

**SİKLOSPORİN A İÇEREN  
MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONUNUN  
GELİŞTİRİLMESİ ve *İN VİTRO*  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. E. Dilek HÜNER  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SİKLOSPORİN A İÇEREN  
MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ  
ve İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Emine Dilek HÜNER**

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği uyarınca  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır.

**Danışman: Prof. Dr. E. Yasemin YAZAN**

Şubat-2003

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**E. Dilek HÜNER'in SİKLOSPORİN A İÇEREN MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONUNUN HAZIRLANMASI ve İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ** başlıklı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi, 18.02.2003 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından, Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Adı-Soyadı**

**İmza**

**Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. E. Yasemin YAZAN**

**Üye : Doç. Dr. Özgen ÖZER**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL**

**Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun**  
**05.02.2003** tarih ve **03/2** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü  
**Enstitü Müdürü**



## ÖZET

Çalışmanın amacı, pratik olarak suda çözünmeyen bir etkin madde olan siklosporin A'nın etkin ve kararlı y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonunu hazırlayarak, oküler kullanım için uygun yeni bir mikroemülsiyon formülasyonunun hazırlanıp, geliştirilmesidir. Bu amaçla, oküler kullanıma uygun, biyolojik olarak kabul edilebilir mikroemülsiyon bileşenleri seçilmiştir. Daha sonra literatürlerde belirtildiği şekilde y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Elde edilen bu mikroemülsiyon formülasyonu, saydam ve kararlı bir formülasyondur. Kararlılığı, mikroemülsiyon sisteminin damlacık boyutu dağılımından takip edilebilmektedir. 6 ay'dan uzun süre değişik ortamlarda saklanan mikroemülsiyon sistemlerinin damlacık boyutu dağılımında herhangi bir değişim görülmemiştir.

Siklosporin A, immünoşüpresif etkili bir etkin maddedir. Molekül ağırlığının büyük olması nedeniyle oldukça yüksek lipofiliteye sahiptir.

Siklosporin A, endojen tüveit'de, nefrotik sendromda, romatoid artrit ve özellikle kuru göz sendromunda kullanılmaktadır. Ancak, bu etkin maddenin piyasada oral kullanımlı preparatlarının bulunmasına karşın göze uygulanabilecek herhangi bir formülasyonu bulunmamaktadır. İşte tüm bu nedenlerden dolayı etkin madde olarak siklosporin A seçilmiş; ve bu etkin maddenin de mikroemülsiyon formülasyonunun uygun olacağı düşünülmüştür.

Mikroemülsiyon formülasyonu, yağlı faz olarak izopropil miristat, yüzey etkin madde olarak Montanox 60<sup>®</sup> (Polisorbat 60<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup>), yardımcı yüzey etkin madde olarak da polietilen glikol 400 ve distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Mikroemülsiyonların fiziksel görünüş, faz ayrışması, damlacık büyüklüğü, kırılma indisi, elektriksel iletkenlik ve pH gibi fiziksel özellikleri farklı sıcaklıklarda (4°C, 40°C, 40°C + %60 RH, 25°C) saklanarak belirlenmiştir. 4°C'de saklanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacıkları arasında görülen aglomerasyon nedeniyle, bu ortamda saklanmış formülasyonun kararlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yaptığımız bu çalışma sonucunda, mikroemülsiyonlar, kararlı olmaları, saydam olmaları ve etkin maddenin yapısını bozacak herhangi bir olumsuzluğa

neden olmaması gibi farmasötik özelliklere sahip olması nedeniyle, siklosporin A gibi suda çözünürlüğü zayıf, yüksek oranda lipofilik özellikli bir etkin maddenin oküler amaçlı kullanılması için uygun taşıyıcı sistemler olarak kabul edilebileceği belirlenmiştir. Ayrıca, y/s tipi mikroemülsiyonların saydam oldukları, göze uygulandıktan sonra hastanın görmesini olumsuz olarak etkilemeyeceği düşünüldüğünde, oldukça önemli bir farmasötik taşıyıcı sistemlerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Siklosporin A, Mikroemülsiyonlar, Kuru Göz.

## ABSTRACT

The purpose of the study is preparing and developing an appropriate novel microemulsion formulation for an ocular application by preparing active and stable o/w type microemulsion formulation of cyclosporin A whose aqueous solubility is low. For this purpose, microemulsion constituents which are biologically acceptable and appropriate for ocular use were chosen. O/w type microemulsion formulation was prepared as described in the literature. The microemulsion formulation obtained is a transparent and stable formulation. Its stability can be followed from the droplet size distribution of microemulsion system. No change was observed in droplet size distribution of microemulsion systems which were kept in different media for more than six months.

Cyclosporin A is an immunosuppressive active substance. It has quite high lipophylity due to its high molecular weight. Cyclosporin A is used in endogen uveitis, nephrotic syndrome, rheumatoid arthritis and especially in Dry Eye Syndrome. However, although this substance has commercially available oral preparations, it has no ophthalmic formulation. Considering all these reasons, cyclosporin A was chosen as an active substance and the microemulsion formulation was thought to be an appropriate delivery system.

Microemulsion formulation was prepared using isopropyl myristate as the oily phase, Montanox 60® (Polysorbate 60®, Tween 60®) as the surface active substance, polyethylene glycol as the co-surfactant and distilled water. Physical properties of microemulsions like physical appearance, phase separation, droplet size, refractive index, electrical conductivity and pH value were determined after keeping at different temperatures (4°C, 40°C, 40°C+60% relative humidity, 25°C). Because of the agglomeration observed between globules of the microemulsion kept at 4°C, it was determined that the formulation stored in this medium was not stable.

As a result of this study, microemulsions can be accepted as appropriate pharmaceutical systems for ophthalmic delivery since they are stable, transparent and that they do not lead to any chemical degradation of highly lipophilic active substance which are weakly soluble in water. Moreover, considering the transparency of o/w type microemulsions and no negative effect on the vision

after ophthalmic application , they are quite important pharmaceutical systems are quite important pharmaceutical systems when they are considered to be transparent and would not effect the vision of the patient after being applied to eye.

**Key Words:** Cyclosporin A, Microemulsions, Dry Eye.

## TEŞEKKÜR

Bana tüm bu çalışmam boyunca her türlü olanağı sağlayan, bilgi yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sonsuz bir anlayış ve iyi niyet göstererek çalışmamın her safhasında benimle aynı heyecanı paylaştığını hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Sayın Yasemin YAZAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda etkin madde olarak kullandığımız siklosporin A'yı sağlayan NOVARTİS İLAÇ SANAYİ FİRMASI'na teşekkür ederim.

Ön formülasyonların hazırlanmasından sonra çizilen üçgen faz diyagramında elde edilen mikroemülsiyon bölgesinin alanın hesaplanıp, ağırlık merkezinin hesaplanmasında yardımcı olan Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Matematik bölümünden Doç. Dr. Hüseyin AZCAN'a teşekkür ederim.

Hazırlamış olduğumuz formülasyonların kırılma indislerinin ölçümlerinde yardımcı olan BİBAM çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgilerini ve yardımlarını gördüğüm bölüm arkadaşlarım, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Bahar Selen KALAVA'ya, Araş. Gör. Ecz. Ebru CENGİZ'e, Araş. Gör. Ecz. Şakir Berker SEVİN'e, Araş. Gör. Ecz. Evrim AKYIL'a, Araş. Gör. Ecz. Murat Sami BERKMAN'a ve Kimyager Sefa AVCIER'e çok teşekkür ederim.

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

Emine Dilek HÜNER



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. MİKROEMÜLSİYONLAR	3
2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri	3
2.1.2. Tarihçesi	4
2.1.3. Mikroemülsiyonların Yapısı	4
2.1.4. Mikroemülsiyon Formülasyonunda Kullanılan Maddeler	7
2.1.4.1. Yağ Fazı	7
2.1.4.2. Yüzey Etkin Maddeler ve Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler	7
2.1.5. Mikroemülsiyonun Formülasyonu	10
2.1.6. Mikroemülsiyon ve Makroemülsiyon Arasındaki Farklar	11
2.1.7. Mikroemülsiyonların Üstünlükleri	12
2.1.8. Mikroemülsiyonlarda Viskozite	14
2.1.9. Mikroemülsiyonlarda Etkin Madde Serbestleşme Mekanizması	15
2.1.10. Mikroemülsiyonların Kararlılığı	15
2.1.11. Mikroemülsiyonların Uygulanma Şekilleri	16
2.1.11.1. Mikroemülsiyonların Topik Uygulanışı	16
2.1.11.2. Mikroemülsiyonların Dermal Uygulanışı	17
2.1.11.3. Mikroemülsiyonların Parenteral Uygulanışı	17
2.1.11.4. Mikroemülsiyonların Oral Uygulanışı	18
2.1.11.5. Mikroemülsiyonların Oküler Uygulanışı	19

2.2.	SİKLOSPORİN A	21
2.2.1.	Siklosporin A'nın Yapısı ve Genel Özellikleri	21
2.2.2.	Tarihçesi	22
2.2.3.	Etki Mekanizması	22
2.2.4.	Dozu	23
2.2.5.	Yan Etkiler	24
2.2.6.	Siklosporin A'nın Diğer Etkin Maddeler ile Etkileşimi	25
2.2.7.	Farmakolojik Özellikleri	26
2.2.8.	Ticari Şekilleri	27
2.2.9.	Biyoyararlanımı	28
2.2.10.	Farmakokinetik Özellikleri	28
2.2.11.	Siklosporin A'nın Miktar Tayini Yöntemleri	29
3.	GEREÇ ve YÖNTEMLER	30
3.1.	MADDE ve CİHAZLAR	30
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	30
3.1.2.	Kullanılan Maddeler	30
3.2.	YÖNTEMLER	31
3.2.1.	Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı	31
3.2.1.1.	Bileşenlerin Seçimi	31
3.2.1.2.	Üçgen Faz Diyagramının Çizimi	32
3.2.1.3.	Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı	33
3.2.1.3.1.	Üçgen Faz Diyagramının Çizimi için Gerekli Olan Ön Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı	33
3.2.1.3.2.	Siklosporin A İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı	35
3.2.1.4.	En Uygun (Optimum) Mikroemülsiyon Formülasyonunun Belirlenmesi	35
3.2.2.	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Özelliklerinin Belirlenmesi	36
3.2.2.1.	Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünüşü	36
3.2.2.2.	Mikroemülsiyonun Tipi	36
3.2.2.3.	Santrifüj	36

3.2.2.4.	Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi	36
3.2.2.5.	Mikroemülsiyonun Elektriksel İletkenliği	37
3.2.2.6.	Mikroemülsiyonun pH'sı	37
3.2.2.7.	Mikroemülsiyonun Damlacık Büyüklüğü	37
3.2.2.8.	Mikroemülsiyonun Kararlılık Çalışmaları	37
3.2.2.8.1.	Mikroemülsiyonun Santrifüjü	37
3.2.2.8.2.	Mikroemülsiyonun Tipi	38
3.2.2.8.3.	Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi	38
3.2.2.8.4.	Mikroemülsiyonun İletkenliği	38
3.2.2.8.5.	Mikroemülsiyonun pH Değerleri	38
3.2.2.8.6.	Mikroemülsiyonun Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	38
3.2.2.8.7.	Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü	39
4.	SONUÇ ve TARTIŞMA	39
4.1.	SONUÇLAR	39
4.1.1.	Formülasyonun Hazırlanmasına Ait Sonuçlar	39
4.1.1.1.	Mikroemülsiyon Bileşenlerinin Seçimi	39
4.1.1.2.	Üçgen Faz Diyagramının Çizimi	40
4.1.1.3.	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanışı	40
4.1.1.3.1.	Üçgen Faz Diyagramının Çizimi için Gerekli Olan Ön Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı	40
4.1.1.3.2.	Etkin Madde İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanışı	41
4.1.1.4.	Üçgen Faz Diyagramında En Uygun Mikroemülsiyon Formülasyonunun Belirlenmesi	41
4.1.2.	Mikroemülsiyonun Fiziksel Özelliklerine Ait Sonuçlar	42
4.1.2.1.	Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü	42
4.1.2.2.	Hazırlanan Mikroemülsiyonların Tipi	42
4.1.2.3.	Santrifüj	43
4.1.2.4.	Hazırlanan Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi	43
4.1.2.5.	Hazırlanan Mikroemülsiyonların Elektriksel İletkenliği	43
4.1.2.6.	Hazırlanan Mikroemülsiyonların pH Ölçümleri	44
4.1.2.7.	Hazırlanan Mikroemülsiyonların Damlacık	

Büyük­lüğü Dağılımı	44
4.1.2.8.    Mikroemülsiyonların Kararlılıkları	45
4.1.2.8.1.    Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü	45
4.1.2.8.2.    Mikroemülsiyonun Tipi	45
4.1.2.8.3.    Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi	46
4.1.2.8.4.    Mikroemülsiyonun Elektriksel İletkenlik Değerleri	47
4.1.2.8.5.    Mikroemülsiyonun pH Değerleri	49
4.1.2.8.6.    Mikroemülsiyonların Damlacık Büyük­lüğü Değerleri	50
4.2.    TARTIŞMA	60
4.2.1. Genel Değerlendirme ve Dozaj Şeklinin Seçimi	60
4.2.2. Çalışılan Maddelere Ait Değerlendirmeler	62
4.2.2.1.    Siklosporin A	62
4.2.2.2.    İzopropil Miristat	63
4.2.2.3.    Mannitol	63
4.2.2.4.    Polietilen glikol 400	63
4.2.2.5.    Benzalkonyum klorür çözeltisi	64
4.2.2.6.    Montanox 60®	65
4.2.3. Mikroemülsiyonlarda Faz Diyagramının Çizilmesi ve Hazırlanışı	65
4.2.3.1.    Üçgen Faz Diyagramının Çizilmesi	65
4.2.3.2.    Mikroemülsiyonun Hazırlanması	66
4.2.4. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonunun Fiziksel Özelliklerinin Değerlendirilmesi	67
4.2.5. Fiziksel Kararlılık Çalışmaları	67
4.2.5.1.    Tipi	68
4.2.5.2.    Kırılma İndisi	68
4.2.5.3.    Elektriksel İletkenliği	68
4.2.5.4.    pH Ölçümü	69
4.2.5.5.    Damlacık Büyük­lüğü	69
5.    KAYNAKLAR	72

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
2.1.3. Farklı Tip Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Sistemlerinin Yapısı	5
2.1.5. Yem+Ko-S, Yağ ve Su İçeren Mikroemülsiyon Sistemlerinin Faz Alanları	11
2.2.1. Siklosporin A'nın Molekül Yapısı	21
4.1.1.2. Yem/Ko-S Oranı 2.5 Olan Mikroemülsiyona ait Üçgen Faz Diyagramı	40
4.1.1.4. Değişen yem/Ko-S Oranına Karşılık Mikroemülsiyon Alanlarında Oluşan Değişim	42
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F2 Formülasyonunun 1. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	53
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F2 Formülasyonunun 5. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	54
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F2 Formülasyonunun 6. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	55
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F3 Formülasyonunun 1. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	56
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F4 Formülasyonunun 1. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	57
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F4 Formülasyonunun 5. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	58
4.1.2.8.6. Farklı Ortamlarda Saklanmış F4 Formülasyonunun 6. Aya Ait Damlacık Büyüklüğü Dağılımı	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
2.1.6. Mikroemülsiyonlar ile Klasik Emülsiyonlar Arasındaki Farklar	12
3.2.1.1. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonları ve Bileşimleri	32
4.1.1.3.1. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesinde Hazırlanan Formülasyonlar	34
4.1.2.4. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kırılma İndisi Değerleri	43
4.1.2.5. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Elektriksel İletkenlik Değerleri	44
4.1.2.6. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının pH Değerleri	44
4.1.2.7. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Damlacık Büyüklüğü Değerleri	45
4.1.2.8.3. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'e Ait Kırılma İndisi Değerleri	46
4.1.2.8.3. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e Ait Kırılma İndisi Değerleri	46
4.1.2.8.3. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e Ait Kırılma İndisi Değerleri	47

4.1.2.8.4. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'ye Ait Elektriksel İletkenlik Değerleri	47
4.1.2.8.4. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e Ait Elektriksel İletkenlik Değerleri	48
4.1.2.8.4. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e Ait Elektriksel İletkenlik Değerleri	48
4.1.2.8.5. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'ye Ait pH Değerleri	49
4.1.2.8.5. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e Ait pH Değerleri	49
4.1.2.8.5. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e Ait pH Değerleri	50
4.1.2.8.6. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'ye Ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları	51
4.1.2.8.6. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e Ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları	51
4.1.2.8.6. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e Ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları	52

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AUC</b>	: Eğri Altında Kalan Alan
<b>C<sub>maks</sub></b>	: Doruk Plazma Konsantrasyonu
<b>CsA</b>	: Siklosporin A
<b>HLB</b>	: Hidrofil-Lipofil Balans
<b>HPLC</b>	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>IL-2</b>	: İnterlökin 2
<b>Ko-S</b>	: Yardımcı Yüzey Etkin Madde
<b>PEG 400</b>	: Polietilen Glikol 400
<b>RIA</b>	: Radyoimmünessey
<b>YEM</b>	: Yüzey Etkin Madde



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda farmasötik teknolojinin gelişmesi ile, konvensiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımlarından doğan sıkıntıları azaltmaya yönelik yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Son derece lipofilik ve genellikle suda az çözünen (siklosporin A gibi) bileşiklerin klinik yararı, bu maddelerin düşük biyoyararlanımı ile sınırlılık göstermektedir. Bu nedenle, suda çözünürlüğü oldukça az olan etkin maddelerin, sulu bir dozaj formu içinde verilebilmesini sağlamak amacı ile dış fazı su olan mikroemülsiyon sistemlerinin geliştirilmesi gerektiği söylenebilir. Bu nedenle yapılan pekçok çalışmada, suda çözünmeyen siklosporin A gibi maddelerin sulu bir ortam içinde formüle edilmeleri farmasötik anlamda her zaman sorun olarak karşımıza çıkmıştır. Suda çözünmeyen bu bileşiklerin çözünürlüklerini sağlamak amacıyla noniyonik yüzey etkin madde kullanılması oldukça yaygındır. Yine bu amaçla, y/s tipi mikroemülsiyonlarının iç fazına suda çözünmeyen etkin madde eklenerek, su taşıyan sistemler hazırlanmıştır. Bu sistemler özellikle oküler uygulama gibi topik uygulamalarda ilgi görmüştür (1, 2).

Mikroemülsiyon sistemleri ile uzatılmış ve kontrollü etkin madde salımı sağlanarak etkin maddenin salım profili kontrol altında tutulabilmektedir (3, 4). Bu nedenle, etkin maddenin sık sık uygulanması önlenerek, hastanın tedaviye olan uyuncu artırılabilir.

Mikroemülsiyon sistemlerinin damlacık büyüklüğünün çok küçük olması nedeniyle (genel olarak 0.2µm'den küçük) görünümleri saydamdır. Bu sayede oftalmik kullanımlarının oldukça kolay olduğu ve görüşü olumsuz olarak etkilemedikleri düşünülmektedir.

Y/s tipi mikroemülsiyon sistemlerinin viskozitesinin Newtonion akış modeline uyum gösterdiği bilinmektedir (5). Mikroemülsiyonların gösterdikleri bu özellik sayesinde, formülasyonun göze uygulanması ile etkin maddenin gözde kalış süresinin, normal sıvı çözeltilere göre daha fazla olduğu söylenebilir. Böylece etkin madde biyoyararlanımında artış olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında siklosporin A'nın sistemik olarak uygulanması ile ortaya çıkabilecek istenmeyen yan etkilerin çok fazla ve ciddi olmasından dolayı (nefrotoksisite, hirsutizm, nörotoksisite vb.), lokal olarak uygulanmasının daha

uygun olduğu belirtilmiştir. Özellikle göz hastalıklarından Dry Eye (Kuru göz) sendromunda kullanılan siklosporin A'nın oküler formülasyonunun hazırlanıp, geliştirilmesinin bu açıdan önemi oldukça fazladır. Buna bağlı olarak tez çalışmamızda:

- Oküler yoldan uygulanabilecek bir mikroemülsiyon formülasyonunun hazırlanması ve geliştirilmesi,
- Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonunun fiziksel kararlılığının ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi,
- Mikroemülsiyon sisteminde zaman içerisinde meydana gelebilecek farmasötik ve fiziksel değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. MİKROEMÜLSİYONLAR

#### 2.1.1. Tanımı ve Genel Özellikleri

Mikroemülsiyonlar, yardımcı yüzey etkin madde moleküllerinin, yüzey etkin madde molekülleri ile birleşerek ara bir yüzeyde kararlı halde bulunması ile yağ ve su gibi birbiri ile karışmayan iki sıvının termodinamik olarak kararlı, izotropik olarak temiz, tek görünümlü dispersiyonları olarak tanımlanabilirler (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Danielson ve Lindman tarafından yapılan diğer bir tanıma göre, mikroemülsiyonlar, sulu veya susuz elektrolit, yağ ve noniyonik yüzey etkin madde içeren, izotropik ve termodinamik olarak kararlı sıvı çözeltileridir (13).

Pekçok çalışmacı mikroemülsiyonlarla çalışmışlar ve mikroemülsiyonları, gerçek emülsiyonlar gibi değerlendirilmeyen, normal kolloidal çözeltiler olarak tanımlamışlardır. Kolloidal çözeltiler su veya hidrokarbonlarla hazırlanmışlardır.

Mikroemülsiyonların tanımlanması üzerine çelişkiler olmasına rağmen son yıllarda potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak ilgi görmektedirler ve pekçok araştırmacı tarafından temiz ve kararlı, terapötik dozaj formu olarak gösterilmektedirler (14, 15). Mikroemülsiyonlar farmasötik amaçlı kullanılmalarının yanısıra son yıllarda, kişisel bakım ürünlerinde, kozmetik preparatlarda ve ev temizliği ürünlerinde de kullanılmaktadır (16).

Son yıllarda, varolan ilaç taşıyıcı sistemlerin yeniden şekillendirilmesi ile etkinliklerinde artma olduğu görülmüştür. Bu yaklaşımla, etkin maddelerin terapötik etkilerinin geliştirilmesinin yanısıra, gerekli olan total doz da azaltılmıştır. İşte mikroemülsiyonların geliştirilmesi de bu işlemin odak noktasıdır (14, 17).

Mikroemülsiyonlar, saydam olmaları, kolay hazırlanmaları ve süzme ile sterilizasyona olanak sağlamaları dolayısıyla geniş kullanım alanına sahiptirler

(18). Mikroemülsiyonların diğer formülasyonlardan en önemli farkı daha kararlı olmalarıdır (8).

### 2.1.2. Tarihçesi

Mikroemülsiyonlar kelime olarak ilk kez, 1943 yılında, İngiliz kimyacı Schulman ve Hoar tarafından, orta zincirli alkoller ile hazırlanan normal bir kaba emülsiyonun titrasyonu ile oluşan çok bileşenli saydam sistemler olarak (multikomponent sistemler) tanımlanmıştır (5, 14, 19, 20, 21, 22). Schulman ve arkadaşları (14), mikroemülsiyonları ilk kez sabun, su ve hidrokarbondan, daha sonra da ortama pentanol gibi orta zincirli alkollerin titre edilerek eklenmesi ile elde etmişlerdir. Emülsiyona belirli konsantrasyonda alkol eklendiğinde saydam bir çözelti elde edilmiştir. Yüzeylerarası gerilim gibi geçici durumların ayarlanması gerektiği Schulman tarafından tartışılmıştır (14, 22).

1943 yılında, mikroemülsiyondaki su damlacıklarının çapı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (19).

$$R = 3 ( \text{Su hacmi} ) \Pi \text{ su} / \text{yağ arayüzeyinin toplam alanı} \quad (19)$$

Bundan başka, bileşim içindeki sınırlı dağılım ve formülasyonun metodolojisi önemlidir. Bu görüş, ayrı ayrı Becher, Carey, Gerbacia ve Adamson (14) tarafından tekrarlanmıştır. Ancak, 1943 yılında yapılan bu tanımlamadan önce de mikroemülsiyonların yüzey etkin madde taşıyan çok bileşenli sistemler olduğu açıklanmıştı (20).

1943-1948 yılları arasında Schulman ve arkadaşları, mikroemülsiyonların oluşumu için gereksinimleri kadar yapısını içeren kavramlar için de öncülük etmişlerdir. Bununla birlikte, mikroemülsiyonlar, 1959'a kadar yağ-su-yüzey etkin madde sistemleri olarak tanımlanmıştır.

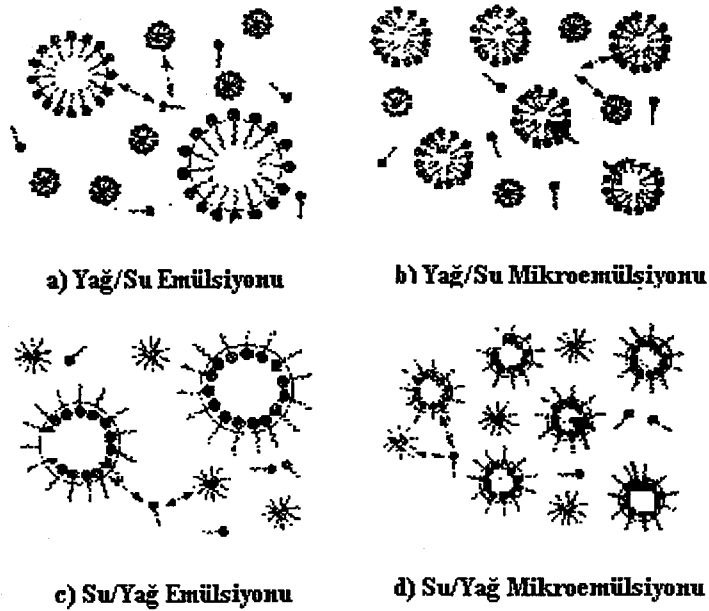
### 2.1.3. Mikroemülsiyonların Yapısı

Mikroemülsiyonlar, enzimatik reaksiyonlar, nanopartikül hazırlama, yüzey etkin bileşenlerin sentezi ve polimerizasyon gibi reaksiyonları kapsamaktadır (9). Genellikle dört bileşenin kombinasyonu ile oluşurlar. Bu bileşenler, yağ, su,

yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde'dir (3, 7). Ancak, mikroemülsiyonlar her zaman dört bileşenli olmak zorunda değildir. Bu görüşe göre, mikroemülsiyonlar su/yağ/yüzey etkin madde üçlüsünün karıştırılması ile oluşan ağimsı büyük halkalara sıvı kristallerin füzyonu sonucu ortaya çıkan karışık ve sıvı bir yapıya sahiptir (5).

Mikroemülsiyon sistemleri, kullanılan yüzey etkin madde ve yağın özelliğine, sistem içindeki herbir maddenin konsantrasyonuna, emülsiyonu oluşturmada kullanılan yöntemin basamaklarına, su-yağ oranına ve sıcaklığa bağlı olarak yağ-içinde-su, su-içinde-yağ veya yüzey etkin madde tabakası ile dağıtılmış zengin yağ ve su içeren sistemler olarak karakterize edilebilirler (12, 13, 23).

Mikroemülsiyon yapısının en basit açıklaması mikroemülsiyon damlacık modelidir. Bu modelde, mikroemülsiyon damlacıkları, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde moleküllerinden oluşan yüzeylearası tabaka ile çevrilmiştir (Şekil 1.)



Şekil 1. Farklı Tip Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Sistemlerinin Yapısı (20).

Yağ-içinde-su ve su-içinde-yağ mikroemülsiyonlarının amfifil moleküllerinin yüzeyalandaki yönelimleri farklıdır. Bu moleküllerin hidrofobik ucu, su-içinde-yağ sistemlerinde disperse olmuş yağ damlacıkları üzerine yerleşmiştir. İçeriği bilinen damlacık sistemleri için damlacık çapı şöyle belirlenir:

$R = 3 \Phi / C_s \alpha_0$  olduğu tahmin edilmektedir. Burada,

$\Phi$ , dispers fazın hacmi

$C_s$ , birim hacme düşen yüzey etkin madde molekülünün konsantrasyonu

$\alpha_0$ , yüzey etkin madde moleküllerinin yüzeyalanı'dır.

Pratikte, yüzey etkin maddenin hiçbirisinin yüzeyalanla ilişkisi yoktur.

Mikroemülsiyon sisteminin yağ/su veya su/yağ olması, büyük ölçüde yüzey etkin maddenin özelliği ile belirlenmektedir. Yüzey etkin madde moleküllerinin geometrileri göz önünde tutarak, sistemin tipinin belirlenmesinde bazı yaklaşımlarda bulunulmuştur. Yüzey etkin madde moleküllerinin hacmi  $V$ , yüzeyalandaki baş grupları  $\alpha$ , genişlikleri  $l$  olarak gösterildiğinde: kritik paketleme parametresi, yani  $V / \alpha.l$  değeri 0-1 arasında ise, sistem yağ/su; fakat,  $V/\alpha.l$  değeri 1'den büyük ise, su/yağ sistemi olduğu belirtilmiştir.  $V$  ve  $l$  parametre değerleri, yaklaşık olarak da kullanılabilir. Yüzey etkin maddenin baş gruplarının hidrasyonu ve yüzey etkin madde içindeki yağ ve yardımcı yüzey etkin maddenin penetrasyonu, damlacıkların etrafındaki yüzeylerarası tabakadaki moleküllerin paketleme değerini etkilemektedir (22).

Mikroemülsiyonların kararlılıkları ve formülasyonları için çok düşük yüzeylerarası gerilim ( $\gamma$ ) gereklidir. Mikroemülsiyonlarda yağ ve su fazı arasındaki yüzey alan çok geniştir. Bunun nedeni de, mikroemülsiyonun yapısını oluşturan damlacıkların çok küçük olmasıdır. Pozitif yüzeylerarası enerjiden dolayı yüzeylerarası gerilim düşüktür, bu da mikroemülsiyonun termodinamik olarak kararlı olmasını sağlar (22).

Yüksek yüzey etkin madde içeriği ile veya yağ ve suyun hemen hemen eşit miktarlarını içeren mikroemülsiyonların yapısı iyi anlaşılamamıştır. Benzer yüzey etkin maddelerin kullanılması ile hazırlanan mikroemülsiyonların kritik paketleme parametrelerinin yakın değerler olduğu bulunmuştur.

## 2.1.4. Mikroemülsiyonların Formülasyonunda Kullanılan Maddeler

### 2.1.4.1. Yağ Fazı

Emülsiyon sistemlerinde kullanılacak ideal yağın biyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıdaki gibi olmalıdır (24) .

Biyolojik özellikler:

- a) Antijenik olmamalı,
- b) İnert olmalı,
- c) Etkin madde emiliminden sonra artık bırakmamalı,
- d) İrritasyon yapmamalıdır.

Fiziksel özellikler:

- a) Çok fazla yapışkan olmamalı,
- b) Parenteral emülsiyonlar için kolaylıkla iğneden geçebilmeli,
- c) Yüksek ve düşük sıcaklıklarda dayanıklı olmalıdır.

Kimyasal özellikler:

- a) Kimyasal olarak dayanıklı olmalı,
- b) Parçalanma ürünü oluşturmamalı,
- c) Fazla yağ asidi içermemeli,
- d) Nötral reaksiyon vermelidir.

### 2.1.4.2. Yüzey Etkin Maddeler ve Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler

Emülsiyon sistemleri sürekli faz içinde iç fazın kararlı bir şekilde dağılması ile oluşmaktadır (12). Sistemdeki yüzey etkin maddenin rolü, yağ ve suyun oluşturduğu iki yüzey arasındaki gerilimi düşürmektir (12, 22, 25). Bu nedenle, sistemde yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde varlığında yüzeylerarası gerilim çok düşüktür (21). Yüzey etkin maddeler, bir hidrofilik, bir de lipofilik kısımdan meydana gelmektedir (12). Mikroemülsiyon sistemlerinin

farmasötik olarak kabul edilebilir olması için, nontoksik, güvenilir maddelerle formüle edilmesi gereklidir (8, 22, 23). Yüzey etkin maddeler, baş gruplarının suda çözünürlük özelliğine bağlı olarak anyonik, katyonik, noniyonik ve amfoterik olmak üzere dört gruba ayrılırlar (12).

Yüzey etkin madde olarak, Tween 80<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup> ve soya fasülyesi lesitini gibi fizyolojik olarak kabul edilebilir bileşenler kullanılarak, retinol asetat, retinol palmitat ve retinol ile birkaç mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır (22). Genel olarak, yüzey etkin maddeler içinde en az toksik olanlardır (18). Bu yüzey etkin maddeler ile göz için uygun, yüksek etkin madde biyoyararlanımı, uzatılmış etki ve oluşan problemleri düzeltlen sistemler elde edildiği bildirilmiştir (8). Ayrıca, mikroemülsiyon sistemi topik olarak uygulanacak ise, iritan özellik göstermemelidir. Birçok noniyonik yüzey etkin maddelerin topik olarak kullanıma uygun olmalarına rağmen, oral ya da parenteral uygulama için çok sınırlı şekilde kullanılmaları gerekmektedir. Örneğin Arlacel<sup>®</sup> ve Brij<sup>®</sup> içeren mikroemülsiyonların peroral kullanımı ile sıçanlarda yan etki meydana gelmekte ve dozun uygulanmasından yarım saat sonra ölüm görülmektedir. Polisorbatların, farmasötik mikroemülsiyonlarda geniş kullanım alanına sahip olmalarına rağmen, sadece polisorbat 20 ve polisorbat 80 gibi bileşenler oral olarak kullanılabilirler (22).

Yüzey etkin madde konsantrasyonu, bir yardımcı yüzey etkin maddenin eklenmesi ile azaltılabilir (23). Tek bir yüzey etkin maddenin kullanılması ile gerekli olan yüzey alanının sağlanması genellikle mümkün değildir. Sisteme ikinci bir amfifil eklendiğinde iki yüzey etkin maddenin etkisi ile emilim gelişmiştir (22). Yardımcı yüzey etkin maddeye gerek kalmadan bir mikroemülsiyonun üretiminin mümkün olması yanında mikroemülsiyonun kararlılığı için n-alkil polioksietilen eter gibi noniyonik bir yüzey etkin maddenin kullanılması gerekmektedir (18). Warisnoicharoen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, polioksietilen veya amin -N-oksit yapısındaki yüzey etkin maddeleri kullanarak hazırlanan ilaç taşıyıcı su-içinde-yağ mikroemülsiyon sistemlerinin, yardımcı yüzey etkin madde içermeden de formüle edilebileceği belirtilmiştir (11). Düşük molekül ağırlıklı, orta ve kısa zincirli alkoller toksik etkiyi azaltmak amacıyla kullanılabilirler (22, 23). Benzer özellikteki alkoller, güçlü etkileri ile



mikroemülsiyonların formülasyonunu etkileyebilir. Amfifilik özellikleri, sahip oldukları kısa hidrofobik zincir ve terminal hidroksil grupları, yüzey etkin madde ile etkileşim içindedir. İşte bu iki özellik nedeniyle mikroemülsiyonların hazırlanmasında kısa zincirli alkoller kullanılmaktadır. Böylece yüzey etkin madde konsantrasyonu azaltılabilir (23).

Yardımcı yüzey etkin madde olarak orta ve kısa zincirli alkollerin kullanılması ile mikroemülsiyonların toksik ve iritan özellikleri ortaya çıkabileceğinden, bu tip yardımcı yüzey etkin maddelerin belirli bir sınırdaki kullanılması gerekmektedir (8, 22, 23). Dişi sıçanlarda ter-butanol, 2- butanol ve 1- butanol'ün toksisitesinin ağırlığa bağlı olduğu belirtilmiştir (22). Su içinde %6.9 butanol, %32 propanol veya %32 etanol'ün uygulanmasından iki ay sonra sıçanlarda megamitokondri görülmüştür (22). 1,2 alkan dioller, alifatik alkollerle benzer özelliktedir (23). Nontoksik özellikteki fosfolipitler ve partiküler fosfoditilkolin (lesitin), oküler, oral veya parenteral uygulama için, alternatif olarak kullanılabilirler (8, 22). Yardımcı yüzey etkin madde olarak da triasetin ve propilen glikol kullanılmıştır (8).

Amfifiller'in hazır bulunduğu su-içinde-yağ veya yağ-içinde-su mikroemülsiyonlarında yağlar apolardır (26).

Dengeli bir mikroemülsiyon üretimi için yardımcı yüzey etkin madde moleküllerinin HLB değeri 7.0-8.0, karbon sayısı 4-6, yüzde karbon miktarı 60-65, yüzde oksijen miktarı 20-30, log P değeri 0.2-0.9 ve log 1/S'nin sıfıra yakın olması gerekmektedir. Buradaki S, sudaki çözünürlüğü simgelemektedir (23).

Yardımcı yüzey etkin madde içeriğinin artırılması ile faz diyagramındaki izotropik alanın azaldığı görülmektedir. Bu da göstermektedir ki, yardımcı yüzey etkin maddenin relatif konsantrasyonundaki artış, sistemin sudaki çözünürlüğünü azaltmaktadır (27).

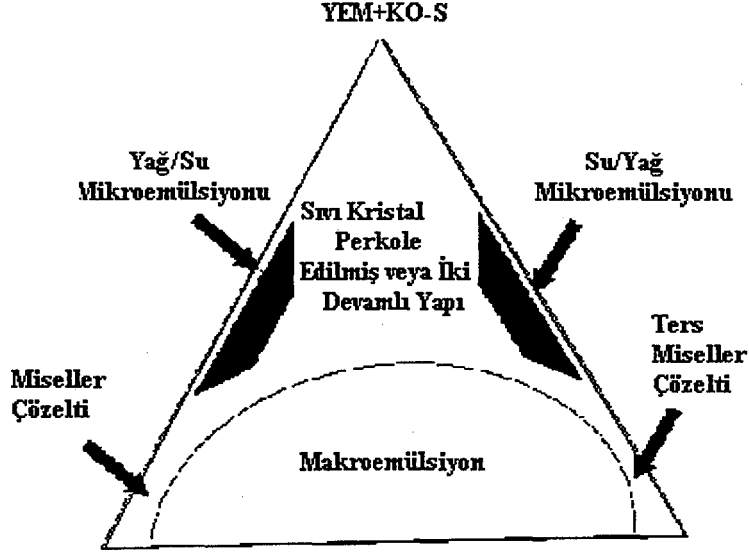
HLB sistemi kullanılarak yüzey etkin maddelerin belirlenmesine ilişkin yaklaşımın makroemülsiyonlardakinin aksine mikroemülsiyonlar için pek kullanışlı olmadığı ve mikroemülsiyon formülasyonunun ampirik bir iş olduğu da belirtilmiştir (5). Genel olarak, yağ-içinde-su mikroemülsiyonlarının hazırlanmasında kullanılan emülsiyon ajanının HLB aralığının 3-8 arasında olması gerekmektedir. Su-içinde-yağ tipi emülsiyonlarda ise bu değer 8-20

aralığında olması gerekmektedir (12 14). Genellikle, mikroemülsiyon üretiminde, karışım halindeki hidrofilik ve lipofilik yüzey etkin maddeler kullanılmaktadır çünkü, bir yüzey etkin maddenin hidrofil-lipofil balans (HLB) noktasında çözünürlüğü maksimum değere ulaşmaktadır (28).

### 2.1.5. Mikroemülsiyonun Formülasyonu

Mikroemülsiyonlar, çok küçük damlacık boyutuna ve çok büyük yüzeylerarası alana sahiptirler (2). Mikroemülsiyonların faz davranışlarının, genel olarak sıcaklıkla etkilendiği literatürlerde belirtilmiştir (28).

Mikroemülsiyonlar, polimerler ve/veya yüzey etkin maddeler gibi bileşimindeki diğer maddelerin özelliklerinin belirlenip, seçilmesi ile yüksek basınç homojenizatörü kullanılarak faz inversiyon sıcaklığında (PIT) kolayca formüle edilebilmektedirler (16). Bir mikroemülsiyon hazırlanmasında en önemli basamak üçgen faz diyagramının çizilmesi ve bundan hareketle en uygun mikroemülsiyon alanının ve dolayısıyla da formülasyondaki bileşenlerin miktarının saptanmasıdır (5, 10, 19, 29). Şekil 2'de hipotez olarak üçgen faz diyagramı gösterilmiştir. Üçgen faz diyagramları, su, yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde fazlarının değişik oranlarda karıştırılması ile elde edilmektedir (30). Faz diyagramının çizilmesinde en kolay yöntem titrasyondur. Belli miktardaki yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde karışımı yağla karıştırılarak tek fazlı bir çözelti oluşturulur. Daha sonra sabit sıcaklık ve karıştırma hızı kullanılarak su ile titrasyon yapılır ve her su eklenmesinden sonra sistemin saydamlığı ve kararlılığı incelenir (5). Üçgen faz diyagramı, S/Y emülsiyonu, lameller veya hegzagonal sıvı kristaller, S/Y mikroemülsiyonu, Y/S emülsiyonu ve Y/S mikroemülsiyonunun dengesinden oluşmaktadır (30).



Şekil 2. Yağ, Su ve Yüzey Etkin Madde+Yardımcı Yüzey Etkin Madde İçeren Mikroemülsiyon Sistemlerinin Faz Alanları (20).

### 2.1.6. Mikroemülsiyon ve Makroemülsiyonlar Arasındaki Farklar

Pekçok çalışmacıya göre, makroemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar arasındaki esas fark, misellerin tipleridir. Bunun yanında, pekçok yaklaşım, mikroemülsiyonların, emülsiyonların küçük boyutlu şekli olduğunu söylemektedir (3, 31). Bu nedenle, mikromülsiyonların saydam olmasına karşın makroemülsiyonlar süt görünümündedirler ve mikroemülsiyonlar, klasik emülsiyonlara göre daha durağan ve kararlıdır (30). Pekçok özellik yönünden mikroemülsiyonlar, makroemülsiyonlarla karşılaştırılmış ve Çizelge 1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1. Mikroemülsiyonlar ile Klasik Emülsiyonlar Arasındaki Farklar (19, 30)**

Özellik	Mikroemülsiyon	Klasik Emülsiyon
İç fazın damlacık büyüklüğü (µm)	< 0.2	0.2 -10
Görünüş	Saydam	Süt görünümünde
Oluşum	Kendiliğinden	Enerji ile
Yardımcı yüzey etkin madde kullanımı	Kullanılır	Kullanılmaz
Yüzey etkin madde konsantrasyonu (%)	> 10	1-20
Kararlılık	Termodinamik olarak kararlı	Termodinamik olarak kararsız

### 2.1.7. Mikroemülsiyonların Üstünlükleri

Mikroemülsiyonlar, klasik emülsiyonlardan veya diğer lipit taşıyıcı sistemlerden daha kararlı olmaları, uzun raf ömrüne sahip olmaları, etkin madde çözünürlüğünün gelişmiş olması, küçük damlacık boyutu, hazırlanma ve uygulama kolaylığı nedeniyle mükemmele yakın ilaç taşıyıcı sistemlerdir (5, 12, 13, 19, 22, 32).

Mikroemülsiyonlar uzatılmış ilaç etkisine izin vermektedirler; partiküler etkin maddelerin kontrollü salımı için tavsiye edilebilir ilaç taşıyıcı sistemlerdir;

ve uygun bileşenler seçilerek hazırlandıklarında transdermal, oral, topikal emilime ve parenteral kullanıma uygundur (8, 22, 33). Yapılan çalışmalar sonucunda, in vitro ve in vivo sonuçlar arasında ilişki olduğu görülmüştür. Küçük damlacık boyutu, saydamlık, ve düşük viskozite özelliklerini taşımaları nedeniyle, mikroemülsiyonlar, lipofilik etkin maddeler için ideal taşıyıcı sistemlerdir (34). Ayrıca, artan emilim ve buna bağlı olarak artan biyoyararlanım, ilaç farmakokinetiğinde daha düşük birey-içi ve bireylerarası değişkenlik, gelişen klinik potansiyel ve azalan toksisite gibi özellikleri sayesinde oral dozaj şekliinden oldukça avantajlıdır (14, 21). Bunların yanısıra, mikroemülsiyonlar kendiliğinden oluşması nedeniyle kolay hazırlanma özelliğine sahiptirler (21).

Mikroemülsiyonlardan tüm moleküllerin emilimlerinin önemli derecede arttığı 1997 yılında mikroemülsiyonlarla ilgili yapılan çalışmada belirtilmiştir (13).

Yağ/su mikroemülsiyonlarının avantajları arasında, etkin madde çözünürlüğünün geliştirilmesi, parenteral kullanım potansiyeli ve yüksek enerji gerekmeden endüstriyel ölçekte üretimi vardır. Kimyasal modifikasyon olmadan, lipofilik etkin maddeler için parenteral ilaç taşıyıcı sistemler olarak mikroemülsiyonların kullanılabileceği önerilmiştir (35). Yapılan bir çalışmada, mikroemülsiyonların, sahip oldukları çözünebilme kapasiteleri, küçük damlacık ortalamaları, termodinamik olarak kararlı olmaları, izotropik görünümleri ve saydam olmaları gibi spesifik özelliklere sahip olmaları nedeniyle farmasötik ve kozmetik uygulamalara uygun olduğu gösterilmiştir (21, 36).

Jel formülasyonları eczacılıkta ve kozmetikte oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni de, kararlı olmaları, pseudoplastik akış göstermeleri ve cilt üzerinde kolay yayılmalarıdır. Mikroemülsiyon jelleri, saydam, homojen, optik olarak izotropik ve termodinamik olarak kararlıdır (21, 36).

Su-içinde-yağ mikroemülsiyonları, süspansiyonların uygulandığı yerlerde, parenteral taşıma için etkin madde çözünürlüğünde faydalar sağlamaktadır (18).

Sulu farmasötik preparatlarda, suda çözünmeyen etkin maddelerin çözünürlüğü her zaman sorun olmaktadır. Bu tip etkin maddeler için noniyonik yüzey etkin maddelerin çözücülük özellikleri ile geniş kapsamlı çalışmalar

yapılmıştır. Son yıllarda, yağ/su mikroemülsiyonunun iç fazına lipofilik özellikteki etkin maddelerin yerleştirilmesi ile çözünürlükleri arttırılmıştır. Farmasötik alanda kullanılan mikroemülsiyonlarda bu yöntem yaygın olarak kullanılmış ve büyük ilgi görmüştür (2).

Mikroemülsiyonların konvensiyonel oral farmasötik preparatlara göre pekçok avantajı vardır. Bunlar arasında, gastrik irritasyon ve ülserasyonun en aza indirilmesi ve doz tekrarının azalması sayılabilir (2).

Mikroemülsiyonlardaki bir sakınca ise, etkin maddelerin taşıyıcı sistemler içerisindeki çözünürlüğü için, yüksek konsantrasyonlarda yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeye gerek duyulmasıdır (8, 23). Bu nedenle, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerin toksisiteleri, kronik kullanımı gerektiren etkin maddeler için araştırılmaktadır (21).

#### **2.1.8. Mikroemülsiyonlarda Viskozite**

Farklı araştırmalar, mikroemülsiyonların kararlılığı ve oluşumu üzerinde yapılan çalışmaları içermektedir ve farklı tekniklerle mikroemülsiyon damlacıklarının büyüklüğü, görünüşü ve etkileşimi üzerinde çalışılmıştır. Mikroemülsiyon damlacıklarının önemi araştırmalara viskozite çalışmalarını eklemiştir (37). Mikroemülsiyonların viskoziteleri, genellikle pseudoplastik akış gösteren makroemülsiyonların aksine, Newton akış modeline uyum göstermektedir (5). Dispers fazın viskozitesini etkileyen pekçok eşitlik tanımlanarak önerilmiştir.

Temel olarak önerilen viskozite eşitliği

$$\eta_{rel} = \exp a \cdot \theta / (1 - k \cdot \theta)$$

olarak belirtilmiştir.

Burada,

a = Katı hücrelerin yüzde 2,5'unun teorik hacim sabiti

k = damlacıklar arasındaki etkileşime ve damlacık boyutu artması veya azalmasına bağlıdır.

### **2.1.9. Mikroemülsiyonlardan Etkin Maddenin Serbestleşme Mekanizması**

Mikroemülsiyonlardan etkin maddenin serbestleşme mekanizmasında yüzey etkin maddenin cinsi, dispers fazın hacmi ve sistemin viskozitesi etkilidir (38, 39). Ayrıca, bir etkin maddenin salım oranı, iç faz hacmi ve dağılımına bağlıdır (39, 40). Mikroemülsiyon sisteminde yer alan etkin madde, lipofilik özelliğine bağlı olarak, sulu ve yağlı faz arasında dağılmaktadır. Etkin maddenin dağılım katsayısı salım hızı üzerine büyük oranda etki eder . Bu nedenle, etkin maddenin yağ ve sulu faz arasındaki dağılımı salım hızını etkiler (7).

Etkin maddelerin mikroemülsiyon formülasyonları içindeki biyoyararlanımları, hem mikroemülsiyon sisteminin hem de etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (1). Yapılan bir çalışmada, etkin maddenin mikroemülsiyon sisteminden salım oranının, kullanılan alkolün ve salım ortamı ile seyreltilmesinden sonra dispers fazın hacmine bağlı olduğu bulunmuştur (3).

Emülsiyon sistemlerinden etkin madde salımının ölçülmesi zahmetli bir iştir. Son yıllarda zayıf asit veya baz özellikteki etkin maddeler için geniş uygulama alanına sahip bir yöntem tanımlamışlardır. Bu yöntem (Highlights), bir akseptör fazın gözlenen pH değişimi ile submikron emülsiyonlardan etkin maddelerin salım hızlarının karşılaştırılmasıdır. Örneğin, trigliserit emülsiyonlarından etkin madde salımı hızlıdır. Trotta'nın yaptığı çalışmada bu yöntem şöyle kullanılmıştır: Azot gazı geçirilmiş 150 mL'lik kaplara, 0.1 mM'lük sodyum hidroksit çözeltisinin 100 mL'si içine, etkin madde taşıyan mikroemülsiyon sisteminin 0.5 mL'si eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve konvensiyonel pH elektrotu ile pH'da hiçbir değişim olmayıncaya kadar ölçüm yapılarak tablolara not edilmiştir. Ölçümler 25 °C'de yapılmıştır (3).

### **2.1.10. Mikroemülsiyonların Kararlılığı**

Mikroemülsiyonlar, pekçok araştırmacı tarafından temiz ve kararlı terapötik dozaj şekilleri olarak gösterilmiştir (33). Mikroemülsiyonları konvensiyonel emülsiyonlardan veya diğer lipit taşıyıcılardan üstün kılan özellik kararlılıklarıdır (13). Bir mikroemülsiyonun kararlılığına etkin maddenin varlığı etkilidir. Ayrıca emülsiyonların aksine, küçük dispersiyon büyüklüğüne sahip olmaları nedeniyle termodinamik olarak dayanıklıdırlar (3). Mikroemülsiyonların

kararlılığını etkileyen en önemli etken onların görünüşleridir (8). Emülsiyonların kararlılığının belirlenmesindeki en önemli özellik, damlacık büyüklüğü dağılımıdır (27). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, butibufen içeren su-içinde-yağ mikroemülsiyonunun kararlılığının belirlenmesi amacıyla 30 gün boyunca 4 ve 40 °C arasında farklı sıcaklıklarda saklanan formülasyonun damlacık boyutunda herhangi bir değişimin olmadığı belirtilmiştir (22).

Flurbiprofen'in parenteral olarak taşınması için hazırlanan mikroemülsiyonunun kararlılığı globül boyutu izlenerek belirlenmiştir (35). Bundan başka, mikroemülsiyonların kararlılığının saptanması için kullanılan bir yöntem de mikroemülsiyonun 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmesidir (8).

Mikroemülsiyonların ayrıca yumuşak jelatin kapsüllerle de uyumlu olduğu Sedlak ve arkadaşlarının (39) yaptığı çalışmada gösterilmiştir.

### **2.1.11. Mikroemülsiyonların Uygulama Şekilleri**

Mikroemülsiyonlar son yıllarda, kimya gibi pekçok alanda araştırma çalışmalarının odak noktası olmuşlardır. Biyofarmasötik preparatlarda ise, çözünür etkin maddelerin topikal ve sistemik yararlanımlarının artması için kullanılmışlardır (33).

#### **2.1.11.1. Mikroemülsiyonların Topik Uygulanışı**

Mikroemülsiyonlar son yıllarda, topikal dozaj şekilleri gibi kullanılmıştır (14, 21). Yapılan bir çalışmada, %1 oranında niflumik asit içeren topik uygulanması amaçlanmış bir mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve niflumik asitten meydana gelen nonsteroid antiinflatuvar (NSAİ) etkinin, diğer lipit taşıyıcı formülasyonlardan daha fazla olduğu belirtilmiştir (42). Ancak, mikroemülsiyonların topikal uygulanmalarındaki sorunlardan birisi, cilt üzerindeki akıcılıklardır. Oysa, mikroemülsiyonun jel formülasyonları, kararlı olmaları, pseudoplastik akış göstermeleri ve cilt üzerine kolay yayılmalarından dolayı tercih edilirler (36). Topik bir mikroemülsiyonun kararlılığı için n-alkil polioksietilen eter gibi noniyonik bir yüzey etkin maddenin kullanılması gerekmektedir (18).



### **2.1.11.2. Mikroemülsiyonların Dermal Uygulanışı**

Su-içinde-yağ mikroemülsiyonunun iç fazına lipofilik özellikte bir etkin maddenin yerleştirilmesi, son zamanlarda bu etkin maddelerin çözünürlüğü için ilgi çekici bir yöntem haline gelmiştir. Topik ilaç taşıyıcı sistemlerdeki gibi, farmasötik alanda kullanılan mikroemülsiyonlarda da bu yöntem büyük ölçüde kullanılmış ve büyük ilgi görmüştür. Mikroemülsiyonlar, çok küçük damlacık boyutuna ve çok yüksek yüzey alana sahiptirler. Bu nedenle, etkin maddelerin perkutan emilimi daha iyidir (2). Dermal uygulama için yüzey etkin madde içeriğinin düşük olması gereklidir. Yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranının düşük olması gerekliliği nedeniyle, amfifilik yapıların cilt üzerine potansiyel irritasyon riski düşünülerek insan cildinde araştırmalar yapılmıştır (38).

Mikroemülsiyonlar topikal ilaç salımına izin verebilmektedir (39). Lokal anesteziğe sahip lidokain'in etkinliğinin uzatılması amacıyla, yavaş salım formülasyonları son günlerde oldukça önem kazanmıştır. Bu amaçla lidokainin mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve amaca uygun sonuçlar elde edilebilmiştir. Hazırlanan mikroemülsiyon sistemi, sıçanlara uygulanmış ve etkin maddenin yarı ömrü 23 dakika olarak gösterilirken, mikroemülsiyon uygulanmasının ardından 35 dakikaya uzadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, lidokainin mikroemülsiyon formülasyonunun, enjeksiyon bölgesinden yavaş emildiği söylenebilir (4).

### **2.1.11.3. Mikroemülsiyonların Parenteral Uygulanışı**

Mikroemülsiyonlar, konvensiyonel parenteral sistemlerden üstündürler. Parenteral uygulamada birincil problem, etkin maddelerin sınırlı çözünürlük göstermeleridir. Hem yağ / su, hem de su / yağ mikroemülsiyonları parenteral olarak kullanılabilir (14, 18, 19, 21, 35). Kyung-Mi Park ve arkadaşları, parenteral kullanım amacıyla, flurbiprofen içeren su-içinde-yağ mikroemülsiyonu hazırlamışlar ve bu sistemi aynı etkin maddenin fosfat tamponu içindeki çözeltisi ile karşılaştırmışlar; mikroemülsiyon formülasyonu ile daha uzun ve daha güçlü terapötik etki gibi olumlu sonuçlar elde etmişlerdir (34). Yine aynı çalışmada, kimyasal modifikasyona gerek kalmadan, lipofilik özellikteki etkin maddeler için

parenteral ilaç taşıyıcı sistemler olarak mikroemülsiyonların kullanılabilceği önerilmiştir.

Bu yolla kullanılacak mikroemülsiyon sistemlerinde, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve yağ fazlarının toksik özellik göstermemeleri gerekmektedir. Çok kısa zincirli alkoller ve etanol, parenteral kullanım için kabul edilemezler. C<sub>3</sub> ve C<sub>4</sub> alkollerinin, parenteral uygulama için kabul edilebilir yardımcı yüzey etkin maddeler olan polietilen glikol 400 ve polietilen glikol 660 ile yer değiştirebileceğini söyleyerek alternatif yaklaşımlarda bulunulmuştur .

#### **2.1.11.4. Mikroemülsiyonların Oral Uygulanışı**

Son yıllarda mikroemülsiyonlar oral yolla kullanılabilmektedir (21). Oral ilaç formülasyonları, parenteral ilaç formülasyonlarına göre daha çok tercih edilirler. Uygulama kolaylıkları ve çocuklar için çok daha az korkutucu olmaları buna neden olarak gösterilebilir. Oral uygulama için mikroemülsiyonlar, konvensiyonel oral formülasyonlardan daha çok üstünlüğe sahiptir. Bunlar arasında, artan emilim, gelişmiş klinik potansiyel ve ilaç toksisitesinde azalma sayılabilir. Mikroemülsiyonların, steroidler, hormonlar, diüretikler ve antibiyotikler gibi etkin madde grupları için ideal oral formülasyonlar oldukları belirtilmiştir. Ayrıca, mikroemülsiyon sistemleri kullanılarak oral uygulamadan sonra biyoyararlanımın arttığı kaydedilmiştir (1). Özellikle su / yağ mikroemülsiyon formülasyonlarından, suda çözünebilen moleküllerin oral emiliminde gelişim görülmüştür. Orta zincirli trigliseritleri içeren yağ mikroemülsiyonları, etkin maddenin çözünmesi ve/veya intestinal emilimin gelişmesi için, oral dozaj şekilleri olarak son yıllarda oldukça fazla ilgi görmektedir (43).

Biyoteknolojinin ilerlemesi ile peptit yapılı etkin maddeler, terapötik ajan olarak kullanımda önemli bir yer almıştır. Oysa, peptit ve protein kaynaklı etkin maddelerin oral olarak uygulanması oldukça güçtür. Zhong-Gao Gao ve arkadaşlarının (1) siklosporinin oral mikroemülsiyonu ile yaptıkları bir çalışmada, zayıf çözünürlüğe sahip ve peptit yapısında olan siklosporin A'nın oral biyoyararlanımının mikroemülsiyon sistemi ile geliştiği gösterilmiştir .

Organ transplantasyonunda, immünosüpresan olarak kullanılan siklosporin'in mikroemülsiyon bazlı formülasyonuna Neoral® adı verilmiştir. Siklosporin'in su-içinde-yağ emülsiyonu olan Neoral®, yağlı bir çözelti olan Sandimmun®'un yerini almıştır. Neoral® ile tedavide güvenilirlik, hastalar arasında görülen değişkenliğin azalması ve kronik reddedilmede azalma gibi sonuçlar elde edilmiştir (19).

#### **2.1.11.5. Mikroemülsiyonların Oküler Uygulanışı**

Oküler kullanılan bir farmasötik formülasyonun absorpsiyonu başlıca kornea ve konjonktiva'da meydana gelir. Etkin maddeler, kornea epitel hücreleri içinden difüze olurlar. Etkin maddenin korneadan geçiş hızı ile yapısı ve fizikokimyasal özellikleri arasında ilişki vardır. Lipit çözünürlüğü fazla bir etkin madde için ise kornea epiteli, hız sınırlayıcı membran gibi davranır. Dolayısıyla lipofil özellik gösteren etkin maddeler kornea epitelini kolaylıkla geçerler. Fakat hidrofil etkin maddelere kornea epitelinin direnci fazladır. Son yıllarda konjonktivadan etkin madde geçişi ile ilgili çalışmalar çok önem kazanmıştır. Oküler uygulanan göz damlalarının lokal etki meydana getirmeleri yanında sistemik absorpsiyona da neden olmaktadır. Oküler yolla sistemik etki, gözyaşı ile burun boşluğuna sürüklenen etkin maddenin bu boşluktan absorpsiyonu ile gerçekleşmektedir (5).

Mikroemülsiyonlar, oftalmik taşıyıcı olarak elverişli sistemlerdir. Mikroemülsiyonların oküler kullanımı ile ilgili yapılan literatür taraması sonucunda iki adet çalışmaya rastlanmıştır (23, 44). Oküler kullanımları için iyi özellik gösterdikleri bildirilmiştir. Kabul edilebilir görünüşleri, fizikokimyasal davranışları, özellikle pH düzeyleri, kırım indisleri, viskoziteleri ve iyi fizyolojik uyum sağlayabilmeleri buna neden olarak gösterilebilir (20). Özellikle dış fazı su olan mikroemülsiyon sistemleri termodinamik olarak kararlı ve görünüşlerinin saydam olmaları nedeniyle oküler kullanım için uygundur (22).

Bir çalışmada, lesitin ile hazırlanan mikroemülsiyonlardan uzatılmış pilokarpin salımı elde edilebileceği in vitro deneysel araştırmalar ile gösterilmiştir. Özellikle zayıf çözünürlüğe sahip etkin maddelerin uygulanmasında, oftalmik yağlar ile karşılaştırma yapıldığında mikroemülsiyonların görmede zayıflatma yapmaması beklenmektedir (20).

Ancak, genel olarak karşılaşılan sorun, fizyolojik olarak uygun bileşenleri bulmaktır. Yüksek oranda yüzey etkin madde içeren mikroemülsiyon formülasyonları için bu durum geçerlidir. Güncel çalışmalarda, pilokarpin hidroklorür benzeri etkin maddeler taşıyan oküler kullanıma uygun mikroemülsiyon sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böyle preparatların görmeye olan etkisi, ve su taşıyan damlalar ile geciktirilmiş etki sağlanması açısından oftalmik yağlara alternatif olarak kullanılabilmesi söylenmektedir (20).

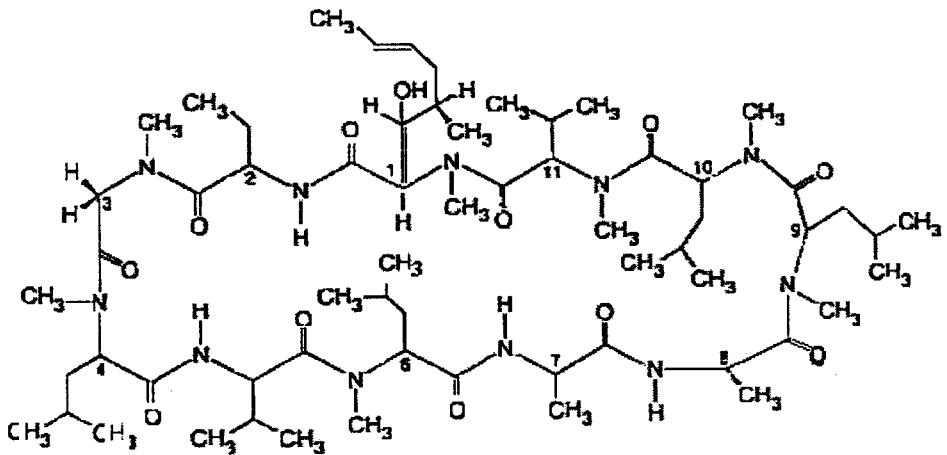
Yüzey etkin madde olarak anyonik yüzey etkin maddelerin ve soya fasülyesi lesitininin, yardımcı yüzey etkin madde olarak da n-butanol, triasetin ve propilen glikolün kullanıldığı retinol içeren bir formülasyonun oküler kullanılabilirliği araştırılmış ve hazırlanan sistemin 20°C'da 6 aya kadar anlamlı bir fiziksel değişim göstermediği belirlenmiştir (5).

## 2.2. SİKLOSPORİN A

Siklosporin A, özellikle organ transplantasyonunda organ reddini önlemek amacıyla ve çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisi için yaygın olarak kullanılan immünoşüpresif etkili bir etkin maddedir (45-52).

### 2.2.1. Siklosporin A'nın Yapısı ve Genel Özellikleri

Siklosporin A, *Hypocladium inflatum* gams, *Tolypocladium inflatum* gams ve bazı mantar türlerinden elde edilen siklik, hidrofobik, nötral bir endekapeptit metabolitidir (53, 54, 55). Beyaz veya beyazımsı renge sahiptir; pratik olarak suda çözünmez ancak mutlak alkol ve diklorometan içinde kolaylıkla çözünür (56). Işıktan korunarak saklanmalıdır (57). Siklosporin A, 15 yıldan fazla süredir organ naklinden sonra ve değişik otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak immünoşüpresif ajan olarak kullanılmaktadır (50, 53, 58). Ancak, Siklosporin A dar bir terapötik pencereye sahiptir. Bu nedenle, kullanım dozu ve şekli oldukça önemlidir (52, 59, 60). Siklosporin A, 11 aminoasitten meydana gelmiş nonpolar siklik bir oligopeptit'tir (21, 60, 61). Siklosporin A, mantar kaynaklı siklik ve undekapeptit yapısındadır (Şekil 3.) (62). Siklosporin A'nın molekül ağırlığı 1202.61'dir ve yüksek derecede lipofildir. Lipoproteinlerle sarılmış siklik bir yapı göstermektedir (21, 51, 56, 57). Lipofilik özelliği ve siklik yapı göstermesi nedeniyle, siklosporin A oldukça kararlı bir moleküldür (53).



Şekil 3. Siklosporin A'nın Molekül Yapısı

Siklo[[*(E)*-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-hidroksi-4-metil-2-(metilamino)-6-oktenol]-*L*-2-aminobutiril-*N*-metilgliseril-*N*-metil-*L*-lösil-*L*-valil]-*N*-metil-*L*-lösil-*L*-alanil-*D*-alanil-*N*-metil-*L*-lösil-*N*-metil-*L*-lösil-*N*-metil-*L*-valil] (56, 57).

### 2.2.2. Tarihçesi

1980'li yıllardan önce, böbrek nakli geçirmiş hastalarda siklosporin A'nın bilinmemesi nedeniyle, nakledilen organın rededilmesini önlemek amacıyla tedavide steroid türevleri ile vazotiyoprin karışımı kullanılmaktaydı (7). Siklosporin A ilk kez, Basel'de, Sandoz (Novartis) Mikrobiyoloji Departmanında, toprak örneklerindeki mantarların ikisinden, *Cylindrocorpos lucidum* Booth ve *Trichoderma polysporum*, izole edilmiş ve zayıf etkili bir antifungal ajan olarak kabul görmüştür (63).

Daha sonra yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada etkin maddenin güçlü bir immünosüpressif etkinliği olduğu gösterilmiştir. Siklosporin A'nın insanlarda böbrek nakillerinde kullanımı konusundaki klinik çalışmalar 1978'de Cambridge'de başlamıştır (63).

Siklosporin A, böbrek, kalp ve karaciğer transplantasyonunda, otoimmün hastalıklarda, Behçet hastalığında ve endojen üveit'de, immün tedaviye getirdiği yeniliklerle yeni bir dönemi başlatmıştır. Günümüzde ise, nakledilen organın reddini önlemek amacıyla pekçok hastada, siklosporin- azotiyoprin- prednizolon ile üçlü veya siklosporin-prednizolon ya da siklosporin-azotiyoprin gibi ikili kombinasyonlar halinde kullanılmaktadır (21, 63).

### 2.2.3. Etki Mekanizması

Siklosporin A, hücre döngüsünün G<sub>0</sub> ve G<sub>1</sub> fazlarında, lenfositlerin tersinir inhibisyonunu sağlayarak, immün mekanizmada cevabın indüksiyonunda önemli rol oynayan T lenfositlerinin, erken evresinde yüksek oranda spesifik inhibisyonunu ve IL-2 geninin baskılanmasını gerçekleştirmektedir (21, 47, 55, 64). Siklosporin A'nın etki mekanizması şöyle açıklanabilir: Siklosporin, sitosil içinde bir *cis-trans*-propil oluşmasında önemli bir rol oynar. Etkin maddelerin çoğunun 12 kilodalton'luk bir molekül olan siklofilin A'ya bağlanmasına karşın, siklosporin, siklofilin ailesinden birçok enzime bağlanmaktadır. Siklofilinler,

immünofilindirler. Siklofilin ve siklosporin kompleksi, immünosüpresif molekülü oluşturur. Siklosporin ve immünofilin kompleksi, kalsiyuma ve kalmoduline bağlı bir fosfotaz olan kalsinürin'e bağlanır. Kalsinürin, IL-2 geninin iyileştirme bölgesinin etkinliğini sağlayan kalsiyuma bağlı sinyalin transdüksiyonunda önemli bir rol oynar (63). Siklosporin A ve siklofilin kompleksi kalsinürin'in fosfotaz etkisini inhibe etmektedir (21, 55). Ayrıca, Siklosporin A diğer transkripsiyon etmenini inhibe eder. Sonuç olarak, siklosporin yardımcı hücrelerden IL-2 mediyatörünün salımını önler. Böylece, IL-2'nin yetersiz üretimi sonucu, sitotoksik T hücrelerinin oluşumu selektif olarak önlenir. Bunun yanında, sitotoksik T hücreleri üzerinde bulunan IL-2 reseptörlerini de bloke eder. Sonuçta, T lenfositlerinin etkisi durur. Bu arada, T supresör hücrelerin fonksiyonları bozulmaz. Bu da, *graft* hoşgörüsünü ve organizmanın kendisini yanlış algılamamasını sağlar (21, 63, 65).

Siklosporin A insan göz yaşını arttırmasını, afferent trigeminal sinirler ve afferent parasempatometik sinirler üzerine etkisi ile refleks göz yaş sekresyonunu arttırarak gerçekleştirmektedir. Siklosporin A göz damlasının oküler irritasyonunun ihmal edilebilecek düzeyde olduğu belirlenmiştir (62).

#### **2.2.4. Dozu**

Siklosporin A, başlangıç olarak transplantasyondan 4-12 saat önce 15 mg.kg<sup>-1</sup> olacak şekilde tek doz olarak verilir. Devamlılık dozu ise, ilk dozlamadan daha az olacak şekilde 10-14 mg.gün.kg<sup>-1</sup> olarak verilir. 5-10 mg.gün.kg<sup>-1</sup> olarak belirlenen idame dozu, her hafta % 5 azaltılarak operasyon sonrası 1-2 hafta sürecek şekilde devam ettirilmelidir (21). Ayrıca, Behçet sendromlu hastalarda görülen endojen üveit'de akut hastalığın remisyonunu sağlamak için 5 mg.gün.kg<sup>-1</sup> gerekirse kısa bir süre için 7 mg.gün.kg<sup>-1</sup>'e çıkartılarak veya düşük doz kortikosteroidler ile birlikte kullanılır. Siklosporin A, 5 mg.gün.kg<sup>-1</sup> dozunda 6 hafta kullanıldığında yeterli cevap vermeyen hastalarda kesilerek tedaviye son verilmelidir (63). Genel olarak, siklosporin A'nın, tedavideki dozu hastanın durumuna göre günde 8-25 mg.kg<sup>-1</sup> olacak şekilde, bir veya iki kez, ağızdan veya intravenöz olarak verilebileceği belirtilmiştir. Ancak, hastalığın seyrine göre bu doz azaltılabilir (66).

Akut parenteral doz aşımı, özellikle prematür yenidoğanların hayatını tehdit edici reaksiyonlar geliştirebileceğinden ciddi olarak değerlendirilmelidir. Siklosporin A'nın oral uygulandığında görülen doz aşımı ile ilgili çok az rapor bulunmaktadır. Multipl sklerozlu bir hastaya, 8 günde 25 g siklosporin A uygulandığında, diş eti yarası, tat duyası değişimi, ayak şişmesi, ellerde hiperestezi, karın ağrısı, şişkinlik ve rahatsızlık, hipertansiyon ve serum kreatin düzeyinde geri dönüşümlü küçük bir artış olduğu saptanmıştır (63).

### **2.2.5. Yan Etkiler**

Topikal siklosporin A tedavisinin yan etkileri, sistemik siklosporin tedavisine göre daha azdır (54). Siklosporin A, sistemik olarak uygulandığında ciddi yan etkiler meydana gelmektedir. Bu nedenle, bazı hastalarda lokal olarak uygulanmaktadır (44, 67). Siklosporinin bölgesel ve sistemik uygulanması ile hipertansiyon, nefrotoksisite ve ağrı gibi ciddi yan etkiler oluştuğu görülmüştür. Ayrıca, Siklosporin A kullanımından sonra sinir sistemi üzerine de olumsuz etkiler meydana getirdiği belirtilmiştir (21, 55, 62). Siklosporin A'nın en önemli yan etkisi nefrotoksisite, nörotoksisite, tromboembolizm, hepatotoksisite ve hipertansiyondur. Görülen en ciddi yan etki böbrek bozukluğudur. Bu nedenle, tedavi sırasında serum kreatin düzeyinin yakından izlenmesi gerekmektedir (66, 68, 69). Siklosporin A'nın hemodinamik etkileri, uygulanan doza bağlıdır ve lökopeni, lenfoma, trombositopeni, anemi, mikroanjiyopatik hemolitik anemi sendromu gibi hematolojik bozukluklara neden olmakla birlikte, azalan glomerüler filtrasyon oranı ile geri dönüşümlü renal vazokonstriksiyona neden olabilmektedir (21, 55). Bunun yanında, diyare, peptik ülser, anoreksi, gastrit, abdominal huzursuzluk, pankreatit ve konstipasyon gibi gastrointestinal sisteme ait yan etkiler de görülmektedir (21). Siklosporin A tedavisi, daha az ciddi yan etkiler olan akne, hirsütizm, gingival hipertrofi, kırılğan el tırnakları ve saç dökülmesine de neden olabilmektedir (21, 66, 68). Yapılan çalışmalarda, bazı yan etkilerin tavşan ve insan arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği ortaya konulmuştur (62).



### 2.2.6. Siklosporin A'nın Diğer Etkin Maddeler ile Etkileşimi

Siklosporin A tedavisi gören hastaların siklosporin A tedavileri devam ederken, farklı etkin maddelerle olan etkileşimlerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Etkileşim sonucunda, metabolizmaları, renal fonksiyon bozuklukları, doz aşımı durumları, reddetme sıklığının artması ile dozun azalması sonucu görülen sorunlar ortaya çıkabilmektedir (21).

Siklosporin A'nın kandaki düzeyini arttıran ve tedavide sıkça kullanılan etkin maddeler şunlardır:

- Kalsiyum kanal blokörleri: Verapamil, diltiazem, nikardipin ve amlodipin
- Antifungal ajanlar: Ketokonazol ve flukonazol
- Antibiyotikler: Eritromisin ve klaritromisin

Karaciğerde mikrozomal enzimleri indükleyen bazı etkin maddeler siklosporin A'nın kan düzeyini ve etkinliğini azaltırlar. Bu etkileşmeler sonucu, siklosporin A ile kontrol altına alınan transplantlı hastalarda reddetme reaksiyonunun ortaya çıktığı bildirilmiştir (66).

Siklosporin A'nın kandaki düzeyini azaltan ve tedavide sıkça kullanılan etkin maddeler şunlardır:

- Antikonvülzanlar: Barbitüratlar, fenitoin ve karbamazepin
- Antitüberküloz ajanlar: İzoniazid ve rifampin (21, 63).

Diğer nefrotoksik özellikteki etkin maddeler, siklosporin A'nın renal toksisitesini daha da arttırmaktadır. Bunlar arasında, nonsteroidal antiinflamatuvar özellikteki etkin maddeler, aminoglikozitler ve amfoterisin B sayılabilir (21, 63, 66). Sonuç olarak, HMG CoA redüktaz enzimi inhibitörleri (lovastatin gibi), siklosporin A ile birlikte verildiğinde nadiren akut renal toksisite ve rabdomiyoliz durumu ortaya çıkabilmektedir. Bu durum doza bağlı değildir, küçük dozlarda da ortaya çıkabilmektedir (21). Ayrıca, siklosporin A metabolizmasına katılan enzimler olan sitokrom P 450 III A enzimleri, çok geniş bir yelpazeye yayılan diğer farmakolojik ajanların metabolizmasını da katalize etmektedir. Bu gibi ajanlarla siklosporin A birlikte kullanıldığında siklosporin A'nın metabolizma hızı düşmüş olacak ve kandaki siklosporin A konsantrasyonu artacaktır. Aynı mekanizma ile, bu enzimlerin inhibitörleri de siklosporinin metabolizma hızını azaltacaktır (63).

### 2.2.7. Farmakolojik Özellikleri

Siklosporin A, insanlarda sekonder Sjögren's sendromunda ve korneal rejeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (44). Bölgesel ve sistemik uygulanması ile *Alopecia areata*, sedef, eklem romatizması ve Behçet hastalığı gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (47, 70, 71, 72, 73, 74). Bunun yanısıra, kuru göz sendromlu veya Sjögren's sendromlu hastalarda ve keratokonjonktivit'li köpeklerde göz yaşı üretiminin Siklosporin A ile düzenlendiği kanıtlanmıştır (68). Ayrıca, % 2 siklosporin A içeren gözdamlaları lokal olarak uygulandığında, retinol S-antijen ile otoimmün üveit deneysel düzeyde kontrol altına alınmıştır (68). Son yıllarda, siklosporin A'nın alıcı durumunda transplantasyon geçirmiş tavşanlarda göz yaşı akışını hızlandığı gözlenmiştir (62). Siklosporin A'nın deney hayvanlarının büyük bir kısmında topikal, intramusküler, retrobulbar ve subkonjonktival yollarla uygulanması ile, kornea'da bulunma zamanında artış görülmüştür (68). Yapılan bir çalışmada, 11 risk taşıyan transplantasyonlu hastaya 12 ay boyunca % 2 oranında siklosporin A içeren formülasyonun topikal olarak uygulanması ile yararlı etkilerin olduğu belirtilmiştir. Son yıllarda, organ transplantasyonundan sonra yama reddedilmesini baskılamada sistemik siklosporin A kullanılmaktadır (62, 75). Inoue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, topikal olarak %2 oranında siklosporin A içeren formülasyonun etkisi ile kortikosteroid tedavisinden sonra görülen etki karşılaştırılmış ve yüksek risk grubundaki hastalarda reddetme riskinin etkin olarak azaldığı sonucuna varılmıştır (54). Toshida ve arkadaşlarının (62) yaptığı bir çalışmada ise, siklosporin A göz damlalarının tek damlatmadan sonra konsantrasyona bağlı olarak göz yaşı sekresyonunu hızlandığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, % 0.1 siklosporin A içeren göz damlalarının tek damlası ile 3-8 saat uzatılmış etki elde edildiği belirtilmiştir (62). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, organ transplantasyonundan sonra nakledilen organın reddedilmesini baskılamak amacıyla sistemik olarak siklosporin A kullanılmaktadır (54). Kirpik konjonktiviti ve kuru göz sendromu gibi farklı göz hastalıklarının tedavisi için, siklosporin A içeren göz damlalarının güvenle kullanılabileceği ortaya konulmuştur (62, 67) .

Siklosporin A'nın farmakolojik etkisini etkileyen pekçok faktör vardır. Bunlar arasında:

- 1- % 0.1 siklosporin A konsantrasyonunda etkin madde içeren göz damlasının tavşanlara damlatılması ile, damlatmadan 3-8 saat sonra göz yaşı üretiminde en güçlü etki görülmüştür.
- 2- Bir muskarinik blokör olan atropin sülfat ile, siklosporin'in neden olduğu göz yaşarması inhibe edilmiştir.
- 3- Siklosporin A'nın neden olduğu göz yaşı akışı, taşikin seçici reseptör antagonisti olan (D-Pro<sup>2</sup>, D- Trp [7 and 9])- madde P'nin konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe edilmiştir.
- 4- Duyusal sinirlerde nörotransmitterleri durdurmak ve salımını stimüle eden kapsaisin ile siklosporin'in neden olduğu göz yaşı akışı inhibe edilmiştir. Farmakolojik çalışmalar sonucunda, tavşanlarda siklosporin A'nın neden olduğu göz yaşı sekresyonu, tüm kolinerjik ve taşikinerjik sinirler ile uyum göstermiştir (62).

### 2.2.8. Ticari Şekilleri

Siklosporin A, Japonya'da lipofilik özellikte olması nedeniyle polioksietillenmiş hintyağı içerisinde, enjeksiyonluk veya yumuşak jelatin kapsül veya yağ bazlı oral çözelti olarak piyasada bulunmaktadır. Oral preparatları alamayan hastalarda, polioksietillenmiş hintyağındaki siklosporin A'nın enjeksiyonları anafilaktik riske neden olmaktadır (47).

Sandoz/Novartis tarafından hazırlanan siklosporin A içeren ticari preparatlar şunlardır:

- Mikroemülsiyon kapsülleri (Neoral<sup>®</sup>) : 25 mg veya 100 mg
- Emülsiyon kapsülleri (Sandimmun<sup>®</sup>): 25 mg, 50 mg, 100 mg
- Oral Mikroemülsiyon (Neoral<sup>®</sup>): 100 mg.mL<sup>-1</sup> (50 mL)
- Oral Mikroemülsiyon (SangCya<sup>®</sup>): 100 mg.mL<sup>-1</sup> (50 mL)
- Oral Emülsiyon (Sandimmun<sup>®</sup>): 100 mg.mL<sup>-1</sup> (50mL) (21, 66).

İnsanlarda göz hastalıklarının tedavisi için ticari olarak topikal siklosporin ürünü bulunmamaktadır (44).

### 2.2.9. Biyoyararlanımı

Siklosporin A, birincil olarak ince bağırsakta emilmektedir (51). Siklosporin A oral olarak uygulandığında, emilim intestinal metabolizmayla ilgili olduğu kadar yüksek oranda safraya bağlı olduğundan, siklosporin A'nın biyoyararlanımı, hastadan hastaya ve hastanın kendi içinde farklılık göstermektedir. Bu düşük ve değişken biyoyararlanım, bazen, organ naklinden sonra reddedilmeye ve ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (44).

### 2.2.10. Farmakokinetik Özellikleri

Siklosporin A, plazmada eritrosit, lenfosit ve granülositlerle dağılmaktadır. Plazmada yaklaşık %90 oranında proteinlere bağlanmaktadır (21). Siklosporin A halkasal bir yapıya ve yüksek lipofilik özelliğe sahip olması ve molekül ağırlığının büyük olması nedeniyle transdermal dağılımı kolay olmamaktadır (61).

Siklosporin A, başlıca karaciğer'de olmak üzere, böbrek veya gastrointestinal yoldaki sitokrom P 450 III A enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir (21, 63). Ancak, gastrointestinal sistem mukozasında presistemik sitokrom P 450 III A enzimleri ile de metabolize olabilir (63). Siklosporin A'nın temel metabolitleri, M<sub>1</sub>, M<sub>17</sub> ve M<sub>21</sub> 'dir (59). En etkin metaboliti siklosporinin immünoşüpressif etkinliğinin % 10-20'sini gösterir ve ana ürün ile sinerjik etki göstermez (63). Siklosporin A metabolitlerinin biriktiği yer olan karaciğerde siklosporin A'nın çapraz reaksiyonu ile metabolitlerinde etkileşme görülebilir (76). Birkaç önemli parçalanma yolu tanımlanmıştır. Bunlar arasında, yan zincirdeki [MeBmt<sup>1</sup>] molekülün kaybı ile dehidrasyon, tek bağlı oksijen ile fotooksidasyon, peptid zincirinin parçalanması tamamlanırken oligopeptid zincirinin açılması ve peptidil yapısının değişimi ile siklosporin A'nın izosiklosporin'e dönüşmesi bunlar arasında sayılabilir (53). Bu metabolitler, bazı hastalarda yüksek konsantrasyona bağlı olarak yüksek nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Literatürde 30'dan fazla farklı Siklosporin A metaboliti tanımlanmıştır (21, 63). İzosiklosporin A ve siklosporin A'nın bilinen diğer metabolitleri, analizlerde, çok erken gelen sistem pikleri ile ana yapıdan ayrılabilirler (53). Bu metabolitlerden pekçoğunun immünoşüpressif etkinliği bulunmamaktadır (59, 63).

% 0.1'lik Siklosporin A göz damlalarının maksimum etkileri, 5 saat'de olmaktadır. Damlatıldıktan 24 saat sonrasına kadar bu etki devam etmiştir. % 0.1 oranında siklosporin içeren formülasyonlarda göz yaşı akışının artışı yönünde güçlü bir etki görülmüştür (62).

### 2.2.11. Siklosporin A'nın Miktar Tayini Yöntemleri

Siklosporin'in miktar tayini yöntemi olarak iki yöntem bilinmektedir: bunlar, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve yeni monoklonal antikor siklosporin RIA yöntemleridir (49, 63, 77). Yapılan bir çalışmada, organ nakli geçirmiş hastalardan alınan örneklerdeki siklosporin A miktarı, HPLC ve <sup>125</sup>I-RIA (radyoimmünessey) olarak adlandırılan iki analitik yöntemle belirlenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, siklosporin A'nın AUC ve C<sub>max</sub> gibi farmakokinetik değerlerinde, <sup>125</sup>I-RIA ve HPLC yöntemleri arasında kabul edilebilir düzeyde çok küçük farklılık olduğu görülmüştür (45, 63, 76). Ancak, pratik faydalarından dolayı, kan örneklerinden siklosporin A'nın miktarının belirlenmesi amacıyla, rutin olarak <sup>125</sup>I-işaretli monoklonal antikor olarak bilinen radyoimmünessey yöntemi kullanılır (45, 63). Bunun yanısıra, siklosporin A'ya spesifik yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi'dir. Plazma veya serum gibi biyolojik örneklerde etkin maddenin ölçümü için sıvı kromatografisi kullanılacaksa, zaman ve sıcaklıkların belirtildiği standart ayırma protokolü izlenmelidir (56, 57, 63). Bu yöntemde, hareketli faz olarak su, asetonitril, *tert*-butilmetil eter ve fosforik asit (520:430:50:1) karışımının kullanılabiliceği belirtilmiştir (57).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. MADDE ve CİHAZLAR

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Damlacık Boyutu Dağılım Cihazı	Malvern Mastersizer Hydro 2000-S	İngiltere
Hassas Terazı	Libror	Japonya
İletkenlik Ölçer	Hanna Instruments	Almanya
Mekanik Karıştırıcı	Heidolph RZR 2051	Almanya
pH Metre	Profi-Lab WTW 597	Almanya
Santrifüj	Hettich D-78532	Almanya
Ultrasonik Banyo	Elma Transsonic 470/H	Almanya
Ultraturaks	Janke&Kunkel IKA LaborTechnik	Almanya

##### 3.1.2. Kullanılan Maddeler

Benzalkonyum Klorür Çözeltisi	Doğa İlaç	Türkiye
İzopropil Miristat (IPM)	Henkel	Almanya
Mannitol	Merck	Almanya

Montanox 60 (polioksietilen 20 sorbitan monostearat)	Seppic	Fransa
Polietilen Glikol 400	Merck	Almanya
Siklosporin A	Novartis	İsviçre
Dimetikon	Goldschmidt	Almanya

### 3.2. YÖNTEMLER

Bu bölümde, mikroemülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi, formülasyonun hazırlanışı ve bu hazırlanan formülasyonun *in vitro* olarak değerlendirilmesi anlatılacaktır.

#### 3.2.1. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanması

##### 3.2.1.1. Bileşenlerin Seçimi

Mikroemülsiyon formülasyonunda, yağ fazı olarak izopropil miristat (IPM), yüzey etkin madde olarak Montanox 60<sup>®</sup>, yardımcı yüzey etkin madde olarak polietilen glikol 400 (PEG 400) ve su fazı olarak da distile su kullanılmıştır.

Çalışmamızda, aynı mikroemülsiyon formülasyonu silikon yağı eklenerek de hazırlanmıştır. Silikon yağı eklenerek hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun görünümünün daha saydam olması ve kararlılığının daha uzun süre devam etmesi nedeniyle çalışmamıza silikon yağı içeren mikroemülsiyon formülasyonu ile devam edilmiştir. Formülasyonda etkin madde olarak siklosporin A kullanılmıştır. Çizelge 2'de hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının bileşimleri ve formülasyon içindeki bileşenleri gösterilmiştir.

**Çizelge 2. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonları ve Bileşimleri**

Maddeler	Miktar % (a/a)			
	Formülasyon 1	Formülasyon 2	Formülasyon 3	Formülasyon 4
Siklosporin A	—	—	0.10	0.10
İzopropil miristat	5.00	4.00	4.90	3.90
Mannitol	5.09	5.09	5.09	5.09
Benzalkonyum klorür çözeltisi	0.01	0.01	0.01	0.01
Polietilen glikol 400	9.46	9.46	9.46	9.46
Montanox 60®	23.65	23.65	23.65	23.65
Distile su	56.70	56.70	56.70	56.70
Dimetikon	—	1.00	—	1.00

### 3.2.1.2. Üçgen Faz Diyagramının Çizimi

Üçgen faz diyagramının çizilmesi ve mikroemülsiyon alanının saptanması aşağıda belirtilen aşamalara göre yapılmıştır:

- 1- En büyük mikroemülsiyon bölgesi veren yüzey etkin madde (yem)/yardımcı yüzey etkin madde (Ko-S) oranı belirlenmiştir. Üçgen faz diyagramının çizilmesi için çalışmamızda kullandığımız oranlar 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0'dür.
- 2- Belirli yüzde oranlarında, yağ fazı ile yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde'den oluşan karışımlar hazırlanmıştır. Bunun için, yağ fazı ile yem /Ko-S karışımları (% 10 yağ : % 90 yem/Ko-S; % 20 yağ : % 80 yem/Ko-S; % 30 yağ : % 70 yem/Ko-S; % 40 yağ : % 60 yem/Ko-S; % 50 yağ : % 50 yem/Ko-S; % 60 yağ : % 40 yem/Ko-S; % 70 yağ : % 30 yem/Ko-S; % 80 yağ : % 20 yem/Ko-S; % 90 yağ : % 10 yem/Ko-S) olacak şekilde hazırlanmıştır.



- 3- Bu karışım sabit sıcaklıkta karıştırılırken üzerine damla damla distile su eklenmiştir. Sistemin bulanık olduğu noktada harcanan distile su miktarı hesaplanmış ve bu noktadaki yağ, su ve yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde miktarları belirlenmiştir.
- 4- Bu işlem her bir yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranları için yapılmıştır.
- 5- Her bir yem/Ko-S oranı ve bu orana karşılık gelen oranlar grafiğe geçirilmiştir. En yüksek mikroemülsiyon alanını veren yem/Ko-S oranı belirlenerek formülasyon bu orana göre düzenlenmiştir.
- 6- En yüksek alan veren yem/Ko-S oranında, mikroemülsiyon bölgesi veren üçgen faz diyagramı çizilmiştir. Faz diyagramı sonucunda oluşan şeklin ağırlık merkezi bulunarak optimum formülasyon belirlenmiştir.

### **3.2.1.3. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanması**

#### **3.2.1.3.1. Üçgen Faz Diyagramının Çizimi için Gerekli Olan Ön Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması**

Farklı yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde oranları (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0) düşünülerek ön formülasyonlar hazırlanmıştır. Buna göre, çalışma programı dokuz farklı formülasyon için düzenlenmiştir. Formülasyonlar toplam formülasyon 10 g olacak şekilde hazırlanmıştır. Yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve yağ fazı su banyosu üzerinde 60 °C oluncaya kadar mekanik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış ve bu durumda sistemin berrak ve kararlı olduğu gözlenmiştir. Distile su, sistemde bulanıklık oluşuncaya kadar büret yardımıyla damla damla eklenmiş ve sistemin bulanık olduğu noktada distile suyun eklenmesi kesilerek, harcanan distile su miktarı belirlenmiştir. Üçgen faz diyagramının çizilmesinde hazırlanan formülasyonlar ve harcanan distile su miktarları **Çizelge 3**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesinde Hazırlanan Formülasyonlar**

Formül	YEM/ KO-S Oranı	Yağ (g)	Yem + Ko-S (g)	Distile SU (g)	Formül	YEM/ KO-S Oranı	Yağ (g)	Yem + Ko-S (g)	Distile Su (g)
D1	0.5	1.0	9.0	2.4	E1	1.0	1.0	9.0	3.5
D2		2.0	8.0	2.6	E2		2.0	8.0	3.8
D3		3.0	7.0	2.3	E3		3.0	7.0	3.4
D4		4.0	6.0	2.0	E4		4.0	6.0	3.2
D5		5.0	5.0	1.9	E5		5.0	5.0	2.9
D6		6.0	4.0	1.6	E6		6.0	4.0	2.7
D7		7.0	3.0	1.4	E7		7.0	3.0	2.4
D8		8.0	2.0	1.1	E8		8.0	2.0	2.1
D9		9.0	1.0	1.0	E9		9.0	1.0	1.5
F1	1.5	1.0	9.0	1.6	G1	2.0	1.0	9.0	4.4
F2		2.0	8.0	1.8	G2		2.0	8.0	4.6
F3		3.0	7.0	1.6	G3		3.0	7.0	4.3
F4		4.0	6.0	1.5	G4		4.0	6.0	4.1
F5		5.0	5.0	1.3	G5		5.0	5.0	4.0
F6		6.0	4.0	1.2	G6		6.0	4.0	3.8
F7		7.0	3.0	1.0	G7		7.0	3.0	3.5
F8		8.0	2.0	0.9	G8		8.0	2.0	3.3
F9		9.0	1.0	0.6	G9		9.0	1.0	3.1
H1	2.5	1.0	9.0	6.5	J1	3.0	1.0	9.0	6.2
H2		2.0	8.0	6.3	J2		2.0	8.0	5.8
H3		3.0	7.0	5.5	J3		3.0	7.0	5.6
H4		4.0	6.0	5.3	J4		4.0	6.0	5.3
H5		5.0	5.0	5.1	J5		5.0	5.0	5.0
H6		6.0	4.0	4.9	J6		6.0	4.0	4.7
H7		7.0	3.0	4.8	J7		7.0	3.0	4.3
H8		8.0	2.0	4.5	J8		8.0	2.0	4.1
H9		9.0	1.0	4.4	J9		9.0	1.0	3.8

### **3.2.1.3.2. Siklosporin A İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması**

Formülasyon 1 ve 2 hazırlanırken, sulu faz olarak Montanox 60<sup>®</sup>, polietilen glikol 400, benzalkonyum klorür çözeltisi, mannitol ve distile su manyetik karıştırıcıda homojen bir sistem elde edilinceye kadar 60°C'de karıştırılmıştır. Aynı sıcaklığa getirilmiş izopropil miristat, sabit sıcaklıkta karıştırılarak homojen hale getirilen su fazı üzerine damla damla eklenmiştir. Bu işlem sonucunda süt görünümünde kararlı kaba bir emülsiyon elde edilmiştir. Daha sonra, 60°C'de karıştırılarak elde edilen emülsiyon sistemi, 5 dakika gibi kısa süre içinde 13500 rpm hızda ultraturaks ile karıştırılarak buz banyosu yardımıyla soğutulmuştur. Elde edilen mikroemülsiyon formülasyonu, aynı karıştırma hızında yine ultraturaks yardımı ile buz banyosunda 10 dakika daha karıştırılarak homojenize edilmesi sağlanmıştır. Tüm bu işlemler sırasında sıcaklık 10°C'nin altında tutulmuştur. Formülasyon 3 ve 4'de aynı şekilde hazırlanmıştır, ancak etkin madde olan siklosporin A yağlı fazda çözünmesi nedeniyle yağlı faza eklenmiştir. Formülasyon 2 ve 4'de sistemin kararlılığını arttırmak amacıyla silikon yağı kullanılmıştır.

Daha sonra hazırlanan tüm bu mikroemülsiyon formülasyonlarının pH'sı 0.1 N. NaOH çözeltisi kullanılarak 7.0'e ayarlanmıştır.

### **3.2.1.4. En Uygun (Optimum) Mikroemülsiyon Formülasyonunun Belirlenmesi**

En büyük mikroemülsiyon alanını veren yem/Ko-S oranı kullanılarak, mikroemülsiyon bölgesini veren üçgen faz diyagramı çizilmiştir. Mikroemülsiyon alanı kullanılarak optimum formülasyon belirlenmiştir. *In vitro* fiziksel kararlılık çalışmalarında, mikroemülsiyon bölgesinin ağırlık merkezi esas alınarak hazırlanacak olan mikroemülsiyon formülasyonunun bileşenleri hesaplanmıştır.

### **3.2.2. Formülasyonun Özelliklerinin Belirlenmesi**

Hazırlanan formülasyonların özelliklerini aydınlatabilmek, kullanılan taşıyıcıdan gelen farklılıkları izleyebilmek, hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları ve etkin madde ile taşıyıcılar arasındaki etkileşim ve geçimsizlikleri araştırmak üzere bir seri analizler yapılmıştır. Bunlar, mikroemülsiyonun tipi, kırılma indisi, iletkenliği, pH'sı, damlacık boyutu dağılımı, santrifüj özellikleri ve kararlılığının belirlenmesidir.

#### **3.2.2.1. Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünüşü**

Taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığındaki (25°C) fiziksel görünüşleri incelenmiştir.

#### **3.2.2.2. Mikroemülsiyonun Tipi**

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının tipleri, dış faz su ile seyreltilerek belirlenmiştir.

#### **3.2.2.3. Santrifüj**

Hazırlanan taze mikroemülsiyon sistemleri 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından herhangi bir faz ayrışması olup olmadığı incelenmiştir.

#### **3.2.2.4. Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi**

Taze hazırlanmış mikroemülsiyon sisteminin kırılma indisi, kırılma indisi ölçer ile sodyum ışığı kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.2.2.5. Mikroemülsiyonun Elektriksel İletkenliği**

Taze hazırlanmış mikroemülsiyonun elektriksel iletkenliği, iletkenlik ölçer kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.2.2.6. Mikroemülsiyonun pH'sı**

Taze hazırlanmış mikroemülsiyonun pH'sı oda sıcaklığında pH ölçer ile ölçülerek belirlenmiştir.

### **3.2.2.7. Mikroemülsiyonun Damlacık Büyüklüğü**

Taze hazırlanmış mikroemülsiyonun damlacık büyüklüğü dağılımı distile su ortamında lazer taramalı cihaz kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.2.2.8. Mikroemülsiyonun Kararlılık Çalışmaları**

Mikroemülsiyonun kararlılığının incelenmesi amacıyla, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları, 4°C, 25°C, 40°C ve 40°C + % 60 relatif nem'de saklanmıştır. Mikroemülsiyonun ağırlık merkezi esas alınarak, dimetikon içeren formülasyon için 1., 5., ve 6. aylarda formülasyonun, fiziksel görünüşü, tipi, bulanıklığı, kırılma indisi, elektriksel iletkenliği, pH'sı, damlacık büyüklüğü ve faz ayrışması gibi özellikleri belirtilen zaman aralıklarında tekrar incelenmiştir.

#### **3.2.2.8.1. Mikroemülsiyonun Santrifüjü**

Termodinamik olarak kararlı bir mikroemülsiyon sisteminin hazırlanmasından sonra değişik sıcaklıklarda (4°C, 25°C, 40°C, 40°C + % 60 relatif nem) saklanan mikroemülsiyon sistemlerinin 1., 5., ve 6. aylarda faz ayrışmasına uğrayıp uğramadığı gözlenmiştir.

### **3.2.2.8.2. Mikroemülsiyonun Tipi**

Hazırlanmış y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonlarının tipleri, 1., 5., ve 6. aylarda dış faz su ile seyreltilerek kontrol edilmiştir.

### **3.2.2.8.3. Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi**

Hazırlanmış ve değişik sıcaklık ortamlarında saklanmış mikroemülsiyon formülasyonunun 25°C'deki, 40°C'deki ve 40°C + % 60 relatif nem ortamlarındaki kırılma indisleri, 1., 5. ve 6. ayların sonunda ölçülerek, yeni hazırlanmış mikroemülsiyon sistemlerinin kırılma indisleri ile karşılaştırılmıştır.

### **3.2.2.8.4. Mikroemülsiyonun İletkenliği**

Farklı sıcaklık ortamlarında saklanmış (4°C, 25°C, 40°C, 40°C + % 60 relatif nem) mikroemülsiyon formülasyonlarının belirlenen zaman aralıklarında (1., 5., ve 6. Aylar) aynı iletkenlik ölçer kullanılarak, iletkenlik değerleri ölçülmüştür.

### **3.2.2.8.5. Mikroemülsiyonun pH Değerleri**

Aynı şekilde hazırlanmış ancak farklı sıcaklık ortamlarında saklanmış (4°C, 25°C, 40°C, 40°C + % 60 relatif nem) mikroemülsiyon formülasyonlarının başlangıçta ölçülen pH değeri ile aynı şartlarda ve aynı pH ölçer kullanılarak 1., 5. ve 6. aylarda pH değerleri tekrar ölçülmüştür.

### **3.2.2.8.6. Mikroemülsiyonun Damlacık Büyüklüğü Dağılımı**

Farklı sıcaklık ortamlarında saklanmış (4°C, 25°C, 40°C, 40°C + % 60 relatif nem) mikroemülsiyon formülasyonlarının belirlenen zaman aralıklarında (1., 5., ve 6. aylar) damlacık büyüklüğü cihazı kullanılarak damlacık büyüklük dağılımları belirlenmiştir.

### 3.2.2.8.7. Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü

Farklı sıcaklık ortamlarında saklanmış mikroemülsiyon formülasyonunun fiziksel görünüşü 6 ay boyunca hergün kontrol edilerek fiziksel görünümü hakkındaki gözlemler not edilmiştir.

## 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

### 4.1. SONUÇLAR

Bu bölümde, bir önceki bölümde anlatılan, mikroemülsiyon formülasyonu üzerinde yapılan *in vitro* çalışmaların sonuçları verilmiştir.

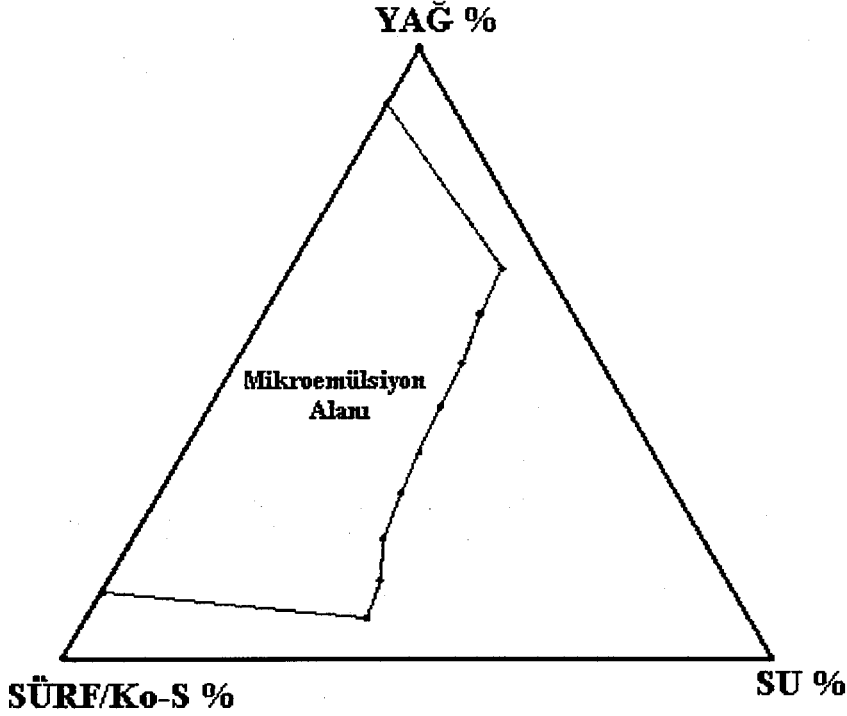
#### 4.1.1. Formülasyonun Hazırlanmasına Ait Sonuçlar

##### 4.1.1.1. Mikroemülsiyon Bileşenlerinin Seçimi

Hazırladığımız dört tip mikroemülsiyon sisteminde temel mikroemülsiyon bileşenlerinden yağlı faz olarak izopropil miristat, yüzey etkin madde olarak Montanox 60<sup>®</sup>, yardımcı yüzey etkin madde olarak polietilen glikol 400, ve distile su kullanılmıştır. Bu dört bileşen ile saydam ve 6 ayı aşkın süre kararlılığını sürdüren ve damlacık büyüklüğü yaklaşık 0.1 µm olan mikroemülsiyon sistemi elde edilmiştir. Ancak, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının 4 °C'deki kararlılığını arttırmak amacıyla formülasyona silikon yağı (dimetikon) eklenmiştir. Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun oftalmik olarak kullanılacağı düşünüldüğü için, elde edilecek mikroemülsiyon sisteminin izotonik özellik taşıması gerektiği düşünülmüştür. Bu durumda tüm mikroemülsiyon formülasyonlarına, tüm bu bileşenlerden başka, mannitol eklenmiştir. Yine hazırlanacak formülasyonun antimikrobiyal özellik göstermesi istenildiğinden hazırlanan tüm mikroemülsiyon sistemlerine benzalkonyum klorür çözeltisi su fazına eklenmiştir.

#### 4.1.1.2. Üçgen Faz Diyagramının Çizimi

Bölüm 3.2.1.2'de anlatılan faz çalışmalarında, en büyük mikroemülsiyon alanını veren yem/Ko-S oranı 2.5 olarak belirlenmiştir. Şekil 4'de yüzey etkin madde oranı 2.5 olan faz diyagramı görülmektedir.



Şekil 4. Yem/Ko-S Oranı 2.5 Olan Mikroemülsiyona Ait Üçgen Faz Diyagramı.

#### 4.1.1.3. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı

##### 4.1.1.3.1. Üçgen Faz Diyagramının Çizilmesi için Gerekli Olan Ön Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı

Bölüm 3.2.1.3.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan formülasyonların, su alma kapasiteleri belirlenmiş ve daha sonra da üçgen faz diyagramına aktarılarak mikroemülsiyon alanı saptanmıştır. Hazırlanan bu ön mikroemülsiyon



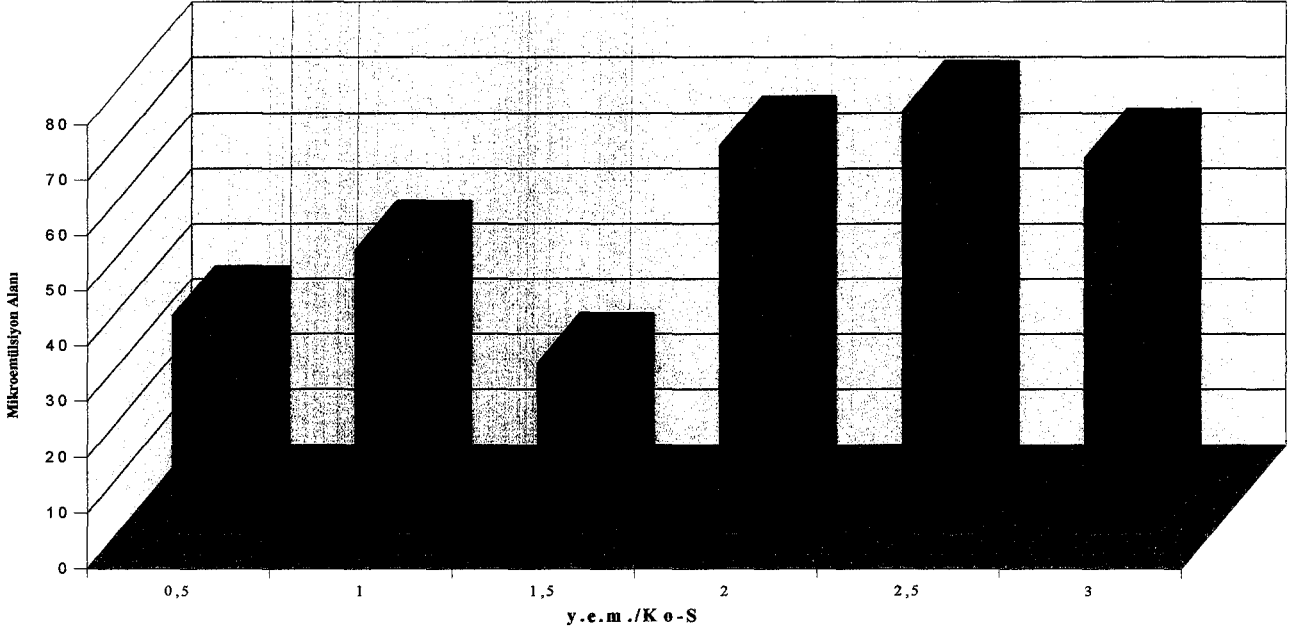
formülasyonlarının tümü kararlılık göstermiş ve herhangi bir faz ayrışması görülmemiştir.

#### **4.1.1.3.2. Etkin Madde İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanışı**

Bölüm 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının, hazırlanması sırasında kararlılık ya da bileşenlerden gelebilecek olumsuz etkileşime rastlanmamıştır.

#### **4.1.1.4. Üçgen Faz Diyagramında En Uygun Mikroemülsiyon Formülasyonunun Belirlenmesi**

Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde çizilen üçgen faz diyagramı sonucunda elde edilen faz üçgen faz diyagramlarında en geniş mikroemülsiyon alanını veren yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranı 2.5'dur. Bu nedenle yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranı 2.5 olan üçgen faz diyagramındaki mikroemülsiyon alanının ağırlık merkezi kullanılarak siklosporin A içeren mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir.



**Şekil 5. Değişen yem/Ko-S Oranına Karşılık Mikroemülsiyon Alanlarında Oluşan Değişim.**

#### **4.1.2. Mikroemülsiyonun Fiziksel Özelliklerine Ait Sonuçlar**

##### **4.1.2.1. Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü**

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde taze hazırlanmış tüm mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) görünümleri, herhangi bir faz ayrışması sorunu olmayan, saydam ve tekdüze olarak belirlenmiştir.

##### **4.1.2.2. Hazırlanan Mikroemülsiyonların Tipi**

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde, taze hazırlanmış tüm mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) emülsiyon tipi su-içinde yağ (y/s ) olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.2.3. Santrifüj

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan tüm mikroemülsiyon formülasyonları (F1, F2, F3 ve F4) 4000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilmiş ve her dört formülasyonda da santrifüj sonunda faz ayrışmasına rastlanmamıştır.

#### 4.1.2.4. Hazırlanan Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi

Bölüm 1.3.1 ve 1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) kırılma indisleri, kırılma indisi ölçer kullanılarak ölçülmüş ve **Çizelge 4**'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 4. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Kırılma İndisi Değerleri**

Kırılma İndisi			
Formülasyon 1	Formülasyon 2	Formülasyon 3	Formülasyon 4
1.4365	1.4370	1.4363	1.4366

#### 4.1.2.5. Hazırlanan Mikroemülsiyonların Elektriksel İletkenliği

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde, tüm taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) elektriksel iletkenliği elektrik iletkenliği ölçer kullanılarak ölçülmüştür. Dört formülasyonun elektriksel iletkenliği **Çizelge 5**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 5. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Elektriksel İletkenlik Değerleri**

İletkenlik ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )			
Formülasyon 1	Formülasyon 2	Formülasyon 3	Formülasyon 4
2.37	2.47	2.50	2.48

#### 4.1.2.6. Hazırlanan Mikroemülsiyonların pH Ölçümleri

Bölüm 1.3.1 ve 1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan tüm taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) pH değerleri, oda sıcaklığında pH ölçer kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 6.**'da gösterilmiştir.

**Çizelge 6. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının pH Değerleri**

pH			
Formülasyon 1	Formülasyon 2	Formülasyon 3	Formülasyon 4
6.42	6.45	6.43	6.47

#### 4.1.2.7. Hazırlanan Mikroemülsiyonların Damlacık Büyüklük Dağılımları

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan tüm taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının (F1, F2, F3 ve F4) damlacık büyüklük dağılımları, damlacık büyüklüğü ve dağılımı ölçer ile belirlenmiştir. **Çizelge 7**'de hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının ortalama damlacık büyüklükleri gösterilmiştir.

**Çizelge 7. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Damlacık Büyüklüğü Değerleri**

Ortalama Damlacık Büyüklüğü ( $\mu\text{m}$ )			
Formülasyon 1	Formülasyon 2	Formülasyon 3	Formülasyon 4
0.124	0.132	0.149	0.156

#### **4.1.2.8. Mikroemülsiyonların Kararlılıkları**

##### **4.1.2.8.1. Mikroemülsiyonun Fiziksel Görünümü**

Bölüm 3.2.1.3.1 ve 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan dört mikroemülsiyon formülasyonunun, dört farklı sıcaklık ortamlarında saklanarak (4°C, 25°C, 40°C ve 40 °C + % 60 nem ortamlarında) 1., 5. ve 6. aylardaki fiziksel görünümleri incelenmiştir. 4°C'de saklanan mikroemülsiyon formülasyonu hariç, tüm formülasyonlar, 6 aydan uzun süre fiziksel görünümlemlerini değiştirmemiştir. 4°C'de bekletilen mikroemülsiyon formülasyonunun aglomere olması sonucunda, mikroemülsiyon sisteminin berrak görünümünün yerini opak görünüm almıştır. Bu olumsuzluğu önlemek amacıyla sisteme silikon yağı (dimetikon) eklenmiştir. Ancak, 4°C'de silikon yağı (dimetikon) kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları (Formülasyon 2 ve formülasyon 4) da bir ay gibi kısa bir süre sonra silikon yağı içermeyen Formülasyon 1 ve formülasyon 3 gibi aglomerasyona uğramıştır.

##### **4.1.2.8.2. Mikroemülsiyonun Tipi**

Bölüm 3.2.1.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan dört y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonunun, üç farklı sıcaklık ortamlarında bekletilerek (25°C, 40°C ve 40 °C + % 60 nem ortamlarında) 1., 5. ve 6. aylarda tüm formülasyonların emülsiyon tipinin y/s olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.2.8.3. Mikroemülsiyonun Kırılma İndisi

Farklı sıcaklık ve ortamlarda saklanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığındaki kırılma indisleri, kırılma indisi ölçer kullanılarak ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 8. ve Çizelge 9 ve Çizelge 10'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılmış ve hem formülasyonlar hem de zamanlar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ).

Çizelge 8. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış, Formülasyon 2'e ait Kırılma İndisi Değerleri

Kırılma İndisi ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	1.4372±0.0001	1.4366±0.0001	1.4371±0.0001
5	1.4374±0.0006	1.4351±0.0006	1.4360±0.0006
6	1.4379±0.0002	1.4387±0.0002	1.4380±0.0002

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 9. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış, Formülasyon 3'e ait Kırılma İndisi Değerleri

Kırılma İndisi ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	1.4375±0.0005	1.4357±0.0005	1.4369±0.0005

**Çizelge 10. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış, Formülasyon 4'e ait Kırılma İndisi Değerleri**

<b>Kırılma İndisi ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	1.4385±0.0005	1.4365±0.0005	1.4378±0.0005
<b>5</b>	1.4375±0.0009	1.4350±0.0009	1.4380±0.0009
<b>6</b>	1.4378±0.0003	1.4382±0.0003	1.4370±0.0003

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

#### **4.1.2.8.4. Mikroemülsiyonun Elektriksel İletkenlik Değerleri**

Farklı sıcaklıklarda saklanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığındaki elektriksel iletkenlikleri, iletkenlik ölçer kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen değerler **Çizelge 11**, **Çizelge 12** ve **Çizelge 13**'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılmış ve hem formülasyonlar hem de zamanlar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ).

**Çizelge 11. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'e ait Elektriksel İletkenlik Değerleri**

<b>İletkenlik (<math>\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}</math>) ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	2.48±0.050	2.36±0.050	2.56±0.050
<b>5</b>	2.46±0.020	2.44±0.020	2.52±0.020
<b>6</b>	2.40±0.030	2.35±0.030	2.48±0.030

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

**Çizelge 12. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e ait Elektriksel İletkenlik Değerleri**

İletkenlik ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	2.39±0.060	2.50±0.060	2.62±0.060

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

**Çizelge 13. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e ait Elektriksel İletkenlik Değerleri**

İletkenlik ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ) ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	2.37±0.010	2.38±0.010	2.68±0.010
5	2.36±0.010	2.70±0.010	2.74±0.010
6	2.20±0.020	2.28±0.020	2.52±0.020

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.



#### 4.1.2.8.5. Mikroemülsiyonun pH Değerleri

Farklı sıcaklık ve ortamlarda saklanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığındaki pH değerleri, pH-Metre kullanılarak ölçülmüştür. pH değerleri Formülasyon 2 için Çizelge 14'de, Formülasyon 3 için Çizelge 15'de, Formülasyon 4 için Çizelge 16'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılmış ve hem formülasyonlar hem de zamanlar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ).

Çizelge 14. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'e ait pH Değerleri

pH ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	7.19±0.012	7.16±0.012	7.20±0.012
5	7.26±0.020	7.22±0.020	7.19±0.020
6	7.15±0.010	7.19±0.010	7.18±0.010

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 15. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e ait pH Değerleri

pH ve Standart Hata Değerleri			
Zaman (Aylar)	25 °C	40 °C	40 °C + % 60 nem
1	7.10±0.010	7.15±0.010	7.12±0.010

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

**Çizelge 16. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e ait pH Değerleri**

<b>pH ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	7.15±0.008	7.17±0.008	7.18±0.008
<b>5</b>	7.16±0.010	7.12±0.010	7.17±0.010
<b>6</b>	7.10±0.020	7.14±0.020	7.19±0.020

\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.

#### **4.1.2.8.6. Mikroemülsiyonun Damlacık Büyüklüğü Değerleri**

Farklı sıcaklıklarda ve ortamlarda saklanmış mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklükleri damlacık boyutu ölçer kullanılarak ölçülmüştür. Formülasyon 2'den elde edilen sonuçlar **Çizelge 17'**de, Formülasyon 3'den elde edilen sonuçlar **Çizelge 18'**de, Formülasyon 4'den elde edilen sonuçlar da **Çizelge 19'**da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testi ile karşılaştırılmış ve hem formülasyonlar hem de zamanlar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ).

**Çizelge 17. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 2'e ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları**

<b>Ortalama Damlacık Büyüklüğü (<math>\mu\text{m}</math>) ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	0.183±0.004	0.192±0.004	0.198±0.004
<b>5</b>	0.221±0.006	0.241±0.006	0.221±0.006
<b>6</b>	0.192±0.007	0.202±0.007	0.219±0.007

**\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.**

**Çizelge 18. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 3'e ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları**

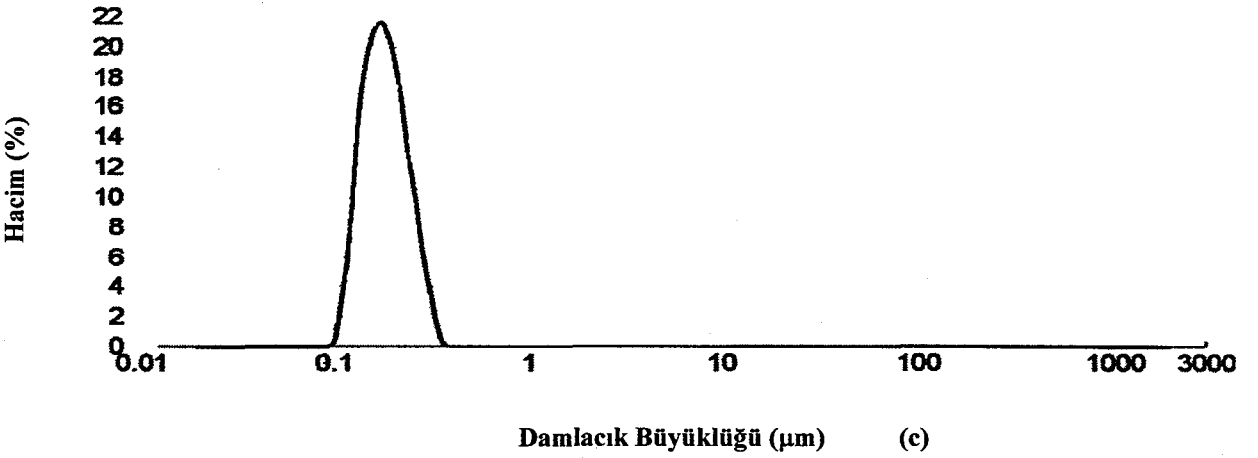
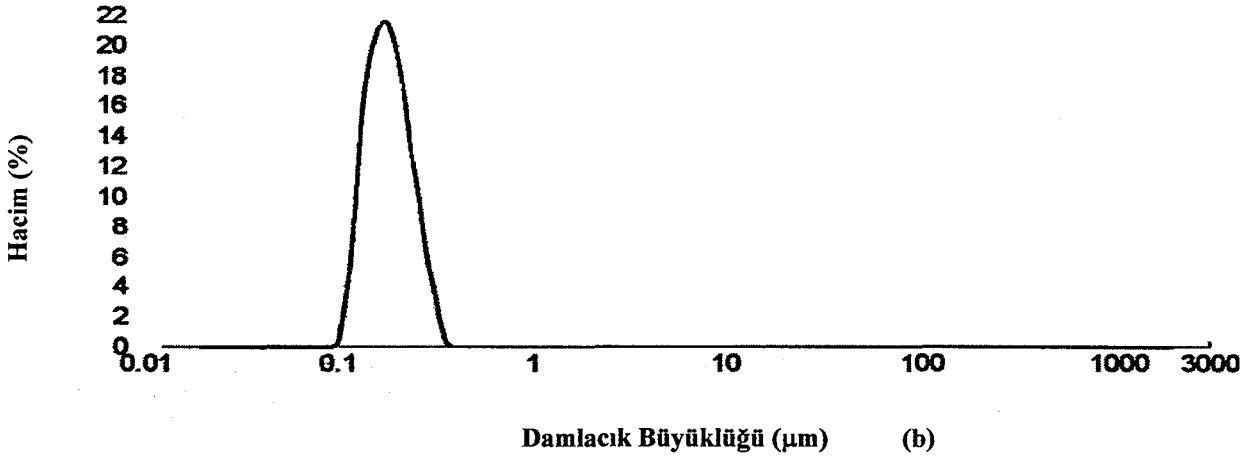
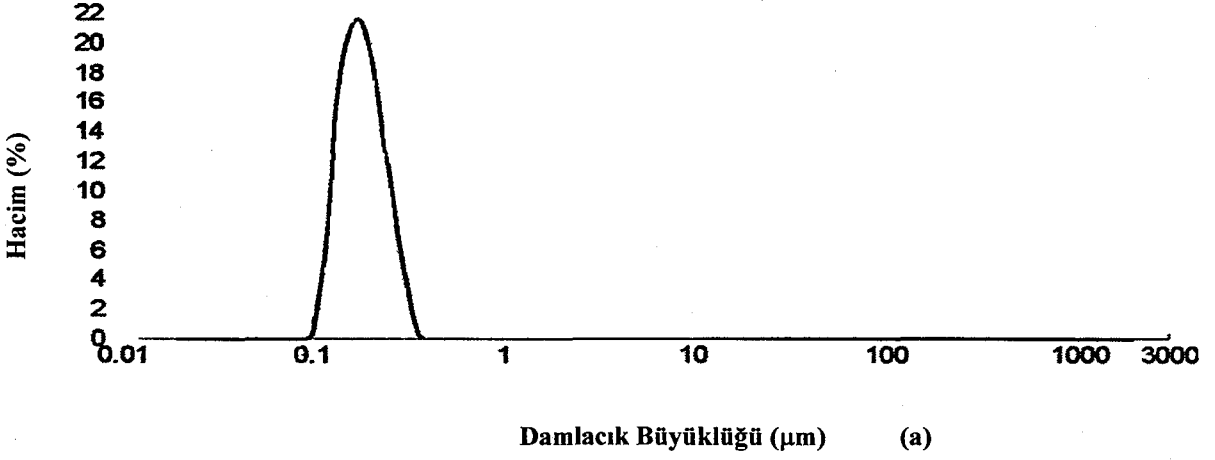
<b>Ortalama Damlacık Büyüklüğü (<math>\mu\text{m}</math>) ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	0.258±0.004	0.255±0.004	0.241±0.004

**\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.**

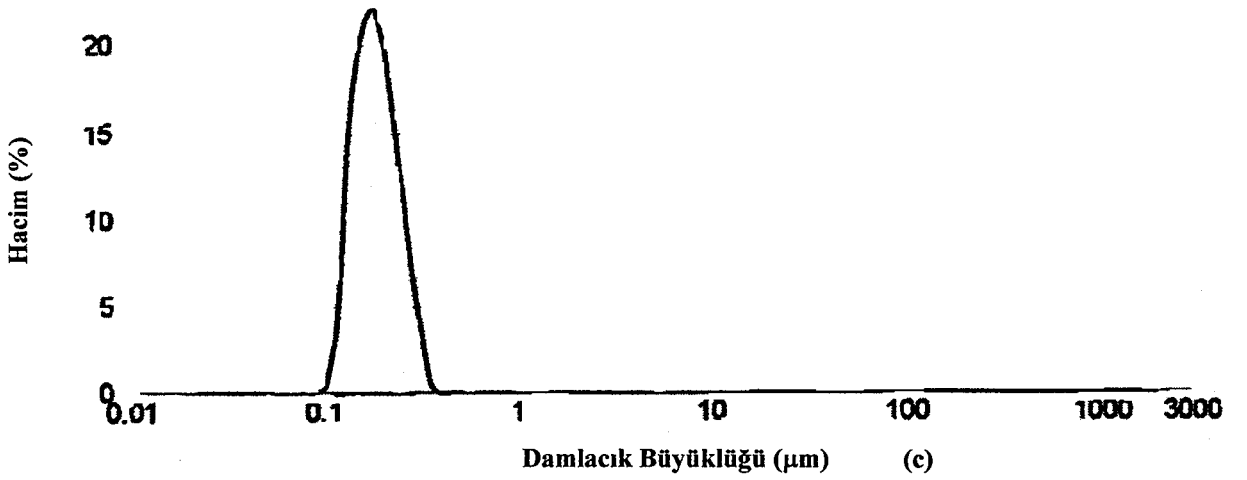
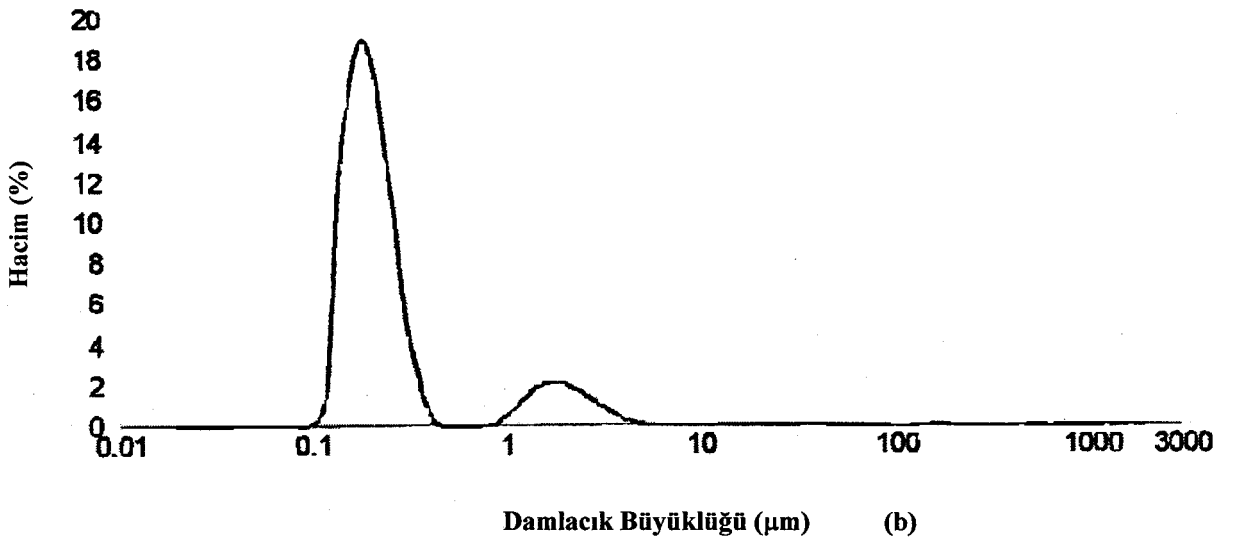
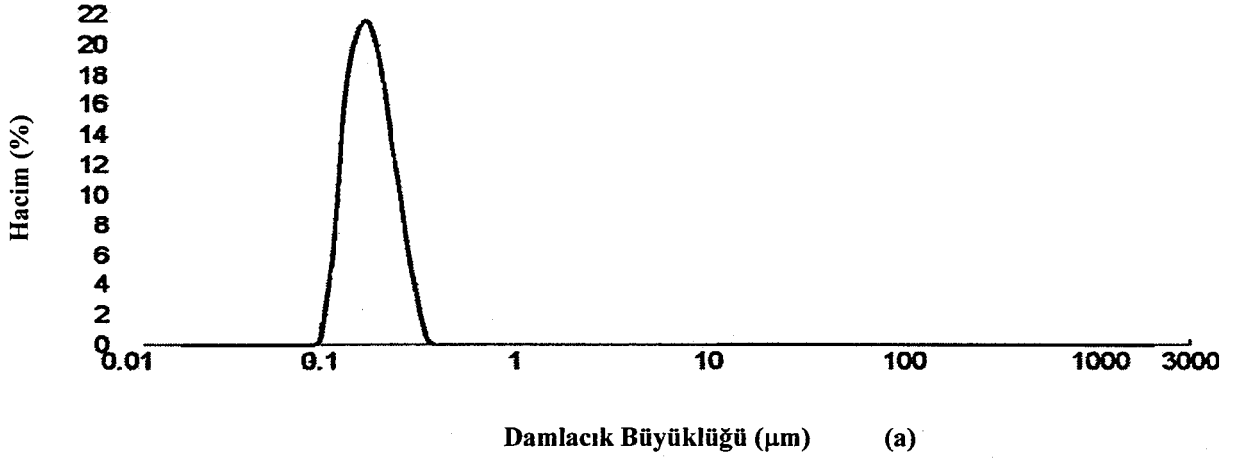
**Çizelge 19. Farklı Sıcaklıklarda Saklanmış Formülasyon 4'e ait Damlacık Büyüklüğü Sonuçları**

<b>Ortalama Damlacık Büyüklüğü (<math>\mu\text{m}</math>) ve Standart Hata Değerleri</b>			
<b>Zaman (Aylar)</b>	<b>25 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>40 °C + % 60 nem</b>
<b>1</b>	0.183±0.010	0.198±0.010	0.221±0.010
<b>5</b>	0.192±0.006	0.202±0.006	0.215±0.006
<b>6</b>	0.203±0.006	0.192±0.006	0.187±0.006

**\*Herbir zaman için üç ölçüm yapılmıştır.**



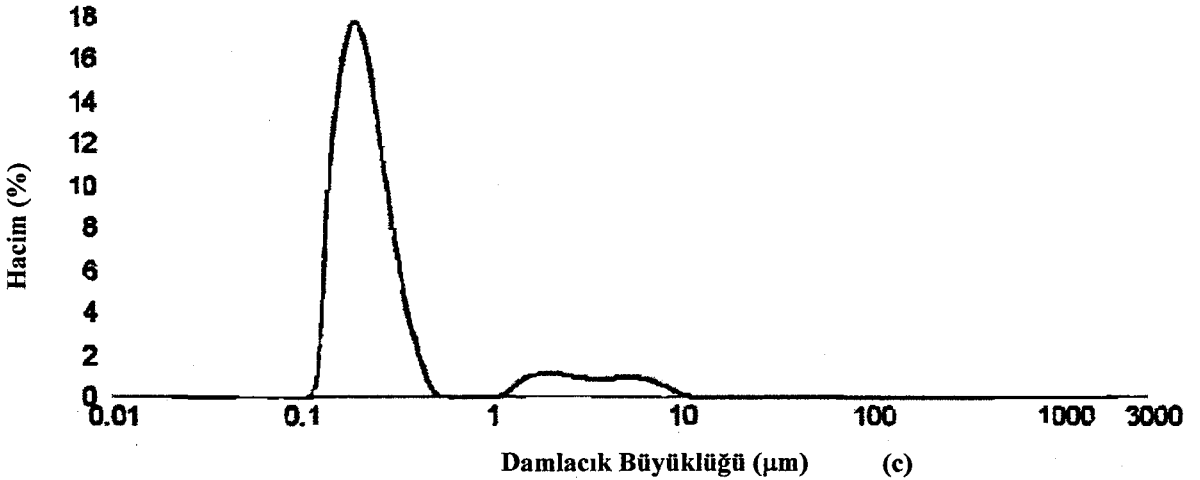
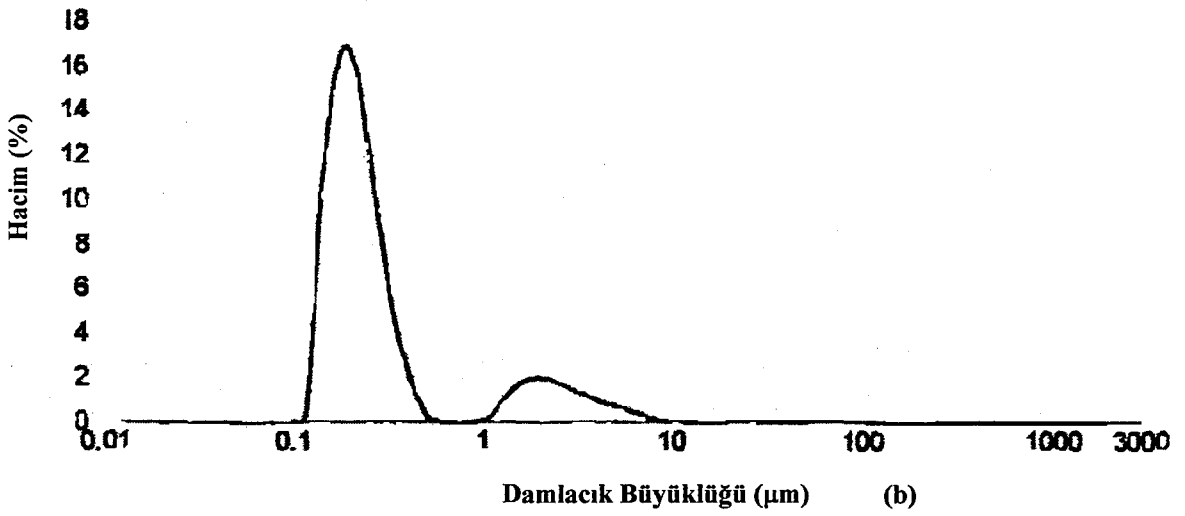
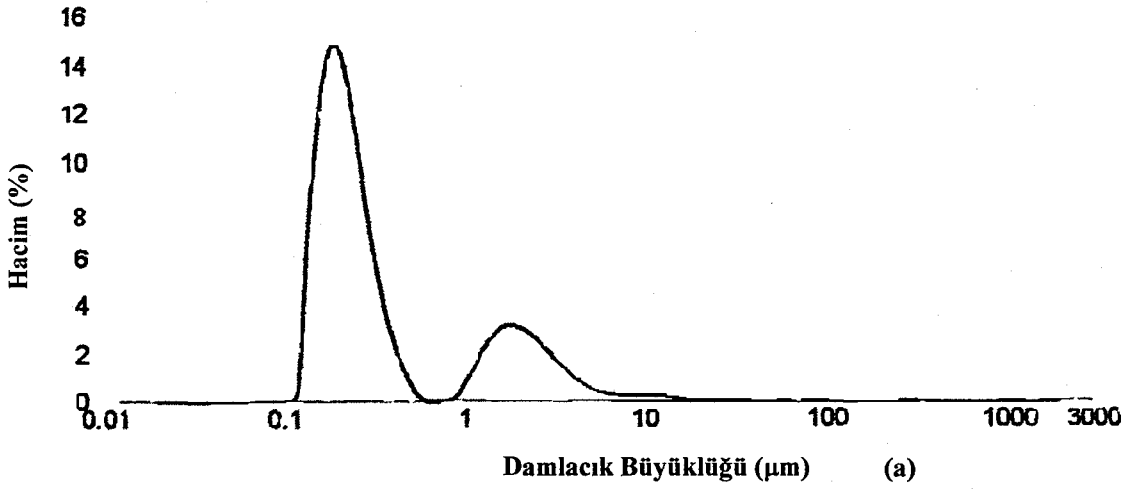
**Şekil. 6.1.** a: 25 °C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
b: 40°C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 1. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
c : 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.



Şekil. 6.2. a: 25 °C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 5. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

b: 40°C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 5. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

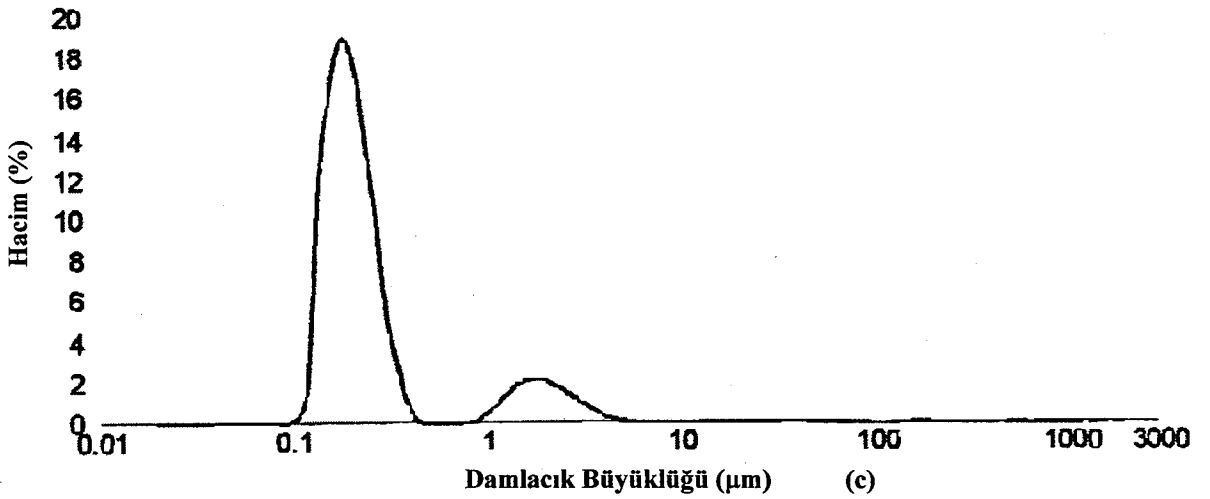
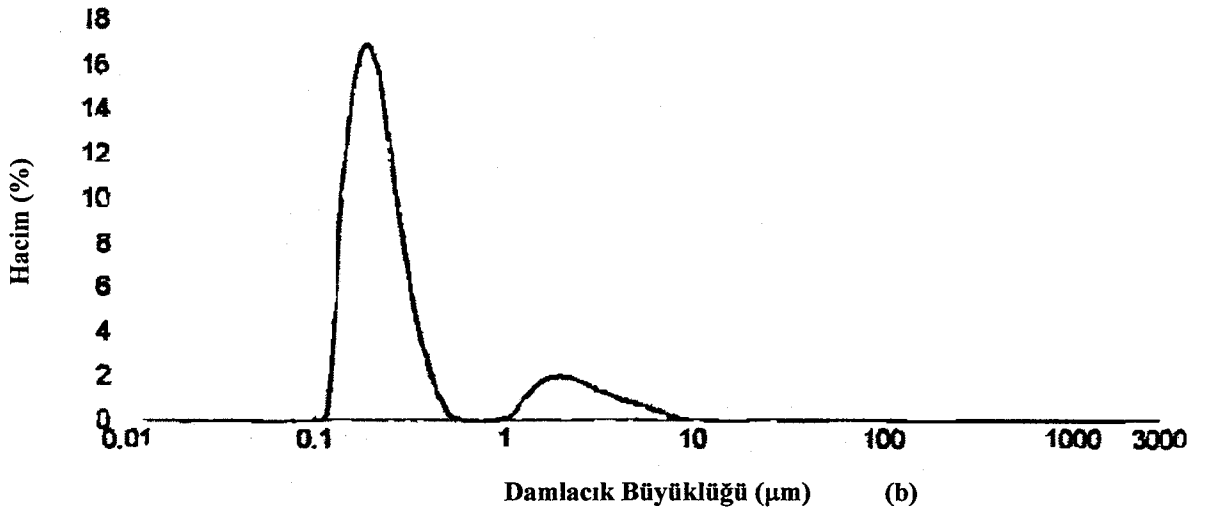
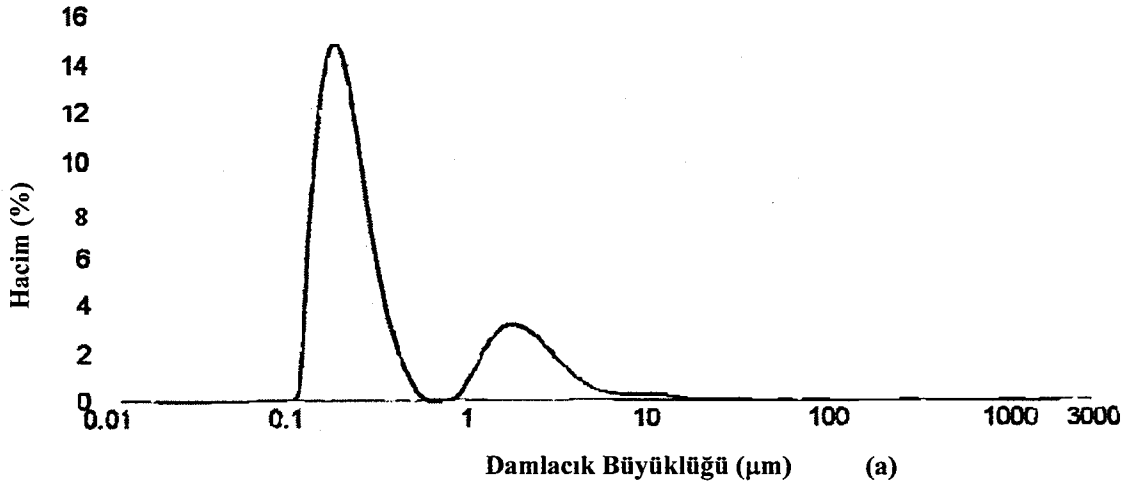
c:40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 5. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.



Şekil. 6.3. a: 25 °C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 6. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

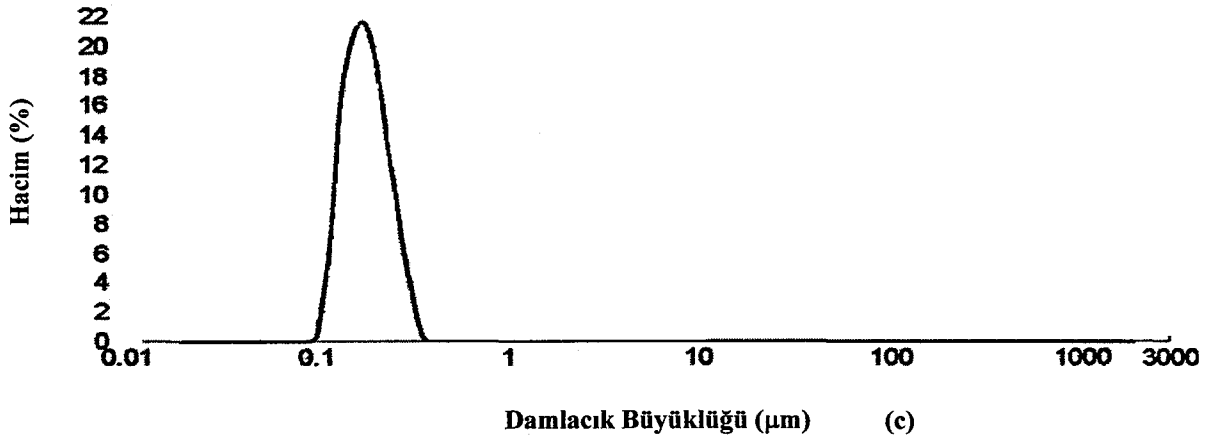
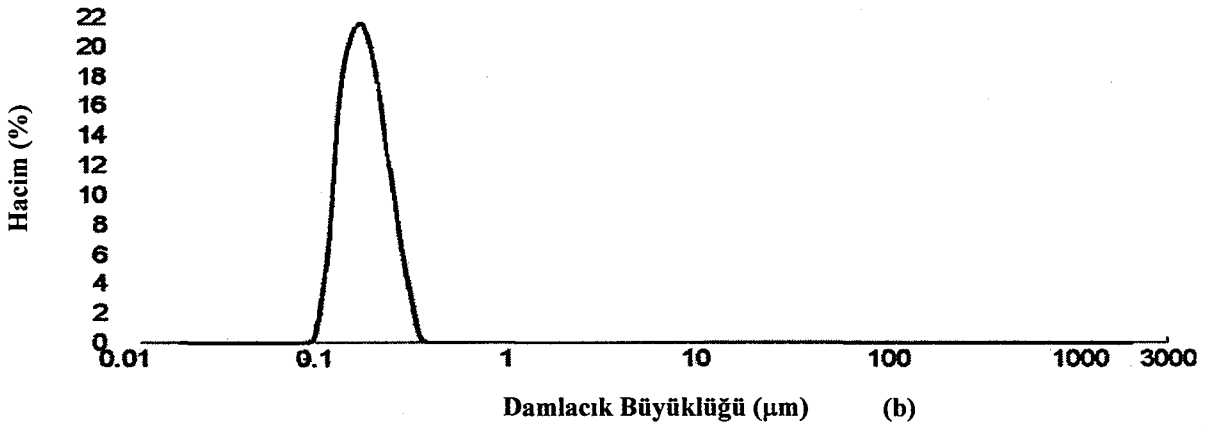
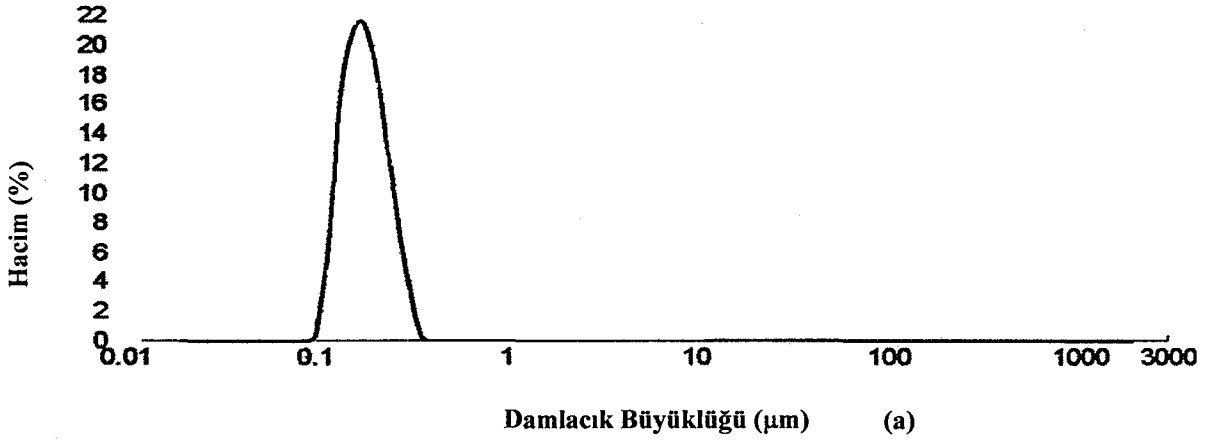
b: 40°C'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 6. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

c : 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F2 Formülasyonunun 6. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

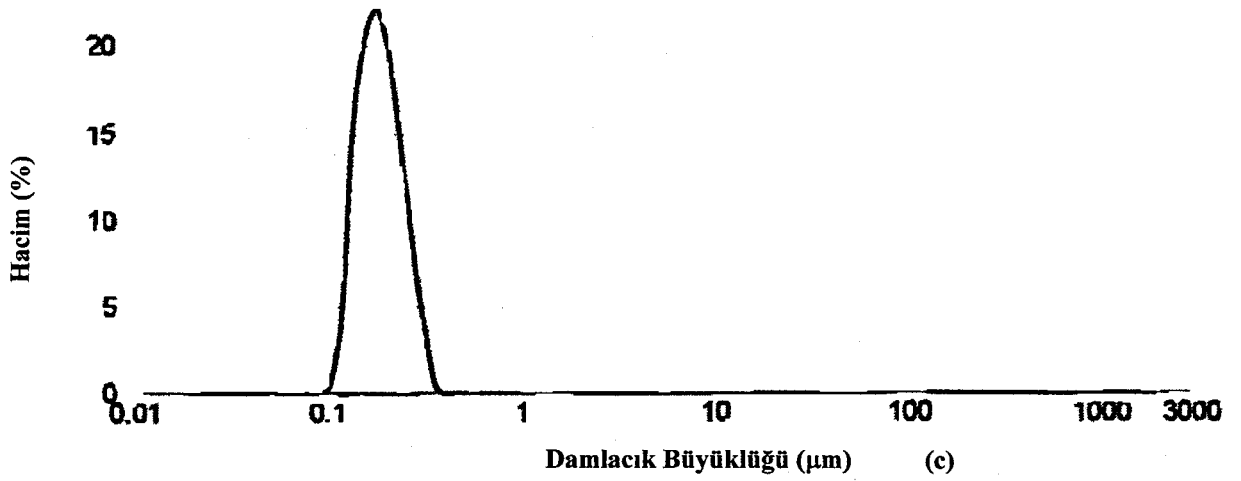
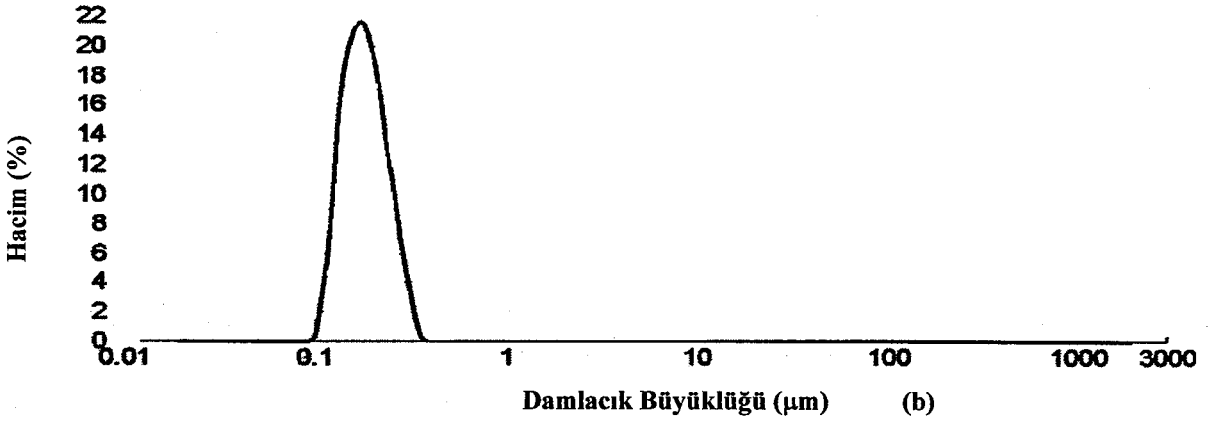
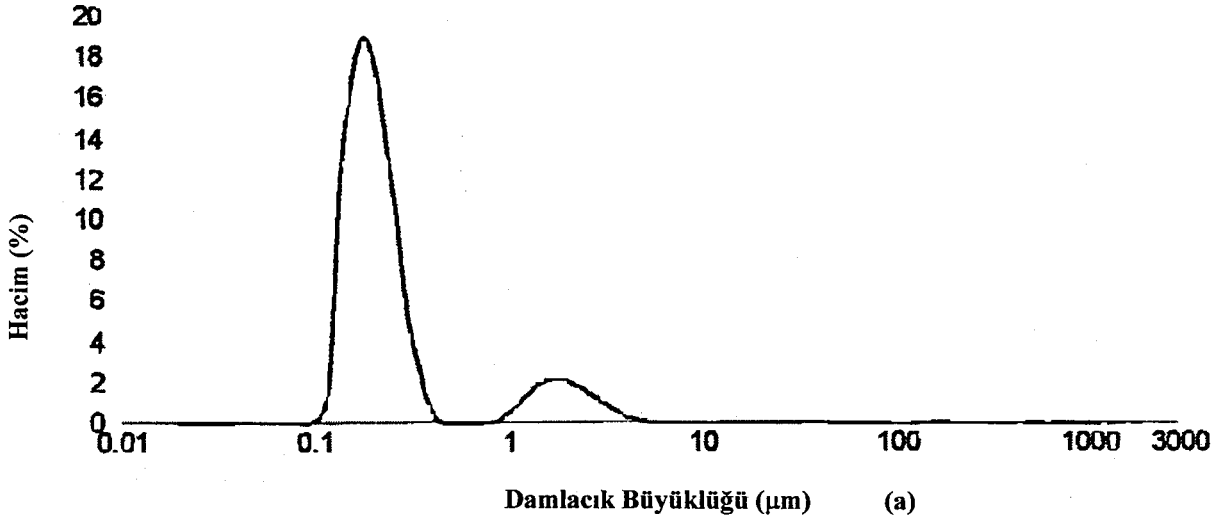


Şekil. 6.4. a: 25 °C'de Saklanmış F3 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 b: 40°C'de Saklanmış F3 Formülasyonunun 1. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 c: 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F3 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

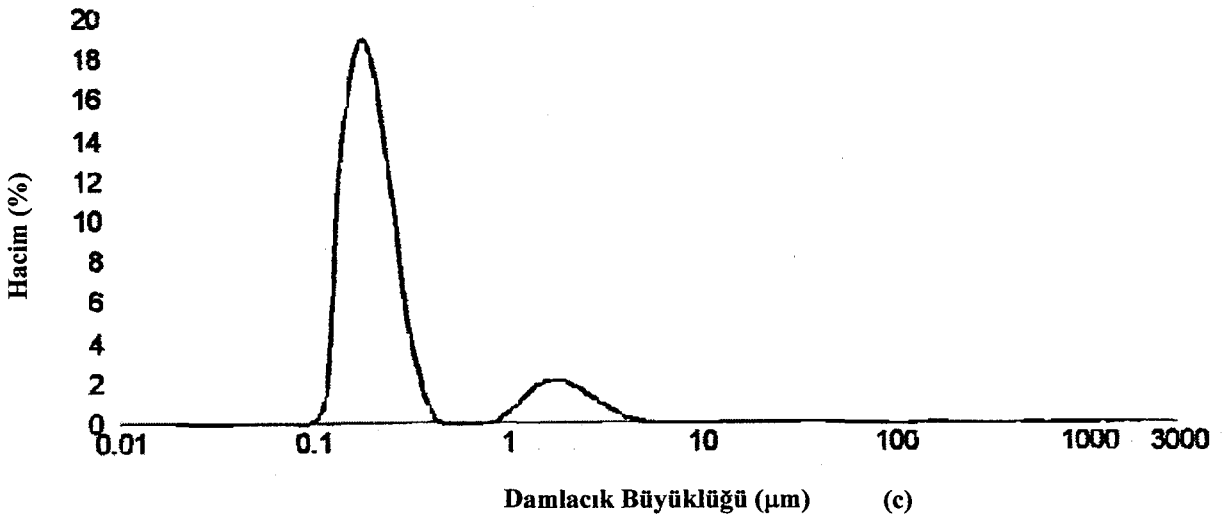
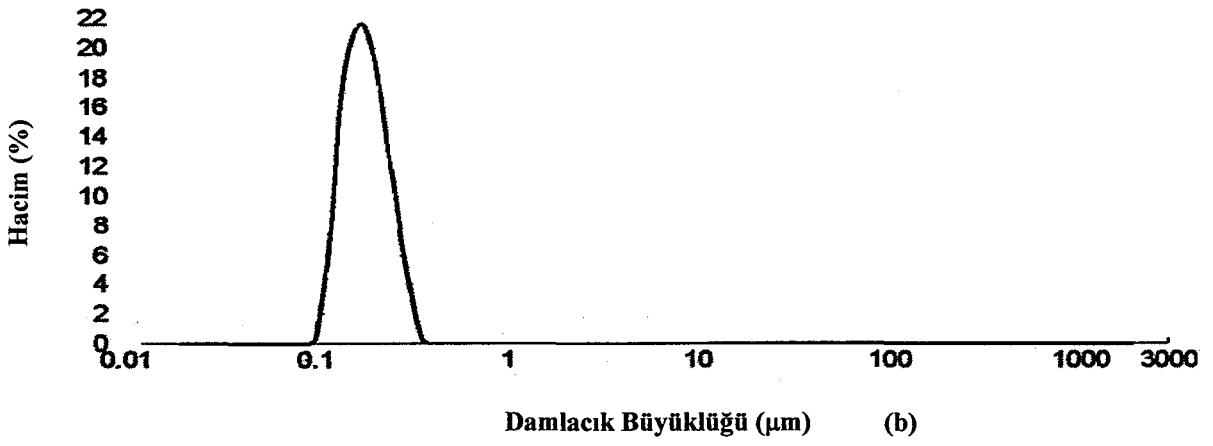
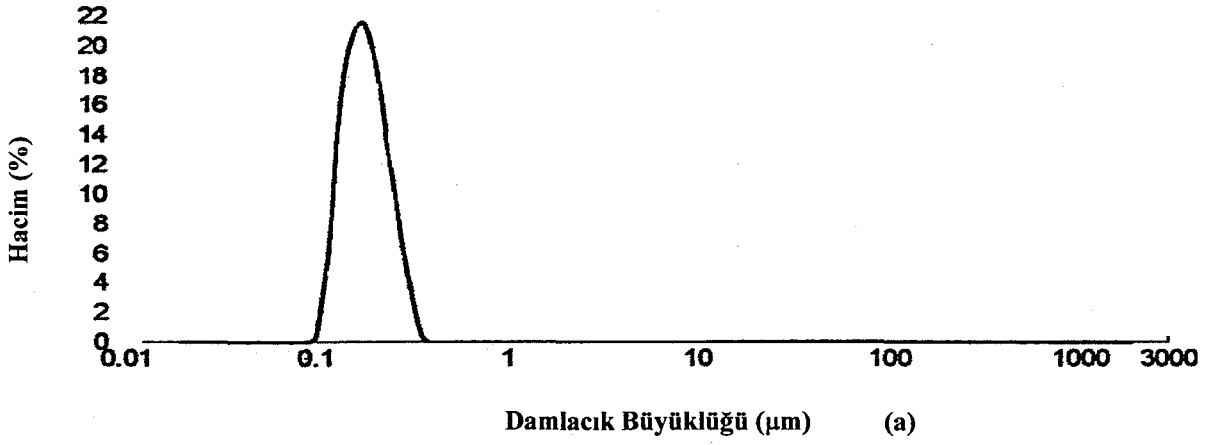




Şekil. 6.5. a: 25 °C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 b: 40°C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 1. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 c: 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 1. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.



Şekil. 6.6. a: 25 °C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 5. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 b: 40°C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 5. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 c: 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 5. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.



Şekil. 6.7. a: 25 °C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 6. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 b: 40°C'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 6. Ay sonundaki Damlacık Büyüklüğü.  
 c: 40°C ve %60 Relatif Nem'de Saklanmış F4 Formülasyonunun 6. Ay Sonundaki Damlacık Büyüklüğü.

## 4.2. TARTIŞMA

Bu bölümde, etkin ve yardımcı maddelerin tercih edilme nedenleri ile hazırladığımız mikroemülsiyonlar üzerinde gerçekleştirdiğimiz in vitro çalışmalara ait sonuçlar tartışılacaktır.

### 4.2.1. Genel Değerlendirme ve Dozaj Şeklinin Seçimi

Son yıllarda başta farmasötik alanda olmak üzere, kozmetik ve biyoteknolojik alanda da ilgi gören kolloidal bir ilaç taşıyıcı sistem olan mikroemülsiyonlar, konvensiyonel emülsiyonlardan ve diğer lipit taşıyıcı sistemlerden birçok üstünlük göstermektedir. Bunlar arasında, saydam olmaları, optik olarak izotropik, termodinamik olarak kararlı olmaları, formülasyonda kullanılan etkin maddenin çözünürlük özelliklerinin artırılması ile birlikte kararlılığının da geliştirilmesi ve oldukça küçük damlacık boyutuna sahip olmaları sayılabilir (13, 36). Ayrıca, biyoteknolojide oldukça sık kullanılan peptitler gibi ortam sıcaklığından etkilenen etkin maddelerin kararlılıklarının devamını sağlamak amacıyla mikroemülsiyon formülasyonlarına orta zincirli gliseritlerin kullanımı oldukça yaygındır (13).

Mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesinde gerekli olan yüzey etkin madde konsantrasyonu oldukça fazla olduğundan ( en az %20), etkin maddenin bu yüzey etkin madde ile geçimsizliğinin söz konusu olması yanında, kullanılan bu yüzey etkin maddelerin biyolojik olarak kabul edilebilir olmayabileceğinden ortaya önemli derecede toksik ve iritan etkiler meydana gelebilmektedir (8). Bu nedenlerden dolayı, gerekli olan yüzey etkin madde konsantrasyonunu düşürmek amacıyla formülasyona toksisitesi az olan yardımcı bir yüzey etkin madde eklenmesine gerek duyulmuştur. Ancak, yapılan bir çalışma, kısa ve orta zincirli alkollerin yardımcı yüzey etkin madde olarak kullanılması ile ortaya toksik ve iritan etkili bir mikroemülsiyon formülasyonun çıktığını göstermiştir (8). Bu durumda da elde edilen mikroemülsiyon formülasyonları sınırlı olarak kullanılacaktır. Bu tip mikroemülsiyon formülasyonlarının, oftalmik olarak uygulanması mümkün değildir. Yüzey etkin madde olarak retinol, retinol asetat, fosfotidilkolin türevleri (lesitin), polisorbata 60 (Tween 60) ve polisorbata 80 (Tween 80) gibi biyolojik olarak kabul edilebilir

yüzey etkin maddelerin yanında triasetin, propilen glikol ve polietilen glikol türevi yapısında olan yardımcı yüzey etkin maddeler kullanılarak fizyolojik olarak uyumlu, oküler, oral ve parenteral kullanıma uygun mikroemülsiyon sistemleri geliştirilmiştir (8). Bu çalışmalar gözönüne alındığında, oküler amaçlı hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonunda, biyolojik olarak kabul edilebilir bir yüzey etkin madde olan polisorbata 60 (Tween 60) ve yardımcı yüzey etkin madde olarak da polietilen glikol 400 kullanılmıştır. Böylece hazırladığımız oftalmik kullanımlı mikroemülsiyon sisteminin kullanımından dolayı herhangi bir irritasyonun meydana gelmemesi beklenmektedir. Sayısı oldukça az olan oküler amaçlı mikroemülsiyon sisteminin geliştirilmesi konulu çalışmalarda, özellikle dış fazı su olan yani y/s tipi mikroemülsiyonların hazırlanması amaçlanmıştır ve hem kararlılık hem de biyoyararlanım yönünden olumlu sonuçlar elde edilmiştir (23). Özellikle dış fazı su olan mikroemülsiyon sistemlerinin oküler amaçlı kullanımının oldukça uygun olduğu belirlenmiştir. Hazırlanan mikroemülsiyon sisteminin su içeriğinin fazla olması ve saydam olmalarından dolayı göze uygulandıktan sonra hastanın görme yetisini azaltmadığı belirlenmiştir (23).

Genel olarak kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerden olan mikroemülsiyonların en önemli özellikleri tüm kolloidal sistemlerde olduğu gibi formülasyonlarında bulunan etkin maddelerin kontrollü olarak salımına izin vermeleridir. Böylece etkin maddenin salım profili kontrol altına alınarak tedavi istenildiği şekilde düzenlenebilir. Yapılan pekçok çalışmada, ilaç taşıyıcı sistem olarak mikroemülsiyon sistemi seçilmiş ve etkin madde salımı yavaşlatılarak uzatılmış etkin madde salımı sağlanmıştır. *In vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen bu sonuçlar, ayrıca *in vivo* çalışmalar ile desteklenmiştir (3, 4, 8, 23).

Özellikle sudaki çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin sulu bir sistem içinde verilebilmeleri ancak y/s tipi mikroemülsiyon sistemleri ile sağlanabilmiştir. Y/s tipi mikroemülsiyonlar oldukça kararlı sistemlerdir (18).

## 4.2.2. Çalışılan Maddelere ait Değerlendirmeler

### 4.2.2.1. Siklosporin A

Siklosporin A, bir immünoşüpresan ajan olarak organ naklinde ve otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. Organ naklinde böbrek, karaciğer, kalp-akciğer ve pankreasın allojenik transplantasyonundan sonra 'graft' reddinin önlenmesinde başarı ile kullanılmaktadır. Otoimmün hastalıklarda ise, varolan otoimmün hastalığı düzelterek kısa sürede etkin bir iyileşme sağlamaktadır. Siklosporin A, halen endojen üveit, nefrotik sendrom, romatoid artrit, sedef, atopik dermatit ve Dry Eye (Kuru göz) sendromunda yaygın olarak kullanılmaktadır (63). Ancak siklosporin A'nın oküler kullanımlı bir formülasyonunun şimdiye kadar bulunmaması, çalışmamızın amacının belirlenmesinde temel neden olmuştur. Özellikle kuru göz sendromunda siklosporin A'nın etkili olması, bu alanda, uzun süre kararlı, sık doz uygulamasından uzak ve görmeyi engellemeyecek bir oküler kullanımlı siklosporin A formülasyonunun geliştirilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir. Bu şartları önemli ölçüde sağlayacak farmasötik dozaj şekli ise mikroemülsiyonlardır. Özellikle y/s tipi mikroemülsiyon sistemlerinin oküler olarak kullanılabileceği daha önce yapılan pekçok çalışmada teorik olarak belirtilmiştir. Ancak, oküler kullanımlı bir mikroemülsiyon formülasyonu ile şimdiye kadar oldukça az çalışma yapılabilmektedir.

Siklosporin A'nın suda zayıf çözünürlüğü nedeniyle biyoyararlanımı çok düşüktür. Bu nedenle, siklosporin A'nın yağ/su mikroemülsiyon sistemleri hazırlanarak biyoyararlanımında artış sağlanmıştır. Elde edilen biyoyararlanım, siklosporin A'nın konvensiyonel oral formülasyonlarından elde edilen biyoyararlanımın yaklaşık 3.5 katıdır (1). Yapılan bir diğer çalışmada, yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve siklosporin A içeren karışıma damla damla distile su eklenmiş ve bir mikroemülsiyon sistemi elde edilmiştir (78). Yapılan bu çalışmada, ticari siklosporin A'dan daha fazla biyoyararlanıma sahip bir mikroemülsiyon sisteminin geliştirildiği yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneyler sonucunda belirlenmiştir (59, 78).

#### 4.2.2.2. İzopropil Miristat

Hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonunda yağlı faz olarak izopropil miristat seçilmiştir. Yapılan pekçok çalışmada toksik ve iritan özelliğinin olmaması nedeniyle yağlı faz olarak izopropil miristat kullanılmıştır (2, 3, 27, 36, 37, 40). Ayrıca, etkin madde olarak kullandığımız siklosporin A, izopropil miristat içinde çözündürülmüş ve başta bu iki madde arasında etkileşimin olmadığı görülmüştür. İzopropil miristat'ın hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonundaki sulu faza eklenen yardımcı maddelerle (benzalkonyum klorür çözeltisi, mannitol) herhangi bir olumsuz etkileşimin olmadığı belirlenmiştir.

#### 4.2.2.3. Mannitol

Hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonunun oküler kullanım amaçlı olması nedeniyle, izotonik olmak zorunluluğu taşımaktadır. İzotonikliğin sağlanmaması durumunda göz yaşı ile, uygulanan formülasyon arasındaki osmotik basınç farkı sonucunda istenilmeyen etkilerin görülmesi kaçınılmazdır.

#### 4.2.2.4. Polietilen Glikol 400

Mikroemülsiyonlar, yardımcı yüzey etkin maddeye gerek olmadan üç bileşenli olarak da hazırlanabilmektedir. Ancak, termodinamik olarak kararlı bir dispers sistemin elde edilebilmesi için, mikroemülsiyon sistemini oluşturan yağ ve su fazı arasındaki yüzeylerarası gerilimin düşük olması gerekliliği bulunmaktadır. Bu nedenle, mikroemülsiyon formülasyonunda yüzey etkin madde konsantrasyonunu azaltmak amacıyla yardımcı yüzey etkin maddeye ihtiyaç duyulmuştur. Aksi halde, mikroemülsiyonun hazırlanabilmesi için gereken yüksek yüzey etkin madde konsantrasyonunun (yaklaşık enaz %20) kullanılması sonucunda toksik ve iritan özelliklerin görülmesi kaçınılmazdır. Bu nedenlerden dolayı, şimdiye kadar hazırlanmış tüm mikroemülsiyon formülasyonlarında dördüncü bileşen olarak yardımcı yüzey etkin madde kullanılmıştır. Özellikle oküler kullanımlı bir mikroemülsiyon sisteminin toksik ve iritan özelliğinin çok düşük düzeyde bulunması gereklidir. Yardımcı yüzey etkin madde seçiminde dikkat edilmesi gereken bir konu da, etkin madde salımıdır. Mikroemülsiyon

sisteminden etkin madde salımını olumsuz olarak etkilemeyecek yardımcı yüzey etken madde seçilmelidir. Kısa ve orta zincirli alkoller yanında amin yapısındaki bileşikler de yardımcı yüzey etkin madde olarak pekçok çalışmada kullanılmıştır. Ancak, kısa ve orta zincirli alkollerin yardımcı yüzey etkin madde olarak kullanılması durumunda, toksik ve iritan özelliklerinden dolayı, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun sınırlı alanda kullanılabileceği belirtilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı, oküler kullanılması tasarlanan bir mikroemülsiyon formülasyonunun sınırlı olarak kullanılması beklenemeyeceğinden, kısa veya orta zincirli alkollerin yardımcı yüzey etkin madde olarak seçilmesi doğru bir seçim olmayacaktır. Polietilen glikol türevleri ve propilen glikol yardımcı yüzey etkin madde kullanıldığında biyolojik olarak kabul edilebilir mikroemülsiyonların hazırlanabileceği ve bu hazırlanan mikroemülsiyonların oral, parenteral ve hatta özellikle oküler olarak kullanımının mümkün olabileceği incelenen pekçok literatürde belirtilmiştir (8, 23). Bundan dolayı hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonunda yardımcı yüzey etkin madde olarak polietilen glikol 400 kullanılmıştır.

#### **4.2.2.5. Benzalkonyum Klorür Çözeltisi**

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun oküler kullanılacağı göz önüne alındığında, hazırlanan mikroemülsiyonun antimikrobik özellik göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle, oküler kullanılması tasarlanan mikroemülsiyona hazırlandıktan hemen sonra otoklav sterilizasyonu uygulanması yanında antimikrobik bir ajanın eklenmesi formülasyonun antimikrobik özellik göstermesi yönünden oldukça önemlidir. Benzalkonyum klorür çözeltisinin düşük konsantrasyonda etkili olduğu ve sulu faza eklenebileceği düşünülerek formülasyonda koruyucu madde olarak benzalkonyum çözeltisi %0.01 konsantrasyonda olacak şekilde mikroemülsiyonun sulu fazına eklenmiştir.



#### **4.2.2.6. Montanox 60® (Polisorbat 60, Tween 60, Polioksietilen 20 sorbitan monostearat)**

Mikroemülsiyon sistemlerinde iki temel bileşen olarak bulunan yağ ve su arasındaki yüzey gerilimini düşürmek amacıyla ortama yüzey etkin maddenin eklenmesi zorunluluğu bulunmaktadır (23). Ancak bu sayede mikroemülsiyon oluşmaktadır. Yağ ve su arasındaki yüzey gerilimi, disperse olmuş damlacıkların boşluktaki durumları, serbest enerji durumları ve dağılmış damlacıklar arasındaki Van Der Waals kuvvetleri dolayısıyla olan etkileşim gibi pekçok etkene bağlıdır. Bu yüzey gerilimi ortadan kaldırmak amacıyla temel olarak iki tip yardımcı yüzey etkin madde bulunmaktadır. Bunlar iyonik ve noniyonik yüzey etkin maddelerdir. Yüzey etkin madde moleküllerinin hidrofilik ve hidrofobik grupları, onların fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmektedir.

Yüzey etkin madde seçiminde her ne kadar HLB değerine dikkat edilse de mikroemülsiyon sistemlerinde formülasyona eklenecek olan yüzey etkin madde seçimi ampiriktir (5). Noniyonik yüzey etkin maddeler diğer grup yüzey etkin maddelere göre daha az toksisite göstermektedir (18). Ayrıca, yapılan bir çalışmada, noniyonik yüzey etkin maddeler kullanıldığında yardımcı yüzey etkin maddenin kullanılmayabileceği belirtilmiştir (18). Daha önce yapılan pekçok y/s tipi mikroemülsiyon hazırlanması çalışmalarında yüzey etkin madde olarak polisorbat türevleri kullanılmıştır (37). Yapılan bir çalışmada oküler amaçlı mikroemülsiyon hazırlanmış ve formülasyonda yüzey etkin madde olarak, polisorbat türevleri kullanılmış ve hem toksisitenin ve irritasyonun görülmemesi; hem de elde edilen sistemin kararlılığı nedeniyle olumlu sonuçlar elde edilmiştir (8).

### **4.2.3. Mikroemülsiyonlarda Faz Diyagramının Çizilmesi ve Hazırlanışı**

#### **4.2.3.1. Üçgen Faz Diyagramının Çizilmesi**

Yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve yağ fazından oluşan mikroemülsiyon sisteminin bileşenlerinin belirlenmesi için faz diyagramının çizilmesi gerekmektedir (14). Mikroemülsiyon sistemlerinde yüzey etkin

madde/yardımcı yüzey etkin madde oranına bağlı olarak faz diyagramında ve mikroemülsiyonun yapısında değişimler gözlenmiştir (1).

Yağ fazı, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde, su fazı ve yardımcı maddeler içeren bir dispers sistemin üçlü faz diyagramının belirlenmesinde iki farklı yöntem bulunmaktadır (43). Bu yöntemlerden birincisi, sabit sıcaklıkta yağ fazı ile HLB değeri düşük yüzey etkin madde kullanılarak saydam bir mikroemülsiyon sistemi elde edilinceye kadar karıştırmaktır. İkinci yöntem ise, yağ ve farklı oranlarda yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde oranlarına sahip dispers sistemin su ile titre edilmesidir (43). Bu iki yöntemden en çok tercih edileni yapılan pek çok çalışmada da görüldüğü gibi (1, 2, 13, 14, 36, 37, 38, 43) faz diyagramının titrasyon yöntemi ile belirlenmiş olmasıdır. Bunun nedeni olarak titrasyon yönteminin daha pratik olması ve buna bağlı olarak da zaman kaybının önlenmiş olmasıdır. Farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, bu iki yöntem deneysel olarak özdeş sonuçlar vermektedir (14). Çalışmamızda, belirli bir yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde ve yağ miktarında sistem karıştırılarak damla damla distile su eklenmiştir (38). Bu şekilde elde edilen faz diyagramından izotropik ve kararlı bir mikroemülsiyon sisteminin elde edilebileceği bölge seçilerek, formülasyon içindeki bileşenlerin oranları belirlenmektedir.

Tüm bu çalışmalar gözönünde bulundurularak hazırladığımız mikroemülsiyonun üçgen faz diyagramı, titrasyon yöntemi ile belirlenmiş ve daha sonra buna bağlı olarak optimum mikroemülsiyon alanını veren yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranı belirlenerek formülasyon geliştirilmiştir. Faz diyagramının çiziminde hazırlanan formüller deneyler bölümünde anlatılmaktadır.

#### **4.2.3.2. Mikroemülsiyonun Hazırlanması**

Mikroemülsiyonun hazırlanmasının ilk basamağı üçgen faz diyagramının çizilmesidir (14). Faz diyagramı için yapılan pek çok çalışmada, belirli orandaki yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeler karışımına 60 °C'de damla damla distile su eklenmiştir (34). Üçgen faz diyagramının çizilmesinden sonra, yağ, su, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde bileşenleri vorteks

karıştırıcıda basitçe karıştırılmıştır (14). Rosano ve arkadaşlarının (14) yaptıkları bir çalışmada y/s tipi emülsiyonları dört basamakta hazırlamaktadırlar.

- 1- Yağ fazında çözünebilen yüzey etkin maddenin seçimi,
- 2- Yağ fazında seçilen bu yüzey etkin madde karakterine bağlı olarak yağ veya su fazı içinde çözündürülmesi,
- 3- Daha sonra yağlı faz,karışmakta olan sulu faz içine damla damla eklenmesi,
- 4- Yüzey etkin maddeden daha çok çözünme özelliğine sahip yardımcı yüzey etkin maddenin, formülasyonun çözünürlüğünü arttırmak amacıyla eklenmesi.

Formülasyonda ne kadar yardımcı yüzey etkin maddeye ihtiyaç duyulduğu, ampirik olarak belirlenmektedir (14).

Siklosporin A'nın mikroemülsiyonu ile yapılan çalışmada, yağ ve yüzey etkin madde karışımına siklosporin A eklenmiş ve hızla karıştırılmıştır. Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun oda sıcaklığında 3 aydan daha uzun süre kararlılık gösterdiği sonucuna varılmıştır (1).

Hazırladığımız siklosporin A içeren mikroemülsiyon formülasyonu tüm bu literatürlerde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve ayrıntıları **deneysel bölümde** anlatılmıştır.

#### **4.2.4. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonunun Fiziksel Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Bir mikroemülsiyon sisteminde formülasyon parametreleri olarak, kırılma indisi, pH ölçümü, iletkenlik, emülsiyon tipi, kararlılık belirlenmesi gerektiği belirtilmiştir. Bu amaçla hazırladığımız siklosporin mikroemülsiyonlarının 0., 1., 5. ve 6. aylardaki parametreleri incelenmiş ve bu bölümde mikroemülsiyonlar hakkında yapılan diğer çalışma sonuçları ile tartışılmıştır.

#### **4.2.5. Fiziksel Kararlılık Çalışmaları**

Hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonları, hazırlandığı ilk günden itibaren dört farklı ortama konulmuş ve görünüşleri, faz ayrışması olup olmadığı ve saydamlıkları hergün incelenmiş ve 6 aydan uzun süre herhangi bir değişimin

meydana gelmediği gözlenmiştir. Ayrıca, mikroemülsiyon sistemlerinin 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesi sonucunda hiçbir faz ayrışmasına rastlanmamıştır. Ancak, 4°C'de saklanan mikroemülsiyon formülasyonu, diğer formülasyonlara göre oldukça kısa bir zaman sonra aglomerasyona uğrayarak bulanık bir görünüm almıştır. Bu da bize, siklosporin A içeren mikroemülsiyon formülasyonunun buzdolabı koşullarında (4°C'de) kararlı olmadığı sonucunu doğurmuştur.

#### **4.2.5.1. Mikroemülsiyon Tipi**

Hazırlanmış olduğumuz mikroemülsiyon formülasyonlarının dış fazı su olması nedeniyle, emülsiyon tipinin belirlenmesi sistemin su fazı ile seyreltilerek meydana gelen dispers sistemin değerlendirilmesi ile mümkün olmaktadır. 0., 1., 5. ve 6. aylarda mikroemülsiyonların su ile seyreltilmesi sonucunda süt görünümünde kararlı bir emülsiyonun oluşması, hazırlanmış olan mikroemülsiyon sisteminin dış fazının su olduğunu göstermektedir. 6 aydan uzun süre mikroemülsiyon sisteminin değişmemesi, siklosporin A içeren mikroemülsiyon sisteminin oldukça kararlı olduğunun bir göstergesidir.

#### **4.2.5.2. Kırılma İndisi**

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının, 0., 1., 5. ve 6. aylardaki kırılma indisleri, 25 °C'de Abbe kırılma indisi ölçer yardımıyla ölçülmüş ve mikroemülsiyon formülasyonlarını içeren literatür sonuçları ile benzerlikler göstermiştir (2, 30.). Dört farklı zamanda ve farklı ortamlarda bekletilmiş mikroemülsiyonların kırılma indislerinin değişim göstermemesi, mikroemülsiyon tipinin değişmediğini ve dolayısıyla da kararlılığının devam ettiğinin bir göstergesidir.

#### **4.2.5.3. Elektriksel İletkenliği**

Hazırlanan tüm mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlikleri 0., 1., 5., ve 6. aylarda ölçülmüştür. Mikroemülsiyon sistemlerinin elektriksel iletkenliği, emülsiyon tipinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenliğinin, s/y tipi

mikroemülsiyon formülasyonlarına göre daha fazla olduğu yapılan pekçok çalışmada gösterilmiştir (5). Ancak mikroemülsiyonların bileşiminde bulunan yüzey etkin maddenin iyonik yada noniyonik olmasına bağlı olarak da mikroemülsiyon sisteminin iletkenliğinde değişimlere rastlanmıştır. Hazırlanan siklosporin A içeren y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonlarının bileşiminde noniyonik bir yüzey etkin madde olan polisorbitat 60'ın kullanılması nedeniyle, elektriksel iletkenlik çok fazla olmamakla birlikte, y/s tipi mikroemülsiyon sistemlerinden elde edilen sonuçlar uyum göstermektedir.

#### **4.2.5.4. pH Ölçümü**

Hazırladığımız mikroemülsiyon formülasyonlarının başlangıçtaki pH değeri, deneysel bölümde anlatıldığı şekilde nötrleştirilmiştir. Çünkü oküler kullanımlı, siklosporin A içeren bir mikroemülsiyon sisteminin nötr özellik göstermesi gerekmektedir. 0., 1., 5. ve 6. ayda mikroemülsiyon sistemlerinin pH değerleri ölçülmüş ve nötr pH'ya oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ortam ve zaman farklılığından görülen pH değişimleri eşleştirilmiş t testi ile yorumlanarak hatanın önemli olmadığı ( $p > 0.05$ ) görülmüştür. Zaman ve ortam farkından pH'da önemli sayılabilecek bir değişimin olmaması, mikroemülsiyon sisteminin zaman içinde herhangi bir değişime uğramadığının göstergesidir.

#### **4.2.5.5. Damlacık Büyüklüğü**

Şimdiye kadar tanımlanmış tüm mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu  $0.2 \mu\text{m}$ 'den küçüktür. Yapılan pekçok çalışmada mikroemülsiyonlarda damlacık boyutunun çok küçük olması nedeniyle mikroemülsiyon sistemlerinin saydam oldukları belirtilmiştir (3, 5). Hatta yapılan bir çalışmada, damlacık büyüklüğünün  $5-30 \text{ nm}$  arasında olabileceği belirlenmiştir (13). Mikroemülsiyonlarda damlacık büyüklüğü ve dağılımı genellikle foton korelasyon spektroskopisi ve lazer kırınım cihazı ile saptanmaktadır (3, 13).

Tüm bunlar göz önüne alınarak, hazırladığımız etkin madde içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklükleri, 0., 1., 5. ve 6. aylarda değişik ortamlarda ( $4^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C} + \%60$  relatif nem ve  $25^\circ\text{C}$ ) saklanması ardından ölçülmüş ve formülasyon içindeki damlacıkların yaklaşık  $0.2 \mu\text{m}$  olduğu

belirlenmiştir. 4°C’de saklanan mikroemülsiyon sisteminin kısa sürede aglomere olması nedeniyle damlacık büyüklüğü ölçülememiştir. Siklosporin A içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüklerinin 0.2 µm’den küçük olmaması, siklosporin mikroemülsiyonunun hazırlanmasını içeren az miktardaki literatürlerle uyumluluk göstermiştir. Siklosporin A ile yapılan bir çalışmada, siklosporin A içeren mikroemülsiyon sisteminin, aynı şekilde ve aynı maddeleri içeren ancak etkin madde içermeyen mikroemülsiyonun damlacık büyüklükleri karşılaştırıldığında; etkin madde içeren mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık boyutunun içermeyen mikroemülsiyonun damlacık boyutuna göre daha büyük olduğu belirtilmiştir (1).

Yapılan çalışmalar sonucunda, başlangıçta amaçlanan, pratik olarak suda çözünmeyen bir etkin madde olan siklosporin A’nın etkin ve kararlı y/s tipi mikroemülsiyon formülasyonunu hazırlayarak, oküler kullanım için uygun yeni bir mikroemülsiyon formülasyonunun hazırlanması hedefine ulaşılmıştır. Mikroemülsiyon formülasyonu içindeki bileşenlerin miktarını doğru bir şekilde belirlemek amacıyla altı farklı yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0) üçgen faz diyagramı çizilmiş ve elde edilen faz diyagramlarının eğri altında kalan alanları hesaplanarak en geniş mikroemülsiyon alanını veren yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde oranı belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda en uygun YEM/Ko-S oranına 2.5 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu oranda hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları oldukça kararlı bir yapıya sahiptir. Daha sonra elde edilen bu mikroemülsiyon formülasyonu, Behçet hastalığı’na bağlı üveit ve Dry Eye Sendromu gibi ciddi göz hastalıklarında terapötik kullanımı olan, ancak şimdiye kadar hazırlanmış oftalmik amaçlı bir formülasyonu bulunmayan siklosporin A içerecek şekilde hazırlanmış ve değişik sıcaklık ortamlarında (4°C, 25°C, 40°C ve 40°C+%60 relatif nem) saklanarak kararlılığı 6 ay boyunca izlenmiştir. Saklanan bu mikroemülsiyon formülasyonlarının 1., 5. ve 6. aylardaki mikroemülsiyonların karakteristik özellikleri olan kırılma indisi, iletkenlik, pH ve damlacık büyüklüğü dağılımı gibi özellikleri incelenmiş ve başlangıçtaki değerler ile karşılaştırılarak kararlılıkları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Elde edilen bu sonuçlara bakılarak 4°C’de saklanan mikroemülsiyon formülasyonu hariç tüm mikroemülsiyon

sistemlerinin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, çalışmanın amacını oluşturan, siklosporin A içeren oftalmik kullanımlı mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve kararlılığı konusunda olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

1. GAO, Z., CHOI, H., SHIN, H., PARK, K., LIM, S., HWANG, K., KIM, C., *Physicochemical Characterization and Evaluation of a Microemulsion Systems for Oral delivery of Cyclosporin A*, International Journal of Pharmaceutics, 161, s. 75-86, (1998).
2. KTISTIS, G., *Effect of Polysorbate 80 and Sorbitol Concentration On In Vitro Release Of Indomethacin From Microemulsions*, Journal Dispersion Science And Technology, 18(1), s. 49-61, (1997).
3. TROTTA, M., *Influence of Phase Transformation on Indomethacin Release From Microemulsions*, Journal of Controlled Release, 60 s. 399-405, (1999).
4. WALLIN, R., DYHRE, H., BJORKMAN, S., FYGE, A., ENGSTROM, S., RENCK, H., *Prolongation of Lidocaine Induced Regional Anaesthesia by a Slow-Release Microemulsion Formulation*, Proceed. Int.'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater, 24, s. 555-556, (1997).
5. YAZAN, Y., *"Emülsiyon Sistemler" Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, ElmaBilgisayar Basım San. Tic. Ltd. Şti., I, s. 133-150, (2002).*
6. TROTTA, M., GASCO, M., PATTARINO, F., *Diffusion of Hormones from O/W Microemulsions: Influence of the Cosurfactant*, Acta Pharmaceutica Technologia, s. 226-231, (1990).
7. TROTTA, M., PATTARINO, F., GROSA, G., *Formation of Lecithin-Based Microemulsions Containing n-alkanol Phosphocholines*, International Journal of Pharmaceutics, 174, s. 253-259, (1998).
8. RADOMSKA, A., DOBRUCKI, R., *The Use of some Ingredients for Microemulsion Preparation Containing Retinol and its Esters*, International Journal of Pharmaceutics, 196, s. 131-134, (2000).
9. SAVELLI, M.P., SOLANS, C., PONS, R., CLAUSSE, M., ERRA, P., *Keratin Cystine Reactivity in Microemulsion Media: Influence of Cosurfactant Chain Length*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 119, s. 155-162, (1996).



10. CONSTANTINIDES, P., SCALART, J.P., LANCASTER, C., MARCELLO, J., MARKS, G., ELLENS, H., SMITH P., *Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation of Water-in-Oil Microemulsions Incorporating Medium-Chain Glycerides*, *Pharmaceutical Research*, 11(10), s. 1385-1390, (1994).
11. WARISNOICHAROEN, W., LANSLEY, A.B., LAWRENCE, M.J., *Nonionic oil-in-Water Microemulsions: The Effect of Oil Type on Phase Behaviour*, *International Journal of Pharmaceutics*, 198, s. 7-27, (2000).
12. JOSHI, A., RAKSHIT, A.K., *Physicochemical Studies of Cyclohexane/CTAB/1-propanol/Water Microemulsion System in the Presence of PEG 400*, *Indian Journal of Chemistry*, 36A, s. 38-45, (1997).
13. CONSTANTINIDES, P.P., SCALART, J.P., *Formulation and Physical Characterization of Water-in-Oil Microemulsions Containing Long-Versus Medium-Chain Glycerides*, *International Journal of Pharmaceutics*, 158, s. 57-68, (1997).
14. BHARGAVA, H.N., NARURKAR, A., LIEB, L.M., *Using microemulsions for Drug Delivery*, *Pharmaceutical Technology*, March, s. 46-52, (1987).
15. RICHARDSON, C.J., MBANEFO, A., ABOOFAZELI, R., LAWRENCE, M.J., BARLOW, D.J., *Prediction of Phase Behavior in Microemulsion Systems Using Artificial Neural Networks*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 187, s. 296-303, (1997).
16. <http://www.centerspan.org/pubs/news/0597a.html>.
17. ASBERG, A., CHRISTENSEN, H., HARTMANN, A., CARLSON, E., MOLDEN, E., BERG, K.J., *Pharmacokinetic Interactions Between Microemulsion Formulated Cyclosporine A and Diltiazem in Renal Transplant Recipients*, *Journal of European Clinical Pharmacology*, 55, s. 383-387, (1999).
18. MALCOLMSON, C., SATRA, C., KANTARIA, S., SIDHU, A., LAWRENCE, M.J., *Effect of Oil on the Level of Solubilization of Testosterone Propionate into Nonionic Oil-in-Water Microemulsions*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(1), s. 109-116, (1998).

19. MORENO, M.A., BALLESTEROS, M.P., FRUTOS, P., LASTRES, J.L., CASTRO, D., *Comparison of UV Spectrophotometric and LC Methods for the Determination of Nortriptyline Hydrochloride in Polysorbate 80 Based Oil/Water Microemulsions*, Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, 22, s. 287-294, (2000).
20. BAGWE, R.P., KANICKY, J.R., PALLA, B.J., PATANJALI, P.K., SHAH, D.O., *Improved Drug Delivery Using Microemulsions: Rationale, Recent Progress, and New Horizons*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 18(1), s. 77-140, (2001).
21. <http://www.2.kumc.edu/druginfo/pharmkey/PharmkeyDec95.html>.
22. CORSWANT, C., THOREN, E.G., *Solubilization of Sparingly Soluble Active Compounds in Lecithin-Based Microemulsions: Influence on Phase Behavior and Microstructure*, Langmuir, 15, s. 3710-3717, (1999).
23. ALANY, R.G., RADES, T., AGATONOVIC-KUSTRIN, S., DAVIES, N.M., *Effects of Alcohols and Diols on the Phase Behaviour of Quaternary Systems*, International Journal of Pharmaceutics, 196, s. 141-145, (2000).
24. BARUT, D., "Gen Tedavisine Yönelik Katyonik Yüzey Etkin Madde İçeren Emülsiyon Şeklinde Taşıyıcı Sistem Üzerinde Çalışmalar", Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, (2001).
25. HABE, A., KEİPERT, S., *Development and Characterization of Microemulsions for Ocular Application*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 43, s. 179-183, (1997).
26. MUKHERJEE, K., MUKHERJEE, D.C., MOULIK, S.P., *Thermodynamics of Microemulsion Formation*, Journal of Colloid and Interface Science, 187, s. 327-333, (1997).
27. KIM, C.K., RYUU, S., PARK, K.M., LIM, S.J., HWANG, S.J., *Preparation and Physicochemical Characterization of Phase Inverted Water/Oil Microemulsion Containing Cyclosporin A*, International Journal of Pharmaceutics, 147, s. 131-134, (1997).
28. ARAMAKI, K., OZAWA, K., KUNIEDA, H., *Effects of Temperature on the Phase Behavior of Ionic-Nonionic Microemulsions*, Journal of Colloid and Interface Science, 196, s. 74-78, (1997).

29. ALANY, R.G., AGATONOVIC-KUSTRIN, S., RADES, T., TUCKER, I.G., *Use of Artificial Neural Networks to Predict Quaternary Phase Systems from Limited Experimental Data*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19, s. 443-452, (1999).
30. ÇİLEK, A., *"İnsülinin Oral Mikroemülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi ve İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi"*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, (2001).
31. HORT, W., BALAZS, ANNA, C., JASNOW, D., *Rheology of Microemulsion Under Shear*, Poster session, March 18, <http://www.centerspan.org/pubs/news/0597a.htm>.
32. FUBINI, B., GASCO, M.R., GALLARATE, M., *Microcalorimetric study of Microemulsions as Potential Drug Delivery Systems. II. Evaluation of Enthalpy in the Presence of Drugs*, International Journal of Pharmaceutics, 50, s. 213-217, (1989).
33. ATTWOOD, D., MALLON, C., TAYLOR, C.J., *Phase Studies on Oil-in-Water Phospholipid Microemulsions*, International Journal of Pharmaceutics, 84, s. R5-R8, (1992).
34. PARK, K.M., KIM, C.K., *Preparation and Evaluation of Flurbiprofen-Loaded microemulsion for Parenteral Delivery*, International Journal of Pharmaceutics, 181, s. 173-179, (1999).
35. AYANNIDES, C.A., KTISTIS, G., *A Rheological Study on Microemulsion Gels of Isopropyl Myristate, Polysorbate 80, Glycerol, and Water*, Journal of Cosmetic Science, 50, s. 1-7, (1999).
36. KTISTIS, G., *A Viscosity Study on Oil-in-Water Microemulsions*, International Journal of Pharmaceutics, 61, s. 213-218, (1990).
37. SCHMALFUB, U., NEUBERT, R., WOHLRAB, W., *Modification of Drug Penetration into Human Skin Using Microemulsions*, Journal of Controlled Release, 46, s. 279-285, (1997).
38. TROTTA, M., GASCO, M.R., MOREL, S., *Release of Drugs from Oil-Water Microemulsions*, Journal of Controlled Release, 10, s. 237-243, (1989).
39. SEDLAK, D., SZYMKOWIAK, J., SAAR, A., OWEN, A.J., BRZECZKO, A., BOTTOM, C., *Compatibility of Microemulsions With Soft*

- Gelatin Capsules, Proceed. Int.'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater, 24, s. 271-272, (1997).
40. BOLZINGER, M.A., CARDUNER, C., POELMAN, M.C., *Bicontinuous Sucrose Ester Microemulsion: A New Vehicle for Topical Delivery of Niflumic Acid*, International Journal of Pharmaceutics, 176, s. 39-45, (1998).
41. CONSTANTINIDES, P.P., WELZEL, G., ELLENS, H. *Water-in-Oil Microemulsions Containing Medium-chain Fatty Acids/Salts: Formulation and Intestinal Absorption Enhancement Evaluation*, Pharmaceutical Research, 13 (2), s. 210-215, (1996).
42. YAMAGUCHI, S., KUNIEDA, H., *Determination of a Three-Phase Tie Triangle (the Hydrophile-Lipophile Balance Plane) in a Composition Tetrahedron: Evaluation of the Composition of Adsorbed Mixed-Surfactant and the Monomeric Solubilities of Short-Chain Surfactant*, Langmuir, 13, s. 6995-7002, (1997).
43. EICKE, H.F., MEIER, W., HAMMERICH, H., *Water/Oil Microemulsions from Binary Ionic-Nonionic Surfactants*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 118, s. 141-148, (1996).
44. KNAGENHJELM, S.K.H., FROYLAND, K., RINGVOLD, A., BJERKAS, E., KJONNIKSEN, I., *Toxicological Evaluation of Cyclosporine Eye Drops*, Acta Ophthalmologica Scandinavica, 77, s. 200-203, (1999).
45. LEE, Y.J., CHUNG, S.J., ve SHIM, C.K., *The Potantial Replacement of HPLC By <sup>125</sup>I-RIA For The Characterization Of Cyclosporin A: A Bioavailability Study After Oral Administration in Healthy Human Subject*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 22(1), s. 183-188, (2000).
46. SABATE, I., GINARD, M., GONZALEZ, J.M., BARO, E., ACEBES, G., CUADROS, J., LIRON, F.J., *Evaluation of The AxSYM Monoclonal Cyclosporin Assay and Comparison With Radioimmunoassay*, Therapeutic Drug Monitoring, 22, s. 474-480, (2000).
47. URATA, T., ARIMORI, K., NAKANO, M., *Modification of Release Rates of Cyclosporin A from Polyl(L-lactic acid) Microspheres by Fatty Acid Esters and In-Vivo Evaluation of The Microspheres*, Journal of Controlled Release, 58, s. 133-141, (1999).

48. CHANG, T., BENET, Z., HEBERT, M., *The Effect of Water-soluble Vitamin E on Cyclosporine Pharmacokinetics in Healthy Volunteers*, *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 59, s. 297-303, (1996)
49. KISELEV, M., GLADILIN, K., NUMAROW, N., SVESHNIKOV, P.G., MIETHE, P., LEVASHOV, A., *Determination of Cyclosporin A in 20% Ethanol By A Magnetic Beads-Based Immunofluorescence Assay*, *Analytical Biochemistry*, 269, s. 393-398, (1999).
50. LEE, E., LEE, S., CHOI, H., KIM, C., *Bioavailability of Cyclosporin A Dispersed in Sodium Lauryl Sulfate-Dextrin Based solid Microspheres*, *International Journal of Pharmaceutics*, 218, s. 125-131, (2001).
51. LLAVEN, J.G., PALMA-AGUIRRE, A., ARREOLA, R.G., BRIZUELA, V., *Comparative Bioavailability Evaluation of Two Cyclosporine Oral Formulations in Healthy Mexican Volunteers*, *Archives of Medical Research*, 30, s. 315-319, (1999).
52. CHATEAUVERT, N., COTE, H., *Circadian Variations in the Pharmacokinetics of A New Microemulsion Formulation of Cyclosporine in Cardiac Transplant Recipients*, *Pharmacotherapy*, 18(2), s. 364-370, (1998).
53. KUMAR, M., SINGHAL, S.K., ve SINGH, A., *Development and Validation of a Stability Indicating HPLC Assay Method for Cyclosporine in Cyclosporine Oral Solution USP*, *Journ. Pharm.Biomed.Analy.*, 25 (1), s. 9-14, (2001).
54. INOUE, K., AMANO, S., KIMURA, C., *Long-Term Effects of Topical Cyclosporine A Treatment After Penetrating Keratoplasty*, *Japanese Journal of Ophthalmology*, 44 (3), s. 302-305, (2000).
55. ALLISON, A.C., *Immunosuppressive Drugs: The First 50 Years and A Glance Forward*, *Immunopharmacology*, 47, s. 63-83, (2000).
56. *British Pharmacopoeia 1*, The Stationery Office, England, (1998).
57. *U.S. Pharmacopoeia National Formulary, USP XXIV/NF XIX*, Mack Printing Company, Easton, USA, (2000).
58. FRIMAN, S., BACKMAN, L., *A New Microemulsion Formulation of Cyclosporin: Pharmacokinetic and Clinical Features*, *Clinical Pharmacokinetics*, 30 (3), s. 181-193, (1996).

59. BROZMANOVA, H., GRUNDMANN, M., SAFARCIK, K., JEGOROV, A., *High-Performance Liquid Chromatographic Method for Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine A and its Two Metabolites in Renal Transplant Patients*, Journal of Chromatography B., 749, s. 93-100, (2000).
60. MALLARY, M.F., HOUTI, I., LABAT, C., BATALLA, A., *Chronopharmacokinetics of Cyclosporine A Following a Single i.v. Dose in The Rat*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 3, s. 49-56, (1995).
61. GUO, J., PING, Q., SUN, G., ve JIAO, C., *Lecithin Vesicular Carriers for Transdermal Delivery of Cyclosporin A*, International Journal of Pharmaceutics, 194, s. 201-207, (2000).
62. TOSHIDA, H., NAKAYASU, K., ve KANAI, A., *Effect of Cyclosporin A Eyedrops on Tear Secretion in Rabbit*, Japanese Journal of Ophthalmology, 42 s. 168-173, (1998).
63. SANDIMMUN NEORAL<sup>®</sup>, NOVARTIS, s. 1-33.
64. TRAN, H.S., MALLI, D.P., *Site-Specific Immunosuppression Using A New Formulation of Topical Cyclosporine A With Polyethylene Glycol-8 Glyceryl Caprylate/Caprates*, Journal of Surgical Research, 83, s. 136-140, (1999).
65. BENEZRA, D., MAFTZIR, G., *Ocular Penetration of Cyclosporin A*, Investigative Ophthalmology&Visual Science, 31 (7), s. 1362-1366, (1990)
66. KAYAALP, O., *Tıbbi Farmakoloji*, 1, Feryal Matbaacılık ve Ticaret Limited Şirketi, ANKARA, s. 1051-1055, (1991).
67. CALVO, P., SANCHEZ, A., MARTINEZ, J., *Polyester Nanocapsules as New Topical Ocular Delivery Systems For Cyclosporin A.*, Pharmaceutical Research, 13, s. 311-315, (1996).
68. DIAZ-LLOPIS, M., MENEZO, J., *Penetration of 2% Cyclosporin Eyedrops Into Human Aqueous Humour*, British Journal of Ophthalmology, 73, s. 600-603, (1989).
69. J. HOWARD, H. ROBERT, F.D., STACY, *Safety, Tolerability, and Efficacy of Cyclosporine Microemulsion in Heart Transplant Recipients: A Randomized, Multicenter, Double-Blind Comparison With The Oil Based Formulation of Cyclosporine Results and Six Months After Transplantation*, Transplantation, 68, s. 663-671, (1999).

70. YOCUM, D.E., ALLARD, S., COHEN, S.B., EMERY, P., FLIPO, R.M., *Microemulsion Formulation of Cyclosporin (Sandimmun Neoral®) vs Sandimmun® : Comparative Safety, Tolerability and Efficacy in Severe Active Rheumatoid Arthritis*, *Rheumatology*, 39, s. 156-164, (2000).
71. WARANUCH, N., RAMACHANDRAN, C., WEINER, N.D., *The Influence of Metabolism On Percutaneous Absorption Of Cyclosporin-A*, *Journal of Liposome Research*, 9(1), s. 129-138, (1999).
72. FUJINO, Y., JOKO, S., MASUDA, K., *Ciclosporin Microemulsion Preconcentrate Treatment of Patients With Behçet's Disease*, Japanese., *Journal of Ophthalmologia.*, (43), s. 318-326, (1999).
73. SÜLLÜ, Y., ÖGE, I., ERKAN, D., ARITÜRK, N., MOHAJERI, F., *Cyclosporin-A Therapy in Severe Uveitis of Behçet's Disease*, *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 76, s. 96-99, (1998).
74. DIAZ-LLOPIS, M., CERVERA, M., MENEZO, J.L., *Cyclosporin A Treatment of Behçet's Disease: A Long-Term Study*, *Current of , Eye., Research*, 9, s. 17-23, (1990).
75. MERTON, G., JONES, K., LEE, M., JOHNSTON, A., HOLT, D., *Accuracy of Cyclosporin Measurements Made in Capillary Blood Samples Obtained by Skin Puncture*, *Therapeutic Drug Monitoring*, 22, s. 594-598, (2000).
76. TRADGER, M., ROBERTS, N., SHERWOOD, R., HIGGINS, G., KEATING, J., *Comparison of Five Cyclosporin Immunoassays with HPLC*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38 (11), s. 1205-1207, (2000).
77. MORRIS, R.G., *Cyclosporin Assays, Metabolite Cross-Reactivity, and Pharmacokinetic Monitoring*, *Therapeutic Drug Monitoring*, 22, s. 160-162, (2000).
78. TAMILVANAN, S., KHOURY, K., GILHAR, D., BENITA, S., *Ocular Delivery of Cyclosporin A I. Design and Characterization of Cyclosporin A-loaded Positively-charged Submicron Emulsion*, *S.T.P. Pharma Sciences*, 11(6), s. 421-426, (2001).