

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

**HYALURONAN MİKROPARTİKÜLLERİ İÇEREN DERMAL
SİSTEMLERİN DOKU ONARIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Erol Eli SİMSOLO

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özgen ÖZER

Yardımcı Danışman

Yard. Doç. Dr. İpek EROĞLU

İZMİR

2013

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HYALURONAN MİKROPARTİKÜLLERİ İÇEREN DERMAL
SİSTEMLERİN DOKU ONARIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Erol Eli SİMSOLO

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özgen ÖZER
Yardımcı Danışman
Yard. Doç. Dr. İpek EROĞLU

İZMİR
2013

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan : Prof.Dr. Özgen ÖZER
(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Gökhan ERTAN

Üye : Prof.Dr. Hande Gürer ORHAN

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında bilgi, deneyim ve önerilerinden faydalandığım, her zaman desteğiyle yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Sayın Özgen Özer'e

İlgi ve yardımlarıyla bana destek olan yardımcı danışmanım Yard. Doç. Sayın İpek Eroğlu'na

Hücre kültürü çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Sayın Hande Gürer Orhan'a

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Sayın Evren Homan Gökçe'ye

Texture Profile Analiz çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Sayın Sinem Yaprak Karavana'ya

Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi analizini gerçekleştirme imkanı bulduğum E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'na (FABAL) ve yardımlarından dolayı Yüksek Müh. Sayın Çiğdem Yengin'e,

Sterilite çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Sayın İsmail Öztürk'e

Tezimin yazımı sırasında verdiği desteklerden dolayı değerli sınıf arkadaşım Dr. Ecz. Sayın Mehmet Ali Ege'ye

Destekleri ile birlikte çalışmayı keyif haline getiren tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine

Bana her zaman destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 12/ECZ/029 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2	GENEL BİLGİLER	2
2.1	DERİ.....	2
2.1.1	Derinin Anatomik Yapısı ve Fizyolojisi.....	2
2.1.1.1	Epidermis	3
2.1.1.1.1	Stratum Corneum (Boynuzsu Tabaka).....	4
2.1.1.1.2	Stratum Lucidum	4
2.1.1.1.3	Stratum Granulosum (Tanecikli Tabaka).....	4
2.1.1.1.4	Stratum Spinosum (Dikensi Tabaka)	5
2.1.1.1.5	Stratum Basale (Bazal Tabaka).....	5
2.1.1.2	Dermis.....	5
2.1.1.3	Hipodermis (Deri altı tabaka).....	5
2.2	EKSTRASELÜLER MATRİKS.....	6
2.3	HYALÜRONİK ASİT	7
2.4	SELÜLİT	10
2.4.1	Selülitin Fizyopatolojisi	11
2.4.2	Selülit Tedavisinde Yaklaşımlar	12
2.4.2.1	Topikal Tedavi Yaklaşımı.....	13
2.4.2.1.1	Mikrosirkülasyon Akışını Arttıran Maddeler	13
2.4.2.1.2	Lipojenezi Azaltan ve Lipolizi Teşvik Eden Maddeler	15
2.4.2.1.3	Deri ve Alt Deri Tabakasının Normal Yapısını Restore Eden Maddeler 15	
2.4.2.1.4	Serbest Radikalleri Süpüren / Serbest Radikal Oluşumunu Engelleyen Maddeler	16
2.5	ETKİN MADDELERİN DERİDEN GEÇİŞ YOLLARI	16
2.5.1	Porlardan ya da Boşluklardan Geçiş.....	17
2.5.2	Hücreleriçi Geçiş (Transselüler Yol).....	17
2.5.3	Hücrelerarası Geçiş (İnterselüler Yol).....	17
2.6	İLAÇ TAŞIYICI PARTİKÜLER SİSTEMLER.....	18
2.6.1	Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri.....	20
2.6.1.1	Çözücü Buharlaştırma/Ekstraksiyon Yöntemi.....	20
2.6.1.2	Polimerizasyon Yöntemi.....	20
2.6.1.3	Delik (Orifice) Yöntemi.....	21
2.6.1.4	Koaservasyon Yöntemi.....	21
2.6.1.5	Wurster Yöntemi	21
2.6.1.6	Püskürterek Kurutma Yöntemi.....	22
2.7	JELLER	23
2.7.1	Organojeller.....	25
2.7.1.1	Organojellerin Oluşum Mekanizması.....	25
2.7.1.2	Lesitin Organojelleri.....	26
2.7.1.2.1	Lesitin.....	27
2.8	KAFEİN.....	30
2.8.1	Tanım.....	30
2.8.2	Fiziksel Özellikleri	32

2.8.3	Saklama Koşulları	32
2.8.4	Piyasa Preparatları	32
3	GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1	Kullanılan Maddeler ve Araç-Gereçler	35
3.1.1	Kullanılan Maddeler	35
3.1.2	Kullanılan Araç-Gereçler	35
4	YÖNTEM ve PRATİK ÇALIŞMALAR	36
4.1	Etkin Madde ve Polimerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	36
4.1.1	Infrared (IR) Spektrumu	36
4.1.2	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) ile Termal Analiz	36
4.1.3	Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmaları	37
4.1.4	Etkin Maddenin Lipit/Su Partisyon Katsayısının Hesaplanması	37
4.2	Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmaları	38
4.2.1	UV Spektrum Çalışmaları	38
4.2.2	UPSK (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları	38
4.3	Analitik Yöntem Validasyonu	38
4.3.1	Doğrusallık	39
4.3.2	Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik	39
4.3.3	Keskinlik	40
4.3.3.1	Tekrar Edilebilirlik	40
4.3.3.2	Tekrar Elde Edilebilirlik	41
4.3.4	Özgünlük, Seçicilik	41
4.3.5	Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)	41
4.3.6	Stabilite	42
4.4	Formülasyon Çalışmaları	42
4.4.1	Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	42
4.4.2	Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	42
4.4.2.1	Partikül Boyutu ve Morfolojisi	42
4.4.2.2	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayini	43
4.4.2.3	Termal Analizler	43
4.4.2.4	Mikropartiküllerin Sterilizasyonu	43
4.4.2.5	Mikrobiyolojik Sterilite Kontrolü	43
4.4.3	Organojel Formülasyonlarının Hazırlanması	44
4.4.4	Organojel Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	44
4.4.4.1	Makroskobik İncelemeler	44
4.4.4.2	pH Ölçümleri	44
4.4.4.3	Reoloji ve Viskozite tayini	44
4.4.4.4	Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayini	46
4.4.4.4.1	Jellerin Sertliği	47
4.4.4.4.2	Jellerin Sıkıştırılabilirliği	47
4.4.4.4.3	Jellerin Adezivliği	47
4.4.4.4.4	Jellerin Kohezivliği	48
4.4.4.4.5	Jellerin Elastikiyeti	48
4.4.5	Formülasyonların Stabilite Çalışmaları	49
4.5	<i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	49
4.6	Formülasyonların Ex-vivo Penetrasyon Çalışmaları	50
4.7	Hücre Kültürü Çalışmaları	51

4.7.1	Sitotoksosite Testi	51
4.8	Araştırma Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	52
5	BULGULAR.....	53
5.1	Etkin Madde ve Polimerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	53
5.1.1	Infrared (IR) Spektrumuna Ait Bulgular	53
5.1.2	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) ile Termal Analiz Bulguları	53
5.1.3	Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulgular	54
5.1.4	Etkin Maddenin Lipit/Su Partisyon Katsayısının Hesaplanmasına Ait Bulgular.....	54
5.1.5	Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular	54
5.1.5.1	UV Spektrum Çalışmalarına ait bulgular.....	54
5.1.5.2	Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular.....	55
5.1.5.2.1	Doğrusallık	55
5.1.5.2.2	Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	56
5.1.5.2.3	Kesinlik	58
5.1.5.2.3.1	Tekrar Edilebilirlik	58
5.1.5.2.3.2	Tekrar Elde Edilebilirlik.....	58
5.1.5.2.4	Özgünlük, Seçicilik	59
5.1.5.2.5	Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)	60
5.1.5.2.6	Stabilite.....	60
5.2	FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	61
5.2.1	Mikropartikül Formülasyonlarının Çalışmalarına Ait Bulgular.....	61
5.2.1.1	Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular.....	61
5.2.1.2	Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	62
5.2.1.2.1	Partikül Boyutu ve Morfolojisine Ait Bulgular	62
5.2.1.2.2	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayinine Ait Bulgular.....	63
5.2.1.2.3	Termal Analiz Bulguları.....	63
5.2.1.2.4	Mikrobiyolojik Sterilite Kontrolüne Ait Bulgular	64
5.2.2	Organojel Formülasyonların Çalışmalarına Ait Bulgular.....	64
5.2.2.1	Organojel Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	64
5.2.2.1.1	Makroskobik İnceleme ve pH Ölçümüne Ait Bulgular	64
5.2.2.1.2	Reoloji ve Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular.....	65
5.2.2.1.3	Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular	66
5.2.3	Formülasyonların Stabilite Çalışmaları	68
5.3	<i>In vitro</i> Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	70
5.4	Formülasyonların Ex-vivo Permeasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	70
5.5	Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	71
6	TARTIŞMA.....	73
7	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BM	%2 Ha İçeren Boş Mikropartikül
DTK (DSC)	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
F1	%0.2 HA İçeren Boş Mikropartiküller
F2	%0.2 HA İçeren Kafein Yüklü Mikropartiküller
F3	%0.5 HA İçeren Boş Mikropartiküller
F4	%0.5 HA İçeren Kafein Yüklü Mikropartiküller
HA.....	Hyalüronik Asit
IR	Kızıl Ötesi (Infra Red)
LO	Lesitin Organojeli
LOD	Teşhis Sınırı (Limit Of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limit Of Quantitation)
MP.....	Mikropartikül
MTT	3-(4,5-Dimetitiazol-2-İl)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
O-B.....	Boş Organojel
O-K	Kafein Yüklü MP içeren Organojeller
ORT	Aritmetik Ortalama
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffer Solution)
SC	Stratum Corneum
SS	Standart Sapma
TPA	Texture Profil Analizi
UPSK (HPLC)	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV.....	Ultraviyole
VK.....	Varyasyon Katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Derinin yapısı	3
Şekil 2: Epidermis şematik görünümü.....	4
Şekil 3: Ekstraselüler matriks şematik gösterimi	6
Şekil 4: Deri tabakasında hyalüronik asit ve kolajen (Advance Medical System Inc.)	7
Şekil 5: HA'ın deri nemlendirme etkisi şematik gösterimi.....	9
Şekil 6: Kadın ve erkek derisi bağ dokusu farklılıkları (understanding the cellulite- The Durham Clinic).....	10
Şekil 7: Deri altı yağ dokusu şematik gösterimi.....	11
Şekil 8: Selülit sonrası değişen yağ hücresi şematik gösterimi.....	12
Şekil 9: Deriden geçiş yollarının şematik görünümü (34)	17
Şekil 10: Mikroküre ve mikrokapsül morfolojik yapıları (47).....	18
Şekil 11: Püskürterek kurutma cihazı ve şematik gösterimi	23
Şekil 12: Lesitin kimyasal yapısı (1-Oleoyl-2-almityol-phosphatidylcholine).....	27
Şekil 13: Kafein kimyasal formülü (3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6- dione)	32
Şekil 14: Brookfield DV III model viskozimetre	45
Şekil 15: Haake osilasyon reometre	45
Şekil 16: TA-XT Plus, Stable Micro System cihazı	46
Şekil 17: Jel formülasyonuna ait TPA grafiği.....	48
Şekil 18: Diyaliz membrandan <i>in vitro</i> salım çalışması.	49
Şekil 19: Franz difüzyon hücresi ve şematik görünümü.....	50
Şekil 20 : Franz difüzyon hücreleri ile difüzyon çalışması.....	50
Şekil 21: Kafein'in IR spektrumu.....	53
Şekil 22 : Kafein'in termal analiz grafiği.....	54
Şekil 23: Kafeinin; (A) UV spektrumu ve (B) UPSK ile bulunan λ_{max} değeri	55
Şekil 24: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile elde edilen standart doğrusu.....	56
Şekil 25: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen standart doğrusu.....	56
Şekil 26: Kafeinin UPSK ile elde edilen pik değeri	60
Şekil 27: F4 formülasyonu partikül büyüklüğü dağılımı (n=6)	62
Şekil 28: F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı	63
Şekil 29: Kafein, HA, fiziksel karışım, F3 ve F4 formülasyonlarına ait DTK termogramı	64
Şekil 30: Formülasyonunun stress sweep test profili (crossover point: 10 Pa).....	65
Şekil 31: F4 formülasyonunun reolojik osilasyon profilleri	66
Şekil 32: O-B formülasyonuna ait TPA grafiği.....	67
Şekil 33: O-K formülasyonuna ait TPA grafiği	67
Şekil 34: O-F4 formülasyonuna ait TPA grafiği	68
Şekil 35: Formülasyonlara ait % salım grafiği.....	70
Şekil 36: Formülasyonlara ait kafein permeasyon grafiği	70
Şekil 37: F3 ve F4 formülasyonlarının <i>in vitro</i> insan dermal fibroblast hücrelerinde sitotoksik aktivitesinin 0,6; 0,2; 0,006; 0,002 mg/ml konsantrasyonlarda, MTT yöntemi ile değerlendirilmesine ait bulgular.....	71

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler	57
Tablo 2: Kafeinin UPSK yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler	57
Tablo 3: Kafeinin UV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik testi sonuçları	58
Tablo 4: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik testi sonuçları	58
Tablo 5: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile elde edilen tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları	59
Tablo 6: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları	59
Tablo 7: UPSK yöntemi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri	60
Tablo 8: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile yapılan stabilite testi sonuçları	60
Tablo 9: Kafeinin UPSK yöntemi ile yapılan stabilite testi sonuçları	61
Tablo 10: Hazırlanan boş mikropartikül formülasyonlarının kodları ve hazırlama şartları	61
Tablo 11: Formülasyonlarının ortalama partikül boyutları	62
Tablo 12: Organojellerin genel özellikleri	64
Tablo 13: Organojellerin viskozite tayinine ait bulgular	65
Tablo 14: Organojellerin Mekanik Özelliklerine ait bulgular	68
Tablo 15: Mikropartikül formülasyonlarının 25°C sıcaklık-%60 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular	69
Tablo 16: Mikropartikül formülasyonlarının 40°C sıcaklık-%75 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular	69
Tablo 17: Organojel formülasyonlarının 25°C sıcaklık-%60 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular (6. ay)	69
Tablo 18: Organojel formülasyonlarının 40°C sıcaklık-%75 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular (6. ay)	69

BÖLÜM I

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Dermal doku hasarının onarımı için kullanılan topikal konvansiyonel yaklaşımlar, tedavi süresince karşılaşılan sorunların giderilmesi konusunda yetersiz kalmaktadır. Konvansiyonel formülasyonların en önemli dezavantajı uygulama sıklığının fazla olması ve etkin bir tedavi sunamamasıdır. Selülit, yağ hücrelerinin anormal irileşmesi ve derinin esnekliğinin azalması sonucu olarak dermal hasara neden olan kozmetik bir bozukluktur. Deri altı yağ hücrelerindeki yağın yanması (lipoliz) selülit tedavisinde olması istenen bir durumdur. Aynı zamanda bu hücrelerde yağ üretiminin artması (lipojenez) engellenmelidir. Kafein bu iki olayı birden gerçekleştirmesi nedeniyle pekçok kozmetik üründe güncel olarak kullanılmaktadır.

Mikropartiküller, çapları birkaç μm 'den birkaç yüz μm 'ye kadar değişebilen ilaç taşıyıcı sistemler olup, polimerik yapıları nedeniyle etkin maddenin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlarlar. Son yıllarda hyaluronik asit (HA) ile hazırlanan mikropartiküller, doku onarımını hızlandıran pekçok formülasyonun terkibine girmiştir. Derinin doğal bileşenlerinden olması, yeni hücre oluşumu ve hareketliliğinin devamını sağlaması ve ayrıca güçlü nemlendirme özelliği nedeni ile selülit tedavisinde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın amacı; topikal yol ile kullanılmak üzere kafein içeren mikropartikül formülasyonlarının geliştirilmesi, etkinliklerinin optimize edilmesi ve tedavide uzun süre etkili bir formülasyon tasarımı yapılmasıdır. Bu bakımdan

çalışmamızda kafein içeren HA mikropartiküllerinin hazırlanması, dermal sistemlere (lesitin organojel) yüklenmesi, karakterizasyon, *in vitro* salım ve *ex vivo* difüzyon çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Son olarak, *in vitro* deneylerin sonuçlarına göre seçilen formülasyonların sitotoksik etkilerini değerlendirmek için hücre kültürü çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Böylece hem selülit tedavisinde etkin hem de hasar görmüş dokunun onarımını hızlandıran nemlendirici özellikte sinerjik etkili bir formülasyon önerilebilecektir.

2 GENEL BİLGİLER

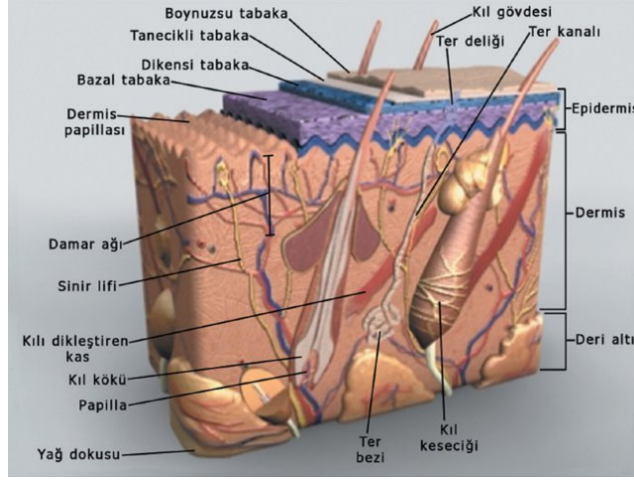
2.1 DERİ

2.1.1 Derinin Anatomik Yapısı ve Fizyolojisi

Deri, insan vücudunun dış yüzeyini saran ve aynı zamanda çevre ve organizma arasındaki iletişimi sağlayan bir organdır. Deri yaklaşık 1.8-2 m² yüzey alanı, 9 kg ağırlığı ile (vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sı) vücudumuzun en büyük organıdır ve yaklaşık 0.5-3 mm kalınlığındadır. Vücut sıcaklığının korunmasında bir termostat gibi rol oynar. Kan basıncını denetler. Ayrıca UV ışınlarına karşı iyi bir koruma sağlar. Derinin pH'ı 5.2-5.6 arasındadır. İnsan vücudunun değişik bölgelerinde derinin rengi, kalınlığı, içerdiği kıl folikülleri ve ter bezlerinin sayısı farklıdır (1,47,57).

İnsan derisinin hayli geniş bir yüzeyi kaplaması ilaç uygulamasında da büyük bir avantaj sağlar. İnsan derisi, saçlı deri ve glabrate (kılsız) olmak üzere iki tiptir. Deri vücudun bir çok yerinde kıl folikülleri yağ bezleri (sebaceus glandlar) ile birleşmiştir.

Deri; epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Şekil 1).

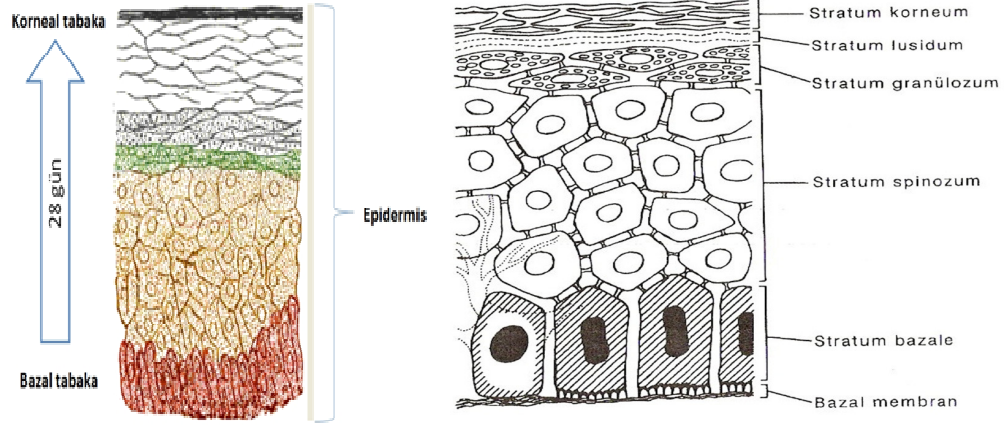


Şekil 1: Derinin yapısı

2.1.1.1 Epidermis

Geçirgen olmayan çok katlı epidermis tabakası, aynı nitelikteki hücrelerin oluşturduğu ve kalınlığı vücudun çeşitli bölgelerine göre değişen bir tabakadır. Ortalama kalınlığı ise yaklaşık olarak 0.1 mm'dir. Histolojik çalışmalar epidermisin en az dört hücre tipinden oluştuğunu göstermiştir. Bunlar sırası ile keratinositler, melanositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreleridir. Epidermis hücrelerinin %95'i keratinositlerdir. Keratinositler bazal tabakadan deri yüzeyine doğru hareketleri sırasında sınırları belirli çok sayıda tabakalar oluşturur. Epidermis dıştan içe doğru başlıca beş tabakadan oluşur (1,57,121) (Şekil 2);

- Stratum corneum (Boynuzsu Tabaka)
- Stratum lucidum
- Stratum granulosum (Tanecikli Tabaka)
- Stratum spinosum (Dikensi Tabaka)
- Stratum bazale (Bazal Tabaka)'dır.



Şekil 2: Epidermis şematik görünümü

2.1.1.1.1 *Stratum Corneum (Boynuzsu Tabaka)*

Epidermisin en dış tabakasıdır ve boynuzsu hücrelerin (korneosit) üst üste yığılması ile oluşmuştur. Stratum corneum (SC)'un %80'ni korneositler oluşturur ve her bir korneosit, protein yapısındaki keratin filamentleri ile dolmuş amorf bir matrikse gömülmüştür. Bu matriks, çift katlı lipid tabakalarından oluşmuştur. Bu lipid tabakaları, serbest yağ asidi, kolesterol ve seramit gibi polar amfifillerden oluşmuştur. Çift katlı lipid tabakada lipofilik ve hidrofilik yapılar matriks yapı içerisinde farklılaşmıştır. Matriks yapılar ise birbirine zengin disülfid bağları ile bağlanmıştır. Her bir hücre bu şekilde yaprak gibi çevrelenmiştir. Bu yapı hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikler için önemli bir bariyer görevi yapar (121,125).

2.1.1.1.2 *Stratum Lucidum*

Epidermisin ikinci tabakasıdır. Ölü hücrelerden oluşmuştur. Kıl kökleri içermez. Avuç içi ve ayak tabanlarında yer alır.

2.1.1.1.3 *Stratum Granulosum (Tanecikli Tabaka)*

Kalınlığı bölgesel farklılıklar gösterir ve deriye rengini verir. Keratinizasyonun ilk bulguları bu tabakada gözlenir.

2.1.1.1.4 *Stratum Spinosum (Dikensi Tabaka)*

Epidermin lipitce zengin tabakasıdır ve mikroskopik görüntüsünde hücre yüzeyinde çok sayıda dikensi yapılar gözlenir.

2.1.1.1.5 *Stratum Basale (Bazal Tabaka)*

Epidermin canlı olan ve en altta bulunan tabakasıdır. Tüm keratinositlerin stratum korneuma yükselmesine olanak verir. Diğer tabakalara göre, daha hızlı bölünebilen, çoğalabilen hücreleri içerir ve ayrıca deri pigmentini oluşturan melanositler de bu tabakada mevcuttur.

2.1.1.2 Dermis

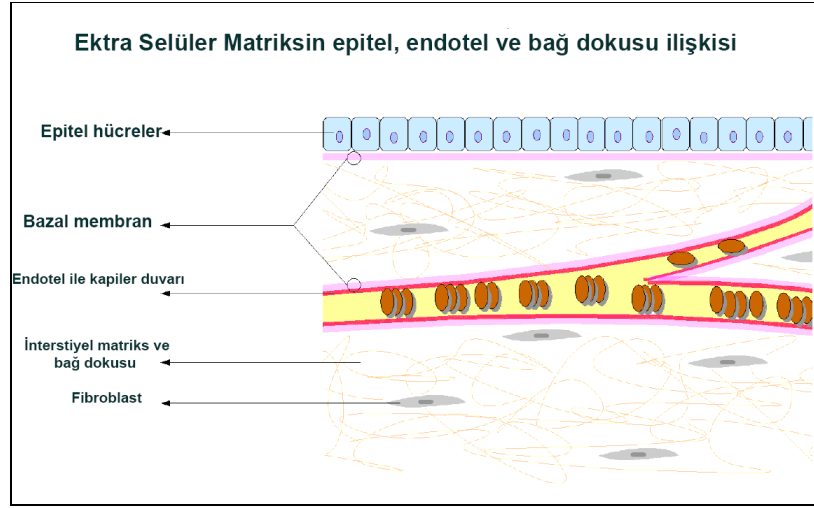
Dermis, epidermisi destekleyen bir tabakadır. Koryum olarak da isimlendirilir. 3-5 mm kalınlığındadır. Kollajen, elastin ve retikülün gibi fibröz proteinlerden dokunmuş olup bağ dokudan bir matriks içerir. Amorf yapıdaki mukopolisakkaritler bu yapının içine gömülmüştür. Sinir hücreleri, kan damarları, lenfatik yollar ve kıl folikülü onu deler geçer. Derinin, besin maddelerini taşıması, artık maddeleri uzaklaştırması, kan basıncını ve ısıyı düzenlemesi için yeterli kan akımına gereksinimi vardır. Dermis, damar ağları ile desteklenmiştir. Arterior fleksusun kollarından biri ter bezlerine, tükürük bezlerine ve kıl köklerine kan taşır (1,57). Dermisteki kapiller kan damarlarında, difüze olan molekül çoğaldığında, sink koşul gerçekleşecek şekilde molekülleri uzaklaştırır (1,125).

2.1.1.3 Hipodermis (Deri altı tabaka)

Bu doku dermin hemen altındadır ve büyük miktarlarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşur. Subkütan yağlar ve kolajenler yoluyla deriye esneklik sağlar, fiziksel olarak deriyi korur ve termal bir bariyer oluşturur. Ayrıca ana kan damarları bu tabakadadır.

2.2 EKSTRASELÜLER MATRİKS

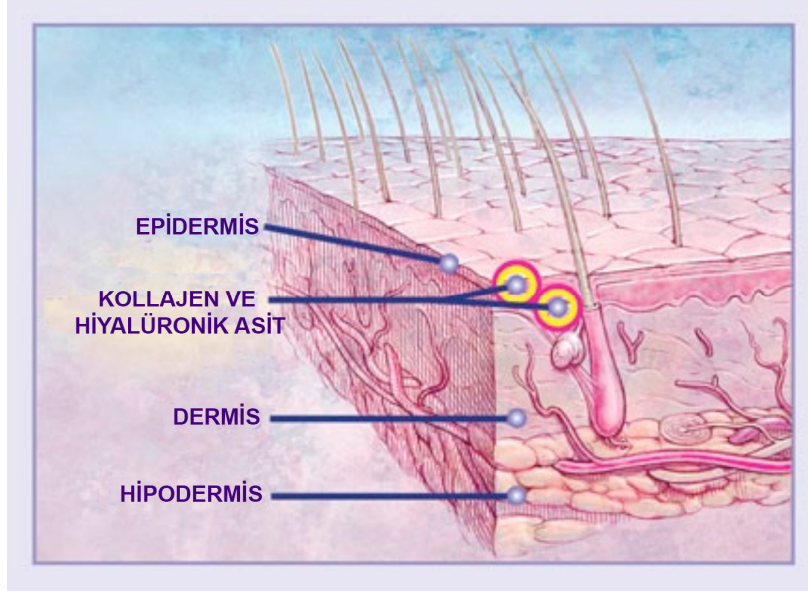
Epidermal tabakada keratinositler ve dermal tabakada ise bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar ve ekstraselüler matriks-ECM bulunur. Epitel hücrelerinin altında esnek, ince ECM'in özelleşmiş şekli olan bazal lamina (destek tabakası) bulunur. Bazal lamina; lamina lucida ve lamina densa olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Bazal laminanın; hücre farklılaşması ve gelişmesi, hücre polaritesinin sağlanması ve hasar gören hücrelerin yenilenmesinde önemli rolü vardır (9, 10, 104, 125) (Şekil 3)



Şekil 3: Ekstraselüler matriks şematik gösterimi

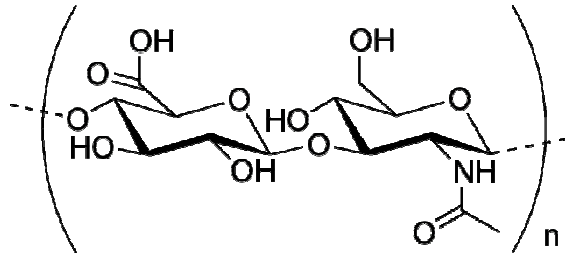
ECM, hücreler arası boşlukları dolduran, hücreleri birbirine bağlayan kompleks bir yapı olup, glikozaminoglikanlar (GAG) ve fibröz proteinlerden oluşmaktadır. GAG türevleri olarak; hyalüronik asit (hyaluronan-HA), kondroitin sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat, keratan sülfat ve heparin sayılabilir (2, 3). Fibröz protein grubunu ise; kolajen, laminin, elastin, fibronektin, perlekan, tenaskin, integrin ve proteoglikanlar oluşturur (4). Kolajen terimi, insan proteinlerinin üçte biri için kullanılan protein ailesine verilen isimdir. Kolajenin, derinin temel fibröz bileşeni olduğu ve yapı matriks proteini olarak doku onarımında fizyolojik bir

düzenleyici görevi yaptığı bilinmektedir. Kolajen, doku tipine göre farklı biçimde düzenlenmiş paralel tropokolajen moleküllerden ibaret örgüye benzer fibrillerden meydana gelir ve molekül ağırlığı 300.000 – 360.000 Da arasında değişmektedir. Kolajen dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur ve dokuya gerilme direnci sağlar (119). (Şekil 4)



Şekil 4: Deri tabakasında hyalüronik asit ve kolajen (Advance Medical System Inc.)

2.3 HİYALÜRONİK ASİT



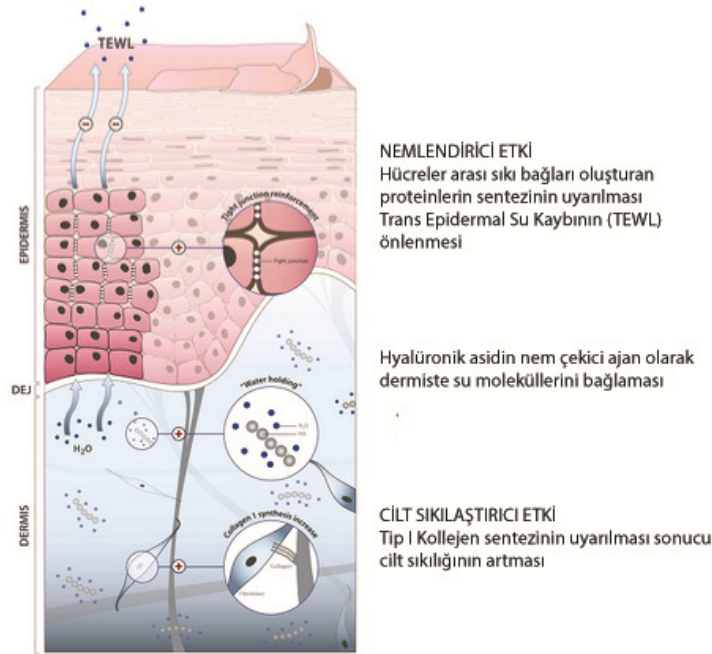
HA, ekstrasellüler matriksde bulunan, yüksek moleküllü, negatif yüklü, lineer polisakkarit olup, glikosaminoglikan ailesinin bir üyesidir. HA, bazal lamina tabakasında sentezlenir ve ekzositozla salınır. Hyalüronan hücre proliferasyonu ve hücre göçünden büyük oranda sorumludur. Cilt dokusunda bulunan HA jel benzeri

bir maddedir, kolajen ve elastin lifleri arasındaki boşlukları doldurur. Derinin epidermis ve dermis tabakalarında bulunur ve büyük miktarda su tutma özelliğine sahiptir (26).Vücudun doğal olarak ürettiği HA'nın %50'si epidermiste bulunur ve 24 saatten daha kısa bir sürede metabolize olup atılır. Vücutta üretilen HA gibi dışarıdan takviye olarak alınan HA'da dermisten epidermis'e doğru yani cildin iç katmanlarından dış yüzeyine doğru cildi nemlendirir. Yüksek hidrasyon özelliği nedeniyle, ciltte pürüzsüzlüğün, yumuşaklığın sağlanması ve kırışıklıkların azalmasına neden olur. Bu sebeple HA bir çok kozmetik ürün ve nemlendirici kremin terkbine girer. Son yıllarda HA, doku yenileme ve hücre poliferasyonunda bulunduğu çok geniş bir alana yayılmıştır (13, 14, 26).

ECM cilt hücreleri arasındaki boşlukları doldurur. Bu cildi yumuşak, pürüzsüz ve esnek yapar. Fakat yaşlandıkça klinik olarak kanıtlanmış olan iki faktörle (HA sentezinin azalması ve epidermisten dermise yenilenme) ciltteki HA içeriği değişir. Her iki durumda epidermides'te HA'nın azalmasına ve bunun sonucu olarak cildin yaşlanması, incilmesi ve neminin azalmasına sebep olur (26). Zaman içerisinde ister doğal yaşlanma sürecine isterse zararlı kimyasal maddeler ve güneş ışığı gibi çevresel faktörlerle olsun vücuttaki doğal HA miktarı azalır ve yok olur. Cildin elastikiyetinin ve nem miktarının azalması, kırışıklıkların oluşumu gibi deri yaşlanması ile ilişkili bir çok değişiklikte bu maddenin eksikliğinin rol oynadığı bilinmektedir. HA cildi içten dışa nemlendirir, kırışıklıkları düzgünleştirici bir süreç yaratır. Cildi nemlendirmede içsel bir kozmetik faktör olarak rol oynar. Ayrıca, 2003'den beri FDA yüzsöl kırışıklar gibi yumuşak doku kusurlarını doldurmak için HA enjeksiyonunu onaylamaktadır. HA nemlendirici etkileri sebebiyle genel olarak cilt bakım ürünleri içeriğinde kullanılmaktadır. (5, 6, 14). Bu ürünler kolajen

enjeksiyonuna benzer olmakla birlikte etkinliğinin daha uzun süre devam etmesi ve alerjik reaksiyon riskinin azalması gibi bir takım avantajlara sahiptir.

Yüksek molekül ağırlıklı Hyalüronik asit (1-1.4 milyon) uzun yıllardan beri, etkin bir nemlendirici olarak kozmetik preparatların ter kibine girmektedir. Son yıllarda, düşük molekül ağırlıklı HA (15.000-50.000) ile hazırlanan preparatların da cilde nüfuz ederek nem düzenleyici etkisini epidermiste hatta dermis te doğrudan gösterdiği bulunmuştur. Cildin elastikiyetinin arttığı ve stratum granulosum hücreleri arasındaki sıkı bağlantıyı (tight junctions) güçlendirerek transepidermal sıvı kaybını önlediği gözlenmiştir (Şekil 5).



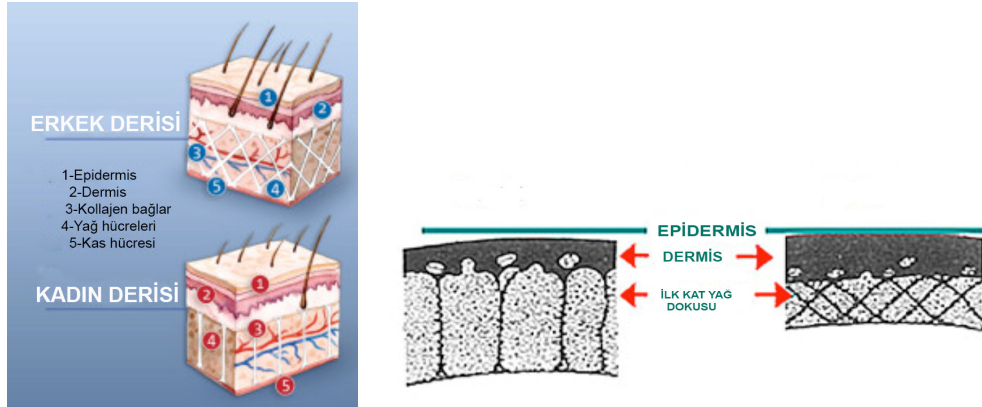
Şekil 5: HA'nın deri nemlendirme etkisi şematik gösterimi

Son yıllarda HA'nın farklı esterifikasyonla hazırlanan benzil esterlerinin degradasyon ve ilaç salımını modifiye ettiği ve istenilen kontrollü salımın elde edilmesi için farklı türlerin kullanıldığı saptanmıştır. Bu nedenle son yıllarda HA sentetik formları geliştirilmiş ve yara tedavisinde kullanılmıştır.

2.4 SELÜLİT

Sellülit derinin düzgün görüntüsünün değişimine neden olan ve portakal kabuğu görüntüsü olarak tarif edilen kozmetik bir bozukluktur. Selülit postadolesan kadınların neredeyse tamamında (% 85 inde) özellikle kalça bölgesinde görülür (52). Kilo alımı ile daha belirgin duruma gelmekle beraber düzenli spor nedeniyle kas gerginliğinin çok iyi olduğu durumlar hariç zayıf kadınlar da bile bulunmaktadır(37, 48). Erkeklerde, bağ dokudaki farklılıklar nedeniyle bu durum oldukça nadir görülmektedir (94, 88). Kadınlarda bağ doku bantları, dermisden dokulara kadar uzunlamasına/dikey seyretmektedir. Bu bantlar yağ kanallara biriktiren yapılardır. Yağ tabakası genişlediği için, derinin pütürlü görünümü oluşturarak yüzeysel şekilde görülmektedir. Erkeklerdeki, yağ tabakasını tutmakta olan bağ dokunun dermisle açık yapacak şekilde çapraz çizgili şekli, deri yüzeyindeki yağlı dokunun oluşumunu engellemektedir (53, 88, 94) (

Şekil 6).

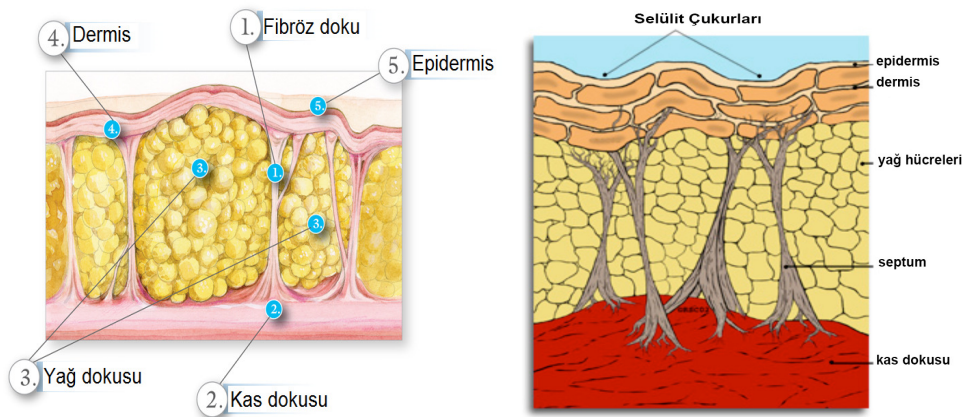


Şekil 6: Kadın ve erkek derisi bağ dokusu farklılıkları (understanding the cellulite-The Durham Clinic)

2.4.1 Selülitin Fizyopatolojisi

Selülit oluşumu, deri altı dokusundaki yapısal, morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucunda görülmektedir (60). Selülit, yağ hücrelerinin anormal irileşmesi ve derinin esnekliğinin azalması sonucu ortaya çıkar.

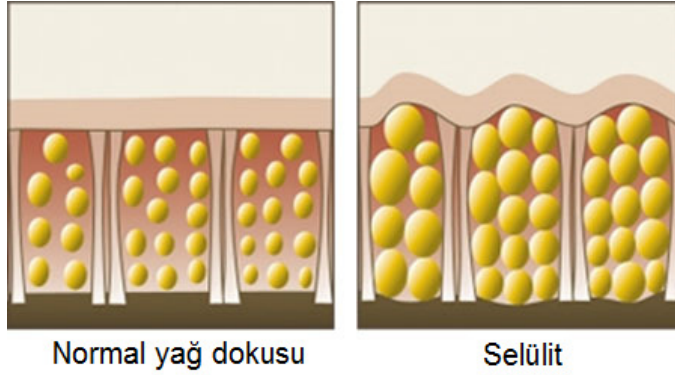
Deriyi dokulara bağlayan deri altı yağ dokusu (hipodermis) temel olarak yağ hücrelerinden meydana gelir. Yağ hücreleri yuvarlak görünümlüdür ve hücre içi hacmen % 95 oranında yağlı madde ile doludur. Bu hücreler büyüdükçe biraraya gelerek salkım görünümünde yağ loblarını oluştururlar. Yağ hücreleri ve bunların oluşturduğu yağ lobları bağ dokusunun içinde dağılmış durumdadır. Bunların arasında da damarlar bulunur. Büyüyen yağ hücreleri ve lobları iplikcikler arasında sıkışarak yukarı doğru dikey şekilde ilerlerler (60, 99). Protein iplikleri aynı oranda esneyemedikleri için deri yüzeyinde girintilerin oluşmasına neden olurlar. İlerleyen yağ lobları ise çıkıntıları meydana getirirler (30, 48). Yağ dokusunda yağ hücrelerinin genişlemesi, doku içindeki damar dolaşımına da bir baskı oluşturur ve dolaşım yavaşlar. Sonuçta damarlardaki sıvı doku içine sızmaya başlar ve ödem oluşur (Şekil 7).



Şekil 7: Deri altı yağ dokusu şematik gösterimi

Hormonların selülit oluşumunu etkiledikleri yönünde kanıtlar mevcuttur. Östrojen, lipojenezi (yağ üretiminin artması) tetiklemekte ve lipolizi (yağ yakımı)

engellemektedir. Bunun sonucunda adiposit hipertrofi (hücresi şişmesi) meydana gelmektedir. Bu mekanizma kısmen kadınlardaki bu durumun daha fazla görülmesini açıklamaktadır (99).



Şekil 8: Selülit sonrası değişen yağ hücresi şematik gösterimi

2.4.2 Selülit Tedavisinde Yaklaşımlar

Selülit tedavisinde amaç, selülitin neden olduğu fiziksel görüntünün olabildiğince azaltılması ve ilerlemesinin engellenmesidir. Tedaviye verilen cevabın değerlendirilmesinde diyet, fiziksel hareketlilik, kilo kaybı gibi selülit etkileyen diğer faktörlerde göz önünde bulundurulmalıdır. Erken tedavide üç ana hedef vardır; östrojenle ilgili bölgesel yağ birikimini önlemek, sürekli dıştan bası tedavisi uygulamak, hipodermal çatlak izlerinin oluşmasını önlemek için bağ doku metabolizmasını hızlandırmak ya da değiştirmek(60, 74)

Selülit belirtilerinin azaltılmasında değişik uygulamalar mevcuttur (73, 74).

- Değişik etkin maddelerin ve/veya bitki ekstraktlarının kullanımı(16,21, 28).
(oral veya lokal)
- Lokalize mekanik etki (masaj), ısı veya enerji uygulanması (51).
- Hareketli yaşam ve gıda alımının düzenlenmesi (52)

2.4.2.1 Topikal Tedavi Yaklaşımı

Selülitin topikal tedavisinde kullanılan aktif maddeler lipojenezi azaltmak, lipolizi aktive etmek ve böylece derinin görüntüsünü düzeltmek amacıyla kullanılır. Genellikle krem, losyon ve jel şeklinde sunulurlar. Bu amaçla kullanılan etkin maddelerin ve bitkisel ekstraktların etkili olduklarını gösteren bilimsel veriler bulunmaktadır (73).

Topikal antiselülit preparatları, etki mekanizmalarına göre 4 ana gruba ayrılmaktadırlar. Bu tedaviler, mikrosirkülasyon akışını arttıran maddeler içermekte, lipojenezi azaltmakta ve lipolizi teşvik etmekte, dermis ve deri altı dokunun normal yapısını restore etmekte ve serbest radikal formasyonunu önlemekte ya da serbest radikalleri süpürmektedir. Selülit tedavisi için mevcut olan çeşitli etkin maddelerin uzun süreli verimliliğe ilişkin çok fazla bilimsel veri yoktur. Yapılan çalışmalarda, aminofilin ve retinoitler kritik olarak değerlendirilmiştir (61).

2.4.2.1.1 Mikrosirkülasyon Akışını Arttıran Maddeler

Bu grup, selülitte karşı topikal tedaviler şeklinde mevcut olan ilaçların çoğunu içermektedir.

Ginkgo biloba, flavanoitler (örn. kuersetin, kamferol epikatekol türevler), biflavonlar (gingketin) ve terpenler (ginkgolid) gibi maddeleri içermektedir. Bu maddeler, kan viskozitesini azaltmakta, trombosit aktive edici faktörü engellemekte, vasküler geçirgenliği azaltmakta ve mikrosirkülasyonu hızlandırarak, vasküler duvar tonusunu geliştirmektedir (51). Önerilen kullanım konsantrasyonu % 1-3 tür (21, 51).

Pentoksifilin, selülit tedavisi için transdermal biçimde kullanılabilir. Eritrosit şekli, trombosit agregasyonu ve plazma fibrinojen konsantrasyonu gibi hemotolojik faktörler üzerindeki etkileri dolayısıyla mikrosirküler perfüzyonu iyileştirmektedir(52, 21).

Ruscus aculeatus, güçlü bir venöz vazokonstriktördür. Kılcal damar mukavemetini arttıran ve lenfatik drenajda gelişmeye neden olan vasküler geçirgenliği ve ödemi azaltan flavonoidlere sahiptir (100). Bu bitkinin özü, sıklıkla %1 ila %3 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılmaktadır (16).

Silisyum, hücre metabolizmasını ve hücre bölünmesini düzenleme yeteneğine sahip yapısal bir bağ doku birleşenidir. Venöz kılcal damar ve lenfatik geçirgenliği değiştirmesi dolayısıyla selülit için faydalı olabilmektedir (28).

Papaya (Carica papaya) ve ananas (Ananas sativus, Ananas comosus), antiinflamatuvar ve antiödem etkilerine sahiptir (28, 89). Topikal formülasyonlar, %2 ila %5 arasında değişen konsantrasyonlarda mevcut olmaktadır.

Siyah üzüm (Vitis vinifera), lipit peroksidasyonunu azaltan antioksidanlar olan tanenler açısından oldukça zengindir. Lenfatik ve mikroarteriyel damarların geçirgenliğini arttıran procyanidinlere sahiptir. Topikal ürünlerde, %2 ila %7 arasındaki konsantrasyonlarda esansiyel yağ kullanılmaktadır (51).

Enginar (Cynara scolymus), çeşitli enzimler, askorbik asit, caffeoylquinic asit türevlerine ve flavonoidlere sahiptir. Sirkülasyon üzerindeki tetikleyici etki ile birlikte antiödem ve diüretik bir etkiye sahiptir (21).

Sarmaşık (Hedera helix) ve yer sarmaşığı (Glechoma hederacea), sahip olduğu saponinler, venöz ve de lenfatik drenajı geliştirmekte ve ödemi azaltmaktadır. Hederin bileşeni, analjezik ve de antiinflamatuvar etkiye, vazokonstriktör özelliklere sahiptir. %2-5 oranda kullanılır (21, 42).

Mineral maddeler, (kaolin, talk, smektit, paligorskit) uygulama alanında dolaşımı hızlandırarak ve antiinflamatuvar etki göstererek selülitin gelişimini geciktirmektedirler.

2.4.2.1.2 Lipojenezi Azaltan ve Lipolizi Teşvik Eden Maddeler

Kafein, aminofilin, teofilin ve teobromin gibi metilksantinler, agonistler şeklinde sınıflandırılmaktadır ve selülit tedavisinde belgelendirilmiş etkiye sahip temel kategoriye teşkil etmektedir (36, 69). En yararlı ve en güvenli metilksantin, %1-%2'lik konsantrasyonlarda normal olarak kullanılan kafeindir.

Coffea arabica bitkisinin kahve tanelerinden özütlenmektedir (92). Kafein, lipolizi teşvik ederek, fosfodiesterazı inhibe ederek ve dolayısıyla döngüsel adenosin monofosfatı arttırarak doğrudan adipoz hücreler üzerinde etkili olmaktadır. Triglicerit lipaz enzimini aktive eder ve trigliceritleri serbest asitlere ve gliserole parçalar. Kafeinin, deri mikrosirkülasyonu üzerinde tetikleyici bir etkisi vardır. Velasco ve ark (120). kafein içeren emülsiyonun, kontrol grubuna kıyasla yağ hücrelerinin oluşumu üzerinde %17'lik bir azalışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Aminofilin, selülitin topikal tedavisinde özellikle yağ lipolizinde kullanılan güvenilir bir madde olmasına karşın etkinliği tam olarak kanıtlanmamıştır (53).

İzoprotrenol ve adrenalin gibi beta-adrenerjik agonistler ve *yohimbin* gibi alfa adrenerjik antagonistler, pireoksan, fentolamin ve dihidroergotamin'in de lipolize neden oldukları bilinmektedir.

2.4.2.1.3 Deri ve Alt Deri Tabakasının Normal Yapısını Restore Eden Maddeler

Retinol ve retinoik asit, topikal selülit tedavilerinde kullanılmaktadır (32, 52, 120). Vit A analogları olan retinoitler, deriyi daha gergin ve esnek bir duruma getirirler, kan akışını uyarırlar, yeni damarların oluşmasını hızlandırırlar, derideki hücre çoğalmasını artırarak derinin kalınlaşmasını sağlarlar. Retinoitler ayrıca dermisteki bağ dokusunu da sağlamlaştırırlar (64, 71).

Yayımlanan çalışmalar, altı aylık ya da daha faz süre boyunca %0.3 miktarında topikal olarak uygulanan retinolün selülit azalttığını göstermektedir (64,

71), orta derecede selülide sahip 20 denek ile yaptıkları çalışmada, altı ay süresince günde iki defa %0.3 retinol içeren krem uygulamışlar ve ultrason taraması ile yapılan kalınlık ölçümleri sonucunda krem uygulanan bölgede deri kalınlığında artış saptamışlardır (18).

Gotu kola, bitkisinin ekstresinde bulunan ve daha sonra sentetik olarak da sentezlenmiş bazı maddelerin (asiyatik asit, madekasik asit ve asiaticozit) derideki bağ dokuyu kuvvetlendirdiği ve damarlanmayı artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu bitkinin standardize edilmiş ekstreleri selülit tedavisi için kullanılmıştır. Ayrıca, ekstrenin bağ dokuda damarlanmayı, epidermisin keratinizasyonunu, hyalüronik asit gibi glikozaminoglikanların oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (66, 71).

Kozmetik peptitler, deride oluşan çatlak ve çizgiler dermal yapıdaki proteinlerde görülen dejeneratif değişiklikler nedeniyle ortaya çıkar. Kozmetik peptitlerin bir kısmı, protein sentezini hızlandırırlar, kollajen üretimini arttırarak derinin görüntüsünü düzeltirler. Derinin elastikiyet ve dayanıklılığını artırırlar, nemlendirirler. (48, 52)

2.4.2.1.4 Serbest Radikalleri Süpüren / Serbest Radikal Oluşumunu Engelleyen Maddeler.

Askorbik asit ve E vitamini gibi vitaminler, deri ve alt deri hücre zarlarını serbest radikal toksisitesinden koruyarak antioksidanlar şeklinde çalışmaktadırlar. Bununla birlikte belli vitaminler de mikrosirkülasyonu geliştirebilmektedir. Siyah üzüm (*Vitis vinifera*), antioksidan olan ve lipid peroksidasyonunu azaltan tanenler açısından zengindir (52).

2.5 ETKİN MADDELERİN DERİDEN GEÇİŞ YOLLARI

Etkin maddelerin deriden geçişi için üç değişik yol saptanmıştır (Şekil 9).

Bunlar:

2.5.1 Porlardan ya da Boşluklardan Geçiş

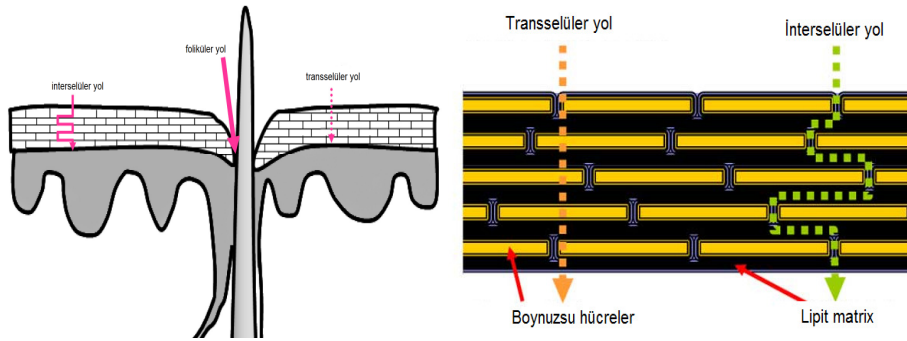
Kıl folikülü ve ter bezi yoluyla ana bariyeri geçen molekül için düşük dirençli kısa bir yan geçittir. Bu yol, su dolu ter kanallarına girebilen, yüksek derecede suda çözünebilen ve polar maddeler için önemli bir geçiş yoludur (66).

2.5.2 Hücreleriçi Geçiş (Transselüler Yol)

Bu yolda geçiş korneositlerden oluşan bariyer hücrelerin içinden olmaktadır. Keratin ve keratohiyalin bu hücreleri hemen hemen geçirmez yapar. Bu yoldan genellikle polar olmayan maddeler geçebilir (70).

2.5.3 Hücrelerarası Geçiş (İnterselüler Yol)

SC'ü transselüler yolla geçmek için, madde membrandaki protein ve lipitlerle etkileşir. Eğer interselüler yol baskın ise, madde ile korneositler arasındaki lipit tabakaların içinden bile geçebilir. Genel olarak, SC'dan geçiş esas olarak geçen molekülün lipit / su partisyon katsayısından ve molekül ağırlığından tahmin edilebilir (34, 93).



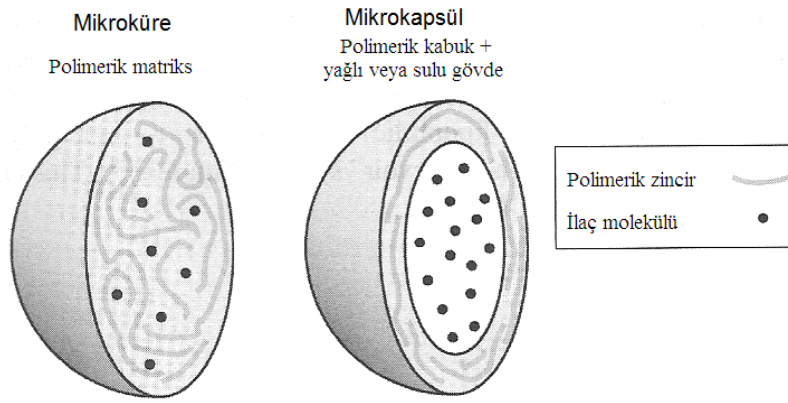
Şekil 9. Deriden geçiş yollarının şematik görünümü (34)

Değim ve ark.'ları (34), noniyonik yapıdaki bileşiklerin insan derisinden *in-vitro* perkütan absorpsiyonlarını incelediklerinde, epidermisin tabakalarından birinin eksik olması durumunda lipofilik bileşiklerin permeasyon hızlarında artış olduğunu

ve dermisin sıvı bir matriks gibi davrandığını ve ilaçların lipofilik özelliklerinin artmasına bağlı olarak permeabilite katsayılarının da arttığını göstermişlerdir (34).

2.6 İLAÇ TAŞIYICI PARTİKÜLER SİSTEMLER

Mikropartiküller, çapları birkaç μm 'den birkaç yüz μm 'ye kadar değişebilen ilaç taşıyıcı sistemler olup, polimerik yapıları nedeniyle etkin maddenin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlarlar. Mikropartiküller mikrokapsül veya mikroküre şeklinde bulunurlar. Mikrokapsülde çekirdek etkin madde bir polimerik bir çeperle çevrilidir. Mikrokürede ise etkin madde matriks sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Mikroküre ve mikrokapsül morfolojik yapıları (47)

Mikropartikül hazırlamada kullanılan matriks maddeleri olarak, doğal (albumin, jelatin, kitozan, arap zambkı, kollajen vb...) ve sentetik (polihidroksi asitler, poliglikolik asit, polilaktik asit, polianhidritler vb...) polimerler örnek olarak verilebilir. Hazırlanmalarında kullanılan polimerlerin biyoyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması istenmektedir (59).

Mikropartikülleme işleminin amacı sıvıları kolay taşınmasını sağlamak için katı hale getirmek, uçucu maddelerin buharlaşma kaybını azaltmak, istenmeyen tat

ve kokuyu gizlemek, geçimsizliği gidermek, atmosfer koşullarından korumak, stabiliteyi arttırmak, etki süresini uzatmak ve kontrolü salan sistemleri üretmektir (85).

Mikropartiküller doku onarımı alanında sentetik ve doğal polimerler ile hazırlanabilmektedirler. Bu alanda tasarlanan mikropartiküllerin formülasyonunda PLGA polimeri önemli bir yer tutmaktadır (63). Ancak PLGA, FDA tarafından onaylı olsa da bu polimerin yara bölgesindeki degradasyonu sonucu oluşan glikolit ve laktit monomerlerinin lokal pH değişikliklerine sebep olduğu ve asidik pH'ya bağlı olarak irritasyona sebep olabileceği belirlenmiştir (104).

Hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan ECM bileşenleri ile formüle edilmiş mikropartiküller hücre oluşumunu hızlandırmak ve yaygınlaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Kolajen ile modifiye edilmiş HA mikropartiküllerinden *in vitro* antibiyotik salımının incelendiği bir çalışmada salımın kontrollü bir şekilde devam ettiği gözlenmiştir (67). Yapılan bir diğer çalışmada, hidrokortizon yüklü HA mikropartiküllerinden salım karakterinin sıfırıncı dereceden olduğu belirtilmiştir (14, 26). ECM'nin yapısındaki GAG türevlerinden HA, CD44 gibi spesifik hücre reseptörleri tarafından tanınarak, adezyon, hücre göçü ve oluşumu gibi hücresel fonksiyonları etkileyerek doku onarımını artırır (26,82). HA bakımından zengin bir ortam, hücre hareketliliğinin ve çoğalmasının devamının sağlanması açısından gereklidir. (45,75,76,97). Ayrıca hücrelerin etrafında oluşturduğu ağ yapı ile serbest oksijen radikallerinin hücrelere ulaşmasını engelleyerek doku onarımını hızlandırmaktadır (8, 78). HA'nın hidrolitik degradasyona uğraması sonucu oluşan ürünlerin biyouyumlu olduğu belirlenmiştir.

2.6.1 Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri

Mikropartikül hazırlama yöntemleri, kullanılan polimerin türüne ve seçilen etkin maddenin çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir. Yöntem seçiminde göz önünde tutulması gerekenler arasında mikropartikülün kullanılma amacı, partikül büyüklüğü ve etkin maddenin salım özellikleri sıralanabilir (22,79, 118).

Çözücü buharlaştırma/ekstraksiyon yöntemi, polimerizasyon yöntemi, delik (orifice) yöntemi, faz ayrımı (koaservasyon) yöntemi, wurster ve püskürterek kurutma yöntemi kullanılan yöntemler arasındadır (22, 85, 127).

2.6.1.1 Çözücü Buharlaştırma/Ekstraksiyon Yöntemi

Polimer, buharlaşma sıcaklığı düşük olan metilen klorür gibi, bir çözücü içinde çözündürülür. Hazırlanan bu çözelti içinde etkin madde ya çözündürülür ya da süspande edilerek içinde emülgatör madde olan, polimeri çözmeyen sulu fazda emülsifiye edilerek karıştırılır. Yağ/su tipinde emülsiyon oluştuktan sonra, mikrodamlacıkların içerdiği çözücünün buharlaşması ve katı mikropartiküllerin elde edilmesi için karıştırma hızı azaltılır. Bu yöntemde, çözücünün tipine ve çalışma sıcaklığına bağlı olarak mikropartiküllerin agregasyonu görülebilmekte ve sulu fazda etkin maddenin serbest kristallerinin oluşmasına bağlı olarak yükleme kapasitesi düşük olabilmektedir (118).

Bu yöntemle, poli (laktik asit), poli (glikolik asit) ve bunların ko-polimerleri kullanılarak mikropartikül hazırlanabilmektedir.

2.6.1.2 Polimerizasyon Yöntemi

Biri suda biri yağda çözünen iki ayrı monomerin kullanımıyla damlacık yüzeyinde polimer oluşumu sonucunda mikropartikül elde edilir. Bu yöntemle sulu çözücüler, suyla karışmayan sıvılar ve katılar kapsüllenebilir. Bu yöntemde partikül ve damlacıklar monomerlerin arayüzeyde polimerizasyonu sonucu oluşan film ile

kaplanır. Hazırlanan mikropartiküllerde, geçirgen olmayan yarıgeçirgen veya salımı kontrol edebilen kaplamalar görülebilir. Bu yöntemin sakıncaları, reaksiyona girmemiş monomerlerin toksisitesi, monomerlerin neden olduğu degradasyon, kaplamanın yüksek geçirgenliği, mikropartiküllerin kırılabilirliği, etkin maddenin kullanılan çözücülerle reaksiyona girmesi olarak sıralanabilir (26, 82).

2.6.1.3 Delik (Orifice) Yöntemi

Bu yöntemde çözündürülen polimer, sertleştirici madde eklenmiş olan ortama eklenir ve film oluşur. Polimerin sertleşmesi inorganik iyonlar, aldehitler ve izosiyanatlar gibi sertleştiricilerle oluşmaktadır. Bu yöntemde kullanılan polimerler arasında aljinatlar, kitozan, jelatin, polivinil alkol sayılabilir. Sertleştirici olarak kalsiyum klorür ve tripolifosfat en çok kullanılanlardır (96).

2.6.1.4 Koaservasyon Yöntemi

Tuz veya alkol gibi suya ilgisi olan maddelerin eklenmesi ile gerçekleştirilir. Eklenen maddeler, biri kolloit damlacıklar açısından yoğun, diğeri ise seyreltik iki fazın oluşumuna neden olur. Bu yöntemde çekirdek maddesi polimer çözeltisi içinde disperse edilir. Koaservasyonu sağlayacak kolloid faz, çözeltiliye eklenir. Koaservat damlacıkları, çekirdek partikülün yüzeyini sarar ve kaplama oluşturacak şekilde birleşir. Çapraz bağlayıcılar ile kaplama sertleştirilir. Bu yöntemde, en çok kullanılan polimerler arasında jelatin gösterilebilir (31,118,127).

Wurster ve püskürterek kurutma yöntemleri mekanik yöntemler olarak da sayılabilir.

2.6.1.5 Wurster Yöntemi

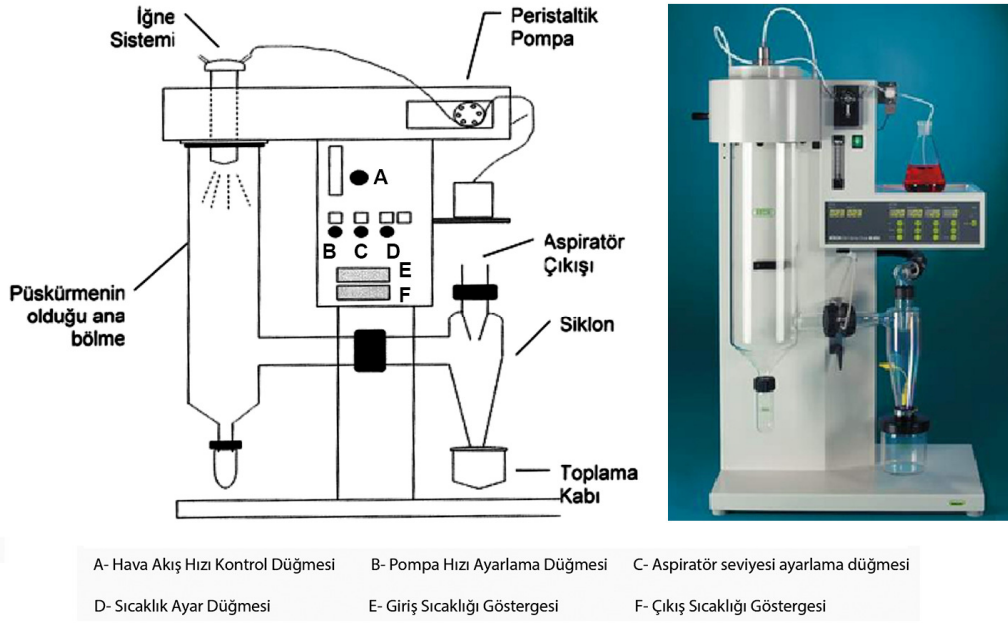
Mekanik mikropartikülleme yöntemleri arasında sıralanan patentli bir yöntem olan Wurster yöntemi, endüstriyel boyutta mikropartikül üretimi için çok kullanılır. Burada toz haldeki çekirdek madde, akışkanlaştırıcı yatak kullanarak havada

süspande edilir ve üzerine kapsül çeperini oluşturacak çözelti süspansiyon veya emülsiyon halindeki kaplama çözeltisi püskürtülür. Partikülleri çevreleyen sıvı fazda çözücü sıcak havanın etkisiyle uzaklaştırılır ve çeperin kurumasıyla kaplama tamamlanır. Bu yöntemde metil selüloz, etil selüloz, stearil alkol, selüloz asetat ftalat, zamklar, mumlar, reçineler çeper maddesi olarak kullanılır. Üretim kapasitesinin yüksek olması ve her şekildeki partikülün enkapsülasyonuna olanak sağlaması ve uygun kurutma koşulları bu yöntemin üstünlükleri arasında iken, 75 µm'den küçük partiküllerin kaplamasında dispersiyon güçlüğü ise sakıncaları arasındadır (80, 82).

2.6.1.6 Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi; çözeltilerin, süspansiyonların kurutulmasında yaygın olarak kullanılır. Bu yöntemde çeper maddesinin çözündürüldüğü fazda çekirdek maddesi dağıtılır ya da çekirdek maddesi sıcak çeper maddesi içinde emülsifiye edilebilir. Emülsiyonun püskürtme ile kurutulması sonucu kuru toz halinde mikropartiküller elde edilir. Püskürterek kurutma mikropartikül etrafındaki filmin sertleştirilmesine dayalı bir yöntemdir ve sertleştirme polimerizasyon veya kondensasyonla yapılır (35,36). Kullanılan çeper maddeleri arasında arap zımkı, jelatin, etil selüloz, selüloz asetat bulunur. Püskürterek kurutma yöntemi ile ilaçlar ve özellikle de ısıya duyarlı ilaçlar, kozmetik ürünler ve gıda maddeleri kapsüllenebilir. Konik veya silindirik bir kurutma kazanında, üstten aşağıya doğru püskürtülen çözelti damlacıkları, aynı yönden gelen sıcak hava içinde her biri birer küresel partikül olacak şekilde kurur (Şekil 11). Püskürtme nedeni ile kurutulacak maddenin yüzey alanı arttığından kuruma çok hızlı olur. Püskürterek kurutma aletinde; kurutulan madde; kurutucu hava ve çözücü buharı ile birlikte içteki boruya teğet yaparak siklon ayırıcıya hızla girer. Merkezkaç kuvveti ile tozlar, ayırıcının iç

çeperine doğru hızla savruur ve buradan akarak toplanma kabında birikir. Kurutma kesintisizdir (24,25,62) (Şekil 11).



Şekil 11: Püskürterek kurutma cihazı ve şematik gösterimi

Püskürterek kurutma yöntemi, mikroküre ve mikropartiküllerin elde edilmelerinde, aseptik koşullarda enjeksiyonluk tozların üretiminde, tablet formülasyonlarında kullanılan doğrudan basım ajanlarının üretiminde; faz ayrışması yöntemi ile elde edilen mikropartiküllerin kurutulmasında, su ve organik çözücülerle hazırlanmış bitkisel ekstraktların kurutulmasında kullanılır. Püskürterek kurutma sonucu oluşan tozlar küresel olduğundan akıcıdır; küme dansiteleeri yüksektir (24)

2.7 JELLER

Jel oluşturan bir madde ve yüksek oranda çözücü içeren, şeffaf yada opak görünümlü yarı katı preparatlardır. USP'de jeller, organik büyük moleküllerin sıvı fazda tamamen çözündüğü veya inorganik küçük moleküllerin suspande halde bulunduğu yarı katı preparatlar tanımlanırken, BP'de homojen, deriye veya bazı mukoz membranlara uygulanan preparatlar olarak tanımlanmaktadır (85).

Jeller genellikle tek veya iki fazlı sistemler olarak sınıflandırılırlar. Tek fazlı sistemler, sıvı fazda tamamen çözülmüş organik moleküller ile hazırlanan sistemlerdir. Sentetik makromoleküller (karbomerler gibi) veya doğal zamklar (kitre zankı gibi) içeren jeller tek fazlı sistemlerdir. Bu sistemlerde organik moleküller çözücü içinde düzensiz esnek zincirler şeklinde bulunurlar. Uygulama, kullanım ve temizleme kolaylığından dolayı, ilaç ve kozmetiklerde çok kullanılırlar. İki fazlı sistemler ise, inorganik küçük moleküllerin sıvı faz içinde üç boyutlu dayanıksız bir ağ yapısı oluşturduğu sistemlerdir. İnorganik moleküller çözünmedikleri için sıvı içinde dağılmış halde bulunurlar (96,127).

Jellerin hazırlanmasında çok çeşitli polimerler kullanılmaktadır. İlaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan jel yapıcı maddelerin aşağıdaki özelliklere sahip olması istenir (85,96).

- İnert ve saf olmalıdır.
- Formülasyonda yer alan etkin madde ve yardımcı maddelerle geçimli olmalıdır.
- Düşük konsantrasyonda kullanılmalıdır.
- Ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilir olmalıdır.
- Kullanılışı ve depolama esnasında sıcaklık ile reolojik özellikleri fazla değişmemelidir.
- Kozmetik ve estetik açıdan kabul edilebilir olmalıdır.

Jel formülasyonunda, katı bileşen olan jel yapıcı madde, sıvı sürekli fazın hareketini engelleyerek birbiri ile bağlantılı moleküller ile kümeleşmiş yapıların üç boyutlu ağ yapısını oluşturur. Jel, sıvı bileşenin yapısına bağlı olarak hidrojel ya da

organojel olarak adlandırılır. Hidrojellerde sıvı bileşen olarak su organojelerde ise sıvı bileşen olarak organik çözücü bulunmaktadır (127).

2.7.1 Organojeller

Organojeller, organik çözücü ile jel yapıcı maddeden oluşmuş yarı katı sistemlerdir (31,79). Organojeller, düşük konsantrasyonlarda, jel yapıcı madde moleküllerinin kendiliğinden birleşmesiyle oluşmakta ve bir araya gelen moleküller birbirine dolaşan genellikle uzun lifler halinde süper yapılar meydana getirmektedirler. Bu şekilde, sıvı büyük ölçüde hareketsiz hale gelmekte ve değişken kıvamda bir jel oluşmaktadır (86,117).

Sıvı yapılarına rağmen katıların dış görünümünü ve reolojik özelliklerini gösterirler. Bu sistemler kolloidal yapıya sahiptirler (65,124). Hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların hapsedilmesinde kullanılabilirler.

Etkin madde içeren organojeller etkin maddelerin sadece lokal etki göstermesini sağlamayıp ayrıca, penetrasyon artırıcıların varlığında lipofilik özellikleri ve örtücü etkileri etkin hale getirildiği zaman transdermal absorpsiyon yoluyla sistemik etki de göstermelerini sağlayabilirler (105, 124).

Lesitin, sorbitan monostearat, ve polisorbitatlar gibi iyonik olmayan yüzey etkin maddeler ters miseller şeklinde birleşme eğilimindedirler. Organik çözücü içindeki bu yüzey etkin maddeler, su eklenmesi ile jel oluşturmak üzere birleşerek, yeniden yapılanmaya girerler. Yeni jel yapıcı maddelerin sentezlenmesi ile, organojellerin çeşitli alanlardaki uygulanabilirliğini araştırılmıştır (7).

2.7.1.1 Organojellerin Oluşum Mekanizması

Organojeller, jel yapıcı madde ve çözücü karışımının ısıtılması ve daha sonra karışımın soğutulması ile hazırlanmaktadır. Isıtma jel yapıcı maddenin sıvı faz içinde

özünmesine yol açar, soğuma ile sıvı faz içindeki jel yapıcı maddenin çözünürlüğü azalır ve bunun sonucunda jel yapıcı madde molekülleri çözeltiden dışarı çıkar. Agregatların birbirine dolaşması sonucunda, bunlar arasındaki birleşmeler sıvı fazın hareket etmesini engelleyen üç boyutlu bir ağ yapısının oluşmasına yol açar. Bu üç boyutlu ağ yapısı, jel iskeleti olarak görev yaparak jele dayanıklılık ve esneklik kazandırır (65).

Organojeller ayrıca ısıtma ve soğutma yöntemi kullanılmadan jel yapıcı madde ile çözücü karışımına üçüncü bir bileşenin eklenmesiyle hazırlanmaktadır. Lesitin organojelleri hazırlanırken lesitin organik çözücüde çözünmesinden sonra çözeltiye su eklenmesi üç boyutlu ağ yapısını oluşturarak organojel oluşmasını sağlamaktadır (74).

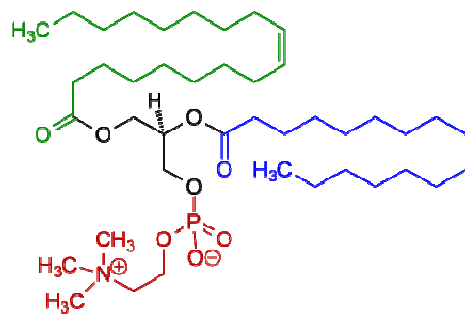
Organojeller genellikle topikal ve transdermal taşıyıcı sistemler olarak incelenmişlerdir. Farklı etkin maddeler içeren lesitin organojelleri hem topikal hem de transdermal taşıyıcı sistemler olarak literatürlerde incelenmişlerdir (91,,106,124).

2.7.1.2 Lesitin Organojelleri

Lesitin organojellerinin (LO) ilk tanımı Scartazzini ve Luisi tarafında 1988 yılında yapılmıştır (103). Araştırmacılar, soya lesitininin, ters misel oluşturması için uygun şartları araştırmışlardır. Yapılan deneyler sonucunda, saf soya lesitininin çeşitli organik çözücülerdeki çözeltilerine çok az miktarda su eklenmesinin viskozitede beklenmeyen bir artışa sebep olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç başlangıçta viskoz olmayan çözeltinin jele veya jel benzeri yapıya dönüşmesine sebep olmuştur. Bunun sonucunda, jel oluşumu için gerekli su miktarının kritik önem taşıdığını belirtmişlerdir (112).

Lesitin organojel matriksi; organik çözücü, polar çözücü ve jel yapıcı madde olarak lesitinden oluşmaktadır. Lesitin, yağ ve su konsantrasyonları organojel sistem dahilinde oldukça kritik konumdadır. Başlangıçta yağ mikro emülsiyonundaki su, optik şeffarlık ve düşük viskozite ile karakterize edilen düşük su konsantrasyonu ile oluşturulan lesitin miselleri ile stabilize edilmiştir. Su miktarı arttığı için, mikro emülsiyon vizkoz jele dönüşmüştür. Bu yüzden organojel sistemi mikro emülsiyon tabanlı jel olarak da anılmaktadır. Aşırı su miktarının sistemi bulanık hale getirdiği görülmüştür bu yüzden su konsantrasyonu, berrak organojel üretiminde çok önemli bir rol oynamaktadır (19).

Lesitin fosfolipitler sınıfında yer almaktadır ve doğal olarak yumurta lesitini ve soya lesitini olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır (109). Lesitin, gliserin, iki yağ asiti, bir fosfat grubu ve kolinden oluşan bir fosfolipit olan fosfatidilkolindir (Şekil 12).



Lesitin, fiziksel yapısı itibariyle, serbest yağ asidi içeriğine bağlı olarak viskoz yarıkatıdan toz forma kadar büyük ölçüde çeşitlilik göstermektedir.

Beyazlatılmış ya da beyazlatılmamış olmasına bağılı olarak renk ağıısından da kahverengiden ağıık sarıya kadar değıışiklik göstermektedir. Organik solvent dahilinde istenilen jelleşme, lesitin %95'den fazla fosfadilkolin iğıermesi durumunda meydana gelir (12, 110,126).

Fosfolipitler olarak adlandırılan biyolojik olarak gerekli olan bir madde sınıfında yer alan lesitin, biyolojik membranların lipit matriksini oluşturmakta ve hücreselel metabolizmada anahtar rol oynamaktadır. Toksik özellik göstermemesi, membran lipitlerinin bileşeni olması nedeniyle farmasötik formülasyonlarda yüzey etkin madde olarak kullanılmaktadır (109). Lesitin amfifilik yapıda olup, yapısındaki iki uzun karbon zinciri ile hidrofobik ve polar özellikteki baş grupları nedeniyle de hidrofilik özelliktedir (110).

Biyogeçimli bir yüzey etkin madde olarak lesitin, emülsiyon yapıcı, viskozite arttırıcı, stabilizör, çözücü ve penetrasyon arttırıcı olarak ilaç, kozmetik ve gıda endüstrilerinde çok çeşitli rollere sahip olmaktadır (110)

Lesitin organojellerin topikal ilaç taşıyıcı sistemler olarak uygulanmaları sonucunda çeşitli etkin maddelerin deriden geçişini önemli derecede arttırdıkları gösterilmiştir (105,107). Literatürde etkin maddenin deriden geçiş hızına etki eden penetrasyon arttırıcı özellikleri incelendiğı gibi aynı zamanda uygulama bölgesinde irritasyon yapıp yapmadıkları da incelenmiştir. Williman ve diğ. (124) hazırladıkları skopolamin veya broksaterol iğıeren lesitin organojellerini transdermal taşıyıcı sistemler olarak tasarlamışlar ve insan derisinden geçiş özelliklerini incelemişlerdir. Skopolaminin deriden geçiş hızının lesitin organojellerinden, sulu skopolamin çözeltisiyle karşılaştırıldığında yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğı bulunmuştur. İlacın deriden geçiş hızının artmasının lesitin penetrasyon arttırıcı özelliğıyle ilgili olduğı belirtilmiştir. Lesitin stratum korneumun lipit tabakaları ile etkileşime

girerek stratum korneumun yapısını bozduğu böylece ilacın deriden geçişini artırdığı düşünülmüştür.

Lesitin organojellerinin avantaj ve dezavantajları (19)

1. Lesitin organojellerine hem hidrofilik hem de lipofilik yapıdaki etkin maddeler yüklenebilmektedir.
2. Dış faz su içermediği için mikroorganizma kontaminasyonuna karşı dayanıklıdır.
3. Optik olarak şeffaf oldukları için, partiküllü sistemin varlığı kolaylıkla görülebilmektedir.
4. Lesitin biyouyumlu ve hücre zarlarına ait bir bileşen olduğu için, deri uyumluluk çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, lesitin organojel topikal kullanımın güvenli olduğu ortaya çıkarılmıştır.
5. Lesitin organojelleri ısıya dayanıklıdır. Organojel sistemin sıcaklığı arttığı zaman, lesitin molekülleri, organojel yapı kaybını minimize ederek kinetik enerjiyi absorbe etmektedir. Düşük sıcaklıklarda lesitin molekülleri yeniden kurulmaktadır.
6. Viskoelastik yapıları nedeniyle topikal uygulamaya elverişlidirler.
7. Bileşimindeki su, deriyi hidratlaştırarak derinin biyoaktif durumunu koruyabilmektedir.
8. Polar olmayan birleşenler içerdikleri için, uzun süreli kullanım için deriye uygulandığında bazı alerjik ve immünolojik reaksiyonlara neden olabilmektedir.
9. Deriye uygulandıktan sonra, herhangi bir kalıntı olmaksızın hızlıca absorbe edilmektedir.
10. Deri bariyeri karşısında ilaç verme konusunda üstün bir araç olarak geniş ölçüde kabul edilmektedir. Etkin madde yüklü lesitin organojelleri ile deri bariyeri aşarak yüksek konsantrasyon sağlanması nedeniyle, yüksek lokal etki sağlanabilmektedir (114).

Lesitin organojel çalışmaları, birçok etkin maddenin dermal yolla uygulanmasına ilişkin etkin bir sistem olarak potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda lesitin, ultraviyole ışını ile indüklenen deri yaşlanmasına karşı koruma sağladığı için A ve C vitaminleri ile kombine formülasyonları hazırlanmış, ayrıca hormonlar, NSAIDS, peptitler, amino asitler, lokal anestezikler ve antifungal madde içeren jellerin topikal olarak etkili oldukları bulunmuştur. Hisyolojik çalışmalar sonucunda deri üzerinde iritan etki göstermediği bulunmuştur. Hem hidrofilik, hem lifofilik etkin maddelerin taşınmasında etkili formülasyonlar olmuşlardır. Hidrasyon mekanizmasının yanı sıra membran yağlarını akışkanlaştırarak cilt kanalıyla etkin permeasyon sağlamaktadır (105, 107). Shaikh ve arkadaşları (105) hidrojel ile kıyaslandığında aseklofenak içeren LO'nin daha etkin ve daha güvenli olduğu yönünde bulgular elde etmiştir. Fuji ve arkadaşları (43) LO ile indometasin permeasyonun daha büyük olduğunu ortaya koyarak sıçan derisi üzerinde deneyler gerçekleştirmişlerdir. Zia ve arkadaşları (128) sürfaktan olarak soye lesitin ve yağ olarak izopropil miristat kullanarak ketorolak trometamin'in topikal uygulaması için lesitin ile kararlı hale getirilmiş mikroemülsiyon bazlı organojeller geliştirmişlerdir. LO'nun daha yüksek oranda ketorolak trometamin konsantrasyonu çözündürdüğü ve LO'dan salım oranının kobay faresi derisi üzerinde artmış olduğu gözlemlenmiştir.

2.8 KAFEİN

2.8.1 Tanım

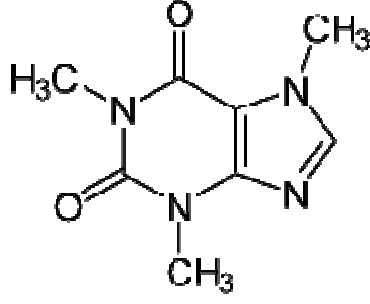
Kafein doğal yapılı bir ksantin türevidir. Santral sinir sistemi uyarıcısı veya hafif diüretik olarak kullanılır. Diğer ksantin türevleri bronkodilatör etkili teofilin ile kakao ve çikolatada bulunan teobromin'dir. Kafein birçok meşrubatın bileşimine girer. (46)

FDA (Food and Drug Administration), kafeini çok amaçlı bir besin maddesi olarak Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen Maddeler (GRAS) listesinde bulundurmaktadır. Kafeinin reçetesiz olarak satılan stimülan ilaç ürünleri içinde aktif bileşen olarak kullanılması onaylanmıştır (36).

Etkin madde olarak kafein, klinikte prematürite apnesi görülen yenidoğanlarda oral ve parenteral yoldan solunum stimülanı olarak kullanılır. Kafein verildikten sonraki 24 saat içinde apne episodlarının frekansını %30-50 oranında azaltır. Kafein bu endikasyonda günde bir kez verilebilme kolaylığı, oral absorpsiyonunun güvenilirliği ve terapötik penceresinin geniş olmasıyla teofilin'e tercih edilir. Kafein migren veya baş ağrısına karşı kullanılmak üzere çoğu zaman analjeziklerle veya ergot alkaloidleri ile kombine edilir. Ayrıca sersemlik haline karşı da yararlanılan bir ilaçtır. (120)

Kafein, gösterdiği yüksek biyolojik aktivite ve cilt bariyerlerinden kolay penetrasyon yeteneği sayesinde kozmetik preparatlarda giderek artan oranda kullanılmaktadır. Cildin kurumasını engeller ve yumuşaklık verir. Böylelikle kuru ve yıpranmış cildin görünümünü düzeltir. Anti-selülit ürünlerinin bileşiminde etkin madde olarak kullanılır. Piyasada bulunan topikal formülasyonları genellikle % 3 kafein içerir. Kafein, hücrelerde yağ moleküllerinin aşırı birikimi engeller ve yağların yıkımı (lipoliz) sırasında fosfodiesteraz enziminin aktivitesini inhibe ederek yağ yıkımını uyarır. Ayrıca kafeinin, güçlü bir antioksidan özelliği vardır. UV ışınlarına karşı hücreyi korur ve cildin fotoyaşlanma sürecini yavaşlatır. Ayrıca, topikal uygulanan kafein, cildin kapiller kan akım hızını arttırarak etki gösterir. Tüm bunların yanı sıra, 5- α -redüktaz aktivitesi inhibisyonu yoluyla saç büyümesini uyarır. (18,36,120)

2.8.2 Fiziksel Özellikleri



Şekil 13: Kafein kimyasal formülü (3,7-dihidro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione)

Kafein çoğunlukla birbirine yapışmış beyaz kristaller veya beyaz kristalize toz halinde bulunur. İngiliz Farmakopesi (BP)'ye göre çözünürlüğü: Suda az çözünür; kaynar su ve kloroformda serbestçe çözünür; susuz alkol ve eterde hafifçe çözünür. Alkali benzoatlar veya salisilatların konsantre çözeltilerinde çözünür. Amerikan Farmakopesi (USP)'ye göre çözünürlüğü: Su ve alkolde az çözünür; kloroformda serbestçe çözünür; eterde hafifçe çözünür. Sudaki çözeltileri turnusol'e karşı nötraldir.

2.8.3 Saklama Koşulları

Kafein 15-30°C arasındaki kontrollü oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı kaplarda saklanmalıdır. Nemden korunmalıdır.

2.8.4 Piyasa Preparatları

ORAL ENJEKTABL	Ergafein draje Kafesit i.v. enjeksiyon Gripin kapsül-kaşe Cafergot tablet Geralgine tablet Minoset plus Panadol film tablet Thomapyrin tablet Youplus energy tablet	İ.E. Ulagay Berko Gripin Novartis Münir Şahin Bayer GlaxoSmith Kline Boehringer Ingelheim Aktivita
---------------------------	---	--

	Zdrovit Multivitamin Mineral Ginseng Tablet	Provitz
TOPIKAL	Active Massage Minceur Activating Body Scrub Advanced Firming Eye Concentrate Aga Forte Saç Solüsyonu Alpecin Likit & Şampuan serisi Anti-Cellulite Cream Anti Cellulite Gel Anti-Fatigue Cooling Effect Stick Anti Couperose Effect Cream Anti Selülit Losyon ve Serum Anti Wrinkle Concentrate Aqua Destock Bioselect Selülit Önleyici Krem Collagen Filler Eye Concentre Lipo-Reducteur Defence Body Anticellulite Lotion Dermoskin Biotin Shampoo Destock Celludestock Divine Lifting Cream Essential C Eye Cream Spf15 Eye Gel Eyes Total Anti Wrinkle Daily Renovating Care Fat Reduction Patches Firm and Tone Serum Hydrophase Intense Yeux Intensive Reinforcing Serum Liftactiv Pro-Fibre Anti Wrinkle and Firming Care Lighteing Eye Contour Cream Lipolene Liposyne Body Contouring Allulite Treatment Massage Oil for Cellulite Mesojection Healthy Cell Serum Myokine Corrective nti-Wrinkle Care Periocular Zone Novacure Saç Spreyi Nuxuriance Anti-Aging Re-Densifying Night Cream Oil-Control Mattifier spf15 Plantur 39 Şampuan ve Tonik Plasenta özlü Selülit Oluşumunu Önleyici Krem Post shave Balm	Pierre-Fabre Murad DDF Assos Pharma Assos Pharma Babe Kraeuterhof Vichy M.Asam Cosmed M.Asam Vichy Bioselect L'Oreal Pierre-Fabre Bionike Matilek Vichy Darphin Murad Avon Vichy Babe Murad La Roche-Posay L'Oreal Vichy Skincode Skin Doctors Vichy Frei DDF Vichy Zed İlaç Nuxe Murad Assos Pharma Evinal & Cosmedic Laboratory Dermalogica

Profile Anti-Cellulite Treatment	Janson Beckett
Original	
Response Cream	Darphen
Reve de Miel Cream Visage	Nuxe
Ultra Recomfortable	
Sensibio eye Contour Gel	Bioderma
Serum Minceur Cellulite	Nuxe
Incrustee	
Thermafirm face Lifting Cream	Avon

BÖLÜM II

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Maddeler ve Araç-Gereçler

3.1.1 Kullanılan Maddeler

Kafein	Boehringer Ingelheim (Germany)
Hyalüronik asit sodyum tuzu (%95)	Acros Organics (ABD)
Lesitin (Lipoid S100)	Lipoid AG (Almanya)
Sodyum hidroksit	Merck (Almanya)
Potasyum dihidrojenfosfat	Merck (Almanya)
Etil alkol	Merck (Almanya)
Metil alkol	Merck (Almanya)
Asetonitril	Sigma Aldrich (ABD)
Fosforik asit (%85-88)	Sigma Aldrich (ABD)
Sabouraud Dekstroz Agar besiyeri	Merck (Almanya)
PrimaPure HDF (Adult) Complete Sistem	Gentilis
Fibroblast Gelişme Ortamı	Gentilis
HEPES tuzlu fosfat tamponu	Gentilis

3.1.2 Kullanılan Araç-Gereçler

Püskürterek kurutma cihazı/Buchi B-290	
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı /Mastersizer	Malvern Hydro EV 3000
UV spektrofotometre	UV-1208 Shimadzu
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPSK)	Thermo Accela UPLC-DAD

FT-IR	Perkin Elmer Spectrum 100
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Perkin Elmer DSC-8000
Reometre	Haake Mars
Texture Profile Analyzer	TA-XT-Plus
Stabilite kabini	Nüve TK 252
UV kabin	UVP-CL 1000
pH metre	InoLab
Hassas terazi	Sartorius TE 214S
Santrifüj	Nüve NF800
Su banyosu	WiseBath
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Ultrasantrifüj Optima L100	Beckman Coulter XP
Derin dondurucu	NuAire

4 YÖNTEM ve PRATİK ÇALIŞMALAR

4.1 Etkin Madde ve Polimerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

4.1.1 *Infrared (IR) Spektrumu*

Kafein'in FT-IR spektrometresinde 400-4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında IR spektrumları çekildi.

4.1.2 *Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) ile Termal Analiz*

Kafein, alüminyum örnek kabında yaklaşık 10 mg kadar tartıldı, kapak basınç yardımıyla kapatıldı. Referans olarak alüminyum boş plaklar kullanılarak, 10°C/dk sıcaklık artışı, 50 mL/dk azot akış hızı ve 20-300°C sıcaklık aralığında termal analiz işlemleri gerçekleştirildi.

4.1.3 Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmaları

Çalışmamızda difüzyon ortamı olarak tuzlu fosfat tamponu (PBS) (pH:7.4) kullanılması planlandığı için, kafeinin bu ortamdaki çözünürlük çalışması yapıldı. Saf etkin maddenin çözünürlüğü difüzyon ortamında incelendi. Bu amaçla kapaklı bir erlen içinde bulunan çözünme ortamına çözünebileceğinden fazla miktarda etkin madde konularak 37°C de bir manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılarak bekletildi. Sıvı fazdan 0.45 µm'lik filtre ile süzülerek alınan numunelerde etkin madde miktarı tayin edildi. Denge oluşumunda ölçülen değer kullanılarak etken maddenin çözünürlüğü hesaplandı (23).

4.1.4 Etkin Maddenin Lipit/Su Partisyon Katsayısının Hesaplanması

Etkin maddenin lipit-su partisyon katsayılarını (log P) tayin etmek için yağ fazı olarak oktanol, su fazı olarak da pH 7.4 PBS kullanıldı. Dağılım katsayısını tayin amacı ile kafeinin pH 7.4 fosfat tamponu içinde 0.1M konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stoktan belirli hacimde örnek alınarak, başlangıçta sulu fazda bulunan etkin madde miktarları UV spektrofotometrede kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Daha sonra, bu stok çözeltisinden 10'ar ml alınarak 10 ml n-oktanol ile birlikte ağzı kapaklı erlenlere konuldu. İçinde n-oktanol ve stok çözeltisinin bulunduğu bu kapaklı erlenler 37±0.5°C'lik su banyosunda manyetik karıştırıcı (50 devir/dk) ile etkin maddenin yağ fazına geçişi tamamlanıncaya kadar, yani sulu fazda ilaç konsantrasyonu sabit kalıncaya kadar karıştırıldı. Bir saatin sonunda karışım 15 dakika santrifüj edilerek iki faz ayrıldı. Sulu fazların absorbansları ölçülerek standart eğri yardımı ile hesaplandı. log P aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Log P} = \text{Log} [(M_b - M_s)/M_s]$$

M_b= Başlangıçtaki kafein miktarı

Ms= Partisyonundan sonraki kafein miktarı

Ayrıca kör deney de yapılarak, n-oktanol'ün etkin maddenin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunda absorpsiyon vermediği saptandı.

4.2 Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmaları

4.2.1 UV Spektrum Çalışmaları

5 mg kafein, 10 mL pH=7.4 fosfat tamponunda çözündürüldükten sonra, maksimum absorbanı, pH 7.4 fosfat tamponuna karşı 1 cm'lik kuvarz küvetlerde, Shimadzu 160 A spektrofotometre kullanılarak, dalga boyu taraması yapılarak saptandı.

4.2.2 UPSK (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları

Mobil faz olarak asetonitril: pH:2.5 fosforik asit (v/v, 25:75) karışımı kullanıldı. Ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra sisteme verildi. Yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapıldı.

4.3 Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, etken maddenin miktar tayini için yöntemin, doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken bütün işlemleri kapsar. Böylece analizi yapılacak maddenin miktar tayininde kullanılan yöntemin güvenilirliği kanıtlanmış olur.

Çalışmamızda hem UV spektrum hem de UPSK yöntemleri için validasyon çalışmaları yapılmış ve aşağıdaki parametreler belirlenmiştir:

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik (Accuracy and Recovery)
- Kesinlik (Precision)
- ✓ Tekrar edilebilirlik (repeatability)

- ✓ Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)
- Özgünlük, Seçicilik (Specificity)
- Teşhis ve Tayin sınırları (LOD ve LOQ)
- Dayanıklılık, Stabilitate (Stability)

4.3.1 Doğrusallık

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Maddeye özgü düşük ve yüksek derişim aralıklarını kapsayan yöntemdir.

Kafeinin, pH=7.4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu ana stok çözeltisinden (50 mg/100 mL) uygun seyreltmeler yapılarak (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 µg/mL) çizildi. UV absorbanslar daha önce belirlenen $\lambda_{\max}$ dalga boyunda okundu ve kalibrasyon doğru denklemi elde edildi.

UPSK yönteminde ise, standart eğrinin çizimi için 1mg kafein 1 mL methanol içinde çözündürölmüş ve stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 8, 12, 16, 20, 24 ve 28 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seyreltmeler yapılarak 6 paralel konsantrasyonda çözelti elde edildi. Her konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen eğri altı alan değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi ve determinasyon katsayısı bulundu.

4.3.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Saptanan değerin gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğunu gösterir. Geri elde ile hesaplanır ve yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

Bu amaçla, UV spektrum yöntemi için ana stoktan hazırlanan 3 seri çözelti (2.5, 5 ve 10 µg/ml) ile çalışıldı.

UPSK yöntemi için, kafeinin methanol içerisinde stok çözeltisinden 3 farklı konsantrasyonda (8, 16 ve 24 µg/ml) 3 seri çözelti hazırlanır ve eğri altı alanlar belirlenen $\lambda_{\max}$ değerlerinde okunur. Okunan eğri altı alan değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen konsantrasyonlardan % geri elde değerleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla bulunur:

$$\%Geri\ Elde = \frac{C_{Pratik}}{C_{Teorik}} \cdot 100$$

C Pratik: Etkin maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen konsantrasyon değerleri

C Teorik: 8, 16 ve 24 µg/ml

4.3.3 Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin de bir ölçüsüdür. Analitik yöntemin kesinliği için istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda aynı konsantrasyondaki örnek ardarda ölçülerek aritmetik ortalama (ORT), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirildi.

Aynı konsantrasyondaki standart çözelti UV spektrum (10 µg/ml) ve UPSK (8 µg/ml) yöntemleri ile ardarda 6 defa ölçülerek hesaplar yapıldı.

4.3.3.1 Tekrar Edilebilirlik

Kalibrasyon doğru denklemi oluşturmak için hazırlanan stok çözeltiden bir konsantrasyon seçildi ve bu konsantrasyondaki çözeltinin eğri altı değeri belirtilen yöntemler ile ardarda 6 defa ölçüldü. Eğri altı alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

4.3.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için, aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki çözeltinin konsantrasyon ve eğri altı alan değerleri 2 farklı analist tarafından ölçüldü ve bunlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ORT, SS, VK hesaplandı. Bulunan varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

4.3.4 Özgünlük, Seçicilik

Salım ve permeasyon çalışmaları sonucunda elde edilen alan değerlerinin etkin maddeye ait olduğunu kanıtlamak için boş formülasyonlar ile alanların çakışıp çakışmadığı kontrol edildi. Etkin maddenin kullanıldığı formülasyonlara giren etkin madde dışındaki bileşenlerin PBS karışımında 200-400 nm dalga boyları arası taranarak UV ve UPSK spektrumları alındı.

4.3.5 Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)

Teşhis sınırı (limit of detection: LOD) analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikle tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur. Signal/noise oranı genellikle 3:1 oranında kullanılmaktadır.

Tayin sınırı (limit of quantitation: LOQ) analizi yapılan maddenin saptanabileceği en düşük konsantrasyondur.

Bu sınırlar düşük konsantrasyona sahip bir seri örneğin (6 paralel) analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Kalibrasyon eşitliğinde en düşük değere karşı gelen alanların standart sapma değerleri hesaplanmıştır ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmüştür. Bu değer 3.3 ile çarpılarak saptama sınırı ve 10 ile çarpılarak tayin sınırı belirlenmiştir.

4.3.6 Stabilit 

Etkin maddenin belirli konsantrasyonda     ltisi hazırlandı ve bu     lti hazırlandığı andan itibaren 30, 60 ve 120. dakikalarda ve 24. ve 48. saatlerde konsantrasyon ve eğri altı alan değerleri okunarak konsantrasyonda değişim olup olmadığı saptandı.

4.4 Formülasyon  alışmaları

4.4.1 Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Mikropartiküller, püskürterek kurutma (spray-drying) yöntemi ile Buchi B290-püskürtmeli kurutucu cihazı kullanılarak hazırlandı. Çalışmamızda iki farklı polimer oranı kullanıldı. Bu amaçla %0.2 ve %0.5 olacak şekilde HA, ultra saf su içinde manyetik karıştırıcı altında     nd r ld . Hazırlanan bu     lti, uygun çalışma şartlarını belirlemek amacıyla püskürtmeli kurutucu cihaz parametreleri (inlet sıcaklık, outlet sıcaklık, hava akış hızı, püskürtme hızı, aspirasyon) değiştirilerek sisteme püskürtüldü ve mikropartiküller elde edildi.

Kafein yüklü mikropartikülleri hazırlamak için ise, %0.1 olacak şekilde kafein, HA     ltisine eklenerek sisteme püskürtüldü. Toplama kabında elde edilen mikropartiküller tartılarak yüzde verim hesaplandı ve karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

4.4.2 Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyon  alışmaları

Hazırlanan mikropartikül formülasyonları, aşağıdaki parametreler ile değerlendirilmiştir.

4.4.2.1 Partikül Boyutu ve Morfolojisi

Elde edilen mikropartiküller lazer difraksiyon dağılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü açısından incelenmiştir. Formülasyonların partikül boyutları Mastersizer

3000 cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bütün çalışmalar 6 tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.4.2.2 Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayini

İlaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliğini belirlemek amacıyla falkon tüpteki 10mg mikropartikül örneğine 25 ml PBS ilavesi yapıldı. Tüpler 3 dakika vorteks ile karıştırıldı. 15 dakika 5000 rpm’de sentifüj yapıldıktan sonra üstteki sıvı kısım ayrıldı. Bu kısımdan örnekler alınarak etkin madde konsantrasyonu UV spektrofotometre yöntemi ile belirlendi. Enkapsülasyon etkinliği, pratik olarak bulunan etkin madde miktarının, teorik olarak yüklenen etkin maddeye yüzde oranının hesaplanması ile belirlendi.

Yükleme kapasitesi ise; pratik olarak bulunan etkin madde miktarının, formülasyon bileşenlerinin toplam miktarına yüzde oranının hesaplanması ile bulundu.

4.4.2.3 Termal Analizler

Hazırlanan mikropartikül ve etkin madde fiziksel karışımı, boş mikropartikül ve etkin madde yüklü mikropartikül formülasyonlarının DTK analizleri yapıldı. Böylece, etkin maddenin formülasyon içindeki fiziksel durumu değerlendirildi.

4.4.2.4 Mikropartiküllerin Sterilizasyonu

Hazırlanan mikropartiküller, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere UV lamba altında (273,7 nm) 24 saat tutuldu.

4.4.2.5 Mikrobiyolojik Sterilite Kontrolü

UV ışını ile sterilize edilmiş mikropartiküller (200 µl), steril serum fizyolojik içinde süspande edilerek agar besiyerine ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme kontrolü için *Escherichia coli* ATCC standart kökeninden 100 koloni forming unit (CFU) süspansiyonlar hazırlanarak aynı besiyerine ekildi. Katı ortamda üreme

olup olmadığı besiyerinde oluşan bulanıklık gözlenerek formülasyonların sterilitesi değerlendirildi.

4.4.3 Organojel Formülasyonlarının Hazırlanması

25.6 g soya lesitini (%100 fosfatidil kolin içeren), 40 C°'ye kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda ısıtılan izopropil miristat (52,8 ml) üzerine yavaşça ilave edildi. Sabit ısıda ve 200 rpm sabit hızda karıştırılarak çözeltinin homojenizasyonu sağlandı. Homojen çözeltinin içerisine 1:1 su/gliserin karışımı (1,6ml) bir pipet yardımıyla damla damla ilave edildi. 15 dk aynı hızda karıştırılarak formülasyonun sıcaklığı oda ısısına kadar düşürüldü ve organojelin oluştuğu gözlemlendi (103,115).

Etkin madde yüklü organojeller ise, %0.1 konsantrasyonda kafein ve aynı oranda kafein içeren mikropartikülün organojel sistemine eklenmesi ile hazırlanmıştır.

4.4.4 Organojel Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

4.4.4.1 Makroskopik İncelemeler

Hazırlanan lesitin organojellerinin görünüşü, rengi, yapısı ve faz ayrımı olup olmadığı makroskopik olarak incelendi.

4.4.4.2 pH Ölçümleri

Formülasyonların pH değerleri pH metre cihazına jel ölçüm probu takılarak, belirli aralıklarla yapıldı..

4.4.4.3 Reoloji ve Viskozite tayini

Organojel formülasyonları viskozite ölçümlerinden bir gün önce hazırlandı ve hava kabarcığı olmayacak şekilde ölçüm kaplarına yerleştirildi. Organojellerinin viskozite ölçümlerinde Brookfield DV III model viskozimetre kullanılarak oda sıcaklığında çalışıldı (Şekil 14). Ölçümler için 29 numaralı spindle kullanılarak 25 rpm hızda çalışıldı.



Şekil 14: Brookfield DV III model viskozimetre

Reolojik çalımlar için ise Haake reometre ile farklı kayma oranları kullanılarak çalışıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Haake osilasyon reometre

Bu çalışmada, 60 mm çapında 1° açılı plate/plate sistemi (35 mm, gap 0.3 mm, 0.1-10.0 Hz) kullanıldı ve sistemin sıcaklığı ölçümler süresince 20°C 'de sabit tutuldu (120). Formülasyonlar üzerinde ayrıca osilasyon ölçümleri yapıldı. Öncelikle,

güvenli olarak çalışılabilecek bölgeyi (lineer viskoelastik bölge) seçebilmek amacıyla stress sweep testi uygulandı ve formülasyonların ortak kırılma noktası (crossover point) belirlendi. Formülasyonların elastik (G') ve viskoz modül (G'') değerleri hesaplandı.

4.4.4.4 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayini

Farklı oranlarda hazırlanan jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için TA-XT Plus Texture analiz cihazı kullanılarak Texture profile analizi (TPA) yapıldı (Şekil 17) (96). Test için aşağıda verilen parametreler kullanıldı. Teste başlamadan önce jeller 20 mL'lik beherlere yerleştirildi ve hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla 20 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi. Jeller 37°C'ye getirildikten sonra aletin probu jelin içine 2.0 mm/saniye hızla 15 mm batırıldı ve jelin yüzeyine geri çekildi, 15 saniye beklendikten sonra prob jele ikinci defa batırıldı ve geri çekilerek test bitirildi. Elde edilen güç-zaman eğrisi kullanılarak jellerin sertliği, adezifliği, kohezifliği, elastikiyeti ve sıkıştırılabilirliği hesaplandı (89). Test, her bir jel formülasyonu için 6 kez tekrarlandı ve standart sapmalar hesaplandı.



Şekil 16: TA-XT Plus, Stable Micro System cihazı

Test Parametreleri

Prob: **Perspex (10 mm ap)**

Test ncesi probun hızı: 2.0 mm/saniye

Test esnasında probun hızı: 2.0 mm/saniye

Test sonrası probun hızı: 2.0 mm/saniye

Hedef modu:Mesafe

Probun jele batma mesafesi:..... 15.0 mm

Probun ikinci batmadan önce bekleme süresi: 15.0 saniye

Teste başlamak için probun hissetmesi gereken kuvvet: 0.05 N

4.4.4.4.1 Jellerin Sertliği

Sertlik, jelin deformasyonunu sağlamak için gerekli olan kuvvet olup, tanımlamak için elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin sertliği hesaplandı. Probun birinci batma periyodunda elde edilen maksimum güç değeri jellerin deformasyonu için gerekli sertlik değerini vermektedir (şekil 17). Sertlik değeri Newton (N) olarak hesaplanmıştır.

4.4.4.4.2 Jellerin Sıkıştırılabilirliği

Sıkıştırılabilirlik, jeli deforme etmek için gerekli olan içi tanımlamakta olup, elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin sıkıştırılabilirliği hesaplandı. Probun jele birinci batma periyodu süresince elde edilen eğrinin altında kalan alan (AUC_1) jelin sıkıştırılabilirlik değerini vermektedir (şekil 17). Sıkıştırılabilirlik değeri Newton x mm olarak hesaplanmıştır.

4.4.4.4.3 Jellerin Adezifliği

Adeziflik, jelin yüzeyi ile probun yüzeyi arasındaki çekme kuvvetlerini yenmek için gerekli içi tanımlamakta olup, elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin adezifliği hesaplandı. Probun birinci batma periyodundan sonra ilk geri çekme

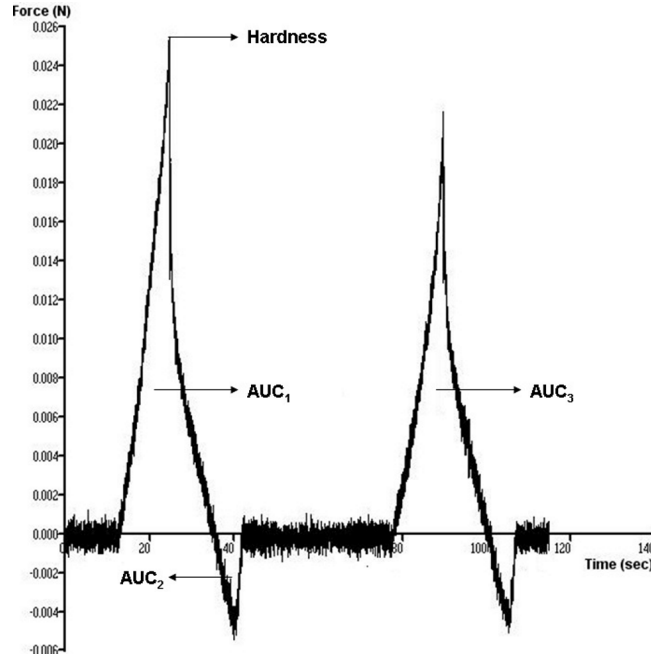
periyodu süresince elde edilen eğrinin altında kalan alan (AUC_2) adeziflik değerini vermektedir (Şekil 17). Adeziflik işinin birimi Newton x mm olarak hesaplanmıştır.

4.4.4.4 Jellerin Kohezifliği

Elde edilen kuvvet-zaman eğrisinden jellerin kohezifliği hesaplandı. İkinci batma periyodunda elde edilen eğrinin altında kalan alanın (AUC_3), birinci batma periyodunda elde edilen eğri altında kalan alana (AUC_1) oranı koheziflik değerini vermektedir (Şekil 17).

4.4.4.5 Jellerin Elastikiyeti

Elde edilen kuvvet-zaman eğrisinden jellerin elastikiyeti hesaplandı. İkinci batma periyodunda maksimum yapısal deformasyon meydana getirmek için gerekli zamanın, birinci batma periyodundaki maksimum deformasyon meydana getirmek için gerekli zamana oranı, jellerin elastikiyetini göstermektedir (Şekil 17).



Şekil 17: Jel formülasyonuna ait TPA grafiği

4.4.5 Formülasyonların Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonlarında tayin edilen parametreler ele alınarak, stabilite kabinlerinde (Nüve TK 252) 25°C sıcaklık-% 60 relatif rutubet ve 40°C sıcaklık-% 75 relatif rutubet koşullarında 6 aylık stabilite çalışmaları yapıldı.

4.5 *In vitro* Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları için 10 mg kafein ve aynı oranda kafein içeren mikropartiküller tartılarak diyaliz membranlara konuldu (Spectra/Por®, MW 12.000-14.000, Spectrum, Kanada). Üzerine 1 ml tampon çözelti eklendi ve membranın her iki uç kısmı kapatıcılar ile kapatıldı. Membranlar içerisinde 200 ml pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) bulunan beherlere yerleştirildi. Beherler parafilm ile kapatılarak 37°C'deki manyetik karıştırıcılı su banyosunda 200 rpm'de karıştırıldı. Tüm sistemin üzeri kapatılarak karanlık bir ortam sağlandı. Belirli zamanlarda 3 ml örnek alındı. 0., 30., 45., 60., 90. dakikalarda ve 2. 3., 4., 5., 6., 24. saat aralıklarında 3 ml örnek alınarak, 273 nm'de UV spektrumda absorpsanları ölçüldü. Alınan örneğin yerine ve reseptör fazdan eşit miktar ilave yapıldı.

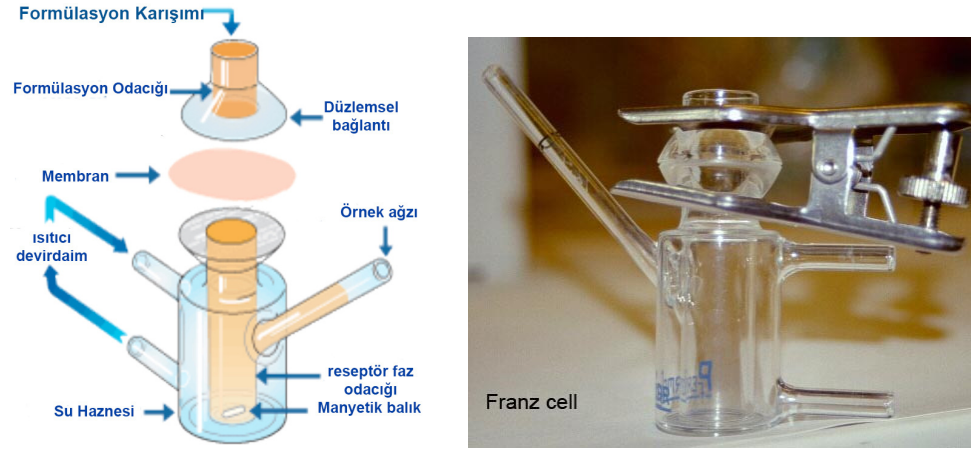
Benzer şekilde, boş organojel, kafein yüklü organojel ve kafein yüklü mikropartikül içeren organojel formülasyonları ile çalışma tekrarlandı.



Şekil 18: Diyaliz membrandan *in vitro* salım çalışması.

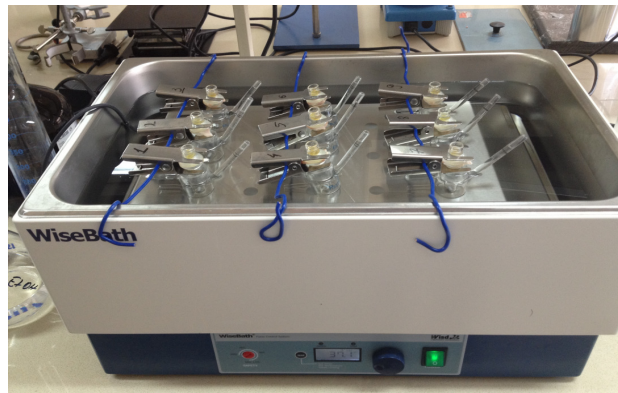
4.6 Formülasyonların Ex-vivo Penetrasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların sıçan karın derisinden ex-vivo penetrasyon çalışmaları, franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldı. Kullanılan franz difüzyon hücrelerinin alanı 0.63 cm^2 ve hacmi yaklaşık 5 mL'dir (Şekil 19).



Şekil 19: Franz difüzyon hücresi ve şematik görünümü

Reseptör faz olarak tuzlu fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) kullanıldı. Formülasyonlar (kafein çözeltisi, kafein yüklü organojel ve kafein yüklü mikropartikül (F4) içeren organojel), franz difüzyon hücrelerinin donör bölümüne yerleştirildi. Tüm çalışmalarda, belirsiz miktarda (infinite) doz uygulaması yapıldı. Hazırlanan franz difüzyon hücreleri, 600 rpm hızda manyetik olarak karıştırılan 37°C lik su banyosuna yerleştirildi (Şekil 20).



Şekil 20 : Franz difüzyon hücreleri ile difüzyon çalışması

0., 2., 4, ve 6. saatlerde reseptör fazdan 300 µL örnek alındı ve hemen aynı hacimdeki taze reseptör faz ilave edildi. Elde edilen tüm örneklerdeki etkin madde miktarları, valide edilmiş UPSK yöntemi kullanılarak tayin edildi. Tüm deneyler 6 defa tekrarlandı.

4.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

İnsan dermal fibroblast hücrelerinin (Invitrogen C-013-5C), üreticinin talimatları doğrultusunda 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren nemli ortamda, Medium 106 ortamı kullanılarak kültürleri yapılmıştır. Hücreler yoğunlukları 5x10³ hücre/cm² olacak şekilde 25cm²’lik tüplere ekilmiştir. Deney 2. ve 5. pasajlamadaki hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.7.1 Sitotoksite Testi

Hücreler 96 kuyucuklu plaklara yoğunluğu 5x10³ hücre/cm² olacak şekilde konulmuş ve hücrelerin tutunabilmesi için 24 saat, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda hücrelere 5.55 µM, 16.66 µM, 50 µM, 150 µM konsantrasyonlarında sadece kafein çözeltisi, aynı miktarda etkin madde içerecek şekilde steril serum fizyolojikte suspande edilmiş mikropartikül, ve kafein yüklü mikropartiküller ile aynı seyreltme oranına tabi tutulmuş kafein içermeyen steril serum fizyolojikte suspande edilmiş mikropartikül uygulanmıştır. Sadece taşıyıcı, negatif (yalnızca ortam) ve pozitif (triton-x-100) kontrol grupları da her çalışmaya ilave edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca örnekler ile temasta bırakılmıştır. Süre sonunda ortam uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. 100 µl ortam ve 20 µl PBS içindeki 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) solüsyonu (5 mg / ml) her bir kuyucuğa eklenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra, ortam uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için

100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. Oluşan mor renkli çözeltinin absorbansı 490 nm’de mikropate okuyucu ile ölçülmüştür.

4.8 Araştırma Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

6 tekrarlı olacak şekilde elde edilen tüm veriler tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) değerlendirildi. GraphPad Prism (sürüm 3.0.2) programı kullanılarak Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi uygulandı. Anlamlı farklılık seviyesi %95 olarak alındı ($P < 0.05$).

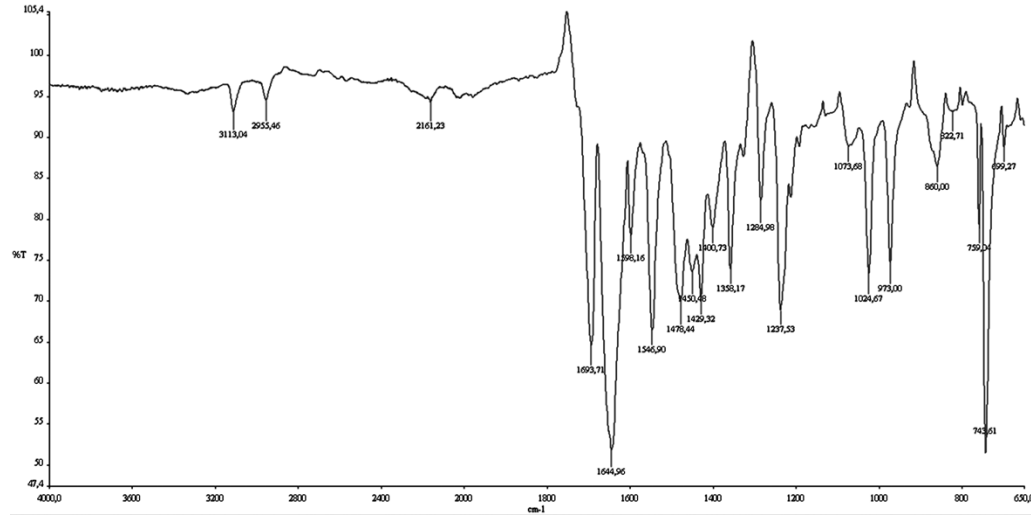
BÖLÜM III

5 BULGULAR

5.1 Etkin Madde ve Polimerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

5.1.1 Infrared (IR) Spektrumuna Ait Bulgular

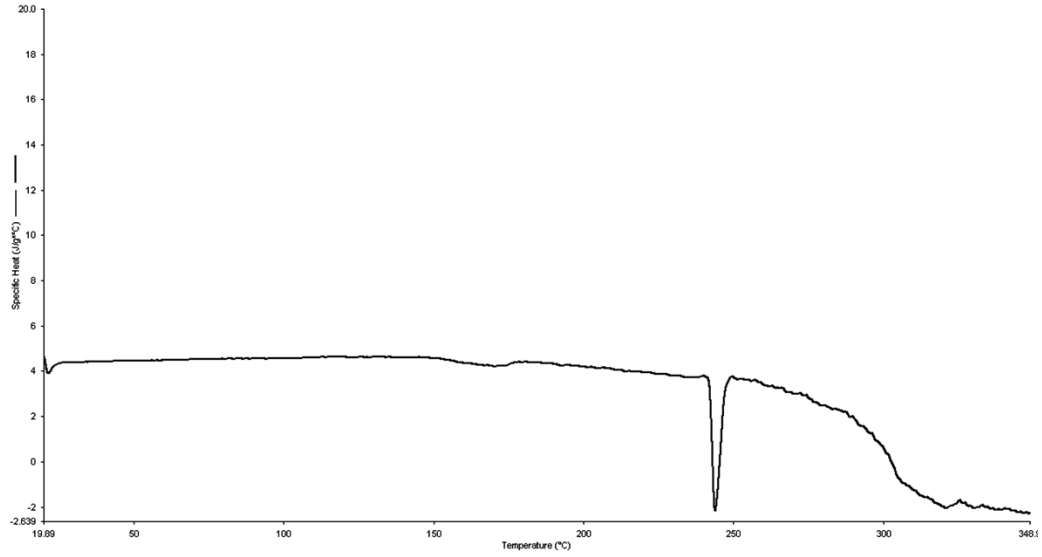
Kafein'in IR spektrumunun gösterdiği absorpsiyon bantları, 1644, 1693 ve 3113 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Bu değerler, literatürlerde verilmiş IR bantları ile uyumludur (15,46,77).



Şekil 21: Kafein'in IR spektrumu

5.1.2 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) ile Termal Analiz Bulguları

Termal analiz sonucunda kafeinin erime derecesi 238.2 $^{\circ}\text{C}$ bulunmuş olup, literatürlerle uyumlu olduğu gözlenmiştir (54)



Şekil 22 : Kafein'in termal analiz grafiği

5.1.3 Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 4.1.3'de anlatılan çalışma sonucunda, kafeinin tuzlu fosfat tamponundaki (PBS) çözünürlüğü 0.02 g/ml olarak bulundu.

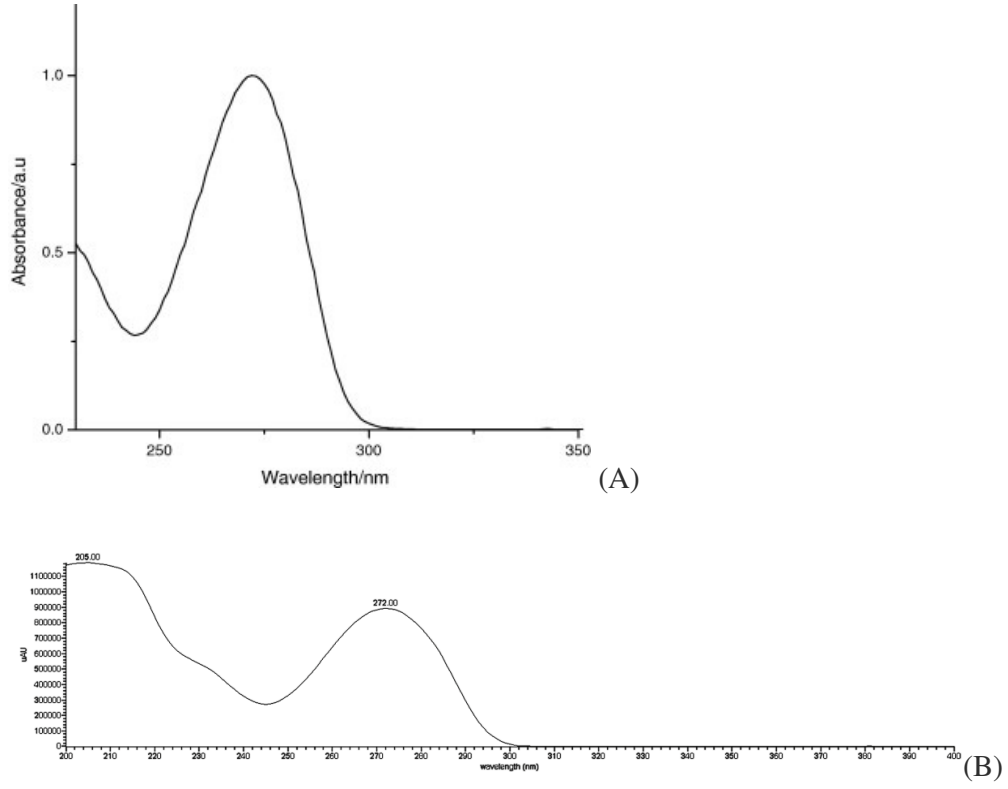
5.1.4 Etkin Maddenin Lipit/Su Partisyon Katsayısının Hesaplanmasına Ait Bulgular

Log P değeri Yöntem 4.1.4'de belirtilen eşitlik yardımıyla hesaplandı ve -0.07 olarak bulundu. Bulunan sonuçların literatür verileri ile uyumlu olduğu bulundu (11).

5.1.5 Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

5.1.5.1 UV Spektrum Çalışmalarına ait bulgular

Etkin maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun (λ_{max}) saptanması için 200-400 nm arasında tarama yapıldı ve λ_{max} değeri 272 nm olarak belirlendi. Maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer, literatürde kafein için belirtilen dalga boyuna uygunluk göstermektedir (15, 46,77)

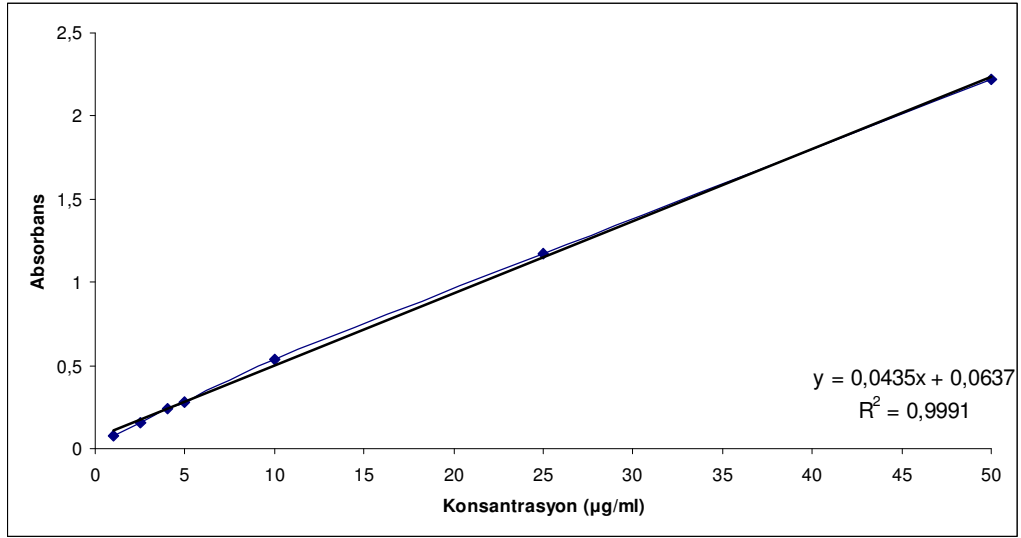


Şekil 23: Kafeinin; (A) UV spektrumu ve (B) UPSK ile bulunan λ_{max} değeri

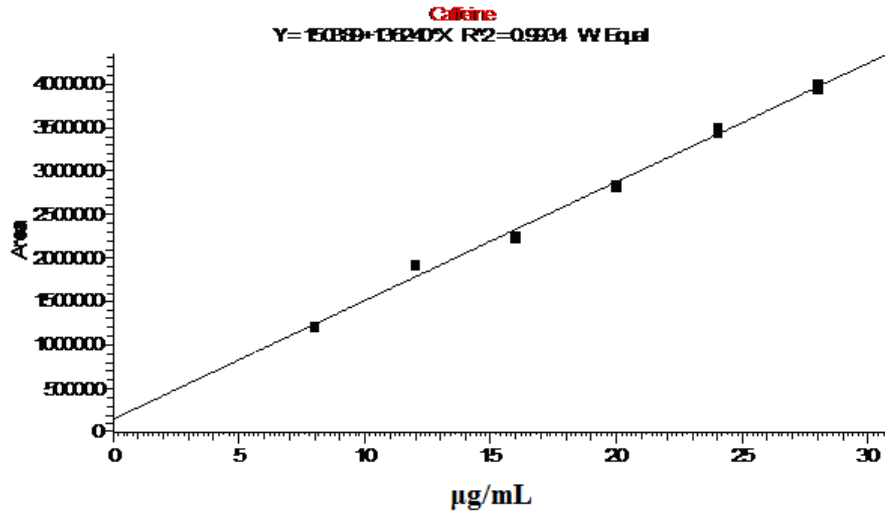
5.1.5.2 Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

5.1.5.2.1 Doğrusallık

Yöntem 4.3.1’de anlatıldığı gibi standart doğrular hem UV spektrofotometre hem de UPSK yöntemleri ile çizildi. Elde edilen standart doğrular ve determinasyon katsayıları (r^2) Şekil 24 ve Şekil 25’de gösterilmiştir.



Şekil 24: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile elde edilen standart doğrusu



Şekil 25: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen standart doğrusu

5.1.5.2.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Geri elde edilebilirlik değerleri konsantrasyon değerlerinden hareketle hesaplandı. UV spektrum ve UPSK yöntemi için sonuçlar sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler

	Absorbans	Bulunan (µg/mL)	C % Geri Elde
2.5 µg/mL	0.170	2.44	97.6
2.5 µg/mL	0.172	2.48	99.2
2.5 µg/mL	0.172	2.48	99.2
		ORT	98.67
		SS	0.924
		VK	0.932
5 µg/mL	0.282	5.01	100.2
5 µg/mL	0.280	4.97	99.4
5 µg/mL	0.279	4.95	99.0
		ORT	99.53
		SS	0.611
		VK	0.614
10 µg/mL	0.497	9.96	99.6
10 µg/mL	0.495	9.91	99.1
10 µg/mL	0.503	10.09	100.9
		ORT	99.87
		SS	0.929
		VK	0.930

Tablo 2: Kafeinin UPSK yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler

	Eğri Altı Alan	Bulunan C (mg/mL)	% Geri Elde
Okuma No	1. Konsantrasyon (8 µg/mL)		
1	1203496.64	7.730	96.63
2	1200751.54	7.710	96.38
3	1260345.49	7.823	97.75
	2. Konsantrasyon (16 µg/mL)		
1	2221577.36	15.203	95.0
2	2222055.66	15.206	95.03
3	2244270.87	15.369	96.06
	3. Konsantrasyon (24 µg/mL)		
1	3467414.87	24.347	101.45
2	3436529.77	24.120	100.5
3	3493729.74	24.540	102.25

5.1.5.2.3 Kesinlik

5.1.5.2.3.1 Tekrar Edilebilirlik

Kafeinin Yöntem 4.3.3.1’de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan örnekleri UV spektrum ve UPSK yöntemi ile 272 nm dalga boyunda 6 kez art arda okundu. VK % 2’den küçük olduğu için yöntemin tekrar edilebilir olduğu saptanmıştır (Tablo 3 ve Tablo 4).

Tablo 3: Kafeinin UV yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik testi sonuçları

Örnek No	Absorbans	Konsantrasyon (10 µg / mL)
1	0.501	10.05
2	0.496	9.94
3	0.505	10.14
4	0.497	9.96
5	0.495	9.91
6	0.503	10.09

***SS = 0.092, % VK = 0.918**

Tablo 4: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen tekrar edilebilirlik testi sonuçları

Örnek No	Eğri altı alan	Konsantrasyon (8 µg / mL)
1	1203496.64	7.742
2	1200751.37	7.715
3	1236122.61	7.771
4	1242496.64	7.728
5	1200751.37	7.715
6	1236186.61	7.776

***SS = 0.0270, % VK = 0.348**

5.1.5.2.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

Kafein için standart doğru çiziminde hazırlanan stok çözeltiden alınan aynı konsantrasyondaki 6 farklı örneğin konsantrasyon değerleri 272 nm dalga boyunda

okundu. VK % 2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilir olduğunu göstermektedir (Tablo 5 ve Tablo 6).

Tablo 5: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile elde edilen tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları

Örnek No	Absorbans	Konsantrasyon (10 µg / mL)
1	0.491	9.82
2	0.502	10.07
3	0.495	9.91
4	0.503	10.09
5	0.499	10.01
6	0.497	9.96

***SS =0.103 , % VK = 1.032**

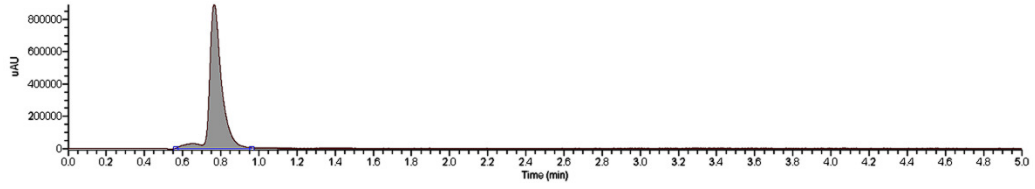
Tablo 6: Kafeinin UPSK yöntemi ile elde edilen tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları

Örnek No	Eğri altı alan	Konsantrasyon (8 µg / mL)
1	1242496.64	7.728
2	1200751.37	7.715
3	1236186.61	7.776
4	1203496.64	7.730
5	1200751.54	7.710
6	1216186.61	7.823

***SS = 0.0314 , % VK = 0.408**

5.1.5.2.4 Özgünlük, Seçicilik

Çalışmada kullanılan polimerlerin ve yardımcı maddelerin, 200-400 nm dalga boyları arasında spektrumları incelendi. Kafeinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda, yardımcı maddelerin herhangi bir absorbans vermedikleri görüldü ve yöntemin etkin maddeye özgü olduğu bulundu (Şekil 26).



Şekil 26: Kafeinin UPSK ile elde edilen pik değeri

5.1.5.2.5 Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)

Yöntem 4.3.5. anlatıldığı gibi elde edilen teşhis ve tayin sınırları sonucu

Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: UPSK yöntemi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri

	Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
LOD	0.043 ± 0.060
LOQ	0.144 ± 0.200

5.1.5.2.6 Stabilite

Kafeinin çözünme ortamlarındaki stabilitesini incelemek için Yöntem 4.3.6’da anlatıldığı gibi çalışıldı ve elde edilen konsantrasyon değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Tablo 8 ve Tablo 9).

Tablo 8: Kafeinin UV spektrum yöntemi ile yapılan stabilite testi sonuçları

Zaman (Saat)	Konsantrasyon ($10 \mu\text{g} / \text{mL}$)
1	10.07
3	9.98
6	9.98
12	10.01
24	9.86
48	9.85

***SS = 0.086, % VK = 0.874**

Tablo 9: Kafeinin UPSK yöntemi ile yapılan stabilite testi sonuçları

Zaman (Saat)	Konsantrasyon (8µg / mL)
1	7.96
3	7.95
6	8.03
12	7.89
24	7.92
48	7.94

*SS = 0.047, % VK = 0.592

5.2 FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

5.2.1 Mikropartikül Formülasyonlarının Çalışmalarına Ait Bulgular

5.2.1.1 Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular

Yüksek verimle mikropartikül elde edilmesi için püskürtmeli kurutucu cihaz parametreleri değiştirilerek çalışıldı. %0.2 HA içeren boş mikropartikül (BM) formülasyonları hazırlama koşulları ve üretim sonunda elde edilen verim sonuçları Tablo 10 da verilmiştir.

Tablo 10: Hazırlanan boş mikropartikül formülasyonlarının kodları ve hazırlama şartları

Formülasyon kodu	Giriş sıcaklığı (°C)	Püskürtme hızı	Aspiratör (%)	Pompa (%)	Verim (%)
BM 1	150	30-35 (400 L/h)	100	30	30 ± 0.5
BM 2	150	40-45 (500 L/h)	100	50	48 ± 0.8
BM 3	180	30-35 (400 L/h)	100	50	65 ± 0.2
BM 4	180	50-55 (600 L/h)	100	50	92 ± 0.8

En yüksek verimin (%92±0.8) elde edildiği BM4 formülasyonunun hazırlandığı koşullar ile çalışılmasına karar verilmiştir.

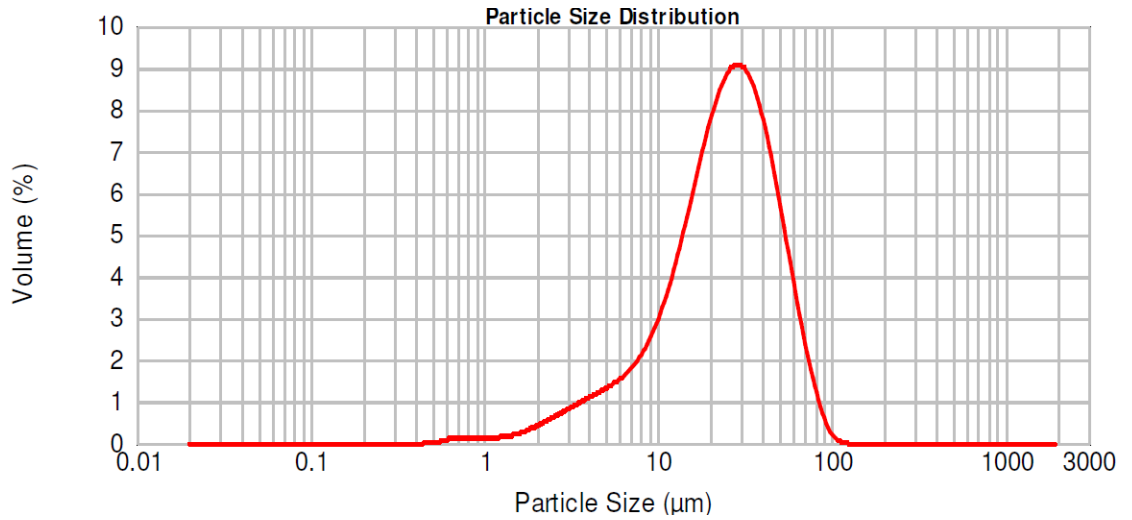
5.2.1.2 Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

5.2.1.2.1 Partikül Boyutu ve Morfolojisine Ait Bulgular

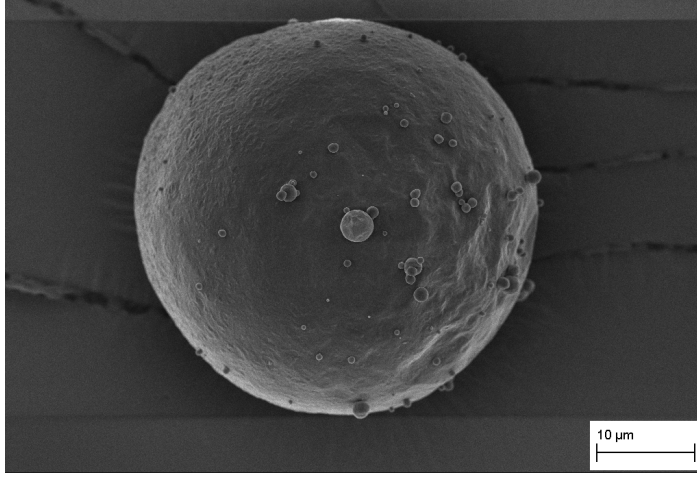
Boş ve kafein yüklü HA mikropartiküllerinin (F1-F4) ortalama partikül büyüklüğü sonuçları Tablo 11’de verilmiştir. F4 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği ve SEM fotoğrafı Şekil 27 ve Şekil 28’de, verilmiştir.

Tablo 11: Formülasyonlarının ortalama partikül boyutları

HA miktarı	Formülasyon	Partikül boyutu (µm)			Span
		d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)	
%0.2	Boş mikropartiküller (F1)	4.56 ± 0.8	22.42 ± 0.5	45.02 ± 2.5	1.976 ± 0.02
	Kafein yüklü mikropartiküller (F2)	7.89 ± 0.6	28.28 ± 0.2	56.14 ± 2.6	1.944 ± 0.13
% 0.5	Boş Mikropartiküller (F3)	10.18 ± 0.7	32.28 ± 0.4	62.40 ± 0.7	1.844 ± 0.03
	Kafein yüklü mikropartiküller (F4)	12.76 ± 0.5	33.97 ± 0.3	64.16 ± 0.8	1.768 ± 0.02



Şekil 27: F4 formülasyonu partikül büyüklüğü dağılımı (n=6)



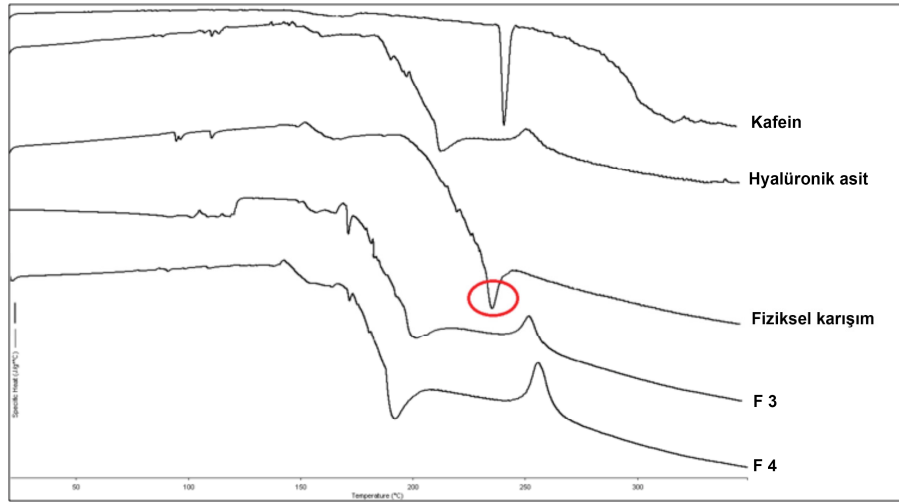
Şekil 28: F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı

5.2.1.2.2 Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayinine Ait Bulgular

Yöntem 4.4.2.2’de belirtildiği gibi yapılan çalışma sonucunda, F2 formülasyonu için yükleme kapasitesi; 0.09 mg ve enkapsülasyon etkinliği %85.42 olarak bulundu. F4 formülasyonu için bu değerler sırası ile 0.1 mg ve %88.56 olarak bulundu.

5.2.1.2.3 Termal Analiz Bulguları

Etkin maddenin formülasyon içindeki fiziksel durumu değerlendirmek için yapılan DTK çalışmaları Şekil 29’da verilmiştir.



Şekil 29: Kafein, HA, fiziksel karışım, F3 ve F4 formülasyonlarına ait DTK termogramı

5.2.1.2.4 Mikrobiyolojik Sterilite Kontrolüne Ait Bulgular

UV lamba altında (273,7 nm) 24 saat sterilizasyona tabi tutulan mikropartiküller ile Yöntem 4.4.2.5’de belirtildiği gibi mikrobiyolojik sterilite kontrolü çalışması yapıldı. Kanlı agar besiyerinde bulanıklık yani üreme olmadığı gözlemlendi.

5.2.2 Organojel Formülasyonların Çalışmalarına Ait Bulgular

5.2.2.1 Organojel Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

5.2.2.1.1 Makroskobik İnceleme ve pH Ölçümüne Ait Bulgular

Yöntem 4.4.4.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan organojeller sarımtırak renkte olup, pH değerleri 5.75-6.05 aralığında gözlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12: Organojellerin genel özellikleri

Formülasyon kodu	Organojel içeriği	Makroskobik özellik	pH
O-B	Boş	Şeffaf, sarımsı renkte, homojen, akışkan	5.75
O-K	Kafein toz	Bulanık, sarımsı renkte, homojen, akışkan	5.86
O-F3	F3 formülasyonu	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	5.88
O-F4	F4 formülasyonu	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	6.05

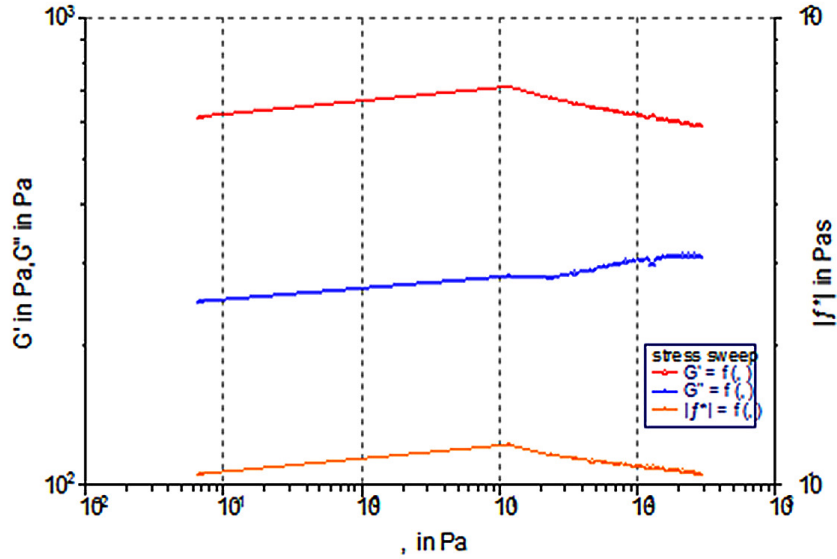
5.2.2.1.2 Reoloji ve Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular

Organojeller için, Brookfield DV III model viskozimetre ölçümlerine ait bulgular Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13: Organojellerin viskozite tayinine ait bulgular

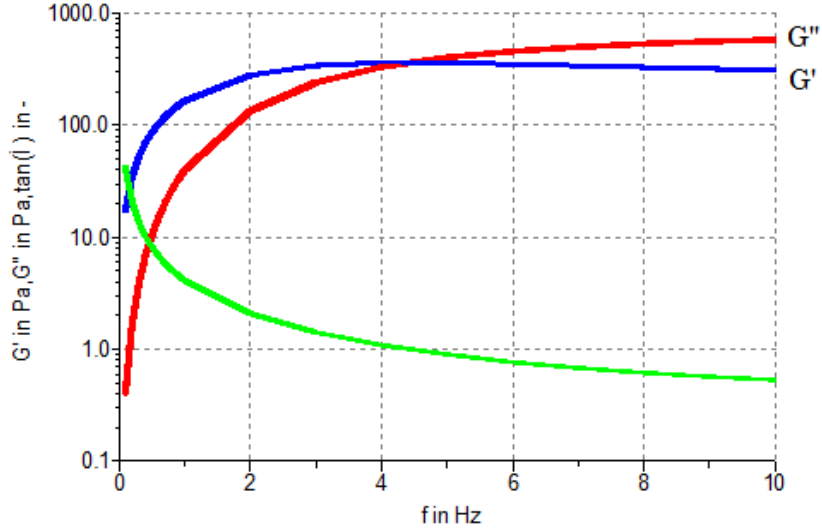
Formülasyon	Viskozite (cps)
O-B	4450 ± 12
O-K	4675 ± 18
O-F3	4546 ± 10
O-F4	4615 ± 15

Formülasyonların reometre ölçümleri Yöntem 4.4.4.3’te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Lineer viskoelastik bölge seçebilmek amacıyla uygulanan stress sweep testi sonucunda formülasyonların ortak kırılma noktası (crossover point) 10 Pa olarak belirlendi (Şekil 30).



Şekil 30: Formülasyonunun stress sweep test profili (crossover point: 10 Pa)

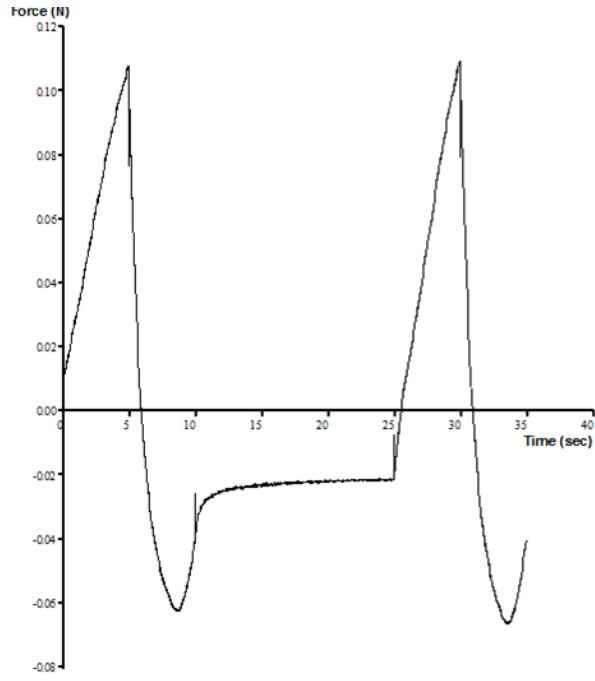
Frekans 0-4 aralığında G' (elastik modül) değeri G'' (viskoz modül) değerinden büyük bulunmuştur. Frekans arttıkça viskozitenin azaldığı (Şekil 31).



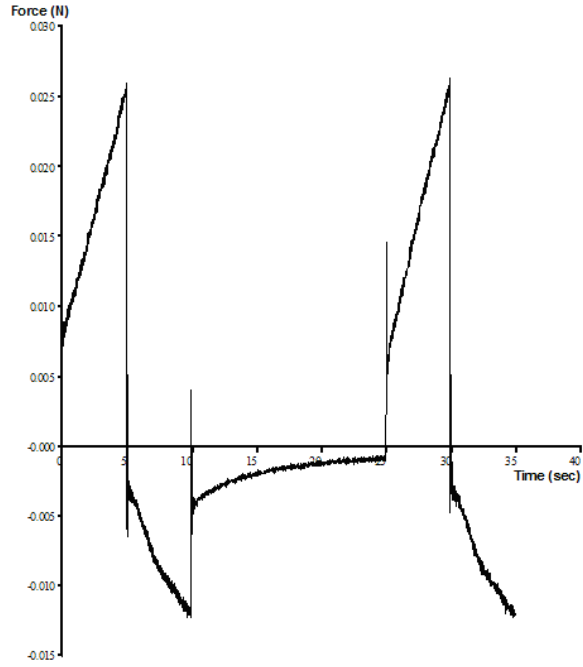
Şekil 31: F4 formülasyonunun reolojik osilasyon profilleri

5.2.2.1.3 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular

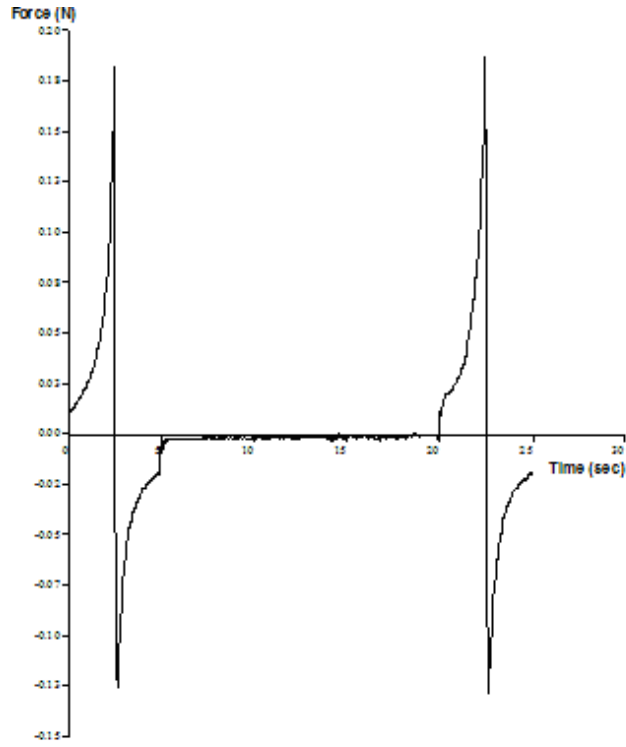
Jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için TA-XT Plus Texture analiz cihazı kullanılarak Yöntem 4.4.4.4'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Formülasyonlara ait TPA grafikleri Şekil 32, Şekil 33 ve Şekil 34'de gösterilmektedir. Bu çalışmalara ait grafiklerin değerlendirilmesi ve gerekli hesaplamaların yapılması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 14'de yer almaktadır.



Şekil 32: O-B formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 33: O-K formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 34: O-F4 formülasyonuna ait TPA grafiği

Tablo 14: Organojellerin Mekanik Özelliklerine ait bulgular

Formülasyon	Sertlik (N) $\pm$ SS	Adeziflik (N.mm) $\pm$ SS	Koheziflik $\pm$ SS	Sıkıştırılabilirlik (N.mm) $\pm$ SS	Elastikiyet $\pm$ SS
O-B	0.011 $\pm$ 0.002	0.026 $\pm$ 0.002	0.761 $\pm$ 0.013	0.190 $\pm$ 0.006	0.908 $\pm$ 0.049
O-K	0.025 $\pm$ 0.001	0.036 $\pm$ 0.001	0.836 $\pm$ 0.009	0.186 $\pm$ 0.002	0.836 $\pm$ 0.025
O-F4	0.018 $\pm$ 0.002	0.042 $\pm$ 0.002	0.811 $\pm$ 0.013	0.175 $\pm$ 0.004	0.884 $\pm$ 0.049

5.2.3 Formülasyonların Stabilité Çalışmaları

Hazırlanan mikropartikül ve organojel formülasyonlarının karakterizasyonlarında tayin edilen parametreler ele alınarak, stabilite kabinlerinde yapılan çalışma sonuçları Tablo 15 ve Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 15: Mikropartikül formülasyonlarının 25°C sıcaklık-%60 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular

Formülasyon	Zaman	Partikül büyüklüğü (µm)	Span	Yükleme kapasitesi (%)
F3	1. ay	35.45 ± 0.6	1.997 ± 0.04	-
	3. ay	35.14 ± 0.9	1.876 ± 0.07	-
	6. ay	36.18 ± 1.2	1.998 ± 0.01	-
F4	1. ay	37.97 ± 0.8	1.975 ± 0.07	90.56
	3. ay	40.42 ± 1.1	2.008 ± 0.05	86.38
	6. ay	38.28 ± 0.9	1.978 ± 0.08	83.42

Tablo 16: Mikropartikül formülasyonlarının 40°C sıcaklık-%75 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular

Formülasyon	Zaman	Partikül büyüklüğü (µm)	Span	Yükleme kapasitesi (%)
F3	1. ay	33.14 ± 0.5	2.026 ± 0.06	-
	3. ay	32.87 ± 0.5	1.956 ± 0.08	-
	6. ay	33.09 ± 1.1	1.948 ± 0.05	-
F4	1. ay	34.12 ± 0.9	2.828 ± 0.09	82.45
	3. ay	36.22 ± 1.2	1.972 ± 0.04	85.22
	6. ay	37.47 ± 0.5	1.872 ± 0.04	85.56

Tablo 17: Organojel formülasyonlarının 25°C sıcaklık-%60 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular (6. ay)

Formülasyon kodu	Makroskobik özellik	Homojenite	pH	Viskozite (cP)
O-B	Şeffaf, sarımsı renkte, homojen, akışkan	+++	5.75	4790 ± 18
O-K	Bulanık, sarımsı renkte, homojen, akışkan	++	5.86	4825 ± 14
O-F3	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	+++	5.88	4996 ± 19
O-F4	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	+++	6.05	4862 ± 16

+++ : çok iyi

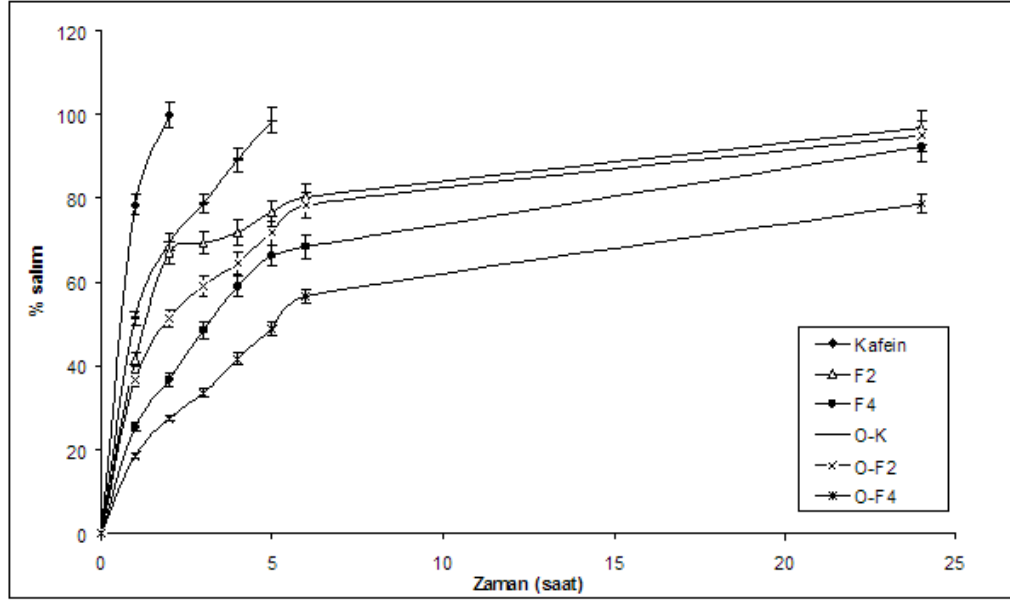
Tablo 18: Organojel formülasyonlarının 40°C sıcaklık-%75 relatif rutubet şartlarındaki stabilite çalışmasına ait bulgular (6. ay)

Formülasyon kodu	Makroskobik özellik	Homojenite	pH	Viskozite (cP)
O-B	Şeffaf, sarımsı renkte, homojen, akışkan	+++	5.75	4569 ± 14
O-K	Bulanık, sarımsı renkte, homojen, akışkan	++	5.86	4512 ± 10
O-F3	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	+++	5.88	4710 ± 15
O-F4	Partiküllü, sarımsı renkte, homojen, viskoz	+++	6.05	4659 ± 20

+++ : çok iyi

5.3 *In vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

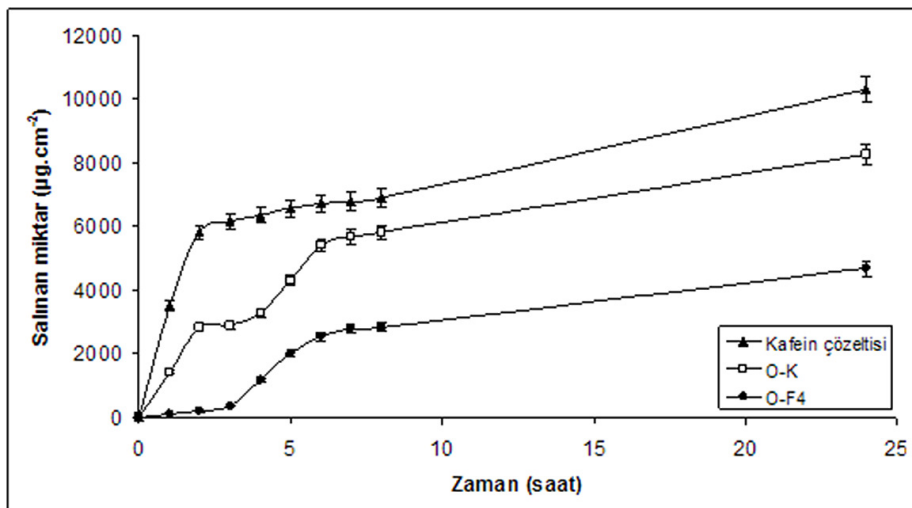
Yöntem 4.5’de anlatıldığı şekilde yapılan salım çalışması sonuçlarına göre elde edilen grafikler aşağıdadır (Şekil 35).



Şekil 35: Formülasyonlara ait % salım grafiği

5.4 Formülasyonların Ex-vivo Permeasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 4.6’de anlatıldığı şekilde yapılan ex-vivo difüzyon çalışma grafiği aşağıdadır (Şekil 36).

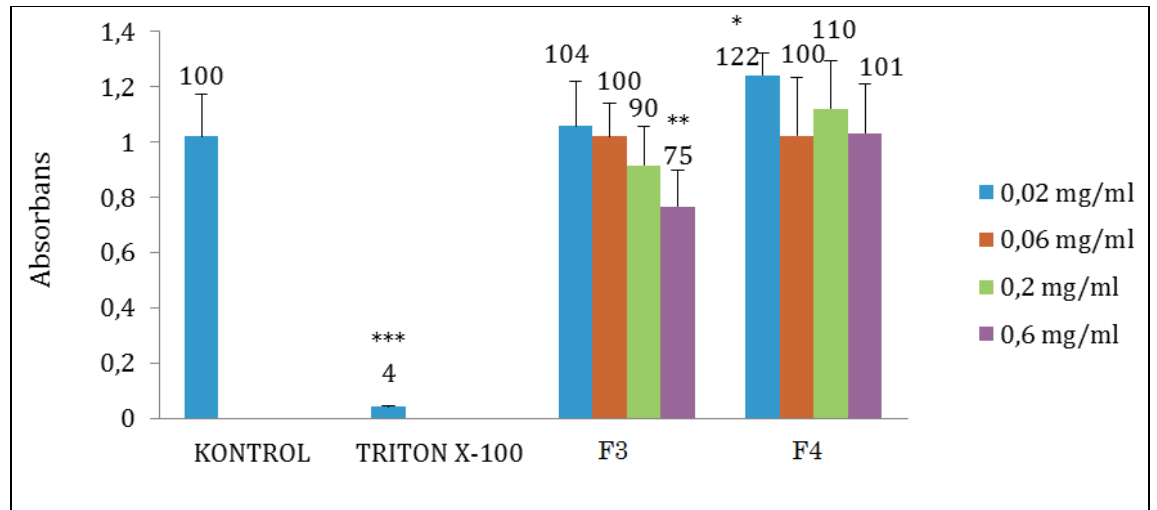


Şekil 36: Formülasyonlara ait kafein permeasyon grafiği

Kafein yüklü olmayan mikropartikül ve organojel formülasyonları ile de çalışma yapılmış, herhangi bir absorbans gözlenmemiştir.

5.5 Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

Çalışmada bir grup insan dermal fibroblast hücresi normal büyüme vasatı içerisinde inkübe edilmiş (kontrol grubu), negatif kontrol grubu olarak ise vasat içerisinde membran hasarı yaparak sitotoksik etki gösterdiği bilinen Triton X-100 ile (15 mM) inkübe edilmişlerdir. Bunun dışında F3 ve F4 örnekleri de hücrelerle 24 saat inkübe edilerek tüm örneklerin hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Şekil 37’de görüldüğü üzere F3 formülasyonu en yüksek konsantrasyonunda canlı hücre sayısını azaltıcı etki göstermiştir ($p < 0,005$). Bu etkinin doza bağımlı olduğu ve örneğin test edilen 0,02-0,2 mg/ml konsantrasyon aralığında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak önemli bir değişime neden olmadığı söylenebilir. Kafein yüklü mikropartikül içeren F4 formülasyonu ise insan dermal fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı üzerine anlamlı bir olumsuz etkiye neden olmamıştır.



Şekil 37: F3 ve F4 formülasyonlarının *in vitro* insan dermal fibroblast hücrelerinde sitotoksik aktivitesinin 0,6; 0,2; 0,006; 0,002 mg/ml konsantrasyonlarda, MTT yöntemi ile değerlendirilmesine ait bulgular.

Sütunlar dört (n=4) çalışmanın “ortalaması $\pm$ standart sapma” değerlerini, sütunlar üzerindeki rakamlar ise kontrole kıyasla rölatif canlılığı göstermektedir.

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi t testi ile yapılmıştır. P degerleri ilgili grup ortalamasının kontrol grubu ortalaması ilk kıyaslanması ile elde edilmiştir.

(*p <0,05, **p <0,005, ***p <0,001)

BÖLÜM IV

6 TARTIŞMA

Selülit son yıllarda çok güncel olan ve kadınların neredeyse tamamında (% 90'ı ile 98'inde) görülen bir kozmetik bozukluktur. Tıbbi açıdan hastalık değildir. Sadece derinin düzgün görüntüsünün değişimine neden olan ve portakal kabuğu görüntüsü olarak tarif edilen doku hasarıdır. Yağ hücrelerinin anormal irileşmesi ve derinin esnekliğinin azalması sonucu ortaya çıkar. Bu konuda yapılmış çok fazla bilimsel çalışma olmadığı için tedavisi konusunda kesin bir çözüm bulunamamıştır. Ayrıca tek bir etkene bağlı olmadığı için tedavi edilmesi oldukça güçtür.

Mikropartiküller farmasötik teknoloji alanında sıklıkla hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler olup, polimerik yapıları nedeniyle etkin maddenin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlarlar. Hyalüronik asit (hyaluronan-HA), derinin doğal yapısında bulunan ve yeni hücre oluşumu/hareketliliğinin devamını sağlayan, nemlendirme özelliğine sahip kozmetik biyolojik bir aktif maddedir. Bu nedenle, uygulama bölgesinde etkin maddenin uzun süre boyunca kontrollü salımının sağlanması amacıyla, HA bazlı mikropartiküllerin hazırlanmasına karar verilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, HA ile hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına rastlanmış ve özellikle yara tedavisinde etkili oldukları gözlenmiştir.

Selülit için etkili olup olmadığı kesin olarak saptanamamış çok sayıda ürün ve uygulama olmasına rağmen, bunlardan bazılarının selülit belirtilerinde iyileşmeye neden olduğunu veya olabileceğini ileri süren bazı bilgiler mevcuttur. Dünya ve

Türkiye piyasasında, selülitin etkilerini giderici ürünler arasında kafein içeren pekçok formülasyon bulunmaktadır.

Kafein, deri altı yağ hücrelerindeki yağın yanmasını (lipoliz) hızlandırmakta ve aynı zamanda bu hücrelerde yağ üretiminin artmasını (lipojenez) engellenmektedir. Bu nedenle selülit tedavisi için pekçok kozmetik üründe güncel olarak kullanılmaktadır. Ancak, yapılan literatür taramaları sonucunda kafeinin uzun süre etkili olmasının sağlandığı herhangi bir formülasyon bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, kafein yüklü mikropartiküller püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanmış, dermal taşıyıcı sistemlere (organojel) yüklenmiş ve bu formülasyonların etkinlikleri değerlendirilmiştir. Böylelikle, doğal deri bileşenlerinden oluşan bu dermal formülasyon ile selülit ile oluşan doku hasarına karşı hem doku onarımını hızlandıran hem de nemlendirme özelliğine sahip yenilikçi bir tedavi önerilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada önce etkin maddelerin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş, Kafeinin, IR spektrumunda kimyasal yapıya bağlı olan karakteristik pikler, maddenin saf olduğunu göstermiştir (Şekil 21). DTK ile yapılan termal analiz sonucunda ise erime derecesi 238.2°C olarak belirlenmiş (Şekil 22). Bu erime derecesi değeri literatürle uyumlu bulunmuştur (54). PBS ortamındaki çözünürlüğü ve lipit/su partisyon katsayısı ise sırasıyla 0.02g/ml ve -0.07 olarak saptanmıştır. Bulunan bu değerler, kafeinin sulu ortamdaki yüksek çözünürlüğünü göstermiş olup literatürlerle uyumlu bulunmuştur (43).

Kafeinin miktar tayini çalışmaları için UV spektrofotometre ve UPSK yöntemleri kullanılmış. Çalışmalarda öncelikle de $\lambda_{\max}$ değeri 272 nm olarak bulunmuştur (Şekil 23) Bulunan $\lambda_{\max}$ değerlerinin literatürlerde belirtilen dalga boylarına uygun olduğu açıkça görüldü (15 ,46,77).

Miktar tayini yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için, ICH kriterleri esas alınarak analitik yöntem validasyonu çalışmaları yapıldı (108). Validasyon için yapılan çalışmalarda doğrusallık, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), özgünlük (seçicilik), teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ) ve stabilite parametreleri incelendi.

Doğrusallık çalışmalarında, çalışılan konsantrasyon aralığında konsantrasyon-eğri altı alan ilişkisinin doğrusal olduğu görüldü. Bu doğrusallığın göstergesi olan determinasyon katsayısı (r^2), kafeinin standart doğru denklemi için, UV spektrofotometre ve UPSK yöntemleri ile sırasıyla 0.9991 ve 0.9934 olarak bulundu.

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmaları üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi. Yapılan çalışmanın sonucunda, elde edilen değerlerle hesaplanan % Geri Elde değerlerinin ortalaması ve bu dağılımının standart sapması yöntemlerin doğruluğunu onaylamaktadır (Tablo 1 ve Tablo 2).

Kesinlik tayininde, etkin maddenin standart doğru çizimlerinde kullanılan ortamlarından hazırlanan herhangi bir konsantrasyondaki çözeltisi seçilerek tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri uygulandı. Varyasyon katsayılarının %2'nin altında olması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır (Tablo 3 ve Tablo 4).

Özgünlüğün saptanabilmesi için; çalışmada kullanılan polimerlerin ve yardımcı maddelerin, 200-400 nm dalga boyları arasında spektrumları incelendi. Kafeinin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunda, yardımcı maddelerin herhangi bir absorpsiyon vermedikleri görüldü ve yöntemin etkin maddeye özgü olduğu bulundu (Şekil 26)

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, örnek içerisindeki teşhis edilen fakat kesinlikle kantitatif olarak tam miktarının belirlenmesine gerek olmayan analitin en küçük miktarıdır. En düşük değere karşılık gelen alan değerleri, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölündü ve standart sapma hesaplandı. Bu değer 3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD: $0.043 \pm 0.060 \mu\text{g/mL}$); 10 ile çarpılarak tayin sınırı (LOQ: $0.144 \pm 0.200 \mu\text{g/mL}$) belirlendi.

Stabilite çalışmalarında ise, etkin maddelerin çözünme ortamında 48 saat boyunca stabilitesi incelendi ve elde edilen konsantrasyon değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Tablo 8 ve Tablo 9). Bunun sonucu olarak, kafeinin bu süre boyunca stabil olduğu sonucuna varıldı.

Formülasyon çalışmalarında, öncelikle HA kullanılarak mikropartikül formülasyonları hazırlandı. Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda özellikle dermal ve transdermal uygulamalarda ilacın salım süresini uzatması ve biyoparçalanabilen polimerler ile sinerjik etkinin sağlanması amacıyla ilgi çeken formülasyonlardır. Mikropartiküller doku onarımı alanında sentetik ve doğal polimerler ile hazırlanabilmektedirler. Hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan ECM bileşenleri ile formüle edilmiş mikropartiküller hücre oluşumunu hızlandırmak ve yaygınlaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Kolajen ile modifiye edilmiş HA mikropartiküllerinden *in vitro* antibiyotik salımının incelendiği bir çalışmada salımın kontrollü bir şekilde devam ettiği gözlenmiştir (67). Yapılan bir diğer çalışmada, hidrokortizon yüklü HA mikropartiküllerinden salım karakterinin sıfıncı dereceden olduğu belirtilmiştir (14). ECM'nin yapısındaki GAG türevlerinden HA, CD44 gibi spesifik hücre reseptörleri tarafından tanınarak, adezyon, hücre göçü ve oluşumu gibi hücresel fonksiyonları etkileyerek doku onarımını artırdığı bildirilmiştir. (75). HA bakımından zengin bir ortam, hücre

hareketliliğinin ve çoğalmasının devamının sağlanması açısından gereklidir (82,123). Ayrıca hücrelerin etrafında oluşturduğu ağ yapı serbest oksijen radikallerinin hücrelere ulaşmasını engelleyerek doku onarımını hızlandırmaktadır (76,78). HA'nın hidrolitik degradasyona uğraması sonucu oluşan ürünlerin biyoyumlu olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, HA ile hazırlanan mikropartiküllerden ilacın salımı *in vitro* deriden geçiş deneyleri ile incelenmiş, sidofovir içeren mikropartiküller ile ilacın epidermada kalış süresinin arttığı ve deriden geçişinin azaldığı gözlenmiştir. Hazırlanan mikropartiküllerin deri ile ilacın uzun süre temasını sağlayan ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Başka bir çalışmada, PLGA polimeri ile püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak bupivakainin mikroküreleri hazırlanmıştır. Koyunlarda yapılan *in vivo* çalışma ile mikrokürelerden ilaç salım zamanının uzadığı kanıtlanmıştır (20). Vitamin C içeren Eudragit® mikrokürelerinin hazırlandığı başka bir çalışmada ise, *in vitro* salım deney bulgularına dayanarak vitamin C içeren mikrokürelerin sürekli salım yaptığı kanıtlanmıştır (39).

Tez çalışmamızda mikropartiküller, püskürterek kurutma (spray-drying) yöntemi ile hazırlanmış olup, Buchi B-290 cihazı kullanılmıştır. Son yıllarda yüksek verimde ve yükleme kapasitesinde, düzgün yüzeye sahip, küresel mikropartiküllerin hazırlanmasına olanak vermesi ve basit/tekrarlanabilir/hızlı/kolay bir yöntem olması ve organik çözücülerden gelen toksik reaksiyonlara neden olmaması açısından bu yöntem sıklıkla tercih edilmektedir (24,25). Ayrıca büyük çapta üretime olanak sağlaması da bir diğer avantajıdır. Pavanetto ve ark. (84), püskürterek kurutma yöntemi ile model ilaç olarak deksametazon içeren sığır serum albumini mikrokürelerini hazırlamışlar ve mikropartiküllerin partikül büyüklüğünün 10 µm'den küçük olduğunu bulmuşlardır. Formülasyonda kullanılan polimer-ilac oranı ve farklı

sıcaklık-stabilizasyon koşullarının, mikrokürelerin morfolojisi, büyüklüğü, ilaç tutma kapasitesi ve mikrokürelerden *in vitro* ilaç salımı üzerine etkileri değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak; püskürterek kurutma yönteminin hızlı bir yöntem olduğu, ilave bir çözücü veya yağ fazı gerektirmediği ve lipofilik karakterdeki ilaçların albumin mikroküreleri ile hazırlanabildiği ve bu yöntem ile büyük miktarda üretimin yapılabilceği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ise Santoyo ve ark. (102), antiviral bir ilaç olan sidofovir içeren PLGA mikropartiküllerini püskürterek kurutma yöntemi ve çözücü uçurma yöntemleriyle hazırlamışlardır. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikropartiküllerin ilaç tutma kapasitesinin çok daha yüksek olduğunu (%80) saptamışlardır. Huang ve ark. (55) püskürterek kurutma yöntemi ile model ilaç olarak seçilen betametazonun mikrokürelerini hazırlamışlar ve bu mikropartiküllerin küresel, düzgün yüzeyli ve homojen partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu saptamışlardır.

Mikropartiküllerin hazırlanması için, öncelikle %0.2 HA konsantrasyonu ile çalışıldı ve uygun çalışma koşullarını belirlemek için cihaz parametreleri (giriş sıcaklığı, püskürtme hızı, aspiratör hızı, pompa akış hızı) değiştirildi. Yapılan literatür taramaları sonucunda, püskürterek kurutma yönteminde kullanılan basınçlı havanın akış hızının artması ile, elde edilen mikropartiküllerin büyüklüğünün düştüğü gözlenmiştir (44) Peristaltik pompanın hızının artırılması birim zamanda püskürtülecek çözelti miktarını da arttırmakta sonuçta partikül büyüklüğü artmakta ayrıca elde edilen küreler tam olarak kuruyamamaktadır (55). Ayrıca, sisteme uygulanan vakumdaki artış çok küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrokürelerin çözücü buharı ile birlikte çekilerek verimin düşmesine neden olmaktadır. (44) Ayrıca kullanılan iğnenin uç açıklığı azaltılırsa püsküren çözelti damlacıklarında küçülmekte ve sonuçta daha küçük mikropartiküller elde edilmektedir.

En yüksek verimin (92 ± 0.8) giriş sıcaklığı ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$), püskürtme hızı (600L/h), aspiratör (100), pompa (50) koşullarında elde edildiği bulunmuş ve kafein içeren mikropartiküllerin bu koşullarda çalışılmasına karar verilmiştir. Püskürterek kurutma yöntemi ile bu koşullarda çalışma esnasında, siklon çevresinde partiküller yapışmamış ve numune toplama kabında rahatlıkla toplanabilmiştir. Dış sıcaklık $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ civarında ve basınç yaklaşık -75 mBar olarak gözlenmiştir.

Polimer konsantrasyonunun salım üzerine etkisi olup olmadığını bulmak için ayrıca 0.5 konsantrasyonda HA ile de çalışma tekrarlanmıştır. Kafein yüklü formülasyonlarda etkin madde içeriği 0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Mikropartiküllerin karakterizasyon çalışmaları partikül büyüklüğü, etkin madde yükleme kapasitesi ve termal analizler ile değerlendirildi. Sırasıyla 0.2 ve 0.5 HA ile hazırlanan boş (F1 ve F3) ve kafein yüklü (F2 ve F4) mikropartiküller için partikül boyutu ortalama 22.42 ± 0.5 , 32.28 ± 0.4 , 28.28 ± 0.2 ve 33.97 ± 0.3 olarak bulunmuştur. Literatür taramaları sonucunda, kullanılan polimer konsantrasyonunun artırılmasının partikül büyüklüğünü artırdığı gözlenmiştir (83).

Span indeksi partiküllerin homojenliğinin bir göstergesi olup, $d_{90}-d_{10}/d_{50}$ (10 , 50 , 90 partikül büyüklüğü dağılımı) formülü ile hesaplanmaktadır. Span değerinin 2 'nin altında bulunması partiküllerin homojen dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (83). SEM çalışması sonucunda, püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen kafein yüklü mikropartikül formülasyonunun (F4) küresel şekilli olduğu gözlenmiştir. Elde edilen etkin madde yükleme kapasitesi ise 88.56 olarak bulunmuş olup, benzer şekilde bu yöntemle yapılan çalışmalarda etkin madde yükleme kapasitesi de genellikle 80 'in üzerinde bulunmuştur (35,6880).

Etkin maddenin formülasyon içindeki fiziksel durumunu değerlendirmek için DTK çalışmaları yapılmıştır. Kafein ve HA fiziksel karışımında kafeine dair pikler

görülmüştür. Buna rağmen F3 ve F4 formülasyonlarında bu pik kaybolmuştur. Bu durum kafeinin mikropartikül içinde kristal halde olmayıp, amorf halde olmasıyla açıklanmıştır.

Formülasyonların sterilizasyonu için UV lamba kullanılmıştır. 24 saat UV kabinde bekletilen mikropartiküllerin sterilite kontrolleri kanlı agar besiyerinde yapılmış, kontrol grubu (*Escherichia coli* ATCC standart kökeninden 100 koloni forming unit (CFU) süspansiyon ekilmiş besiyeri) ile kıyaslandığında bulanıklık yani üreme olmadığı gözlenmiştir.

Hazırlanan mikropartikül formülasyonları topikal uygulamada uygun viskoziteyi verecek jel formülasyonları içerisinde dağıtılması planlanlandı. Ancak, HA suda çözünür özellikte olduğu için sistemin organojel olarak hazırlanmasına karar verildi. Organojeller, organik çözücü ile jel yapıcı maddeden oluşmuş yan katı sistemlerdir. Lesitin organojelleri, farklı fizikokimyasal özellikteki molekülleri taşıyabilmeleri, deri iritasyonlarının düşük olması, deriye penetrasyonu artırması, biyogeçimli olması, kolay hazırlanabilmesi, stabil olmaları gibi üstünlükleri nedeni ile son yıllarda topikal uygulamalarda tercih edilmektedirler.

Lesitin, tüm yaşayan hücreler için önemli bir bileşendir ve Amerikan Gıda ve İlaç dairesi tarafından (FDA) GRAS (Genellikle güvenilir olarak kabul edilmektedir . Özgün lipit moleküler yapısı sayesinde kullanıldığı formülasyonlarda birden çok fonksiyonu üstlenmektedir. Emülgatör, viskozite değiştirici ajan, stabiliteyi arttırıcı ajan, çözünürlük ve penetrasyon arttırıcı olarak ilaç, kozmetik ve gıda endüstrilerinde çok çeşitli rollere sahip olmaktadır. (115)

Organojeller, jel yapıcı madde ve çözücü karışımının ısıtılması ve daha sonra karışımın soğutulması ile hazırlanmaktadır. Çalışmamızda, lesitin organojelleri lesitin izopropil miristat (IPM) içinde ısıtılması (40 C°) ve sonra su/gliserin

karışımının ilave edilmesi ile soğutulması yöntemi ile oluşturulmuştur. Hazırlama sırasında çözücünün fazla eklenmesi ve sıcaklığın fazla artırılması, jelin stabilitesinin bozulmasına ve faz ayırmasına yol açmıştır. IPM, cildin su kaybını önleyerek, cildi normal su seviyesinde tutabilmek için cilt üzerinde su tutucu bir tabaka oluşturur. Su/gliserin karışımı ise daha kıvamlı ve stabil bir organojel hazırlamasına olanak verir (72).

Hazırlanan organojeller içine % 0.1 etkin madde oranında olacak şekilde kafein, F3 ve F4 mikropartikül formülasyonları eklenmiş ve bu jel formülasyonları üzerinde, makroskobik incelemeler, pH, reoloji ve viskozite ölçümleri, mekanik karakterizasyon ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan jellerin sarımsı renkte ve cilde uygulamak için uygun pH değerlerinde olduğu bulunmuştur (5.75-6.05) (Tablo 18).

Jel tipi formülasyonlarda, ilacın gerek üretim aşamasında gerek ambalajlanmasında gerekse kullanımı sırasında optimum bir viskozite değerine sahip olması önem taşımaktadır. Bu nedenle, yapılan tüm formülasyon çalışmalarının bu yönde incelenmeleri gerekmektedir (72). Etkin madde ve mikropartikül içeren jeller için viskozite değerleri yaklaşık 4500 cps olarak ölçüldü. Organojeller kafein ilavesinin de viskozite değeri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptandı (Tablo17-18).

Ayrıca, döndürme ile jel yapısında oluşabilecek değişiklikleri gözlemlemek amacı ile organojellerin Haake osilasyon reometresi kullanılarak reolojik kontrolleri yapıldı. Etkin madde içermeyen (O-B), etkin madde yüklü (O-K) ve mikropartikül içeren (O-F4) lesitin organojel formülasyonlarının yapılan ölçümleri sonucunda, jellerinin psödoplastik özellikte olduğu gözlemlendi. Kayma hızındaki artışa bağlı olarak formülasyonların viskoziteleri azalmıştır (Kayma ile incelen-shear thinning sistem).

Osilasyon çalışmaları için öncelikle viskoelastik bölgenin bulunması için stress sweep testi uygulandı ve jellerin ortak kırılma noktası (crossover point) 10Pa olarak belirlendi (Şekil 30). G' (elastik modül) değeri G'' (viskoz modül) değerleri bulunarak grafik çizildi ve organojellerin 0-4 frekans aralığında gerçek jel yapısında olduğu ($G' > G''$), daha sonra ise jel yapısının bozulduğu gözlemlendi ($G' < G''$).

Topikal olarak uygulanan yarı katı preparatların, hastanın preparattan mümkün olduğunca fayda görmesi için belirli mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Jelin primer ambalajından kolayca çıkabilmesi, sürülebilmesi, yayılabilmesi ve adezifliği sayesinde ürünün istenen bölgede dağılmadan kalabilmesi topikal jellerin tasarımında önemli parametrelerdir (58). Jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için, Stable Micro System Texture Analyser cihazı kullanılarak Texture Profile Analysis (TPA) analizleri yapılmıştır.

Jellerin mekanik karakterizasyonunda, sertlik, adeziflik, koheziflik, sıkışabilirlik ve elastikiyet parametreleri kullanıldı. O-B, O-K ve O-F4 organojellerinin sertlik değerleri sırasıyla 0.011 ± 0.002 , 0.025 ± 0.001 ve 0.018 ± 0.002 N olarak belirlendi. Bu sonuç, topikal olarak jel formülasyonlarının uygulanması için uygun bir sertlik değeridir. Jel formülasyonunu tüpten kolayca çıkarabilmek ve uygulama bölgesine kolayca yayabilmek için, sıkıştırılabilirlik değerinin küçük olması oldukça önemlidir. Lesitin organojellerinin sıkıştırılabilirlik değerleri yaklaşık 0.02 N.mm olarak belirlendi. Adeziflik değeri yüksek olması, formülasyonun uygulama bölgesinde uzun süre kalabilmesini belirleyen bir parametredir. F4 mikropartikül formülasyonu içeren organojellerinin adeziflik ve koheziflik değerleri sırasıyla 0.042 ± 0.002 ve 0.811 ± 0.013 olarak hesaplandı ve bu değerler topikal olarak jel uygulanması için elverişli bulundu. Son olarak, O-F4 organojellerinin elastikiyet değerleri ise 0.884 ± 0.049 olarak hesaplandı. TPA

analizlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, projemizde hazırlanan O-F4 organojel formülasyonunun topikal uygulama için uygun mekanik özelliklere sahip olduğu söylenebilmektedir.

İlaçların raf ömrü boyunca ve hasta kullanımına ulaştığı ana kadar etkin ve güvenilir olmaları gerekmektedir. Bir ilacın stabilitesi denildiği zaman, bir çok faktör bir arada değerlendirilir: Örneğin bir dozaj şeklini oluşturan etkin maddenin kimyasal özellikleri, formüle giren yardımcı maddelerin ilaç molekülü ile etkileşimi, son ürünün yüksek sıcaklık, ışık ve rutubet gibi dış ortam şartları ile karşılaşma ihtimali bir farmasötik ürünün stabilitesini belirler. Stabilite bir ilaç molekülünden beklenen farmakolojik etkinin görülebilmesi için bir ön şarttır. Bu sebeplerden dolayı, hazırlanan tüm mikropartikül ve jel formülasyonları (boş ve etkin madde içeren) $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve % 60 ± 5 relatif rutubet ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve % 75 ± 5 relatif rutubet koşullarında 6 ay süre ile stabilite kabinlerinde bekletilerek formülasyonların stabilitesi incelendi. Yapılan stabilite çalışmaları sonucunda; $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve % 60 ± 5 relatif rutubet koşullarında tutulan numunelere yapılan kontrollerde, mikropartikül formülasyonlardaki etkin madde miktarında ve partikül büyüklüğünde anlamlı bir değişikliğin görülmediği, organojellerin ise viskozite, pH değerlerinin ve dış görünüşlerinin değişmediği belirlendi. (Tablo 17,18).

Formülasyonların karakterizasyon çalışmalarının tamamlanmasının ardından, *in vitro* salım ve *ex vivo* difüzyon çalışmalarına geçildi. *In vitro* salım çalışmaları UV spektrofotometre ile *ex-vivo* çalışmalar ise reseptör fazda bulunan etkin madde miktarının çok küçük olması sebebiyle daha hassas bir madde miktar tayinine olanak sağlayan UPSK yöntemi ile değerlendirilmiştir. Salım çalışmalarında difüzyon hücreleri kullanılmıştır. *In vitro* çalışmalar için diyaliz membranlar kullanılmıştır. Sıçan karın derisinden *ex-vivo* penetrasyon çalışmaları ise franz difüzyon hücreleri

kullanılarak yapılmıştır. *In vitro* çalışma sonucunda, kafein çözeltisi ile 2. saatin sonunda %100 salıma ulaşılırken, %0.5 HA ile hazırlanan mikropartiküller ile %0.2'lik ile hazırlananlara kıyasla daha uzun süreli salım elde edilmiştir. Genellikle mikropartiküler sistemlerden salım partikül büyüklüğü, polimer özellikleri, yüzey yükü, etkin madde/polimer oranı gibi özelliklerle ilişkilidir. Bunlara ek olarak salım hızı etkin maddenin çözünürlüğü, molekül ağırlığı ve mikropartiküler sistem içindeki konsantrasyonuna bağlıdır (17, 115). Organojellerde ise F4 mikropartikülleri içeren organojelin (O-F4) formülün artan polimer oranına bağlı olarak partikül boyutu, yükleme kapasitesi gibi etkenlerden yavaş salıma sahip olduğu, 24. saatin sonunda yaklaşık %70 ilaç salıverildiği gözlenmiştir (Şekil 35).

Sıçan karın derisinden *ex-vivo* penetrasyon çalışmaları ise franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Kafein içeren organojel ($8262 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ile kıyaslandığında, F4 mikropartikül formülasyonu içeren organojelden difüzyonun ($4676 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) yaklaşık %50 oranında azaldığı gözlenmiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 36).

In vitro salım ve sıçan karın derisinden *ex-vivo* penetrasyon çalışmaları sonucunda, kafein yüklü MP içeren F4 formülasyonu ile O-F4 formülasyonlarının diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında uzatılmış bir salım gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca O-F4 formülasyonunun yapısında yer alan ve bir fosfolipit olan Lesitin, biyolojik membranların lipid matriksini oluşturmakta ve hücrel metabolizmada anahtar rol oynamaktadır. MP lerin çeperini oluşturan HA ise, derinin temel yapısında bulunan ve cildin nemlenmesinden sorumlu, doku yenileyici bir madde olması nedeniyle sunulan formülasyonun içerdiği bu maddeler sayesinde kozmetik açıdan önemli sinerjik ve düzenleyici etkileri bulunmaktadır.

Çalışmamızın son bölümünde mikropartiküllerin *in vitro* insan dermal fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığının değeriendirilmesi için MTT yöntemi ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Sitotoksik olduğu bilinen TritonX-100 ile inkübe edilen grupla kıyaslandığında, kafein yüklü mikropartikül içeren F4 formülasyonunun hücre canlılığı üzerine anlamlı bir olumsuz etkiye neden olmadığı sonucu bulunmuştur (Şekil37).

BÖLÜM V

7 SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız tüm çalışmaların sonucunda, HA ile hazırlanan mikropartikül formülasyonları ile kafeinin salımının belirgin derecede uzatıldığı görüldü. Tez çalışmaları sırasında hazırlanan lesitin organojellerinin deride adezyonu artırarak kalış süresini artıracığı ve HA mikropartikül formülasyonlarının nemlendirici ve tedavi edici etkileri ile sinerjik bir etki oluşturarak selülit tedavisinde etkin olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; kafein yüklü HA mikropartikül- lesitin organojel formülasyonunun topikal selülit tedavisi için halen ilaç piyasasında bulunan konvansiyonel preparatlara, kafein + lesitin + HA içeren bir ürün olarak önemli bir alternatif olabileceği düşünülmekte ve tarafımızdan sunulmaktadır.

ÖZET

HYALURONAN MİKROPARTİKÜLLERİ İÇEREN DERMAL SİSTEMLERİN DOKU ONARIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Selülit, yağ hücrelerinin irileşmesi ve derinin esnekliğinin azalması sonucu olarak dermal hasara neden olan kozmetik bir bozukluktur. Bitkisel ekstraktlardan elde edilen kafein, kan dolaşımını arttırıcı, lipolitik ve lipojenezi inhibe edici etkileri nedeniyle selülit tedavisinde tercih edilen bir maddedir. Mikropartiküller farmasötik teknoloji alanında sıklıkla hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler olup, polimerik yapıları nedeniyle etkin maddenin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlarlar. Bu çalışmada, selülit tedavisinde uzun süre etkili yeni bir formülasyon geliştirilmesi ve etkinliklerinin optimize edilmesi amaçlandı.

Bu amaçla, yeni hücre oluşumu/hareketliliğinin devamını sağlayan ve nemlendirme özelliğine sahip doğal deri bileşenlerinden olan hyalüronik asit (hyaluronan-HA) ile kafein yüklü mikropartiküller püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlandı. Hazırlanan mikropartikül formülasyonları topikal uygulamada uygun viskoziteyi verecek lesitin organojel formülasyonları içerisinde dağıtıldı. Hazırlanan organojel formülasyonları pH, viskozite, reolojik ve mekanik özellikler ile karakterize edilirken, mikropartikül formülasyonları partikül büyüklüğü, morfolojik incelemeler ve etkin madde yükleme etkinliği parametreleri ile karakterize edildi. Formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\% 60 \pm 5$ relatif rutubet koşullarında 6 ay süre ile stabil kaldıkları belirlendi. Termal analizlerin

ardından, mikropartiküllerin diyaliz membrandan *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirildi. UV altında sterilize edildikten sonra, sitotoksik etkileri hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirildi. Formülasyonların sıçan karın derisinden *ex-vivo* difüzyon çalışmaları yapıldı. Mikropartikül içeren organojel formülasyonlarından kafein salımının anlamlı derecede uzadığı belirlendi ($p<0.05$).

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında, doğal deri bileşenlerinden oluşan bu dermal formülasyon ile selülit ile oluşan doku hasarına karşı hem daha etkin ve hem de nemlendirme özelliğine sahip yenilikçi bir formülasyon geliştirilmiştir. Ayrıca, kafein, HA ve lesitin maddelerinin kombinasyonu ile yapılan formülasyonların doku onarımı üzerine sinerjik etkisi ilk defa bu tez çalışması ile değerlendirilmiştir.

ABSTRACT

STUDY ON THE EFFECTS OF DERMAL SYSTEMS CONTAINING HYALURONAN MICROPARTICLES ON DERMAL TISSUE REPAIR

Cellulite is a cosmetic disorder that causes dermal damage as a result of the hypertrophy of fat cells and decrease in elasticity of the skin. Caffeine derived from plant extracts is a preferred agent in the treatment of cellulite through the effects of increase the blood circulation, lipolytic efficacy and inhibiting lipogenesis. Microparticles are drug delivery systems that are oftenly used in the field of pharmaceutical technology because of the polymeric structures that provides controlled and sustained release of the active ingredient. The purpose of this study was to develop and optimize a new formulation of a long-acting treatment of cellulite.

For this purpose, hyaluronic acid (hyaluronan-HA), a natural constituent of skin that generates formation and poliferation of new cells having a remarkable moisterizing ability and caffein loaded microparticles were prepared by spray-drying method. Prepared microparticle formulations were distributed in lecithin organogels to give the proper viscosity for topical application. While the prepared organogel formulations were characterized by pH, viscosity, rheological and mechanical properties, microparticle formulations were characterized by the parameters of the particle size and distribution, morphological features and loading efficiency of active substance. The stability of the formulations was studied at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $60 \pm 5\%$ relative humidity conditions and formulations showed good stability for a period of 6 months. Following the thermal analysis, *In vitro* permeation experiments of the

microparticles were performed by using dialysis membrane. Cytotoxic activities were evaluated by cell culture studies. after being sterilized under UV light. Ex vivo diffusion studies of the formulations were performed using rat abdominal skin and the results indicates that the release of caffeine increased significantly from the organogel formulations containing microparticles ($p < 0.05$).

In conclusion of this study, an innovative therapy. was developed with this topical formulation containing the natural components of the skin which is not only more effective in repairing the tissue damage caused by cellulite but has a moisturizing effect at the same time. Additionally, with the present study the synergistic effects of caffeine, HA and lecithine combination given in as a new formulation were evaluated for the first time on tissue repair.

REFERANSLAR

1. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S., Tırnaksız, F. (2007). Modern Farmasötik Teknoloji: Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, s. 337-361.
2. Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, Journal of Control. Release, 100: 5-28.
3. Aigner, J., Tegeler, J., Hutzler, P., Campoccia, D., Pavesio, A., Hammer, C., (1998).Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester, J ournal of Biomed. Mater. Res., 42 172,
4. Alpaslan, GH., Alpaslan, C., (2001 June) Efficacy of temporomandibular joint arthrocentesis with and without injection of sodium hyaluronate in treatment of internal derangements. Journal of Oral Maxillofac Surgery;59(6):613-8; discussion 618-9.
5. Altman, RD., Moskowitz, R., (1998 November) Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. Journal of Rheumatology;25(11):2203-12
6. Alvarez-Figueroa, M.J., Delgada-Charro, M.B., Blanco-Mendez, J. (2001). Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate, Int. J ournal of. Pharmaceutical sciences., 212: 101-107.
7. Anand, B., Pisal, S.S., Paradkar. A.R .. Mahadik. K.R. (2001). Applications of organogels in pharmaceuticals. Journal of Scientific & Industrial Research. 60 311-318
8. Barrandon, Y., Green, H.,(1987) Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The role of transforming growth factor c and epidermal growth factor, Cell, 50 1131-1137

9. Barry, B.W. (1983). Basic principles of diffusion through membranes, Dermatological Formulations. Marcel Dekker Inc., New York, s. 49-94.
10. Barry, B.W. (1983). Properties that influence percutaneous absorption, Dermatological Formulations: Marcel Dekker Inc., New York, s. 127-234.
11. Barry, W.B. (1983). Basic principles of diffusion through membranes. J. Swarbrick (Ed.). Dermatological Formulations. Marcel Dekker Inc. New York, s. 49-89.
12. Belgamwar, V.S., Pandev. M.S .. Chauk. D.S.. Surana. S.J. (2008 July-September). Pluronic lecithin organogel. Asian Journal of Pharmaceutics.. 1.34-138.
13. Benedetti, L., Cortivo, R., Berti, T., (1993) Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HYAFF) implanted in rats, Biomaterials, 14 (15):1135-1139
14. Benedetti, L., Joshi, H.N., Goei, L., (1991). Dosage forms from polymeric prodrugs: hydrocortisone esters of hyaluronic acid, New Polymeric Matter, 3 (1): 41-48,
15. Bennett AW, Bonnie KB (2001). The world of caffeine: The science and culture of the World's most popular drug. Routledge, ISBN 0415927226, p. 228.
16. Berg, D.,(1990) Venous constriction by local administration of ruscus extract [in German]. Fortschr Med 108:473-476,
17. Berge G, Øvrebø S, Botnen IV, Høwer A, Phillips DH, Haugen A, Møllerup S.Br., (2004 July) Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. Journal of Cancer. 19;91(2):333-8.
18. Bertin, C., Zunino, H., Pittet, J.C., et al.(2001) A double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinol, caffeine, and ruscogenine by a combination of several non-invasive methods. JOURNAL OF Cosmet Sci 52:199-210,
19. Bhatnagar, S., Vyas, S.P. (1994). Organogel-based system for transdermal delivery. Journal of Microencapsulation, 11 (4), 431-438

20. Blanco MD, Bernardo MV, Sastre RL, Olmo R, Muñiz E, Teijón JM. (2003 March) Preparation of bupivacaine-loaded poly(epsilon-caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm.*;55(2):229-36.
21. Botanicals AFS: A Phytocosmetic Desk Reference. Boca Raton, FL, CRC Press, 1999
22. British Pharmacopeia, (2007). Volume 1&2, Monographs: Medicinal and pharmaceutical substances, 2007
23. Brown, W., Rymden, R. (1986). Diffusion of Polystyrene Latex Spheres in Polymer Solutions Studied by Dynamic Light Scattering, *Macromolecules*, Vol.19,No.12, 2943-2952,
24. Buchi Labortechnik AG, Training Papers Spray Drying, pp.11, 7.
25. Buchi Operation Manual B-290, Version G, pp. 34.
26. Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G., Williams, D.F., (1998). Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification, *Biomaterials*, 19: 2101-2127
27. Capitani, D., Segre, AL., Dreher, F., Walde, P., Luisi, P.L. (1996). Multinuclear NMR investigation of phosphatidylcholine organogels. *Journal of Physics and Chemistry*, 100, 15211-15217.
28. Carle R: Anti-inflammatory and spasmolytic botanical drugs. *Breast J Phytother* 1:32-39, 1990
29. Carter, W.G., Ryan, M.C., Gahr, P.J., (1991). Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha 3 \beta 1$ in epithelial basement membranes, *Cell*, 65:599-610
30. Cellulite GMP: A review of current treatments. *Cosmet Dermatol* 15:17-20, 2002
31. Chien, Y.W., Cabana, B.E., Mares, S.E. (1982). *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker Inc., New York, s. 193.
32. Collis N, Elliot LA, Sharpe C, et al. (1999). Cellulite treatment: A myth or reality: A prospective randomized, controlled trial of two therapies, endermologie and aminophylline cream. *Plast Reconstr Surg* 104:1110-1114,

33. De Brugerolle de Fraissinette. A., Picarles, V., Chibout, S., Kolopp, M., Medina, I., Burtin, P .. Ebelin, M.E .. Osborne, S., Mayer, F.K., Spake, A., Rosdy, M., De Wever, B .. Ettlin, R.A .. Cordier, A.(1999). Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of vehicles. *Cell Biology and Toxicology*. 15,121-1-35.
34. Değim, I.T. (1996). Physico-chemical determinants of skin penetration, Ph. D. Thesis, Welsh School of Pharmacy, University of Wales College of Cardiff, Cardiff, U. K.
35. Değim, Z., Çelebi, N., Sayan, H., Babul, A., Erdoğan, D., Take, G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine–chitosan gel formulation, *Amino Acids*, 22:187–198,
36. Dias, M., Farinha, A., Faustino, E., et al.(1999). Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *International Journal of Pharmacy* 182:41-47,
37. Draelos, Z.D., Marenus, K.D.(1997). Cellulite. Etiology and purported treatment. *Dermatological Surgery* 23:1177-1181,
38. Dreher, F., Walde, P., Walther, P., Wehrli, E. (1997). Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport. *Journal of Controlled Release*. 45.131-140.
39. Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti, E., Nastruzzi, C., Cortesi, R. (2002 August) Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C..*Int J Pharm*. 21;242(1-2):329-34
40. Esposito, A. Piancastelli, A.L. Costa, M. Serantoni, G. Toci, M. Vannini, (2011) *Opt. Mater*. 33 346.
41. Esposito, E., Leaver, M., Walker, M., Waddington, R.J., Parsons, D., Chen, W.Y.J., Embury, G., (2005).Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study, *Int. J. Pharm.*, 288: 35–49,
42. Facino, R.M., Carini, M., Stefani, R., et al. (1995): Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors contributing to their

- efficacy in the treatment of venous insufficiency. Arch Pharm (Weinheim) 328:720-724,
43. Fuji, M., Takeda, Y., Yoshida, M., Matsumoto, M., and Watanabe, Y.(2004). Enhancement effect of p-methane-3,8-diol on in vitro permeation of antipyrine and indomethacin through Yucatan micropig skin. Drug. Dev. Ind. Pharm. 30: 673-677.
 44. Giunchedi, P., Juliano, C., Gavini, E., Cossu, M., Sorrenti, M., (2002 March) Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. Eur Journal of Pharmacy and Biopharmacy.;53(2):233-9.
 45. Grinnell, F., Ho, C.H., Wysocki, A., (1992). Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound, Investigation Dermatology., 98 (4): 410-416,
 46. Guzin, A. (2002). Derivative spectrophotometer determination of caffeine in some Beverages. Turkish Journal of Chemistry., 26: 295–302.
 47. Gürsoy, A.Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri: Transdermal Sistemler, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, s. 239-260.
 48. Harvard Women's Health Watch Cellulite meltdown. Harv Health Pub Group 5:7, 1998
 49. Hasçıçek, C., Gönül, N., Erk, N., (2003 January) Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulfate for nasal administration: preparation and in vitro characterization. Farmaco.;58(1):11-6.
 50. Hekimoğlu, S. (2004). Sıvıların Akış Özelliği (Reoloji L. A.Z. Gürsoy (Ed). Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. (15-26). İstanbul: Pikel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti.
 51. Hexsel, D., Orlandi, C., Zechmeister do Prado, D., et al. (2005). Botanical extracts used in the treatment of cellulite. Dermatol Surg 31:866-873,
 52. Hexsel, D., Zechmeister do Prado, D., Goldman, M.P. (2010) Topical management of cellulite, in Goldman M, Hexsel D (eds): Cellulite: Pathophysiology and Treatment. London, England, Informa Health Care, , pp 62-68

53. Hexsel, D.M., Abreu, M., Rodrigues, T.C., et al. (2009) Side-by-side comparison of areas with and without cellulite depressions using magnetic resonance imaging. *Dermatological Surgery* 35:1471-1477,
54. Hitachi High-Tech Science Corporation TA no.15 apr.1984 ‘‘Thermal Analysis of Caffeine
55. Huang, Y.C., Yeh, M.K., Cheng, S.N., Chiang, C.H. (2003 July-August) The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal of Microencapsulation.*;20(4):459-72.
56. Jadhav, K..R ., Kadam,V.I., Pisal, S.S. (2009). Formulation and Evaluation of Lecithin Organogel for Topical Delivery of Fluconazole. *Current Drug Delivery* 6 (2),174-183
57. Junginger, H.E. (2002). Human skin- The medium of touch, *Advanced Drug Delivery Rev.*, 54(1): S1-S2.
58. Karavana, S.Y, Güneri, T., Ertan, G.(2009). Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: preparation, rheological, textural, mucoadhesive and release properties.*Pharmaceutical Developmant and Technology.*;14(6):623-31.
59. Kas, H.S. ‘‘İlac Taşıyıcı Partikuler Sistemler’’ in *Kontrollü Salım Sistemleri*, Gursoy, A.Z. (Ed.), Elma Bilgisayar Basım ve Amb. San. Tic. Ltd. Sti., İstanbul, 82 (2002).
60. Khan, M.H., Victor, F., Rao, B., et al. (2010). Treatment of cellulite: Part I. Pathophysiology. *Journal of American Academy of Dermatology* 62:361-370,
61. Khan, M.H., Victor, F., Rao, B., et al. (2010) Treatment of cellulite: part II. Advances and controversies. *Journal of American Academy of Dermatology* 62:373-384; quiz 385-6, 2010
62. Kikou, O., Mikrajuddin, A., Wuled,L., Ferry, I. (2006). Advanced Powder Technology 17 (6) 587.
63. Kim, S-S., Gwak, S-J., Choi, C.Y., Kim, B-S., (2005).Skin Regeneration Using Keratinocytes and Dermal Fibroblasts Cultured on Biodegradable Microspherical Polymer Scaffolds, *Appl Biomater*, 75B: 369–377,

64. Kligman, A.M., Pagnoni, A., Stoudmayer, T.(1999)Topical retinol improves cellulite. *Journal of Dermatological Treatment*. 10:119-125,
65. Kumar, R., Katare, O.P. (2005). Lecithin organogels as a potential Phospholipid structured system for topical drug delivery: A Review. *AAP S Pharmaceutical Sciences and Technology*. 6 (2). Article 40. 298-310.
66. Lai, P.M., Roberts, M.S. (1999). An analysis of solute structure-human epidermal transport relationships in epidermal iontophoresis using the ionic mobility: pore model, *Journal of Controlled Release*, 58: 323-333.
67. Lee, J.E., Park, J.-C., Kim, J.-G., Suh, H. (2001).Preparation of collagen modified hyaluronan micoparticles as antibiotic carrier, *Yonsei Med, J* 42: 291-298,
68. Leibovich, S.J., Ross, R., (1975).The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum, *American Journal of Pathology*, 78:71–100,
69. Lesser, T., Ritvo, E., Moy, L.S., et al. (1999). Modification of subcutaneous adipose tissue by a methylxanthine formulation: A double-blind controlled study. *Dermatol Surg* 25:445-462,
70. Lotte, C., Rougier, A., Wilson, D., Maibach, H. (1987). In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: Effect of anatomic site, *Arch. Dermatol. Res.*, 279: 351-356.
71. Machinal-Quélin, F., Dieudonné, M.N., Leneveu, M.C., et al. (2001). Expression studies of key adipogenic transcriptional factors reveal that the antiadipogenic properties of retinol in primary cultured human preadipocytes are due to retinol per se. *International Journal of Cosmetic Sciences*, 23:299-308,
72. Mandal, S., Mandal, S.S., Sawant, K. (2010). Lecithin stabilized organogel: Design and development for topical application of Clobetasol propionate, *International Journal of Pharmaceutical Technology Research Coden (USA): IJPRIF ISSN : 0974-4304 Vol.2, No.2, pp 1133-1138*,

73. Manela-Azulay, M., Bagatin, E. (2009). Cosmeceuticals vitamins. *Clinical Dermatology* 27:469-474,
74. Martin, K.L., Ailor, S.K. An ounce of prevention. *Mo Med* 108:64-68, (2011).
75. Martin P., Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration, *Science*, 276: 75-81, (1997).
76. Mendoza, G., Prieto, J.G., Real, R., Pérez, M., Merino, G., Alvarez, A.I., (2009). Antioxidant Profile of Hyaluronan: Physico-Chemical Features and its Role in Pathologies, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9: 1479-1488,
77. Misra, H., Mehta, D., Mehta, B.K., Soni, M., Jain, D.C. (2009). Study of extraction and HPTLC – UV method for estimation of caffeine in marketed tea granules. *Int. Journal of Green Pharm.*, 3(1): 47–51.
78. Moseley, R., Leaver, M., Walker, M., Waddington, R.J., Parsons, D., Chen, W.Y., Embury, G., Comparison of the antioxidant properties of HYAFFs-11p75, AQUACELs and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro, *Biomaterials*, 23: 2255–2264
79. Murdan, S. (2005). Organogels in drug delivery. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 2(3),489-505
80. Müller, S., Jensen, M., Svensson, P., Skakkebaek, N.E., (1991). Insulin-like growth factor I (IGF-I) in burn patients, *Burns*, 17 (4):279–281,
81. Nasser, A.A., Aboofazeli, R., Zia. H.. Needham. I.E. (2003). Lecithin.stabilized microemulsion-based organogels for topical application of ketorolac tromethamine. In vitro release study. *iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 117-123
82. Neudecker, B.A., Maibach, H.I. Stern, R., *Hyaluronan: The Natural Skin Moisturizer, Cosmetics and Active Cosmetics* Ed: Elsner, P and maibach, H.I., Taylor&Francis Group U.S.A. 373-406, (2005).
83. Patel, M.R., San Martin-Gonzalez, M.F. (2012 January). Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Food Science.*;77(1):N8-13.doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02517.x.

84. Pavanetto, F., Genta, I., Giunchedi, P., Conti, B., Conte, U. (1994 July-August). Spray-dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone. *Journal of Microencapsulation*;11(4):445-54.
85. Pena, L.E., (1990). Topical drug delivery: Gel dosage forms: Theory, formulation, and processing, Marcel Dekker Inc., New York, s. 381-388.
86. Penzes, T., Blazso, G., Aigner, Z., Falkay, G., Eros, I. (2005). Topical Absorption of Piroxicam from Organogels in Vitro and In Vivo Correlations. *International Journal of Pharmaceutics*, 298. 47-54.
87. Penzes, T .. Csoka, L, Eros I. (2004). Rheological Analysis of the Structural Properties Effecting the Percutaneous Absorption and Stability in Pharmaceutical Organogels. *Rheologica Acta*, 43, 457-463.
88. Piérard, G.E, Nizet J.L., Piérard-Franchimont, C. (2000).vCellulite: From standing fat herniation to hypodermal stretch marks. *American Journal of Dermatopathology*. 22:34-47,
89. Pineapple, in The Lawrence Review of Natural Products Monograph System. Facts and Comparisons. St. Louis, MO, Wolters Kluwer, 2001
90. Pisal, S., Shelke, V., Mahadik, K., Kadam, S. (2004). Effect of organogel components on in vitro nasal delivery of propranolol hydrochloride. *AAPS Pharm.Sci'Tech*; 5 (4). article 63. 1-9.
91. Pisal, S.S., Paradkar. A.R .. Mahadik. K.R. (2001 April).Applications of organogels in Pharmaceuticals. *Journal of Scientific & Industrial Research*. No:4, 60, 311-318,
92. Potard, G., Laugel, C., Baillet, A., et al. (1999). Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies. *Int J Pharm* 189:249-260,
93. Pugh, W.J., Değim, T., Hadgraft, J. (2000). Epidermal permeability-penetrant structure relationship: 4. QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge, *Int. JOURNAL OF Pharm.*, 197: 203-211.
94. Querleux, B., Cornillon, C., Jolivet, O., et al.(2002). Anatomy and physiology of subcutaneous adipose tissue by in vivo magnetic resonance imaging and

- spectroscopy: Relationships with sex and presence of cellulite. *Skin Research and Technology* 8:118-124,
95. Rawlings, A.V. (2006). Cellulite and Its Treatment, *International Journal of Cosmetic Science*, 28:175-190.
 96. Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990). 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania.
 97. Ridley, A.J., Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70:389–399,
 98. Rogouet, R. Schaefer, H. (1997). Overview of in vitro cell culture Technologies and pharmaco-toxicological applications. *Toxicology in vitro*, 11,591-599
 99. Rossi, A.B.R., Vergnanini, A.L. (2000) Cellulite: a review. *Journal of European Academy of Dermatology, Venerol* 14:251-262,
 100. Rubanyi, G., Marcelon, G., Vanhoutte, (1984). P.M. Effect of temperature on the responsiveness of cutaneous veins to the extract of *Ruscus aculeatus*. *Gen Pharmacol* 15:431-434,
 101. Sainio, E.L., Rantanen, T., Kanerva, .L, et al. (2000). Ingredients and safety of cellulite creams. *Eur J Dermatol* 10:596-603,
 102. Santoyo, S., Ga de Jalón, E., Ygartua, P., Renedo, M.J., Blanco-Príeto, M.J. (2002 August). Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *International Journal of Pharmacy*. 21;242(1-2):107-13.
 103. Scartazzini, R., Luisi, P.L. (1988). Organogels from lecithin. *The Journal of Physical Chemistry*, 92. 829-833.
 104. Seal B.L., Otero T.C., Panitch A., Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater Sci Eng R* 34 147-230, (2001).
 105. Shaikh, I.M., Jadhav, KR .. Gide, P.S., Kadam, V.J., Pisal, S.S. (2006). Topical delivery of aceclofenac from lecithin organogels: prefomulation study. *Current Drug Delivery*, 3, 417-427.

106. Shaikh, I.M., Jadhav, K.R., Kadam, V.1., Pisal, S.S. (2007). Lecithin Organogels as a Drug Delivery System: A Review. *Drug Delivery Technology*, 7 (2),60-66.
107. Shaikh, I.M., Jadhav. S.L.. Jadhav, K.R., Kadam, V.J., Pisal, S.S. (2009) aceclofenac organogels: in vitro and in vivo characterization. *Current drug delivery*,6,1-7
108. Sharmin, R., Chowdhury, M. M., Mahbubul, H. S. (2012). Development and Validation of a Simple RP-HPLC Method for Determination of Caffeine in Pharmaceutical Dosage Forms *Asian journal of Pharm. Ana.*; Vol. 2: Issue 1, Pg 01-04
109. Shchipunov, Y.A. (1996). Phase Behavior of Lecithin at the Oil/Water Interface. *Langmuir*, 12,6443-6445.
110. Shchipunov, Y.A. (2001). Lecithin Organogel A Micellar System with Unique Properties. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*. 183-185.
111. Shchipunov. Y.A. (1997). Self-organising structures of lecithin. *Russian Chemical Reviews*. 6.301-322.
112. Shehipunov, Y.A., Durrsehmi T. Hoffmann. H. (1999). Electrorheological effects in lecithin organogels with water and glycerol. *Journal of Col/oid Intertace Sciences*, 212. 390-401.
113. Stashevskaya, K.S., Markvicheva, E.A., Strukova, S.M., Rusanova, A.V., Makarova, A.M., Gorbacheva, L.R., Prudchenko, I.A., Zubov, V.P., Grandfis, K., (2007). Biodegradable Microparticles with Immobilized Peptide for Wound Healing, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomed Chemistry*, 1 (2):147-154,
114. Structural and Dynamic Properties of Polymer-like Reverse Micelles. *The Journal of Physical Chemistry*; 94,3695-3701
115. Sushil, R. Santosh,S.,Bhadoriya,A., Vaibhav,U., Vijay, M. (2012). Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging, *Acta Pharmaceutica Sinica B*;2(1):8–15

116. Suzuki. M., Nakajima, Y .. Matsumoto. M .. Kimura, M .. Shirai, H., Hanabusa, K. (2004). In situ organogelation at room temperature: direct synthesis of gelators in organic solvents. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2, 1155-1159
117. Terech. P ., Weiss, R.G. (1997). Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels. *Chemistry Reviews*. 97. 3133-3159.
118. The United States Pharmacopeia National Formulary Supplement, USP XXIII, NF XVIII, 1995.
119. US Patent 6147121 - Skin toning by stimulating collagen synthesis/proliferation of dermal fibroblasts.
120. Velasco, M.V., Tano, C.T., Machado-Santelli, G.M., et al. (2008) Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue:Histological evaluation. *J Cosmet Dermatol* 7:23-29,
121. Vera, B., Lemperle, G., Gallo, R.L., (2002).Phagocytosis of Different Particulate Dermal Filler Substances by Human Macrophages and Skin Cells, *Dermatol Surg*, 28: 484–490,
122. Vintiloiu, A., Leroux, J.E. (2008). Organogels and their use in drug delivery a review. *Journal of Controlled Release*, 125. 179-192.
123. Werner, S., Peters, K.G., Longaker, M.T., Fuller-Pace, F., Bande, M.J., Williams, L.T., (1992)..Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 6896-6900,
124. Willimann, H., Walde, P., Luisi, P.L., Gazzaniga, A., Stroppolo, F. (1992). Lecithin Organogel as Matrix for Transdermal Transport of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81 (9),871-874.
125. Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., (1989).Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(3):933–937,
126. Yurtov, EX .. Murashova, KM. (2003). Lecithin Organogels in a Hydrocarbon Oil. *Kolloid journal*. 65 (1), 124-128.

127. Zatz, J. L., Kushla, G. P. (1996). Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems: Gels, Volume 2, Marcel Dekker, s. 399-421.
128. Zia, H.A., et al., (2003). Lecithin-Stabilized microemulsion-Based organogels for topical application of ketorolac tromethamine. II. in vitro release study. Iranian Journal of Pharmaceutical Research,. 2: p. 117-124.

TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN BİLDİRİLER

POSTER BİLDİRİSİ

E.E. Simsolo, İ. Özcan, Ö. Özer, Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microparticles for dermal delivery of caffeine, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), 128-129 pp., Antalya, Türkiye, Eylül 2012.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Doğum yeri ve tarihi : İzmir, 22.08.1968

Medeni durumu : Evli

İş adresi : 7371/72 sok. No: 26-1 Onur Mah. Bayraklı İzmir

e-posta adresi : info@eczanerey.com

Yabancı diller : İspanyolca, İngilizce

Eğitim Durumu

İlkokul : Musevi ilk okulu

Ortaokul : İzmir Özel Çamlaraltı Koleji

Lise : İzmir Atatürk Lisesi

Lisans : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Çalıştığı yerler

Rey Eczanesi, 2008-bugüne dek.