülasyonların da bu süre sonunda stabil olduğu gözlenmiştir.

Tablo 17. Mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu ve polidispersite indeks değerleri.

Formülasyon	Damlacık boyutu ($\pm$ SD)	PDI ($\pm$ SD)
SM12	34.65 $\pm$ 5.858	0.358 $\pm$ 0.044
FM3	27.62 $\pm$ 1.193	0.446 $\pm$ 0.025
SM12*	57.67 $\pm$ 3.155	0.268 $\pm$ 0.014
FM3*	51.98 $\pm$ 4.011	0.338 $\pm$ 0.017

* - % 0,1 MMC yüklenmiş mikroemülsiyonlar.

n=3

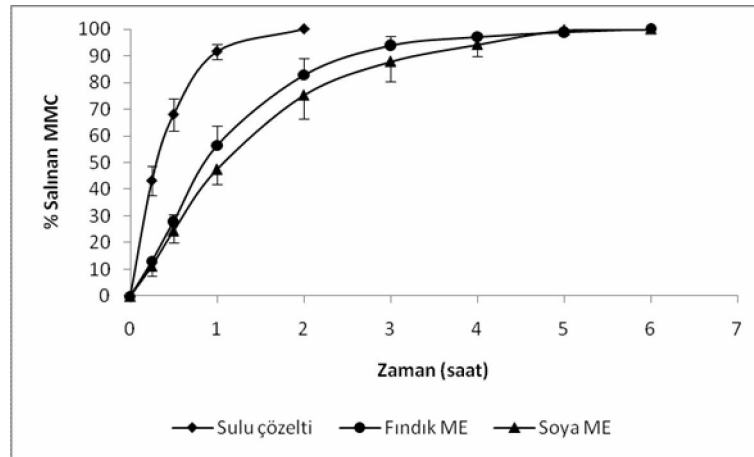
III.8. Mitomisin mikroemülsiyonlardan ve sulu çözeltiden salımına ilişkin bulgular

Sulu çözeltiden ve mikroemülsiyon formülasyonlarından mitomisin C’nin salım profilleri karşılaştırmalı olarak Şekil 18’de yer almaktadır.

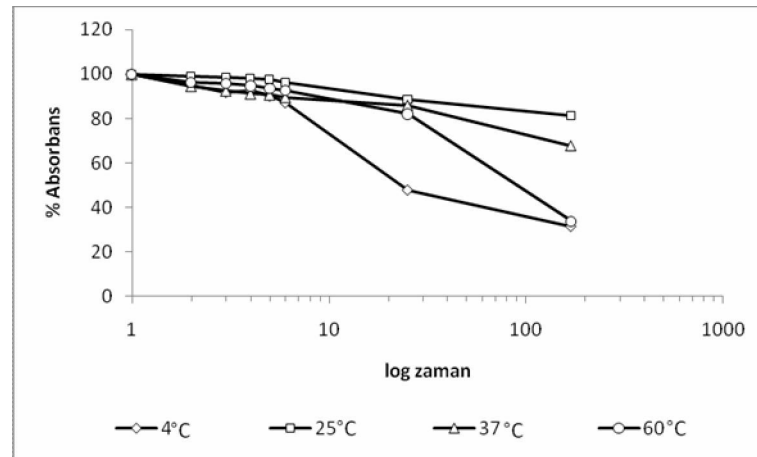
III.9. Mitomisin C’nin formülasyondaki stabilitesine ilişkin bulgular

III.9.1. Mitomisin C’nin distile sudaki çözeltisinin stabilitesinin test edilmesi

MMC’nin Sulu çözeltide dört farklı sıcaklıktaki stabilitesi şekil 19’da görüldüğü gibidir.



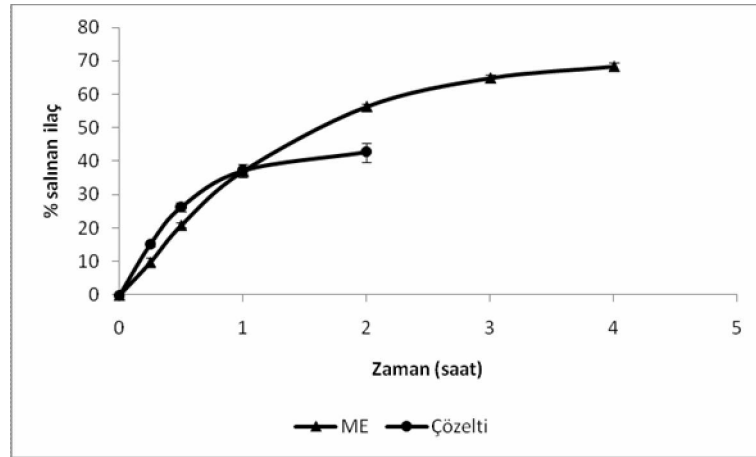
Şekil 18. Soya ve fındık yağlı mikroemülsiyon formülasyonlarında Mitomisin C'nin % salım profilleri. n=3



Şekil 19. Mitomisin C'nin sulu çözeltide dört farklı sıcaklıktaki stabilitesi

III.9.2. Mitomisin C'nin Y/S mikroemülsiyonlardaki stabilitesinin test edilmesi

MMC'nin fındık yağlı mikroemülsiyondan ve sulu çözeltisinden 1 hafta bekletildikten sonra yapılmış olan salım çalışması sonuçları Şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 20. Sulu çözelti ve mikroemülsiyon formülasyonundan 1 hafta bekletme sonrası yapılan salım profili.

III.10. İstatistiksel analize ait bulgular

Fındık yağlı mikroemülsiyon formülasyonundan belli zamanlardaki MMC salımının, MMC çözeltisinden elde edilen salım değerlerine göre anlamlı olarak farklı olduğu ($p < 0.01$) ve iki grubun farkının da anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$).

Soya yağlı mikroemülsiyon formülasyonundan belli zamanlardaki MMC salımının, MMC çözeltisinden elde edilen salım değerlerine göre anlamlı olarak farklı olduğu ($p < 0.01$) ve iki grubun farkının anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.003$).

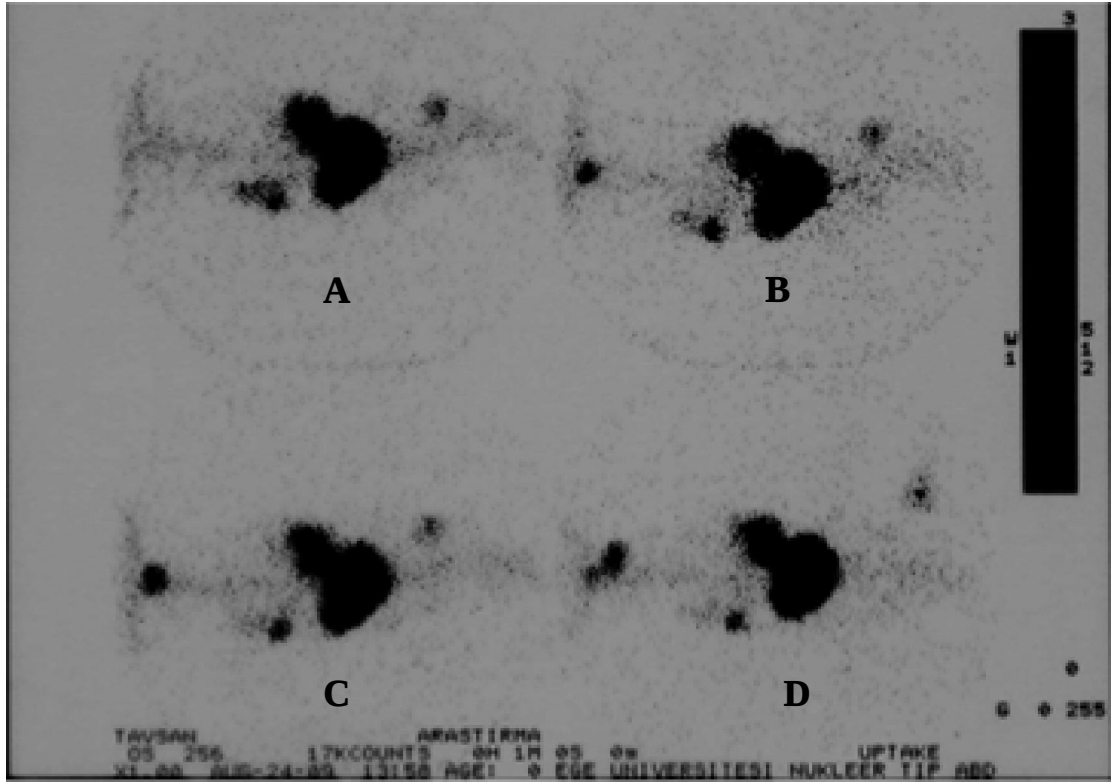
Fındık yağlı emülsiyondan salım değerleri ile soya yağlı emülsiyondan MMC salım değerleri arasında farklılığın anlamsız olduğu ($p = 0.228$) ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız ($p = 0.313$) olduğu saptanmıştır.

Stabilite çalışması için yapılan 1 hafta $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş olan fındık yağlı mikroemülsiyondan MMC salım değerleri ile 1 hafta $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş olan MMC

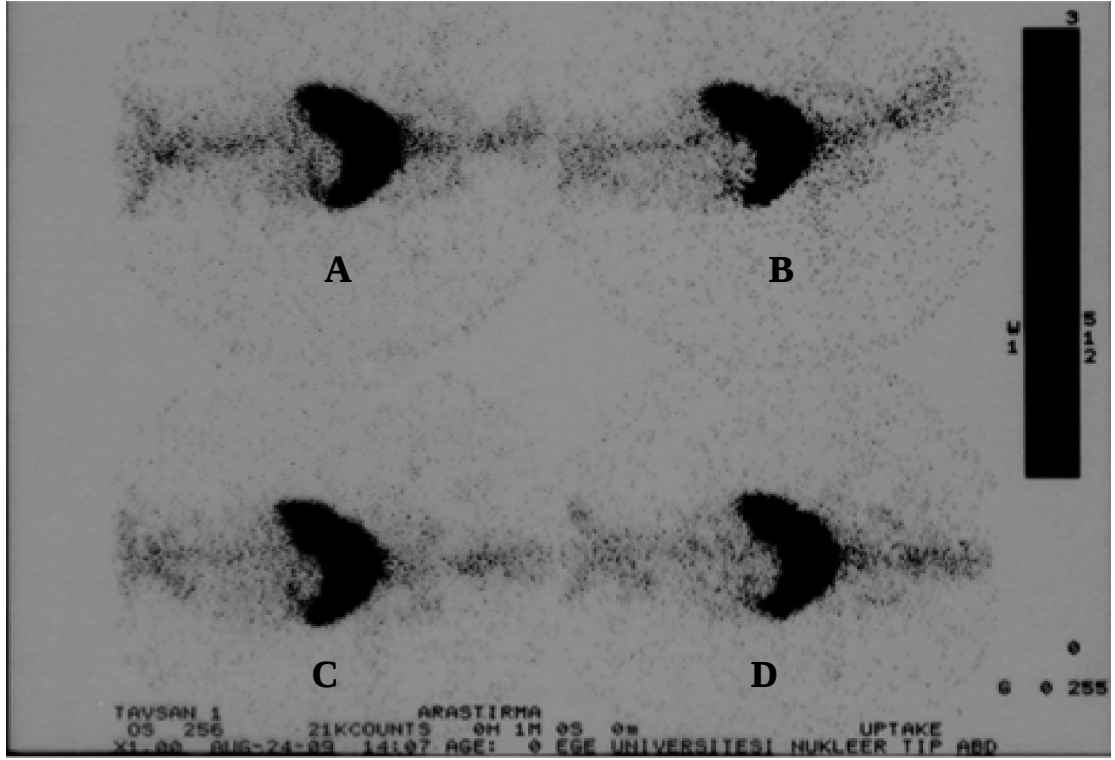
çözeltilisinden salım değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmuş ($p<0.01$) ve iki grup arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur ($p=0.007$).

III.11. İn vivo denemelere ilişkin bulgular

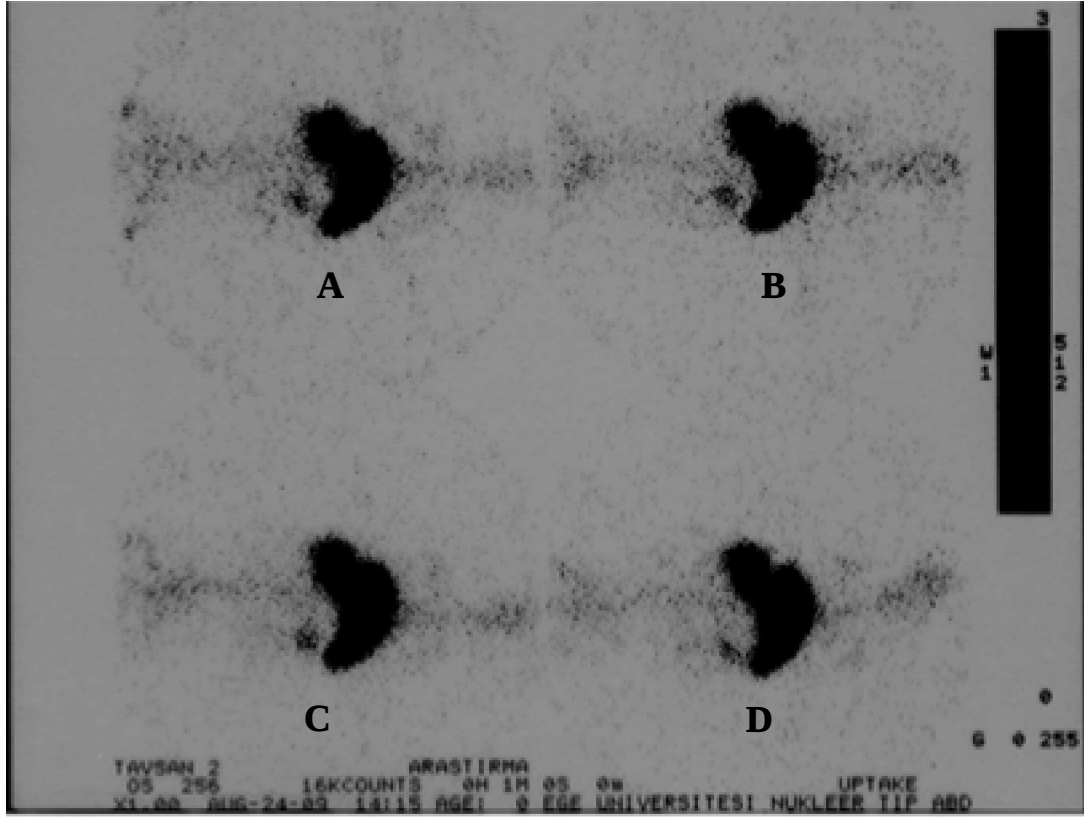
İlk 15 dakikada alınan görüntülerde kontroldeki aktivite karaciğer, dalak ve bağırsaklarda görünürken, yarım saatte mesaneye ulaşmıştır. Buna karşın mikroemülsiyona ilave edilen aktivite ile ilk 15 dakikada kontrol ile aynı görüntüler elde edilmesine rağmen, daha sonraki saatlerde (0.5, 1, 1.5 ve 2. saat (görüntülerde A, B, C ve D)) belirgin mesane tutulumu gözlenmemiştir. 1.5 ve 2. saatlerde kemikte tutulum da görülmektedir.



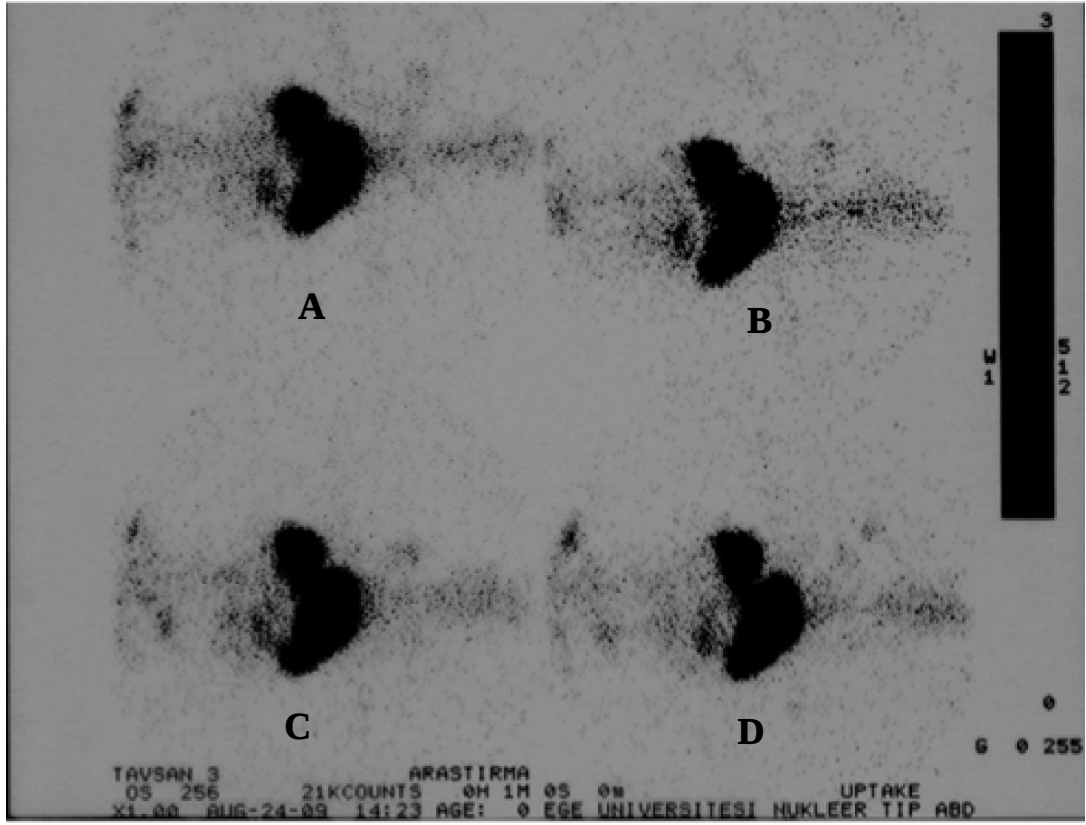
Görüntü 1. Kontrol amaçlı uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C çözeltisi ile elde edilen film.



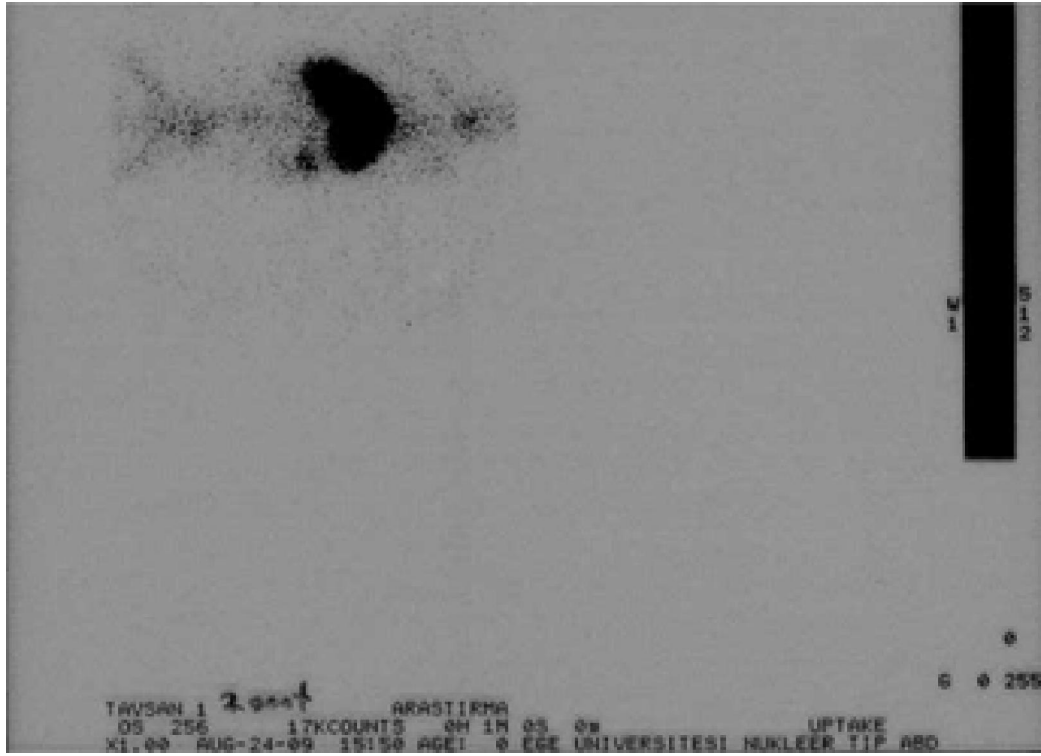
Görüntü 2. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (1. tavşan).



Görüntü 3. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (2. tavşan).



Görüntü 4. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile elde edilen film (3. tavşan).



Görüntü 5. Mikroemülsiyon formülasyonunda uygulanan radyoaktif işaretli mitomisin C ile 2. saatte elde edilen film (1. tavşan).

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

MMC'nin UV spektrumlarında en yüksek absorbens değeri 362 nm bulunmuştur ve bu değer literatürle uyumlu bulunmuştur [65, 106].

Y/S dağılım katsayıları, sulu fazlardan elde edilen absorbens değerleri ölçülerek MMC'nin su ve yağdaki konsantrasyonları saptanarak hesaplanmıştır. Tablo 8'de görüldüğü gibi yağ/su dağılım katsayılarına göre soya yağında MMC fındık yağından daha fazla çözünmektedir. Fındık yağında ise hiç çözünmediği görülmektedir.

Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan yağlardan özellikle soya yağı farmasötik dozaj şekillerinde birçok çalışmada kullanılmıştır [70, 98, 134]. Non iyonik sürfaktanların minimal toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir, bu nedenle T80 ve L sürfaktan olarak kullanılmıştır [28, 85, 132].

Mikroemülsiyon formülasyonlarında Y/S mikroemülsiyon oluşturmaya uygun olarak 10.60, 11.33, 12.25 HLB değerlerinde çalışılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmaya en uygun HLB değeri 11.33 olarak seçilmiştir.

Fındık yağlı Y/S mikroemülsiyonlar oluşturmak için 4:1, 2:1, 1:1, 1.5:1 S/KoS oranlarında çalışılmıştır. Oluşturulan faz diyagramları sonucunda fındık yağlı ME için ideal S/KoS oranı 1.5:1 olarak saptanmıştır. Şekil 15'de görüldüğü gibi stabil olan mikroemülsiyon formülasyonları nokta olarak gösterilmiş ve faz diyagramlarındaki Y/S ME alan bölgelerine uygun bulunmuştur. Bulunan berrak formülasyonlar öncelikle bir hafta süreyle gözlenmiş ve bu süre sonucunda berraklığını koruyan sistemlerden en az S/KoS oranı içeren formülasyonlar saptanarak stabilite, karakterizasyon çalışmaları, salım çalışmaları ve in vivo

çalışmalar için seçilmiştir. Tablo 10’da gösterilen 13 formülasyondan yukarıda belirtilen özelliklere göre FM3 formülasyonu, S/KoS oranının çok yüksek olmaması ve diğer formülasyonlara göre daha uzun süre stabil kalması nedeniyle ideal formülasyon olarak belirlenmiştir.

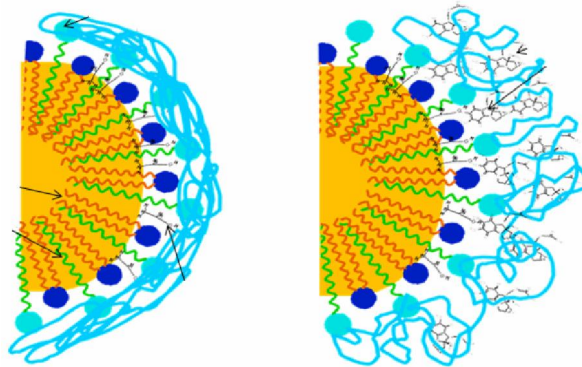
Soya yağı faz diyagramları da aynı şekilde oluşturularak ideal Y/S ME formülasyonu için T80/L oranı 2:1, S/KoS oranı ise 1.5:1 olarak seçilmiştir. Daha sonraki çalışmalar için Tablo 11’de görüldüğü gibi 23 berrak formülasyon noktası belirlenmiştir ve bu noktalardan beş formülasyon seçilerek stabilite ve karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir (SM3, SM12, SM21, SM22, SM23). Seçilen tüm formülasyonlarda Tablo 12’de görüldüğü gibi Y/S tipi ME’ların viskozitesi mitomisin C eklendikten sonra düşmüştür. Formülasyonlara MMC ilavesi ile viskozitenin azalmasının nedeninin kullanılan Mitomisin C preparatı içeriğindeki izotoni sağlama amacıyla konulan NaCl’den geldiği düşünülmektedir [110, 113].

Tablo 14’de görüldüğü gibi seçilen MMC yüklü ve boş formülasyonların pH değerleri 6’dan yüksektir. Bu değerler de i.v. uygulama için uygundur [28]. MMC yüklenen mikroemülsiyonlarda pH değerlerinde önemli bir etkilenme olmamıştır. Bu bulgularda literatürle uyumlu bulunmuştur. Djordjevic ve ark. [38], çeşitli mikroemülsiyon formülasyonları hazırlayarak yine bir amfifilik ilaç olan diklofenak dietilamin (DDA) yüklemişler ve mikroemülsiyon fizikokimyasal özelliklerine ilaç yüklenmesinin etkilerini araştırmışlardır. Amfifil ilaç yüklenmesiyle formülasyonun elektriksel iletkenlik değerleri ilaç yüklenmemiş formülasyonlara göre 2-3 kat artmıştır [38]. Bulguları bizim iletkenlik bulgularımızla uyumludur. Çalışmada MMC yüklenen formülasyonlarda, yüklenmemiş formülasyonlara kıyasla oldukça yüksek elektriksel iletkenlik değerleri gözlenmiştir. İletkenlik değerlerinin

yüksekliğinin MMC'nin amfifil olmasının yanı sıra ilaç dozaj şeklinde bulunan NaCl'den ileri geldiği düşünülmektedir. NaCl inorganik bir elektrolittir ve sistemin iletkenliğini etkiler [38, 91].

Ayrıca, Lv F.F. ve ark. [90] oküler y/s mikroemülsiyon ilaç formülasyonu hazırlamışlar ve kloramfenikol yükleyerek elektriksel iletkenlik çalışması yapmışlardır. Sisteme kloramfenikol yüklendiğinde iletkenlik değerlerinin arttığını gözlemişlerdir, elde edilen bu sonucunda maddenin polar özellikte olmasından kaynaklandığını savunmuşlardır. MMC de amfifil bir madde olduğundan ve mikroemülsiyona yüklenmesiyle elektriksel iletkenlik değerlerinin artış göstermesi yönünden Lv F. ve ark.nın sonuçlarıyla uyumludur [90].

Tablo 17'de görülen damlacık büyüklüğü değerlerine göre seçilen mikroemülsiyonlarda MMC eklendikten sonra damlacık büyüklükleri artmıştır. Bunun nedeninin MMC'nin formülasyonda sürfaktan olarak kullanılan T80'in polioksietilen zincirleri ile etkileşerek ME'un arayüzünde yerleşmesi olduğu varsayılmaktadır [38, 90] (Şekil 21)



Şekil 21. Mitomisin C eklendikten sonra mikroemülsiyon formülasyonundaki damlacık büyüklüklerinin artış nedeninin şematize edilmiş şekli [90].

Salım çalışmaları için seçilen SM12 ve FM3 formülasyonları 1ay, 1.5 ay ve 4 ay süresince stabilitenin bir göstergesi olan damlacık büyüklükleri açısından incelenmiştir. SM12 formülasyonu için başlangıçta 34.65 ± 5.86 nm olan damlacık büyüklüğü 4 ay sonunda 19.04 ± 0.225 nm olarak bulunmuştur. FM3 formülasyonu için başlangıçta 27.62 ± 1.19 nm olan damlacık büyüklüğü 4 ay sonunda 22.13 ± 0.662 nm olarak ölçülmüştür. Damlacık boyutlarındaki değişimin fazla olmaması bize formülasyonlarımızın stabil olduğunu ve sistemin bozulmadığını göstermiştir.

Salım çalışması sonuçlarına göre fındık yağlı ME'dan salım değerleri ile soya yağlı ME'dan salım değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil. 18; $p=0,313$). y/s dağılım katsayısı sonuçlarına göre soya yağının MMC'yi çok az da olsa çözdüğü saptandığından soya yağlı ME'dan salımın daha yavaş olacağı varsayılmıştı. Ama sonuç olarak bu varsayım istatistiksel olarak doğru bulunmamıştır. Bu sonuçlar ayrıca yağda çözünmeyen bir maddenin bile mikroemülsiyon formülasyonuna yüklendiğinde daha geç salındığını göstermiştir. Her iki ME formülasyonundan salım değerleri ile çözeltiden MMC salım değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlenmiştir (Şekil 18, FM3 için $p<0.01$; SM12 için $p<0.003$). Bu sonuç da, MMC'nin y/s ME formülasyonuna yüklenmesinin salımını geciktirdiğini doğrulamıştır.

Mitomisin C'nin formülasyondaki stabilitesini incelemek için MMC yüklenmiş fındık yağlı mikroemülsiyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında bekletildikten sonra salım çalışması yapılmış ve yine $+4^{\circ}\text{C}$ 'de aynı süre bekletilmiş olan MMC çözeltisi salım sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak MMC ME formülasyonundan 4 saatlik salım sonucunda $\%68,29 \pm 1,32$ salım gözlenirken MMC çözeltisinden ise ikinci saatte $\%42,71 \pm 2,86$ 'lık bir salım gözlenmiştir. 24 saat sonra ise mikroemülsiyon formülasyonunda $\%96,24 \pm 0,92$ salım elde edilirken, çözeltiden elde edilen salım ise

%40,87 $\pm$ 2,87'dir, yani daha da düşmüştür. Fındık yağlı ME'dan salım değerleri ile MMC çözeltisinden salım değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmuş ($p < 0.01$) ve iki grup arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur ($p = 0.007$). Bu sonuçlara göre MMC mikroemülsiyonda çözeltiye göre anlamlı derecede stabil kalmıştır (Şekil 20).

Sasaki H. ve ark. [124], MMC'nin lipofilik karakterde 1a-süstitüe önilaçları hazırlayarak lipozom ve y/s emülsiyonlara yüklemişler ve bu formülasyonlardaki MMC' nin antitümoral aktivitesini araştırmışlardır. Gerçekleştirdikleri in vitro salım çalışmasında MMC önilaçları lipozom formülasyonundan hızlı salınırken, y/s emülsiyondan daha yavaş salınmıştır [124]. Bu bulgular da bizim salım bulgularımızla uyumludur.

Hazırlanan y/s ME sistemlerde MMC'nin su fazında bulunmasının yanı sıra bir kısmının da mikroemülsiyon damlacıklarının arayüzüne yerleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Djordjevic ve ark. [38], geliştirdikleri y/s mikroemülsiyon sistemlerdeki daha yüksek su içeriği, daha düşük sürfaktan ve yağ konsantrasyonlarında, amfifil bir ilaç olan diklofenakdietilamin'in su fazı ile S/KoS arayüz filmi arasında ağırlıklı olarak dağılmış olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda da bu görüş ile uyumlu olarak, MMC amfifil ilaç olduğundan, y/s mikroemülsiyon formülasyonunda ise yüksek su içeriği ve daha düşük sürfaktan ve yağ konsantrasyonu bulunduğu ortamdaki su fazı ile S/KoS arayüz filmi arasında bölünmüş olarak bulunması olasıdır. Bu nedenle, MMC mikroemülsiyonda sudaki çözeltisinden daha stabil olmakta ve daha geç salınmaktadır.

Yine literatürde bulunan bir diğer çalışmada, Lv F.F. ve ark., [90] oküler y/s mikroemülsiyon ilaç formülasyonu hazırlamışlar ve çabuk hidroliz olan kloramfenikol yükleyerek stabilite çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada

kloramfenikolün bir amfifilik ilaç olduğu ve kosürfaktan gibi hareket ederek mikroemülsiyon damlacıklarının arayüzeyine girdiğini savunmuşlardır. Bu görüş ile ilgili olarak yaptıkları ^1H NMR çalışmaları sonucunda kloramfenikolün mikroemülsiyon damlacıklarının birçok oksietilen gruplarından oluşan hidrofilik kabuğunda tutulduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle kloramfenikolün stabilitesinin y/s formülasyonda önemli derecede arttığını saptamışlardır [90]. Bu kaynak da bizim varsayımımızı doğrulamaktadır. Yüksek verimle MMC yüklü polilaktik asit nanopartikülleri oluşturmak için Hou Z. ve ark. [67] MMC'nin yağda çözünürlüğünü artırmak için lesitin-MMC kompleksi oluşturmuşlardır. Buna göre hazırlanan formülasyonların içeriğinde bulunan lesitin bir miktar MMC'nin yağ fazına geçmesini sağlayacağı ve bunun da gecikmiş salıma neden olabileceği düşünülmüştür.

İn vivo biyodağılım çalışması Yeni Zelanda erkek tavşanlara radyoaktif işaretlenmiş MMC çözeltisi ve ME i.v. verilerek gerçekleştirilmiştir. Gama kamera çalışması sonucunda elde edilen filmlerde kontrol çözeltisindeki aktivitenin 15. dakikada mesaneye ulaşması, mikroemülsiyon formülasyonundaki aktivitenin ise 2. saat sonunda mesanede belirgin olarak görülmemesi, MMC'nin mikroemülsiyon formülasyonunda karaciğer ve dalakta daha uzun kaldığını ve organizmadan daha geç atıldığını göstermektedir. Bu sonuç, bizim salım çalışmalarımızla da uyumludur.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Mitomisin C için taşıyıcı sistem olarak fındık yağı ve soya yağı ile y/s mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonlara MMC yüklenerek ilacın organizmada kalış süresinin artırılması ve in vivo çalışma yapılarak organizmada organlara dağılımının incelenmesi amaçlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda soya yağı ile elde edilen mikroemülsiyon formülasyonu viskozitesinin daha düşük olması nedeniyle in vivo parenteral uygulama için daha uygun bulunmuştur. İn vivo denemeler sonucunda, geliştirdiğimiz y/s MMC mikroemülsiyon formülasyonunun kontrol olarak kullanılan MMC çözeltisine kıyasla organizmada daha uzun süre kaldığı, ayrıca, karaciğer, dalak ve kemiklerde tutulduğu gösterilmiştir.

Geliştirilen y/s mikroemülsiyon formülasyonu, ilacın stabilitesini artırdığı, organizmadan atılımını geciktirdiği, belli organlarda tutulumunu sağladığı ve böylece sonuç olarak terapötik etkiyi artırdığı için, MMC tedavisinde uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olarak önerilir.

ÖZET

Vücut organlarına hedefleme amacıyla hazırlanan Mitomisin-C yüklü taşıyıcı sistemlerin organizmada biyodağılımının incelenmesi

Mustafa Kotmakchiev

Mitomisin-C (MMC) insan tümörlerinin geniş alanına karşı aktif güçlü bir antineoplastik etkindir. Fakat, bu ilacın sistemik verilmesi kemik iliği depresyonu, renal ve gastrointestinal harabiyet gibi çeşitli yan etkilerle birlikte. Diğer yandan MMC' nin yarı ömrü çok kısadır (yaklaşık 50 dakika).

Bu çalışmanın amacı, soya yağı ve fındık yağıyla y/s mikroemülsiyon sistemler geliştirmek ve mikroemülsiyon formülasyonunun Mitomisin C salımı üzerine etkisini MMC çözeltisi ile karşılaştırarak araştırmak ve in vivo çalışma ile mikroemülsiyon sistemden MMC'nin biyodağılımını incelemektir.

Bu amaç için, mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilmiş ve viskozite, pH, elektriksel iletkenlik ve damlacık büyüklüğü dağılımı gibi fizikokimyasal özellikleri saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalar için iki mikroemülsiyon sistem seçilmiştir. Her iki formülasyon MMC ile yüklenmiş ve invitro salım çalışmaları yapılmıştır. Salım çalışması sonuçlarına göre, her iki formülasyondan MMC salım değerleri benzerdir ve aralarında önemli farklılık yoktur. Mikroemülsiyon formülasyonlarından salım değerleri, MMC çözeltisinin salım değerlerinden anlamlı derecede farklılık göstermiştir.

Biyodağılım çalışması için, fındık yağlı mikroemülsiyondan daha düşük viskoziteye sahip olduğu için soya yağlı mikroemülsiyon seçilmiştir. Gama kamera çalışmaları MMC mikroemülsiyon formülasyonunun MMC çözeltisinden daha fazla karaciğer ve dalakta biriktiğini ve MMC mikroemülsiyon formülasyonunun MMC çözeltisinden daha yavaş atıldığını göstermiştir.

ABSTRACT

Examination of organism biodistribution of Mitomycin-C loaded carrier systems prepared with the purpose to target body organs

Mustafa Kotmakchiev

Mitomycin-C (MMC) is a potent antineoplastic agent active against a wide range of human neoplasms. However, systemic administration of this drug is associated with severe side-effects, such as bone marrow depression, renal and gastrointestinal damage. On the other hand, the biological half life of MMC is very short (about 50 minutes).

The aim of this study is to develop o/w microemulsion systems with soybean oil and hazelnut oil and to investigate the effect of microemulsion formulations on in vitro release of Mitomycin-C by comparing Mitomycin-C solution and to examine the biodistribution of MMC from microemulsion system with in vivo study.

For this aim, microemulsion formulations were developed and their physicochemical characteristics were determined such as viscosity, pH, electrical conductivity and droplet size distribution. Two microemulsion systems were selected for further studies. Both of formulations were loaded with MMC and in vitro release studies were carried out. As to the results of release study, the release values of MMC from both formulations were similar, there is no significant difference between them. The release values from microemulsions were different significantly from the release values of MMC solution.

For biodistribution study, soybean oil microemulsion was selected for lower viscosity than hazelnut oil. Gamma camera studies showed that MMC microemulsion formulation was accrued in liver and spleen more than MMC solution and elimination of MMC microemulsion formulation were slower than MMC solution.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. **Aboofazeli R., Barlow D.J., Lawrence M.J.:** Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions:I. total intensity light scattering; *AAPS Pharmsci*, 2(2) article 13 (2000)
2. **Aboofazeli R., Barlow D.J., Lawrence M.J.:** Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. photon correlation spectroscopy; *AAPS Pharmsci* 2(2) article 19 (2000)
3. **Agatonovic-Kustrin S., Glass B.D., Wisch M.H., Alany R.G.,** Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ANN methodology, *Pharm Res*, 20(11): 1760-1765 (2003)
4. **Ağabeyoğlu İ.,** Modern Farmasötik Teknoloji, Bölüm 11 (Temel Farmakokinetik), *Fersa Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara:* 183-226 (2007)
5. **Angelico R., Ceglie A., Olsson U., Palazzo G.;** Phase diagram and phase properties of the system lecithin-water-cyclohexane; *Langmuir*, 16: 2124-2132 (2000)
6. **Anton N., Gayet P., Benoit J.P., Saulnier P.;** Nan-oemulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion, *Int J Pharm*, 344: 44-52 (2007)
7. **Aslan İ., Ulubil A., Oysu Ç., Yazıcıoğlu E., Başer N.:** Larengotrakeal stenozlarda topikal "Mitomisin-C" uygulaması; *Türk ORL Arşivi*, 39 (2) : 109-112 (2001)

8. **Atsumi R., Endo K., Kakutani T., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H.:** Disposition characteristics of mitomycin C – dextran conjugates in normal and tumor-bearing muscle of rabbits; *Cancer Res*, 47: 5546-5551 (1987)
9. **Audisio RA., Doci R., Mazzaferro V. ve ark.,** Hepatic arterial embolisation with microencapsulated mitomycin C for unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhosis; *Cancer*, 66: 228-236 (1990)
10. **Axnanda S., Shantz D.F.,** Cationic microemulsion-mediated synthesis of silicalite-1, *Microporous Mesoporous Mater.*, 84: 236-246 (2005)
11. **Azevedo C.H.M., Carvalho J.P., Valduga C.J., Maranhão R.C.:** Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma; *Gynecol Oncol.*, 97: 178-182 (2005)
12. **Baroli B., López-Quintela M.A., Delgado-Charro M.B., Fadda A.M., Blanco-Méndez J. :** Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen; *J Control Release*, 69: 209-218 (2000)
13. **Baumann R.P., Hodnick W.F., Seow H.A. et al.,** Reversal of mitomycin C resistance by overexpression of bioreductive enzymes in chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, 61: 7770-7776 (2001)
14. **Boonme P., Krauel K., Graf A., Rades T., Junyaprasert V.B.;** Characterisation of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij97:1-butanol; *AAPS PharmSciTech*, 7(2): article 45 (2006)
15. **Bökenkamp A., Offner G., Hoyer P.F.,** Improved absorption of cyclosporin A from a new microemulsion formulation: implications for dosage and monitoring, *Pediatr Nephrol.*, 9(2): 197-198 (1995) (Abstrakt)

16. **Bradner W.T.**, Mitomycin C: a clinical update, *Cancer Treat Rev.*, 27: 35-50 (2001)
17. **Brime B., Molero G., Frutos P., Frutos G.**: Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil–water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*; *Eur J Pharm Sci*, 22: 451-458 (2004)
18. **Buroker T.R., Kim P.N., Baker L.H. et al.**, Mitomycin-C alone and in combination with infused 5-fluorouracil in the treatment of disseminated gastrointestinal carcinomas, *Med Pediatr Oncol.*, 4(1): 35-42 (2006)
19. **Bustamante-Rangel M., Delgado-Zamarreño M.M., Sánchez-Pérez A., Carabinas-Martínez R.**, microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of retinol, cholecalciferol, δ -tocopherol and α -tocopherol, *J Chromatogr A*, 1125: 270-273 (2006)
20. **Buzdar AU, Legha SS, Tashima CK, et al.**, Adriamycin and mitomycin C: possible synergistic cardiotoxicity, *Cancer Treat Rep.*, 62(7): 1005-1008 (1978)
21. **Caboi F., Lazzari P., Pani L., Monduzzi M.**; Effect of 1-butanol on the microstructure of lecithin/water/tripalmitin system; *Chem Phys Lipids*, 135: 147-156 (2005)
22. **Changez M., Chander J., Dinda A.K.**: Transdermal penetration of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo; *Colloids Surf B Biointerfaces*, 48: 58-66 (2006)
23. **Chen H., Chang X., Weng T. et al.** A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide, *J Control Release*, 98: 427-436 (2004)

24. **Cheng M.-B., Wang J.-C., Li Y.-H.**, Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme, *J Control Release*, 129(1): 41-48 (2008)
25. **Cheung RY., Rauth AM., Wu XY.**: In vivo efficacy and toxicity of intratumorally delivered mitomycin C and its combination with doxorubicin using microsphere formulations; *Anticancer Drugs*, 16: 423-433 (2005)
26. **Chimel O., Traitler H., Voepel K.**, Food microemulsion formulations, *United States Patent* – 5674549 (1996)
27. **Cornwell P.A., Tubek J., van Gompel H.A.H.P., Little C.J., Wiechers J.W.**; Glyceryl monocaprylate/caprate as a moderate skin penetration enhancer; *Int J Pharm*, 171: 243-255 (1998)
28. **Corrigan O.I., Healy A.M.**; Surfactants in Pharmaceutical Products and Systems, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, Inc.*: 2nd edition, vol. 3, 2639-2652 (2002)
29. **Cui Z., Sloat B.R.**, Topical immunization onto mouse skin using a microemulsion incorporated with an anthrax protective antigen protein-encoding plasmid, *Int J Pharm*, 317: 187-191 (2006)
30. **Çilek A., Çelebi N., Tırnaksız F., Tay A.**: A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats; *Int J Pharm*, 298: 176-185 (2005)
31. **Dantas T.N.C., Da Silva A.C., Neto A.A.D.**, New microemulsion systems using diesel and vegetable oils, *Fuel*, 80: 75-81 (2001)
32. **Date A.A., Nagarsenker M.S.**, Parenteral microemulsions: An overview, *Int J Pharm*, 355: 19-30 (2008)

33. **Demirci H., McCormick S.A. and Finger P.T.,** Topical mitomycin chemotherapy for conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia, *Arch. Ophthalmol.*, 118: 885-891 (2000)
34. **Den Hartigh J., McVie J.G., van Oort W.J. and Pinedo H.M.,** Pharmacokinetics of mitomycin C in humans, *Cancer Res.*, 43: 5017-5021 (1983)
35. **Dennis I.F., Ramsay J.R.S., Workman P. and Bleehen N.M.,** Pharmacokinetics of BW12C and mitomycin C, given in combination in a phase 1 study in patients with advanced gastrointestinal cancer (abstract), *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32(1): 67-72 (1993)
36. **Dierkes F., Haegel F.-H., Schwuger M.J.,** Low-temperature microemulsions for the in situ extraction of contaminant from soil, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 141: 217-225 (1998)
37. **Djekic L. and Primorac M.,** The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides; *Int J Pharm*, 352(1-2): 231-239 (2008)
38. **Djordjevic D., Primorac M., Stupar M., krajisnik D.** Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug, *Int J Pharm*, 271; 11-19 (2004)
39. **Dorr R.T., Bowden G.T., Alberts D.S. and Liddil J.D.,** Interaction of mitomycin C with mammalian DNA detected by alkali elution, *Cancer Res.*, 45: 3510-3516 (1985)
40. **El-nokaly M., Hiler G.D., Mcgrady J.,** Food microemulsion, *United States Patent – 5045337* (1990)

41. **Eroğlu M., Irmak S., Acar A., Denkbaş EB.:** Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer; *Int J Pharm.*, 235 : 51-59 (2002)
42. **Eroğlu M., Öztürk E., Özdemir N., Denkbaş EB., Doğan I., Acar A., Güzel M.:** Mitomycin-C-loaded alginate carriers for bladder cancer chemotherapy: in vivo studies; *J Bioactive Compat Polym.*, 20 :197-208 (2005)
43. **Feng J.L., Wang Z.W., Zhang J, Wang Z.N., Liu F.,** Study on food-grade vitamin E microemulsions based on nonionic emulsifiers, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 339: 1-6 (2009)
44. **Finger P.T., Czechonska G. and Liarikos S.,** Topical mitomycin C chemotherapy for conjunctival melanoma and PAM with atypia, *Br J Ophthalmol.*, 82: 476-479 (1998)
45. **Flangan J., Singh H.,** Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 46(3): 221-237 (2006)
46. **Florence A.T. and Attwood D.;** Chapter 7: Emulsions, Suspensions and Other Dispersions: *Physicochemical Principles of Pharmacy*, Palgrave New York, N.Y. 10010: 3rd edition, 254-307 (1998)
47. **Fracasso P.M. and Sartorelli A.C.,** Cytotoxicity and DNA lesions produced by mitomycin C and porfiromycin in hypoxic and aerobic EMT6 and chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, 46: 3939-3944 (1986)
48. **Gabizon AA., Tzemach D., Horowitz AT., Shmeeda H., Yeh J., Zalipsky S.:** Reduced toxicity and superior therapeutic activity of a mitomycin C lipid-based prodrug incorporated in pegylated liposomes; *Clin Cancer Res.*, 12 (6):1913-1920 (2006)

- 49. Garti N., Yaghmur A., Leser M.E., Clement V., Watzke H.J.,** Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol, *J Agric Food Chem.*, 49: 2552-2562 (2001)
- 50. Ghosh P.K., Majithiya R.J., Umrethia M.L. Mutrhy R.S.R.,** Design and development of microemulsion drug delivery systems of acyclovir for improved oral bioavailability, *AAPS PharmSciTech*, 7(3): article 77 (2006)
- 51. Goddeeris C., Cuppo F., Reynaers H., Bouwman W.G., Van de Mooter G.:** Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes; *Int J Pharm.*, 312: 187-195 (2006)
- 52. Goldberg JA., Kerr DJ., Blackie R., Whately TL., Pettit L., Kato T., McArdle CS.:** Mitomycin C-loaded microcapsules in the treatment of colorectal liver metastases; *Cancer*, 67: 952-955 (1991)
- 53. Gottfried M.R. and Sudilovsky O.,** Hepatic veno-occlusive disease after high-dose mitomycin C and autologous bone marrow transplantation therapy (Abstrakt), *Human Pathol.*, 13(7): 646-50 (1982)
- 54. Gradzielski M.;** Recent developments in the characterisation of microemulsions; *Curr Opin Colloid Interface Sci.*, 13: 263-269 (2008)
- 55. Griffin W.C.;** Calculation of HLB values of non-ionic surfactants; *J Soc Cosmet Chem.*, 5 (4): 249-256 (1955)
- 56. Gritskova I.A., Panich R.M., Voyutskii S.S.;** The physicochemical properties of oxyethylated non-ionic surface-active substances; *Russ Chem Rev.*, 34 (11): 867-882 (1965)
- 57. Gulsen. D., Chauhan A.,** Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: a potential ophthalmic drug delivery vehicle, *Int J Pharm.*, 292: 95-117 (2005)

58. **Guo X., Rong Z., ying X.**; Calculation of hydrophyle – lipophyle balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method; *J Colloid Interface Sci.*, 298: 441-450 (2006)
59. **Gupta S., Moulik S.P., Hazra B. ve ark.**, New pharmaceutical microemulsion system for encapsulation and delivery of diospyrin, a plant-derived bioactive quinonoid compound, *Drug Deliv.*, 13(3): 193-199 (2006)(Abstrakt)
60. **Gupta S., Moulik S.P.**, Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery, *J Pharm Sci.*, 97(1): 22-44 (2008)
61. **Hansen S.H., Gabel-Jensen C., El-Sherbin, Pedersen-Bjergaard S.**, Microemulsion electrokinetic chromatography – or solvent-modified micellar electrokinetic chromatography?, *Trends Analyt Chem.*, 20(11): 614-619 (2001)
62. **Hashida M., Atsumi R., Nishida K. ve ark.**, Biliary excretion of mitomycin C dextran conjugates in relation to physicochemical characteristics of carrier dextran, *J Pharmacobiodyn*, 13(7): 441-447 (1990)
63. **Haskell C.M. and Rosen L.**, Cancer Treatment, 5th edition, Part II (Drug Therapy), Chapter 10 (Antineoplastic Agents): 104-205, *W.B. Saunders Company The Curtis Center Independence Square West Phyladelphia, Pennsylvania 19106* (2001)
64. **Hazbun E.A., Schon S.G., Grey R.A.**, Microemulsion fuel system, *United States Patent – 4744796* (1986)
65. **He M., Sheldon P.J. and Sherman D.H.**, Characterization of a quinone reductase activity for the mitomycin C binding protein (MRD): functional switching from a drug-activating enzyme to a drug-binding protein, *Proc Natl Acad Sci.*, 98(3): 926-931 (2001)

66. **Ho H-O, Shiao C-C., Sheu M-T.**, Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acids as surfactant for the delivery of protein drugs; *J Pharm Sci.*, 85(2): 138-143 (1996)
67. **Hou Z., Wei H., Wang Q. ve ark.**, New method to prepare mitomycin C loaded PLA-nanoparticles with high drug entrapment efficiency, *Nanoscale Res Lett.*, 4: 732-737 (2009)
68. **Hu E. and Howell S.B.**, Pharmacokinetics of intraarterial mitomycin C in humans, *Cancer Res.*, 43: 4474-4477 (1983)
69. **Iyer V.N. and Szybalski W.**, A molecular mechanism of mitomycin action: linking of complementary DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50: 355-362 (1963)
70. **Kantarci G., Özgüney I., Karasulu H.Y., Arzik S., Güneri T.**: Comparison of Different Water/Oil Microemulsions Containing Diclofenac Sodium: Preparation, Characterization, Release Rate, and Skin Irritation Studies; *AAPS PharmSciTech*, 8 (4) Article 91 (2007)
71. **Kantarci G., Özgüney I., Karasulu Y., Güneri T., Başdemir G.**, In vitro permeation of diclofenac sodium from novel microemulsion formulations through rabbit skin, *Drug Dev Res.*, 65(1):17-25 (2005)
72. **Kantaria S., Rees G.D., Lawrence M.J.**; Formulation of electrically conducting microemulsion-based organogels; *Int J Pharm.*, 250: 65-83 (2003)
73. **Karoop Y., Chauhan A.**, Ophthalmic delivery of cyclosporine A from Brij-97 microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels, *Int J Pharm.*, 361: 222-229 (2008)
74. **Kato T., Nemoto R., Mori H., Kumagai I.**: Sustained release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog; *Cancer*, 46: 14-21 (1980)

75. **Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M., Harada M.:** Arterial chemoembolisation with mitomycin C microcapsules in the treatment of primary or secondary carcinoma of the kidney, liver, bone and intrapelvic organs; *Cancer*, 48: 674-680 (1981)
76. **Kennedy K.A., Rockwell S. and Sartorelli A.C.,** Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells, *Cancer Res.*, 40: 2356-2360 (1980)
77. **Kennedy K.A., McGurl J.D., Leondaridis L. and Alabaster O.,** pH dependence of mitomycin C-induced cross-linking activity in EMT6 tumor cells, *Cancer Res.*, 45: 3541-3547 (1985)
78. **Kim K.M., Choi B.M., Park S.W. ve ark.,** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol microemulsion and lipid emulsion after an intravenous bolus and variable rate infusion, *Anesthesiology*, 106(5): 924-934 (2007) (Abstrakt)
79. **Kim S.K., Lee E.H., Vaishali B. ve ark.,** Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates, *J Control Release*, 105: 32-42 (2005)
80. **Klotz W.L., Schure M.R., Foley J.P.,** Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography, *J Chromatogr A*, 930: 145-154 (2001)
81. **Koo D.H., Lee J.L., Kim T.W. et al.,** Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and mitomycin-C (FAM) for 6 months after curative resection of gastric carcinoma, *Eur J Surg Oncol.*, 33: 843-848 (2007)

82. **Köybaşıoğlu F., Önal BÜ., Han Ü., Adabağ A., Kılıç M.:** Mesane Yıkama Sitolojisi: İnvaziv Olmayan Ürotelyal Kanserlerde Mesane İçi Mitomisin-C Tedavisi Sonrası İzlemde Kullanılabilir mi?; *Türk Üroloji Dergisi*, 31 (3) : 335-341 (2005)
83. **Kreuter J.** Drugs and the Pharmaceutical Sciences vol. 66 (Colloidal Drug Delivery Systems, chapter 2: Microemulsions, by Attwood D.) pp: 50-57; Marcel Dekker, Inc., 207 Madison Avenue, New York, New York 10016 (1994)
84. **Lankelma J. Stuurman M., Van Hoogenhuijze J. et al.,** The pharmacokinetic plasma profile of mitomycin C, measured after sequential intermittent intravenous administration, *Eur J Clin Oncol.*, 24(2): 175-180 (1988)
85. **Lawrence M.J., Rees G.D.:** Microemulsion-based media as novel drug delivery systems; *Adv Drug Deliv Rev.*, 45: 89-121 (2000)
86. **Li L., Nandi I., Kim K.H.,** Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam, *Int J Pharm.*, 237: 77-85 (2002)
87. **Li T.D., Gan L.M., Chew C.H., Teo W.K., Gan L.H.,** Preparation of ultrafiltration membranes by direct microemulsion polymerization using polymerizable surfactants, *Langmuir*, 12: 5863-5868 (1996)
88. **Li Y., Park C.-W.,** Particle size distribution in the synthesis of nanoparticles using microemulsions, *Langmuir*, 15: 952-956 (1999)
89. **Lin J.C., Dipre J.T., Yates M.Z.,** Microemulsion-directed synthesis of molecular sieve fibers, *Chem Mater*, 15: 2764-2773 (2003)
90. **Lv F-F., Zheng L-Q., Tung C-H.,** Phase behaviour of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system, *Int J Pharm.*, 301;237-246 (2005)

91. **Mehta S.K., Dewan R.K., Bala K.,** Percolation phenomenon and the study of conductivity, viscosity, and ultrasonic velocity of microemulsions, *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 50(6):4759-4762 (1994)
92. **Mele S., Chittofrati A., Ninham B.W., Monduzzi M.,** ¹⁹F NMR investigation of mixed surfactants partitioning kinetic and stability of fluorinated nanodroplets in water; *J Phys Chem.*, 108: 8201-8207 (2004)
93. **Memon M.H., Worsfold P.J.,** Analytical applications of microemulsions. Spectrophotometric determination of zinc using dithizone, *Analyst*, 113: 769-771 (1988)
94. **Moreno MA., Frutos P., Ballesteros MP.:** Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B; *Pharm Res*, vol. 18, 3: 344-351 (2001)
95. **Nagamitsu A., Konno T., Oda T. ve ark,** Targeted cancer chemotherapy for VX2 tumour implanted in the colon with lipiodol as a carrier; *Eur J Cancer*, 34 (11): 1764-1769 (1998)
96. **Narang A.S., Delmarre D., Gao D.,** Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *Int J Pharm.*, 345 (1-2): 9-25 (2007)
97. **Narayanan K.S., Kaminsky M., Ianniello R.M.,** Stable, single phase w/o microemulsion matrix formulation for forming sprayable, aerosol agriculturally active compositions, *United States Patent – 5603942* (1995)
98. **Nishimura M., Yamaguchi A., Yamaguchi M., Ueda N., Naito S.,** Soybean oil in total parenteral nutrition maintains albumin and antioxidant enzyme mRNA levels, *Biol Pharm Bull.*, 28(7): 1265-1269 (2005)

- 99. Nornoo A.O., Osborne D.W., Chow D.S-L.:** Cremophor-free intravenous microemulsion for paclitaxel I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis; *Int J Pharm.*, 349: 108-116 (2008)
- 100. Ohba N.;** Hydrophyle – lipophyle balance values for O/W emulsions stabilized by nonionic surfactants. I. Hydrophyle – lipophyle balance values of nonionic surfactants determined by emulsification; *Bull Chem Soc Jpn.*, 35 (6): 1016-1020 (1962)
- 101. Özer Ç., Akbulut K.G., Gönül B., Yetkin G., Çelebi N.:** İskemili ve iskemisiz peptik ülser modellerinde dönüştürücü büyüme faktörü-alfa mikroemülsiyon formunun yara iyileşmesine etkisi ve malondialdehit, glutatyon, nitrik oksit düzeyleri ile ilişkisinin araştırılması; *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 24: 461-468 (2004)
- 102. Özer G., Altınel M., Koçak B., Torun C., Gönenç F.:** Düşük riskli yüzeyel mesane kanserlerinde operasyondan hemen sonra uygulanan tek doz mitomisin-C instilasyonunun kısa dönem rekürrensler (tekrarlayan tümör) üzerine etkisi; *Türk Üroloji Dergisi*, 27 (4) : 407-410 (2001)
- 103. Pallas N.R., Gillespie J.L., Singh L., Xiaodong X.C.,** Stable liquid pesticide compositions, *European Patent – EP1395116* (2002)
- 104. Pan S-S., Andrews P.A., Glover C.J. and Bachur N.R.,** Reductive activation of mitomycin C and mitomycin C metabolites catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase, *J Biol Chem.*, 259(2): 959-966 (1984)
- 105. Park K.-M., Kim C.-K.,** Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery, *Int J Pharm.*, 181:173-179 (1999)

- 106. Paroni R., Arcelloni C., DeVecchi E. ve ark.,** Plasma mitomycin C concentrations determined by HPLC coupled to solid-phase extraction, *Clin Chem.*, 43(4): 615-618 (1997)
- 107. Pasterz R.B., Buzdar A.U., Hortobagyi G.N. and Blumenschein G.R.,** Mitomycin in metastatic breast cancer refractory to hormonal and combination chemotherapy, *Cancer*, 56(10): 2381-2384 (1985)
- 108. Paul B.K., Moulik S.P.:** Uses and applications of microemulsions; *Curr Sci.*, 80 (8): 990-1001 (2001)
- 109. Paul K.B., Moulik S.P.:** Microemulsions: an overview; *J Dispers Sci Technol.*, 18 (4): 301-367 (1997)
- 110. Paul K.B., Moulik S.P.:** The viscosity behaviors of microemulsions: an overview, *Proc Ind Natl Sci Acad.*, 66; 499-519 (2000)
- 111. Peer D. and Margalit R.:** loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in the three mice tumor models; *Int J Cancer*, 108 : 780-789 (2004)
- 112. Penketh P.G., Hodnick W.F., Belcourt M.F., Shyam K., Sheman D.H. and Sartorelli A.C.,** Inhibition of DNA cross-linking by mitomycin C by peroxidase-mediated oxidation of mitomycin C Hydroquinone, *J Biol Chem.*, 276(37): 34445-34452 (2001)
- 113. Peyrelasse J., Boned C.** Study of the structure of water/aerosol OT/dodecane systems by time domain dielectric spectroscopy, *J Phys Chem.*, 89; 370-379 (1985)
- 114. Poch E., González-Clemente J.M., Torras A., Darnell A., Botey A. and Revert L.,** Silent renal microangiography after mitomycin C therapy, *Am J Nephrol.*, 10(6): 514-517 (1990)

115. **Price G.J., Hunter T.C.**, Polymerization of microemulsion to yield functionalized absorbent membranes, *Eur Polym J.*, 33(5): 599-605 (1997)
116. **Qiu S., Dong J., Chen G.**, Preparation of Cu nanoparticles from water-in-oil microemulsions, *J Colloid Interface Sci.*, 216: 230-234 (1999)
117. **Ravikumar T.S., Sibley R., Reed K. and Grage T.B.**, Renal toxicity of mitomycin-C, *Am J Clin Oncol.*, 7(3): 279-285 (1984)
118. **Ribeiro F.A., Guaraldo L., Borges J.P., Vianna M.R. and Eckley C.A.**, Study of wound healing in rats treated with topical and injected mitomycin C, *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 117(10): 786-790 (2008)
119. **Richter T., Keipert S.**, In vitro permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione microemulsions and their components, *Eur J Pharm Biopharm.*, 58: 137-143 (2004)
120. **Ross D., Siegel D., Beall H. ve ark.**, DT-diaphorase in activation and detoxification of quinones: Bio-reductive activation of mitomycin C, *Cancer Metastasis Rev.*, 12: 83-101 (1993)
121. **Rump A.F.E., Woschée U., Theisohn M. et al.**, Pharmacokinetics of intra-arterial mitomycin C in the chemoembolization treatment of liver metastases with polyvinylalcohol degradable starch microspheres, *Eur J Clin Pharmacol.*, 58: 459-465 (2002)
122. **Ryoo H.-K., Park C.-W., Chi S.-C., Park E.-S.**, Development of propofol-loaded microemulsion systems for parenteral delivery, *Arch Pharm Res.*, 28(12): 1400-1404 (2005)
123. **Santanna V.C., Curbelo F.D.S., Dantas T.N.C. ve ark.**, Microemulsion flooding for enhanced oil recovery, *J Petroleum Sci Eng.*, 66: 117-120 (2009)

124. **Sasaki H., Takakura Y., Hashida M., Kimura T., Sezaki H.** Antitumor activity of lipophilic prodrugs of mitomycin C entrapped in liposome or o/w emulsion, *J Pharmacobiodyn.*, 7;120-130 (1984)
125. **Schwab A.W., Pryde E.H.**, Microemulsions from vegetable oil and lower alcohol with octanol surfactant as alternative fuel for diesel engines, *United States Patent* – 4557734 (1984)
126. **Schwartz H.S., Sodergren J.E. and Philips F.S.**, Mitomycin C: chemical and biological studies on alkylation, *Science*, 142: 1181-1183 (1963)
127. **Schultz K.R., Nevill T.J., Balshaw R.F.**, Effect of gastrointestinal inflammation and age on the pharmacokinetics of oral microemulsion cyclosporin A in the first month after bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant.*, 26: 545-551 (2000)
128. **Shinoda K., Lindman B.**, Organized surfactant systems: Microemulsions; *Langmuir*, 3(2):135-149(1987)
129. **Shukla A., Janich M., Jahn K., Krause A., Kiselev M.A., Neubert R.H.H.**: Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering; *Pharm Res.*, 19 (6): 881-886 (2002)
130. **Simon P., Hervé J.P., Ramée M.P. et al.**, Mytomycin C nephrotoxicity. 3 new cases and review of the literature, *Nephrologie*, 3(4): 152-157 (1982)
131. **Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N.**, Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases, *Biotechnol Adv.*, 17: 293-318 (1999)
132. **Strickley R.G.**, Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharm Res.*, 21: 201-229 (2004)
133. **Šegota S., Težak Đ.**: Spontaneous formation of vesicles; *Adv. Colloid Interface Sci.*, 121: 51-75 (2006)

134. **Tamilvanan S.**, Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems, *Prog Lipid Res.*, 43: 489-533 (2004)
135. **Tanasescu C., Serbanescu A., Spadaro A., Jen L.H., Oliani C.:** Comparison of two microemulsion of cyclosporine A in healthy volunteers; *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 3: 5-9 (1999)
136. **Tomasz M.**, Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective), *Chem Biol.*, 2: 575-579 (1995)
137. **Tomasz M. and Palom Y.**, The mitomycin bio-reductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity, *Pharmacol. Ther.*, 76(1-3): 73-87 (1997)
138. **Tomasz M., Chowdary D., Lipman R. et al.**, Reaction of DNA with chemically or enzymatically activated mitomycin C: isolation and structure of the major covalent adduct, *Proc Natl Acad Sci USA, Biochemistry*, 83: 6702-6706 (1986)
139. **Tomasz M., Lipman R., Chowdary D. et al.**, Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA, *Science*, 235: 1204-1208 (1987)
140. **Valavaara R. and Nordman E.**, Renal complications of mitomycin C therapy with special reference to the total dose, *Cancer*, 55(1): 47-50 (1985)
141. **Valenta C., Schultz K.**, Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations, *J Control Release*, 95: 257-265 (2004)
142. **Vandamme Th.F.**, Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges, *Prog Retin Eye Res.*, 21: 15-34 (2002)
143. **Verweij J., van der Burg M.E. and Pinedo H.M.**, Mitomycin C-induced hemolytic uremic syndrome. Six case reports and review of the literature on renal,

pulmonary and cardiac side effects of the drug, *Radiother. Oncol.*, 8(1): 33-41 (1987)

144. Villani F, Comazzi R, Lacaita G et al., Possible enhancement of the cardiotoxicity of doxorubicin when combined with mitomycin C, *Med Oncol Tumor Pharmacother.*, 2(2): 93-97 (1985)

145. Von Corswant C., Engström S., Söderman O.: Microemulsions based on soybean phosphatidylcholine and triglycerides. phase behavior and microstructure; *Langmuir*, 13: 5061-5070 (1997)

146. Von Corswant C., Thorén P., Engström S.: Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances; *J Pharm Sci.*, 87(2): 200-208 (1998)

147. Vyas T.K., Babbar A.K., Sharma R.K., Singh S., Misra A., Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsions of sumatriptan, *AAPS PharmSciTech* 7(1): Article 8 (2006)

148. Wagenaar H.C., Pecorelli S., Mangioni C. et al., Phase II study of mitomycin-C and cisplatin in disseminated, squamous cell carcinoma of the uterine cervix. A European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Gynecological Cancer Group Study, *Eur J Cancer*, 37: 1624-1628 (2001)

149. Xi-xiao Y., Jan-hai C., Shi-ting L., Dan G., Xv-xin Z.: Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as a carrier for mitomycin C in rabbits bearing VX2-liver tumor; *Regul Toxicol Pharmacol.*, 46: 211-217 (2006)

150. Yashima M., Falk L.K.L., Palmqvist A.E.C., Holmberg K., Structure and catalytic properties of nanosized alumina supported platinum and palladium particles synthesized by reaction in microemulsion, *J Colloid Interface Sci.*, 268: 348-356 (2003)

151. **Yu Z-J. and Neuman R.D.;** Reversed micellar solution-to-bicontinuous microemulsion transition in sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate/n-heptane/water system; *Langmuir*, 11: 1081-1086 (1995)
152. **Yücel Ö.T.:** Laser miringotomide topikal mitomisin C'nin yeri; *K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 7 (3) : 205-208 (1999)
153. **Zhang L., Sun X., Zhang ZR.:** An investigation on liver-targeting microemulsions of norcantharidin; *Drug Deliv.*, 12: 289-295 (2005)
154. **Zhang Q., Jiang X., Jiang W. ve ark.,** Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain, *Int J Pharm.*, 275: 85-96 (2004)
155. **Zhang W., Qiao X., Chen J.,** Synthesis of nanosilver colloidal particles in wate/oil microemulsion, *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp.*, 299: 22-28 (2007)
156. **Zhao X., Chen D., Gao P., Ding P., Li K.,** Synthesis of ibuprofen eugenol ester and its microemulsion formulation for parenteral delivery, *Chem Pharm Bull.*, 53(10): 1246-1250 (2005)
157. **Zhou N., Bates F.S., Lodge T.P.,** Mesoporous membrane templated by a polymeric bicontinuous microemulsion, *Nano Lett.*, 6(10): 2354-2357 (2006)
158. **Zilelioğlu G., Uğurbaş SH., Anadolu Y., Akıner M., Aktürk T.:** Adjunctive use of mitomycin C on endoscopic lacrimal surgery; *Brit J Ophthalmol.*, 82 : 63-66 (1998)
159. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00305>
160. http://www.malvern.com/LabEng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm (©Copyright 2009 - Malvern Instruments Ltd)

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2009-2

23.01/ 2009

KONU: Onay

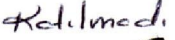
Doç. Dr. Gülten KANTARCI

E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

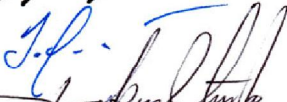
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“Vücut organlarına hedefleme amacıyla hazırlanan Mitomisin-C yüklü taşıyıcı sistemlerin organizmada biyodağılımının incelenmesi”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

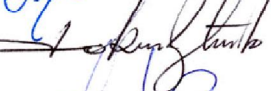
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

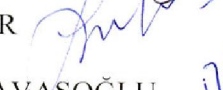
Prof. Dr. Rasih YILMAZ 
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof.Dr. Mustafa KAYMAKÇI  *Katılmadı*

Prof.Dr. Hüseyin TEZEL 

Prof.Dr. İsmet GÜRHAN 

Prof.Dr. Lokman ÖZTÜRK 

Doç.Dr. Gülcihan Mehtap ÇINAR 

Doç.Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU 

Doç.Dr. Tansel TANRIKUL 

Yard.Doç.Dr. Gülnur SEVİN 

Özcan NALBANTOĞLU 

Tingiz ÖZCAN 

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Bulgaristan'ın Razgrad şehrinde doğdum. 1989-1997 yılları arasında köyümüzdeki ilk ve orta okuldan mezun oldum. 2000 yılında Razgrad Maria Currie Biyoteknoloji Meslek Lisesinin Farmasötik Ürün İmalatında Operatör branşından mezun olduktan sonra Türkiye'de üniversite öğrenimi almak üzere Ankara'ya geldim. Bir yıl Türkçe eğitimi aldıktan sonra, 2001-2005 yılları arasında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimi gördüm. 2006 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Farmasötik Biyoteknoloji grubunda yüksek lisansa başladım.