

BEYZA BETÜL GÖKÇE

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018



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

DOKTORA TEZİ

**DENDRİTİK NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN DERMAL
HEDEFLENDİRME AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BEYZA BETÜL GÖKÇE

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEVGİ GÜNGÖR**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

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

DOKTORA TEZİ

**DENDRİTİK NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN DERMAL
HEDEFLENDİRME AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

BEYZA BETÜL GÖKÇE

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEVGİ GÜNGÖR**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. RICHARD H. GUY**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Programında Doktora öğrencisi Beyza Betül GÖKÇE tarafından Prof. Dr. Sevgi GÜNGÖR'ün danışmanlığında hazırlanan “Dendritik nanotaşıyıcı sistemlerin dermal hedeflendirme açısından değerlendirilmesi” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27/12/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı


Jüri-Danışman

Prof. Dr. Sevgi GÜNGÖR
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı


Jüri

Prof. Dr. Rana SANYAL
Boğaziçi Üniversitesi
Kimya Bölümü


Jüri

Prof. Dr. Erem BİLENSOY
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı


Jüri

Doç. Dr. Meryem Sedef ERDAL
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Beyza Betül Gökçe



İTHAF

Güzel aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan ve yol gösteren tez danışmanım Sayın Hocam **Prof. Dr. Sevgi Güngör**'e ve İngiltere'de Bath Üniversitesi'nde laboratuvarındaki araştırmalarım için olanak sağlayan ve katkıda bulunan ikinci tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Richard H. Guy**'a en içten dileklerle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yardım ve desteklerinden dolayı Eczacılık Teknolojisi Bölümü ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Ahmet Araman**'a,

Doktora öğrenimim boyunca gösterdiği yakınlık ve desteklerinden dolayı Sayın **Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer**'e,

Doktora çalışmalarım süresince gösterdiği ilgi ve destekleri ile tez projeme katkılarından dolayı Sayın **Prof. Dr. Rana Sanyal**'a ve Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirilen çalışmalarda katkılarından dolayı doktora öğrencisi **Filiz Emlik Çalık**'a,

Doktora eğitimim boyunca gösterdikleri ilgi ve destekleri için Sayın **Prof. Dr. Erdal Cevher**'e ve Sayın **Doç. Dr. M. Sedef Erdal**'a, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Sena Çağlar-Andaç**'a,

Doktora eğitim sürecinde bana her daim manevi desteklerini sunan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi ve lisansüstü programı öğrencisi arkadaşlarıma ve Bath Üniversitesi'ndeki araştırmalarımda desteklerinden dolayı **Dr. Saray F. Cordery**'e,

Doktora eğitimim yanı sıra hayatım boyunca destek olup bana güvenen, beni daima cesaretlendiren, benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, üzerimde çok emekleri olan sevgili **Anne ve Babama**; maddi ve manevi desteği ile her daim arkamda olan kıymetli **Eşime** ve beni her daim cesaretlendiren biricik **Kardeşime** çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-21246

Araştırma projesi ayrıca, TÜBİTAK – BİDEB 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xviii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xxv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xxx
ÖZET	xxxii
ABSTRACT.....	xxxiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Derinin Özellikleri ve İlaçların Deriden Geçiş Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. Yapısı ve Fonksiyonları	4
2.1.2. Derinin Tabakaları	5
2.1.2.1. <i>Epidermis</i>	6
2.1.2.2. <i>Dermis</i>	8
2.1.2.3. <i>Hipodermis</i>	8
2.1.3. Deri Uzantıları.....	9
2.1.4. Deriden Geçiş Yolları	9
2.1.4.1. Hücreler Arası Yol (İnterselüler/Paraselüler Yol)	10
2.1.4.2. Hücre İçi Geçiş Yolu (İntraselüler/Transselüler Yol).....	11
2.1.4.3. Yan Geçit Yolu (Transfoliküler Yol).....	11
2.1.5. Deride esteraz aktivitesi	11
2.2. Deriden Penetrasyonu Etkileyen Faktörler	11
2.2.1. Derinin Bariyer Özelliğini Etkileyen Faktörler	11
2.2.1.1. Yaş, Irk, Cinsiyete Bağlı Fizyolojik Özellikler.....	12
2.2.1.2. <i>Stratum corneum</i> 'un Hidrasyonu	12
2.2.1.3. Anatomik Bölge	12
2.2.1.4. Dermatolojik Hastalıklar	12
2.2.2. Moleküle ait Fizikokimyasal Özellikler.....	13

2.2.2.1. Yağ/Su Partisyon Katsayısı.....	13
2.2.2.2. Molekül Ağırlığı.....	13
2.2.2.3. Çözünürlük/Erime Sıcaklığı.....	13
2.2.2.4. Konsantrasyon.....	14
2.2.2.5. İyonizasyon	14
2.2.2.6. Hidrojen Bağı Yapan Grup Sayısı.....	14
2.2.3. Formülasyona ait Özellikler.....	15
2.3. Deriden Geçiş Arttırmaya Yönelik Yaklaşımlar.....	16
2.4. Nanotaşıyıcıların Deriye Uygulanması.....	17
2.5. Nanotaşıyıcıların Deride Potansiyel Birikim Bölgeleri	20
2.6. Nanotaşıyıcılar ile Foliküler Hedeflendirme/Transfoliküler Penetrasyon.....	22
2.7. Akne Hakkında Genel Bilgiler.....	24
2.7.1. Tanımı ve Klinik Özellikleri	24
2.7.2. Etiyolojisi ve Patogenezi.....	24
2.7.3. Aknede Tedavi Yaklaşımları	25
2.7.3.1. Aknenin Topikal Tedavisi.....	27
2.7.3.2. Sistemik Tedavi.....	30
2.8. Aknenin Topikal Tedavisinde Nanotaşıyıcıların Önemi	31
2.9. Adapalen Hakkında Genel Bilgiler.....	32
2.9.1. Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	33
2.9.2. Farmakodinamik Özellikleri	33
2.9.2.1. Etki Mekanizması.....	33
2.9.2.2. Endikasyonu ve Tedavi Dozu	34
2.9.2.3. Yan Etkileri	34
2.9.3. Farmakokinetik Özellikleri	35
2.9.4. Adapalenin Literatürde Kayıtlı Alternatif Formülasyon Yaklaşımları	35
2.10. Dendritik Nanotaşıyıcılar Hakkında Genel Bilgiler	36
2.11. Dendrimerlerin Yapısı ve Özellikleri.....	37
2.11.1. Dendrimerlerin Sentezlenmesi	38
2.11.2. PAMAM Dendrimerler	41
2.11.3. İlaç-Dendrimer Etkileşimleri	43
2.11.4. Dendrimerlerin Dermal Uygulamaya Yönelik Değerlendirilmesi.....	44

2.12. Dendritik Blok Kopolimerler ile Hazırlanan Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler: Dendron Temelli Miseller	47
2.12.1. Miseller Hakkında Genel Bilgiler	47
2.12.2. Dendritik Blok Kopolimerler ile Hazırlanan Miseller	48
2.12.3. Misel Hazırlama Yöntemleri	50
2.12.4. Polimerik Misel Nanotaşıyıcıları ile Dermal Uygulamaya Yönelik Yaklaşımlar	52
2.13. Yarı Katı Farmasötik Dozaj Şekillerinden Jeller Hakkında Genel Bilgiler	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. GEREÇ	56
3.1.1. Kimyasal Maddeler	56
3.1.2. Cihaz ve Malzemeler	57
3.1.2.1. Cihazlar	57
3.1.2.2. Malzemeler	58
3.1.3. Bilgisayar Programları	59
3.2. YÖNTEM	59
3.2.1. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Analiz Yöntemi Geliştirme Çalışmaları	59
3.2.1.1. Hareketli Fazın Hazırlanması	60
3.2.1.2. Kromatografik Koşullar	61
3.2.1.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.2.2. Adapalenin HPLC Analiz Yönteminin Validasyonu	61
3.2.2.1. Seçicilik	62
3.2.2.2. Doğrusallık	63
3.2.2.3. Kesinlik	63
3.2.2.4. Doğruluk	64
3.2.2.5. Teşhis Limiti, TL (<i>Limit of Detection</i> , LOD)	65
3.2.2.6. Miktar Tayini Limiti, MTL (<i>Limit of Quantitation</i> , LOQ)	66
3.2.2.7. Örneklerde Adapalenin Stabilesi	66
3.2.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmaları	67
3.2.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyonu Çalışmaları	69

3.2.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi Yöntemi ile Yapılan Yükleme Çalışmaları	70
3.2.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltisine İlavesi Yöntemi ile Yapılan Yükleme Çalışmaları	71
3.2.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Probu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklmesi Çalışmaları	72
3.2.4.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Optimizasyonu	73
3.2.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımının (Polidispersite İndeksi) Değerlendirilmesi	81
3.2.6. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Stabilitte Çalışmaları	81
3.2.7. Seçilen Adapalen yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	81
3.2.7.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi.....	82
3.2.7.2. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında Zeta Potansiyelin Ölçülmesi	82
3.2.7.3. PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarına Yüklenen Adapalen Miktarının Belirlenmesi	83
3.2.7.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında TEM Analizi ..	84
3.2.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyonu	84
3.2.8.1. Ultrasonik Banyoda Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması.....	86
3.2.8.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi ile Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması.....	86
3.2.8.3. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması.....	87
3.2.8.4. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Optimizasyonu	87
3.2.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Partikül Dağılımının (Polidispersite İndeksi) Belirlenmesi	92
3.2.10. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Stabilitte Çalışmaları	93

3.2.11. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	93
3.2.11.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında Zeta Potansiyelin Ölçülmesi.....	93
3.2.11.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Yüklenen Adapalen Miktarının Belirlenmesi	93
3.2.11.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında TEM Analizi	95
3.2.12. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları (PAMAM Dendrimer ve Dendron Temelli Miseller) İçeren Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	95
3.2.12.1. Dendritik Nanotaşıyıcı Sistemleri İçeren Formülasyonların Jelleştirilmesi	95
3.2.12.2. Jel Formülasyonlarının Viskozite Ölçümleri ve Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi	96
3.2.12.3. Jel Formülasyonlarında Yayılabilirliğin (<i>Spreadability</i>) Değerlendirilmesi	97
3.2.12.4. Jel Formülasyonlarının pH'sının Ölçülmesi	97
3.2.12.5. Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarından ve Differin® Jel'den Adapalenin Geri Kazanımı	97
3.2.12.6. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarının ve Differin® Jel'in Floresan Mikroskop ile İncelenmesi.....	98
3.2.13. <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmaları	98
3.2.13.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması.....	99
3.2.13.2. <i>In vitro</i> Penetrasyon Çalışması Prosedürü	99
3.2.13.3. Adapalenin <i>In Vitro</i> Penetrasyonunun <i>Punch</i> Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesi	100
3.2.13.4. Adapalenin <i>Stratum Corneum</i> 'daki Birikiminin Bantla Soyma (<i>Tape Stripping</i>) Yöntemi ile İncelenmesi	101
3.2.13.5. Adapalenin Deri Örneklerinden ve Bantlardan Ekstraksiyon İşlemi ile Geri Kazanımı	102
3.2.13.6. Reseptör Fazda BSA'nın Çöktürülmesi ve Adapalenin Geri Kazanımı ..	103
3.2.13.7. Reseptör Fazda Adapalenin Stabilitesi.....	103
3.2.13.8. Adapalenin Foliküler Birikiminin Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi	104
3.2.14. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Yapılan Görüntüleme Çalışmaları	105

3.2.14.1. PAMAM Dendrimerler ile Yapılan CLSM Çalışmaları	105
3.2.14.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları ile Yapılan CLSM Çalışmaları	106
3.2.15. Adapalenin Dendron Temelli Yapılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Misel Formülasyonlarının Hazırlanması.....	108
3.2.15.1. Adapalen Bağlı Polyester Dendron Polimer Konjugat (PDC-ADA) Yapısının Hazırlanması.....	108
3.2.15.2. PDC-ADA Yapısı ile Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması	109
3.2.16. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımı (Polidispersite İndeksi) ile Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi.....	110
3.2.17. PDC-ADA Yapısının Miktar Tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Yöntemi ve Validasyon Çalışmaları	110
3.2.17.1. Hareketli fazın hazırlanması	110
3.2.17.2. PDC-ADA'nın HPLC Analizinde Kromatografik Koşullar	110
3.2.17.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	110
3.2.17.4. PDC-ADA'nın HPLC Analizi Yöntemi Validasyonu	111
3.2.18. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından <i>In Vitro</i> Salımı Çalışmaları.....	112
3.2.18.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	112
3.2.18.2. Esteraz içeren Ortamda <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	113
3.2.19. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmaları.....	114
3.2.19.1. Adapalenin <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyonunun Punch Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesi	115
3.2.19.2. Adapalenin <i>Stratum Corneum</i> 'daki Birikiminin Bantla Soyma (<i>Tape Stripping</i>) Yöntemi ile İncelenmesi	116
3.2.20. İstatiksel Analiz.....	116
4. BULGULAR.....	117
4.1. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Geliştirilmesine Ait Bulgular	117
4.2. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular	117
4.2.1. Seçicilik.....	118
4.2.2. Doğrusallık.....	119
4.2.3. Kesinlik	121

4.2.4. Doğruluk	123
4.2.5. Teşhis Limiti	123
4.2.6. Miktar Tayini Limiti	123
4.2.7. Örneklerin Stabilitesi	124
4.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulgular	125
4.4. Adapalenin PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	126
4.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi ile Hazırlanan Formülasyonlara ait Bulgular	127
4.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltisine İlavesi ile Hazırlanan Formülasyonlara ait Bulgular	128
4.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Problu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklendiği Nanotaşıyıcılara ait Bulgular	128
4.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Stabilitate Çalışmalarına ait Bulgular	136
4.6. Seçilen Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	141
4.6.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların FTIR Spektroskopisi ile Analiz Bulguları	142
4.6.2. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarına ait Zeta Potansiyel Bulguları	145
4.6.3. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında Yükleme Bulguları	146
4.6.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların TEM Analizi Bulguları	147
4.7. Adapalenin Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	148
4.7.1. Ultrasonik Banyoda Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Formülasyonlarına Ait Bulgular	148
4.7.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular	148
4.7.3. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular	149

4.7.3.1. Sonikasyon Uygulaması ile Hazırlanan Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular:	151
4.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Stabilitate Çalışmalarına ait Bulgular.....	154
4.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	156
4.9.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına ait Zeta Potensiyel Bulguları.....	156
4.9.2. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında Yükleme Bulguları	157
4.9.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların TEM Analizi Bulguları.....	158
4.10. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcılar (PAMAM Dendrimer ve Dendron Temelli Miseller) ile Hazırlanan Jel Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	159
4.10.1. Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Reolojik Özelliklerine ait Bulgular	159
4.10.2. Jel Formülasyonlarının Yayılabilirlik (<i>Spreadability</i>) Bulguları.....	161
4.10.1. Jel Formülasyonlarının pH Bulguları.....	161
4.10.2. Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarından ve Differin® Jel'den Adapalenin Geri Kazanımı Bulguları	162
4.10.3. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarının ve Differin® Jel'in Floresan Mikroskop Bulguları	163
4.11. <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	166
4.11.1. Adapalenin <i>In vitro</i> Deriden Penetrasyonunun <i>Punch</i> Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular	166
4.11.2. Adapalenin <i>Stratum Corneum</i> 'daki birikiminin <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmaları Sonrasında Bantla Soyma (<i>Tape Stripping</i>) Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular.....	178
4.11.3. Adapalenin Deri ve Bantlardan Ekstraksiyon İşlemi ile Geri Kazanımı	180
4.11.4. Reseptör Fazda BSA'nın Çöktürülmesinin Ardından Adapalenin Geri Kazanım Çalışmasına Ait Bulgular	180
4.11.5. Adapalenin Reseptör Fazdaki Stabilitatesine ait Bulgular.....	181
4.11.6. Adapalenin Foliküler Birikiminin Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesine ait Bulgular.....	181

4.12. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	183
4.12.1. PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılar ile Yapılan CLSM Analizi Bulguları.....	184
4.12.2. Adapalenin Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılar ile Yapılan CLSM Analizi Bulguları.....	186
4.13. Adapalenin Dendron Temelli Nanotaşıyıcılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanmasına ait Bulgular...	189
4.14. Adapalen Bağlı Polyester Dendron Polimer Konjugat (PDC-ADA) Yapısının Hazırlanmasına Ait Bulgular	189
4.15. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımı (Polidispersite İndeksi) ile Zeta Potansiyel Bulguları	189
4.16. PDC-ADA'nın Miktar Tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Yöntemi ve Validasyonu	190
4.16.1. Seçicilik.....	190
4.16.2. Doğrusallık.....	190
4.16.3. Kesinlik	191
4.16.4. Teşhis Limiti (TL).....	192
4.16.5. Miktar Tayini Limiti (MTL)	192
4.16.6. Örneklerin Stabilitesi	192
4.17. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından <i>In Vitro</i> Salımı Çalışmalarına Ait Bulgular	193
4.17.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	193
4.17.2. Esteraz içeren Ortamda <i>In Vitro</i> Salımı Çalışmalarına Ait Bulgular.....	194
4.18. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	195
4.18.1. Adapalenin <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyonunun <i>Punch</i> Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular	195
4.18.2. Adapalenin <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyonunun Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular	197
5. TARTIŞMA	199
5.1. Giriş.....	199
5.2. Adapalenin Miktar Tayini Yöntemi Validasyonunun Değerlendirilmesi.....	205
5.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Değerlendirilmesi	207

5.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	207
5.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi ile Hazırlanan Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi	209
5.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltisine İlavesi ile Hazırlanan Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi	210
5.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Problu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklendiği Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi	211
5.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi.....	215
5.6. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	216
5.6.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların FTIR Spektroskopisi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	216
5.6.2. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Zeta Potansiyel Bulgularının Değerlendirilmesi.....	219
5.6.3. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Yükleme Oranı ve Yükleme Etkinliği Bulgularının Değerlendirilmesi	220
5.6.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların TEM Bulgularının Değerlendirilmesi.....	221
5.7. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Formülasyon Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	222
5.7.1. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	223
5.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi.....	228
5.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	229
5.9.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Zeta Potansiyel Bulgularının Değerlendirilmesi.....	229
5.9.2. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Yükleme Oranı ve Yükleme Etkinliği Bulgularının Değerlendirilmesi	230
5.9.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların TEM Bulgularının Değerlendirilmesi.....	231

5.10. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıların Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Jellerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	232
5.11. <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	236
5.12. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	251
5.12.1. PAMAM Dendrimer Temelli Nanotaşıyıcı Sistemlerle Yapılan CLSM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	251
5.12.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları ile Yapılan CLSM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi.....	252
5.13. Adapalenin Dendron Temelli Nanotaşıyıcılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Hazırlanan Misellere ait Çalışmaların Değerlendirilmesi	253
5.13.1. PDC-ADA için Analitik Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi.....	255
5.13.2. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından <i>In Vitro</i> Salımı Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi.....	256
5.13.2.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	256
5.13.2.2. Esteraz İçeren Ortamda <i>In Vitro</i> Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	257
5.13.3. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının <i>In Vitro</i> Deriden Penetrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	258
5.18. Sonuçlar ve Öneriler	262
KAYNAKLAR	264
HAM VERİLER	292
FORMLAR	293
ETİK KURUL KARARI	294
PATENT HAKKI İZNİ	295
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	296
ÖZGEÇMİŞ	297

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Deriye uygulanmak üzere hazırlanan yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler ve bu sistemlere yüklenen bazı ilaçlar	20
Tablo 2-2: Yaygın olarak kullanılan topikal anti-akne ajanları ve dezavantajları.....	27
Tablo 2-3: Dermal uygulamaya yönelik dendrimerlerin kullanıldığı çalışmalar-1	45
Tablo 2-4: Dermal uygulamaya yönelik dendrimerlerin kullanıldığı çalışmalar-2	46
Tablo 3-1: Çözünürlük çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri ve kullanılan oranlar	69
Tablo 3-2: Adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine katı halde ilavesi ile hazırlanan formülasyonlar	71
Tablo 3-3: Adapalenin tetrahidrofuranda çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilavesi ile hazırlanan formülasyon	72
Tablo 3-4: Sonikasyon işlemi sırasında uygulanan güç seviyeleri ve Watt birimi cinsinden karşılığı	72
Tablo 3-5: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.....	73
Tablo 3-6: Farklı oranlarda PAMAM içeren 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları	74
Tablo 3-7: Farklı sürelerde OP 1’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları	75
Tablo 3-8: Farklı güçte sonikasyon işlemi ile hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları	75
Tablo 3-9: Farklı sürelerde OP 2’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları	76
Tablo 3-10: Farklı yardımcı bileşenler ilave edilerek hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları	77
Tablo 3-11: Farklı oranlarda PAMAM içeren adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları.....	77
Tablo 3-12: Farklı miktarlarda adapalen ve seçilen konsantrasyonda (%0,02) PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları.....	78
Tablo 3-13: Farklı oranlarda PAMAM içeren 0,5 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları	78

Tablo 3-14: %0,05 ve %0,07 PAMAM ve farklı oranlarda kullanılan PEG 400 ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları.....	79
Tablo 3-15: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 0,75 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları.....	80
Tablo 3-16: Farklı çözücü oranları kullanılarak seçilen oranlarda PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları	80
Tablo 3-17: İnce film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan dendron temelli misel formülasyonu	86
Tablo 3-18: Ko-solvan evaporasyon yöntemi ile hazırlanan dendron temelli misel formülasyonu	87
Tablo 3-19: Adapalen yüklü dendron temelli misellerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler.....	88
Tablo 3-20: Farklı oranlarda PDC ile hazırlanan adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonları ve bileşenleri	88
Tablo 3-21: Dispersiyon ortamına ilave edilen %1 (a/h) PEG 400'ün etkisinin incelendiği dendron temelli misel formülasyonları	89
Tablo 3-22: Dispersiyon ortamına farklı oranlarda PEG 400 ilave edilen dendron temelli misel formülasyonları	90
Tablo 3-23: Hazırlama sonrasında uygulanan sonikasyon işleminin etkisinin incelendiği dendron temelli misel formülasyonları	91
Tablo 3-24: Farklı miktarlarda adapalen yüklenen hazırlama sonrasında sonikasyon uygulanan dendron temelli misel formülasyonları	92
Tablo 3-25: Farklı oranlarda HPC ile hazırlanan jeller ve kullanılan jel yapıcı madde yüzdeleri.....	96
Tablo 3-26: Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarında ve Differin®Jel'de bulunan adapalen yüzdesi.....	98
Tablo 4-1: Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında HPLC ile analizi yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)	119
Tablo 4-2: Adapalenin pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) ortamında HPLC ile analizi yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)	120
Tablo 4-3: Adapalenin HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)	121

Tablo 4-4: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)	122
Tablo 4-5: Adapalenin HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)	122
Tablo 4-6: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)	122
Tablo 4-7: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait doğruluk bulguları (n=3).....	123
Tablo 4-8: Adapalenin ekstraksiyon ortamında hazırlanan örnek çözeltilerine ait stabilite bulguları (n=3)	124
Tablo 4-9: Adapalenin <i>in vitro</i> salım ortamında stabilite bulguları.....	125
Tablo 4-10: Farklı çözünme ortamlarında adapalenin çözünürlüğü (n=3)	125
Tablo 4-11: PAMAM dendimerlerin metanol ortamında ölçülen partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	127
Tablo 4-12: PAMAM dendimerlerin saf su ortamında ölçülen partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	127
Tablo 4-13: Adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine toz halde ilavesi ile hazırlanan nanotaşıyıcılardan adapalenin geri kazanım bulguları.....	127
Tablo 4-14: Adapalenin tetrahidrofuranda çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilavesi ile hazırlanan nanotaşıyıcılara ait bulgular.....	128
Tablo 4-15: Farklı oranlarda PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (Sonikasyon: OP 1, 1 dk) (n=3)	129
Tablo 4-16: Farklı sürelerde OP 1’de sonikasyon işlemi uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	129
Tablo 4-17: Farklı şiddette sonikasyon işlemi ile hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	130
Tablo 4-18: Farklı sürelerde OP 2’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	130
Tablo 4-19: Farklı dispersiyon ortamlarında %0,1 PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	131
Tablo 4-20: Farklı oranlarda PAMAM içeren adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (Sonikasyon: OP 2, 3+3 dk) (n=3)	131

Tablo 4-21: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,02 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	132
Tablo 4-22: Farklı oranlarda PAMAM ve 0,5 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı.....	133
Tablo4-23: Farklı oranlarda kullanılan formülasyon bileşenleri ile %0,05 PAMAM içeren PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	133
Tablo 4-24: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,05 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	134
Tablo 4-25: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,07 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	134
Tablo 4-26: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 0,75 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	135
Tablo 4-27: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	135
Tablo 4-28: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,07 PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3).....	135
Tablo 4-29: PAMAM (%0,02) ve farklı miktarlarda adapalen ile hazırlanarak 5±3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	137
Tablo 4-30: PAMAM (%0,05), adapalen (0,5 mg) ve farklı oranlarda PEG 400 ile hazırlanarak 5±3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	138
Tablo 4-31: PAMAM (%0,05), farklı miktarda adapalen (0,75 ve 1 mg) ve PEG 400 ile hazırlanarak 5±3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	139
Tablo 4-32: PAMAM (%0,07), PEG 400 (%1) ve farklı oranlarda adapalen ile hazırlanarak 5±3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	140
Tablo 4-33: %0,05 PAMAM ve 0,5-1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarından geri kazanılan adapalen miktarları (n=3).....	141
Tablo 4-34: %0,07 PAMAM ve 0,5-1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarından geri kazanılan adapalen miktarları (n=3).....	141

Tablo 4-35: Seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)	146
Tablo 4-36: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)	147
Tablo 4-37: İki farklı yöntemle hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	149
Tablo 4-38: Farklı oranlarda PDC ve 35 µg adapalen ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	149
Tablo 4-39: Farklı miktarlarda adapalen ve 0,7 mg PDC ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	150
Tablo 4-40: Farklı oranlarda PDC ve 80 µg adapalen ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	150
Tablo 4-41: Dispersiyon ortamına ilave edilen %1 (a/h) PEG 400'ün etkisinin incelendiği dendron temelli misel nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	150
Tablo 4-42: Seçilen oranlarda PDC ile ve dispersiyon ortamına farklı oranlarda PEG 400 ilave edilerek hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	151
Tablo 4-43: Hazırlama sonrasında uygulanan sonikasyon işleminin etkisinin incelendiği dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)	152
Tablo 4-44: Farklı oranlarda PDC ve %1 (a/h) PEG 400 ile hazırlanan ve sonikasyon uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	152
Tablo 4-45: Farklı oranlarda PEG 400 ilave edilen ve sonikasyon işlemi uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	153
Tablo 4-46: Farklı miktarlarda adapalen yüklenen hazırlama sonrasında sonikasyon uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)	153
Tablo 4-47: Sonikasyon uygulanmadan hazırlanan seçilmiş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları	155

Tablo 4-48: Sonikasyon uygulanarak hazırlanan seçilmiş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları.....	155
Tablo 4-49: Adapalen yüklenmeden hazırlanan boş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları.....	156
Tablo 4-50: Seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)	157
Tablo 4-51: Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)	157
Tablo 4-52: Farklı oranlarda HPC ile hazırlanan jellerde yapılan tek noktalı viskozite tayinine ait bulgular ($\gamma=5 \text{ s}^{-1}$) (n=3).....	159
Tablo 4-53: Farklı jel formülasyonlarında yapılan tek noktalı viskozite tayinine ait bulgular ($\gamma=5 \text{ s}^{-1}$) (n=3).....	160
Tablo 4-54: Farklı jel formülasyonlarının reolojik özelliklerine ait bulgular ($\gamma=1-100 \text{ s}^{-1}$) (n=3).....	160
Tablo 4-55: Farklı jel formülasyonlarının yayılabilirlik bulguları (n=3)	161
Tablo 4-56: Nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarından ve Differin® Jel'den adapalenin geri kazanım oranları (n=3)	163
Tablo 4-57: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyonunun <i>punch</i> biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyon ve adapalen miktarları.....	168
Tablo 4-58: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin <i>in vitro</i> deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik <i>punch</i> biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-1 (n=5).....	168
Tablo 4-59: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin <i>in vitro</i> deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik <i>punch</i> biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-2 (n=5).....	169
Tablo 4-60: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyonunun <i>punch</i> biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyon ve adapalen miktarları.....	172
Tablo 4-61: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin <i>in vitro</i> deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik <i>punch</i> biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-1 (n=5).....	172

Tablo 4-62: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin <i>in vitro</i> deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik <i>punch</i> biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-2 (n=5).....	173
Tablo 4-63: Adapalen yüklü PAMAM-Jel ve ticari preparat ile bantla soyma işlemi yapmak üzere 24 saat süre ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışmalarında deriye uygulanan formülasyon ve etken madde miktarları.....	179
Tablo 4-64: PAMAM-Jel'den ve ticari preparattan adapalenin <i>stratum corneum</i> 'daki birkiminin bantla soyma yöntemi ile incelenmesine ait bulgular (n=4)	179
Tablo 4-65: Adapalenin deri ve bant örneklerinden geri kazanım bulguları (n=3)	180
Tablo 4-66: Reseptör fazda adapalenin, BSA'nın çöktürülmesi işlemi sonrasında ekstraksiyon ortamında geri kazanım bulguları (n=3).....	181
Tablo 4-67: Adapalenin pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) ortamındaki stabilite bulguları ..	181
Tablo 4-68: PDC-ADA'nın HPLC ile analiz yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)	190
Tablo 4-69: PDC-ADA'nın HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3).....	191
Tablo 4-70: PDC-ADA'nın HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3).....	192
Tablo 4-71: PDC-ADA'nın ekstraksiyon ortamında hazırlanan örnek çözeltilerine ait stabilite bulguları (n=3)	193
Tablo 4-72: PDC-ADA yapısından % salınan kümülatif adapalen miktarları ile 50 ml reseptör ortamında saptanan salınmış adapalen miktarları bulguları (n=3).....	194
Tablo 4-73: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ve ticari preparattan adapalenin <i>in vitro</i> deriden penetrasyonunun incelenmesinde <i>punch</i> biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular (n=4).....	196
Tablo 4-74: Bantla soyma yöntemi kullanılarak deri tabakalarında bulunan serbest ve PDC-ADA yapısında bağlı halde bulunan adapalen miktarları (n=4) (Sonsuz/ <i>infinite</i> doz)	198

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Önkolda deriye özgü “hiyeroglif desenler”in mikroskop görüntüsü	5
Şekil 2-2: Derinin morfolojik yapısı	5
Şekil 2-3: <i>Epidermis</i> ’in yapısı	6
Şekil 2-4: <i>Stratum basale</i> ’dan başlayan ve <i>stratum corneum</i> yüzeyinden deskuamasyonla sonlanan epidermin yenilenme süreci	7
Şekil 2-5: <i>Stratum corneum</i> ’un “tuğla ve harç” modeli ile tanımlanan yapısı	8
Şekil 2-6: Pilosebace ünite (PSU) ile beraberindeki deri eklerinin temsili görünümü	9
Şekil 2-7: Moleküllerin <i>stratum corneum</i> bariyerini aşmak üzere deriden geçiş yollarının temsili gösterimi: a) hücreler arası yol b) transfoliküler yol c) hücre içi yol d) mekanik olarak <i>stratum corneum</i> ’da açılan yollar (ör. mikroiğne aracılı).....	10
Şekil 2-8: İlaçların deriden penetrasyonunu arttırmaya yönelik bazı yöntemler ve deriden penetrasyon yolları.....	17
Şekil 2-9: Nanopartiküllerin birikimi için deride potansiyel hedef bölgeler	21
Şekil 2-10: Nanopartiküllerin kıl foliküllerinde birikiminin temsili gösterimi	23
Şekil 2-11: Akne tedavisinde tercih edilebilecek tedavi seçenekleri.....	26
Şekil 2-12: Kuşaklara göre sınıflandırılan retinoitlerin kimyasal yapıları	29
Şekil 2-13: Adapalen molekülünün kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.....	33
Şekil 2-14: Dendrimer ve diğer dendritik polimerlerin sentezlenmesinde kullanılan iki temel yöntem.....	39
Şekil 2-15: Yaygın olarak kullanılan ticari dendrimerlerin kimyasal yapıları	40
Şekil 2-16: PAMAM-NH ₂ dendrimerlerin kimyasal yapısı	41
Şekil 2-17: PAMAM dendrimerlerin çekirdekten G7’ye doğru, doğrusal şekilde artan çapları.....	42
Şekil 2-18: Dendrimer-ilâç etkileşimleri	44
Şekil 2-19: Amfifilik diblok kopolimer ünitelerinin sulu ortamda KMK üzerinde misel oluşturması.....	47
Şekil 2-20: Nano ilâç taşıyıcı sistemler olarak literatürde kayıtlı dendron temelli miseller ve misel agregatlarını oluşturan amfifilik blok kopolimerlere örnekler	50
Şekil 2-21: (1) Basit çözündürme (2) Diyaliz (3) Yağ/Su emülsiyon (4) Solvan evaporasyon (5) Liyofilizasyon	51
Şekil 3-1: G3 PDC yapısı.....	85

Şekil 3-2: G3 PDC yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarında adapalenin enkapsülasyonu.....	85
Şekil 3-3: Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının hazırlanması	92
Şekil 3-4: Hidroksil yüzey gruplu G3 PDC-OH yapısı	108
Şekil 3-5: PDC-ADA'nın kimyasal sentezi	109
Şekil 3-6: PDC-ADA yapısı ile misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması.....	109
Şekil 4-1: HPLC analizinde adapalene ait kromatogram.....	117
Şekil 4-2: HPLC analizinde kontrol deri örneğinden gelen pik görüntüsü.....	118
Şekil 4-3: HPLC analizinde kontrol bant örneğinden gelen pik görüntüsü	118
Şekil 4-4: Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı	120
Şekil 4-5: Adapalenin pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) ortamında kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı	121
Şekil 4-6: Farklı çözücü ortamlarında adapalenin çözünürlüğü	126
Şekil 4-7: PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimerlere ait partikül boyutu dağılım grafiği	136
Şekil 4-8: Adapalenin IR spektrumu	142
Şekil 4-9: G2 PAMAM-NH ₂ 'nin IR spektrumu	142
Şekil 4-10: Adapalenin PAMAM dendrimer kompleksinin IR spektrumu	143
Şekil 4-11: Farklı miktarda adapalen yüklenen PAMAM dendrimer komplekslerinin IR spektrumu.....	144
Şekil 4-12: Farklı miktarda adapalen yüklenen PAMAM dendrimer kompleksleri ile beraber adapalenin karşılaştırmalı IR spektrumu	144
Şekil 4-13: PMM 0.05-S-A5 kodlu dendrimer kompleksi, adapalen ve PAMAM dendrimere ait (sırasıyla yukarıdan aşağıya doğru) karşılaştırmalı IR spektrumu	145
Şekil 4-14: PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait TEM (JEM-1011) görüntüleri	148
Şekil 4-15: DMc A500 1PEG S kodlu dendron temelli misellere ait partikül boyutu dağılım grafiği.....	154
Şekil 4-16: DMc 1 A500 1PEG S kodlu adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait TEM (JEM-1011) görüntüleri	158
Şekil 4-17: Hazırlanan jel formülasyonları ve Differin® Jel'e ait reogram	161

Şekil 4-18: pH indikatör skalası ile beraber elde edilen pH sonuçları a) PAMAM-Jel b) PDC-misel-Jel.....	162
Şekil 4-19: pH indikatör skalası ile beraber Differin®Jel ile elde edilen pH sonucu....	162
Şekil 4-20: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarında (PAMAM-AQ) bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüsü	164
Şekil 4-21: PDC misel nanotaşıyıcılarında (Dendron-AQ) bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüsü	164
Şekil 4-22: PAMAM Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri	165
Şekil 4-23: PDC Misel Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri	165
Şekil 4-24: Differin®Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri	165
Şekil 4-25: Nil Kırmızısı içeren HPC (%1,5) jellerin deriye uygulanması ile deri yüzeyinde oluşan görünüm	166
Şekil 4-26: <i>Punch</i> Biyopsi tekniği ile deriden alınan örneklerin mikroskop altındaki görüntüsü: Kıl folikülü içermeyen biyopsi örneği, KF-Neg (Soldaki) ve kıl folikülü içeren biyopsi örneği, KF-Poz (Sağdaki)	167
Şekil 4-27: <i>Punch</i> biyopsi uygulamalarında deri örneğindeki görünüm	167
Şekil 4-28: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=5)	169
Şekil 4-29: Foliküler hedefleme açısından adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparata ait KF-Poz/KF-Neg oranları (n=5)...	170
Şekil 4-30: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan deriye geçen etken madde miktarları (n=5)	170
Şekil 4-31: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri (n=5)	171
Şekil 4-32: PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=5).....	173
Şekil 4-33: Foliküler hedefleme açısından adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparata ait KF-Poz/KF-Neg oranları (n=5)...	174
Şekil 4-34: Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan deriye geçen etken madde miktarları (n=5)	174
Şekil 4-35: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri (n=5)	175

Şekil 4-36: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonlarından ticari preparat ile karşılaştırmalı olarak deriye geçen adapalen miktarları (n=5).....	175
Şekil 4-37: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ile ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5)	176
Şekil 4-38: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ formülasyonları ile PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5)	177
Şekil 4-39: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ ile PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları ile birlikte hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg oranları) değerlerini gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5).....	178
Şekil 4-40: Adapalen yüklü PAMAM Jel ve ticari preparat ile yapılan <i>in vitro</i> penetrasyon çalışmalarında bantla soyma işlemi yapılarak belirlenen <i>stratum corneum</i> tabakasındaki adapalen miktarları (n=4).....	180
Şekil 4-41: Dendritik nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonları ile Differin® Jel'in 24 saat süre ile deriye uygulanmasını takiben floresan mikroskop ile deri yüzeyinde elde edilen görüntüler; karşılaştırmalı olarak a, b) PAMAM-Jel c, d) PDC-misel-Jel e, f) Differin® Jel	182
Şekil 4-42: Sulu koloidal nanotaşıyıcı sistemlerin 24 saat süre ile deriye uygulanmasını takiben floresan mikroskop ile deri yüzeyinde elde edilen görüntüler a) PAMAM-AQ ve b) PDC-misel-AQ	183
Şekil 4-43: PAMAM-NH ₂ -FITC nanotaşıyıcısının deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntülerinde tespit edilen kıl folikülünün a) üst parçası (10X) b) alt parçası (10X) c) immersiyon objektifi ile 40X büyütülmüş hali d) foliküler açıklık.....	184
Şekil 4-44: PAMAM-NH ₂ -FITC nanotaşıyıcısının deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X)	185
Şekil 4-45: FITC in PBS (pH 7,4) içindeki kontrol çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüsü (10X)..	185

Şekil 4-46: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X) a) <i>Stratum corneum</i> b) Kıl folikülü	186
Şekil 4-47: Nil Kırmızısı'nın PBS (pH 7,4)'teki kontrol dispersiyonunun deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüsü (10X).....	186
Şekil 4-48: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 7'şer µm kalınlıkta alınan yatay kesitler ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X).....	187
Şekil 4-49: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 7 µm kalınlıkta alınan yatay kesitte elde edilen üç boyutlu CLMS görüntüleri (10X)	188
Şekil 4-50: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarına ait örnek partikül boyutu dağılımı grafiği	189
Şekil 4-51: PDC-ADA'nın kalibrasyon doğrusuna ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı	191
Şekil 4-52: PDC-ADA yapısından adapalenin pH 5,5 PBS ortamında (%1,75 Tween 80) <i>in vitro</i> salım profili	194
Şekil 4-53: 2 ve 5 IU/ml PLE ortamında PDC-ADA yapısından enzimatik hidroliz ile adapalenin serbestleşmesi	195
Şekil 4-54: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından ve ticari preparattan deriye geçen serbest ve PDC-ADA yapısında bağlı halde (prodrug) bulunan adapalen miktarları (n=4).....	197
Şekil 4-55: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından ve ticari preparattan kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=4).....	197
Şekil 4-56: SC ve canlı <i>epidermis/dermis</i> tabakalarında serbest ve bağlı (prodrug) halde bulunan adapalen miktarları (n=4).....	198

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

a/a: Ağırlık/Ağırlık

a/h: Ağırlık/Hacim

ADA: Adapalen

ATRA: *All-Trans* Retinoik Asit

ATR-FTIR: Hafifletilmiş Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Infrared (*Attenued Total Reflection-Fourier Transformer Infrared*)

ACN: Asetonitril

AUC: Eğri altında kalan alan

CLSM: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)

DHT: Dihidrotestosteron

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (*Dynamic Light Scattering*)

DMSO: Dimetil sülfoksit

EPR: Permeabilite ve Retansiyon Etkisi

EtOH: Etanol

FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi (*U.S. Food and Drug Administration*)

FHF: Foliküler Hedefleme Faktörü

GRAS: Genel Olarak Güvenli (*Generally Recognized As Safe*)

h/h: Hacim/Hacim

HLB: Hidrofilik-Lipofilik Denge

HPC: Hidroksi Propil Selüloz

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*)

IR: Infrared

KF: Kıl Folikülü

KF-Poz: Kıl Folikülü İçeren/Pozitif

KF-Neg: Kıl Folikülü İçermeyen/Negatif

KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu

LDBK: Lineer Dendron Temelli Blok Kopolimerler

LDE: Lazer Doppler Elektroforez (*Laser Doppler Electrophoresis*)

Log P: Partisyon katsayısı

MetOH: Metanol

MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus*

MTL: Miktar Tayin Limiti (LOD)

PAMAM: Poli(amidoamin)

PDC: Polimer-Dendron Konjugatı

PBS: Fosfat Tamponu (*Phosphate Buffered Saline*)

PDI: Poli Dispersite İndeksi

PLE: Domuz Karaciğer Esterazı (*Porcine Liver Esterase*)

PPI: Poli(propilenimin)

r^2 : Determinasyon Katsayısı

RARs: Retinoik Asit Reseptörleri

rpm: Dakikadaki Dönüş Sayısı

RSD: Bağlı Standart Sapma

SC: Stratum corneum

SD: Standart Sapma

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SHBG: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin (*Sex Hormone Binding Globulin*)

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskobu (*Transmission Electron Microscope*)

THF: Tetrahidrofuran

TL: Teşhis Limiti (LOQ)

UV: Ultraviyole

TEWL: Transepidermal Su Kaybı (*Transepidermal Water Loss*)

ÖZET

Gökçe, B.B. (2018). Dendritik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Dermal Hedeflendirme Açısından Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Akne, kıl follikülleri ile beraberindeki yağ bezlerinin oluşurduğu pilosebace ünite de oluşan kronik bir dermatolojik hastalıktır. Topikal tedavisinde ilaçların hedef bölgede; pilosebace ünite de, özellikle kıl foliküllerinde lokalizasyonu önemlidir.

Bu tez çalışmasında; aknenin topikal tedavisine yönelik adapalen yüklü PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel (DM) nanotaşıyıcılarının geliştirilmesi, optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları yürütüldü. Seçilen dendritik nanotaşıyıcıların topikal jel formülasyonları da hazırlandı, formülasyonların reolojik özelliği ve yayılabilirliği incelendi. PAMAM dendrimerler ve DM'lerin sulu koloidal formülasyonlarından ve bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarından adapalenin deride ve kıl foliküllerindeki birikimi punch biyopsi tekniği ile kantitatif belirlendi. Nanotaşıyıcıların ve bu nanoyapıları içeren jel formülasyonlarının foliküler hedeflendirme açısından etkinlikleri ticari jel preparatı ile karşılaştırıldı. Floresan işaretli PAMAM dendrimerlerin ve floresan özellikli Nil Kırmızısı yüklü DM'lerden floresan boyanın derideki ve özellikle kıl foliküllerindeki lokalizasyonu konfokal mikroskop ile görüntülendi. Adapalenin dendron yapıları kovalan konjugasyonu ile oluşturulan polimer-dendron konjugatlarından (PDC-ADA) adapalenin in vitro salımı değerlendirildi. Deride lokalize olan PDC-ADA ve konjugattan serbestleşen adapalen miktarları kantitatif belirlendi.

Sonuçta; dendritik nanotaşıyıcıların adapalenin foliküler lokalizasyonunu ve derideki birikimini iyileştirdiği saptanmıştır. Ticari ürüne göre daha düşük dozda adapalen içeren dendritik nanotaşıyıcı sistemler ile hazırlanan jel formülasyonları, kıl foliküllerinde ilaç birikimi açısından etkin bir performans göstermiştir. Dendritik nanotaşıyıcıların; akne gibi dermatolojik hastalıkların topikal tedavisinde ilaçların seçici olarak etki bölgesine hedeflendirilmesini, uygulanacak dozun düşürülmesini, dolayısı ile yan etkilerin azaltılmasını sağlama potansiyeli gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: PAMAM dendrimer, dendron misel, deri, kıl folikülü, akne

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 21246) ve 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında TÜBİTAK – BİDEB tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gökçe, B.B. (2018). Evaluation of Nano-Sized Dendritic Structures for Dermal Drug Targeting. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. PhD Thesis. İstanbul.

Acne is a chronic dermatological disease of pilosebaceous units consisting of hair follicles and accompanying sebaceous glands. In its topical treatment, drug localization at the target site, in pilosebaceous units, especially in hair follicles is essential.

In this thesis; development, optimization and characterization studies of adapalene loaded PAMAM dendrimer and dendron-based micelle (DM) nanocarriers for topical acne treatment were conducted. Gel formulations of the selected dendritic nanocarriers were also prepared, rheological properties and spreadability were investigated. Adapalene accumulation in hair follicles and in the skin from PAMAM dendrimers' and DMs' aqueous colloidal formulations and their gel formulations were quantitatively determined using punch biopsy technique. Follicular targeting efficiency of the nanocarriers and their gel formulations was compared with the commercial gel product. The localisation of fluorescently labeled PAMAM dendrimers and the fluorescent dye from DMs loaded with fluorescent Nile Red was visualized using confocal microscope. In vitro adapalene release from polymer-dendron conjugates (PDC-ADA), constructed by covalent conjugation of adapalene to dendron structures, was evaluated. The localised amounts of PDC-ADA and adapalene released from the conjugates within the skin quantitatively determined.

In conclusion, it was determined that dendritic nanocarriers improved follicular localization and skin deposition of adapalene. The dendritic nanocarriers' gel formulations including lower adapalene doses compared to the commercial product, exhibited efficient performance in terms of drug accumulation in hair follicles. Dendritic nanocarriers' potential to selectively target drugs to the site of action, reduce dose administration, therefore minimize side effects in topical treatment of dermatological diseases such as acne was shown.

Key Words: PAMAM dendrimer, dendron micelle, skin, hair follicle, acne

The present work was supported by the **Research Fund of İstanbul University** (Project No: 21246) and **TUBITAK-BIDEB** within the scope of **2214/A International Research Fellowship Program for PhD Students**.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dermatolojik hastalıkların tedavisinde topikal uygulama ile; ilaç moleküllerinin doğrudan hastalığın geliştiği hedef bölgeye uygulanmasının yanında, ilaca bağlı sistemik yan etki ve komplikasyonlardan da kaçınılmaktadır¹. Diğer taraftan, topikal tedavide ilaç moleküllerinin derinin hedef tabakalarına ulaşması tedavi etkinliği açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak, oldukça kompleks bir membran olan derinin en dışındaki *stratum corneum* tabakası mükemmel bir bariyer özelliğine sahip olduğu için, organizmaya yabancı maddelerin girişini engellediği gibi, topikal uygulanan ilaçların da derinin daha derin hedef tabakalarına ulaştırılmasında hız kısıtlayıcı özellik göstererek tedavi etkinliğininin kısıtlanmasına yol açabilmektedir². Bu durum, ilaçların penetrasyonunun iyileştirilmesi ve derideki hedef bölgeye ulaşmasını sağlayacak yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler doğrultusunda, son yıllarda nanotaşıyıcı sistemler ile ilaçların derinin belirli tabakalarına hedeflendirilmesi de bu yaklaşımların arasında yer almaktadır³⁻⁴. Nanotaşıyıcı sistemlerin, ilaç moleküllerinin deride hastalığın geliştiği bölgedeki lokalizasyonunu ve hedeflendirilmesini sağlaması, sistemik dolaşıma ilaç geçişini arttırmadan deride kalış süresini uzatması potansiyeli bulunmaktadır^{5,6}. Kıl folikülleri, topikal olarak uygulanan ilaçlar için rezervuar görevi görmesi sebebiyle son yıllarda oldukça fazla dikkat çekmektedir^{7,8}. Nanopartiküllerin kıl foliküllerinde lokalize olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur⁹⁻¹⁷.

Akne en sık karşılaşılan dermatolojik hastalıklardan biridir. Akne lezyonları, kıl folikülleri ve foliküle açılan yağ bezlerinden oluşan *pilosebace* ünitede oluşur. Aknenin patofizyolojisinin oldukça kompleks olduğu ve aslında tam olarak anlaşılamadığı vurgulanmakla birlikte, akne ile sonuçlanan dermatolojik hastalıkta etkilenen kıl folikülünde gelişen patofizyolojik olayların rol aldığı görülmektedir⁸. Bu nedenle, akne tedavisinde önemli bir yer tutan topikal uygulamada ilaçların hedef bölgeye, *pilosebace* üniteye ve özellikle kıl foliküllerine yeterli miktarda ulaşması, bu bölgede lokalizasyonu topikal tedavinin başarısı açısından önem taşımaktadır¹⁸.

Aknenin topikal tedavisine yönelik nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine son yıllarda pek çok araştırma yapılmaktadır. Akne tedavisinde kullanılan ilaçların; penetrasyonunun iyileştirilerek tedavi etkinliğinin artırılması, deride hedef bölgede

lokalizasyonlarının sağlanması, yan etkilerinin azaltılması, stabilitelerinin artırılması ve kontrollü/uzatılmış salımı amaçlanmaktadır¹⁹⁻³¹.

Adapalen, akne tedavisinde topikal olarak kullanılan üçüncü kuşak bir retinoit türevidir. Akne lezyonlarının oluşum sürecinde mikrokomedon gelişimine sebep olan keratinosit hiperproliferasyonunu önlediği, bu hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını kontrol ettiği düşünülmektedir³²⁻³⁴. Adapalenin dünya ilaç pazarında %0,1'lik ve %0,3'lük farklı firmaların ürettiği krem, jel, losyon ve solüsyon dozaj şekilleri mevcuttur³⁵. Topikal adapalen tedavisinde, “retinoit reaksiyonu” olarak bilinen ve doza bağlı olarak uygulama bölgesinde eritem, kuruluk, yanma hissi ve soyulma ile karakterize yan etkilerle karşılaşılabilir³⁶. Adapalen, son derece lipofilik ve sudaki çözünürlüğü zayıf bir bileşiktir³⁷ ($\log P=8,04$). Deriden penetrasyon kabiliyeti zayıftır ve aşırı lipofilik karakteri, topikal uygulama sonrasında *stratum corneum*'un üst kısımlarında birikmesine ve derinin daha alt tabakalarına geçişini sınırlamaktadır³⁷⁻³⁹. Adapalenin suda güç çözünürlüğü topikal formülasyonlarının geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Ticari preparatlarında, adapalenin çözünürlüğünü arttırmak için bazı alkoller ve sürfaktanlar kullanılmaktadır. Bu yardımcı maddeler ilaca bağlı yan etkilerden bağımsız olarak *stratum corneum* ile etkileşime girerek deride iritasyon yapabilmektedirler^{16,40}. Uzun süreli ve sabır isteyen bir süreç gerektiren akne tedavisinde ortaya çıkan yan etkiler hasta uyuncunu önemli ölçüde azaltabilmektedir^{41,42}.

Adapalenin topikal tedavisinin etkinliğinin artırılması için, yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; özellikle ilacın derideki hedef bölgelere, kıl foliküllerine, ulaşmasının sağlanması ve yan etkilerinin en aza indirilmesi açısından önem taşımaktadır. Adapalenin literatürde yenilikçi topikal formülasyon yaklaşımları arasında mikroemülsiyonlar⁴³, katı lipit nanopartiküller⁴⁴, nanokapsüller⁴⁵, aside duyarlı polimerik nanotaşıyıcılar¹⁶, polimerik misel nanotaşıyıcıları¹⁷, lipozomlar⁴⁶ bulunmaktadır. Adapalenin PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması ve formülasyon optimizasyonuna yönelik bildiğimiz kadarıyla literatürde kayıtlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Dendritik polimerler, özgün şekilde tasarlanabilen çok fonksiyonlu nano boyutlu taşıyıcı sistemlerdir⁴⁷. Ağaç benzeri⁴⁸ bir yapı olarak tanımlanan dendrimerler, lineer polimerlere göre daha yeni, çok sayıda dala sahip monodispers üç boyutlu polimerik nanopartiküllerdir. Yüzeylerinde bulunan çok sayıda kontrol edilebilir fonksiyonel

gruplar, yüzey gruplarının yapısına bağlı olarak membran lipitleri ile etkileşme ve penetrasyon artırıcı özellik gösterme özellikleri, hidrofobik ilaçların sudaki çözünürlüklerini arttırmaları başlıca avantajlarındandır⁴⁹⁻⁶⁰. Amin yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimerlerin hem epidermal hem de dermal tabakalarda etkin şekilde biriktiği gösterilmiştir ve topikal tedavide potansiyel nanotaşıyıcılar olabilecekleri düşünülmektedir^{55,61}. Dendronlar, dendrimerlerin yapısal komponentleridir. Son yıllarda dendron yapıları kullanılarak amfifilik dendritik blok kopolimerler sentezlenmekte ve dendrimerlerin özellikleri ile lineer blok kopolimerlerin yüksek ilaç yükleme kapasitesi gibi avantaj sunan özellikleri bir molekülde toplanmaktadır. Amfifilik dendron temelli blok kopolimerler ile kendiliğinden oluşan, çekirdek kısmında hidrofobik moleküllerin etkin bir şekilde enkapsüle edilebildiği misel sistemleri hazırlanabilmektedir^{47,62-65}.

Bu doktora tezinin amacı; adapalenin deride kıl foliküllerinde seçici olarak lokalizasyonunun sağlanması ve dozunun düşürülerek yan etkilerinin azaltılması için PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel yapısında dendritik nanotaşıyıcılarının optimizasyonu ve seçilen nanotaşıyıcıların konvansiyonel bir dozaj formu ile kombine edildiği topikal formülasyonların geliştirilmesidir. Bu amaçla; a) adapalen yüklü PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel yapısındaki dendritik nanotaşıyıcıların optimizasyonu ve karakterizasyonu, b) seçilen PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının topikal uygulamaya yönelik jel formülasyonlarının hazırlanması, c) dendritik sulu koloidal nanotaşıyıcılar ve bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarından adapalenin deriden penetrasyonunun ve kıl foliküllerinde birikiminin kantitatif olarak pazarda bulunan ticari orijinal ürün (Differin® Jel) ile karşılaştırılmalı *punch* biyopsi tekniği ile değerlendirilmesi, d) bu nanotaşıyıcıların derideki penetrasyon derinliğinin ve kıl foliküllerindeki birikimin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi e) adapalenin dendron temelli yapılara kovalan bağlı bulunduğu konjugatlar (PDC-ADA) ile misel formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu, f) PDC-ADA yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ile adapalenin penetrasyonunun ve kıl foliküllerinde birikiminin *punch* biyopsi tekniği ile değerlendirilmesi, g) PDC-ADA yapısı ve PDC-ADA yapısından serbestleşen adapalenin *stratum corneum* ve canlı *epidermis/dermis*'teki lokalizasyonunun bantla soyma tekniği kullanılarak incelenmesi planlanmıştır. Böylece, akne tedavisine yönelik, adapalenin seçici olarak derideki hedef bölge olarak kabul edilen kıl foliküllerinde lokalizasyonu ile tedavi etkinliğinin iyileştirileceği yenilikçi formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Özellikleri ve İlaçların Deriden Geçiş Hakkında Genel Bilgiler

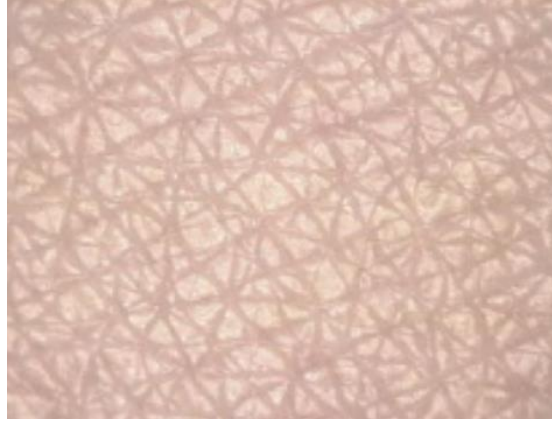
2.1.1. Yapısı ve Fonksiyonları

Deri, doğal bir fiziksel bariyer sağlama özelliği ile yabancı maddelerin organizmaya girişini ve aynı zamanda endojen su ve ısı kaybını önleyen, yaklaşık 1,8 m² yüzey alanı ile vücudun en büyük organıdır^{66,67}. Toplam yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Deri, mukozal epitel bariyerler gibi doğal bağışıklık sisteminin bir parçasını oluşturur⁶⁸.

İnsan derisi, deri yüzeyinde bir asit mantoya (pH 4,2-5,6) sahiptir. Anatomik bölge, cinsiyet, ter, sebum içeriği ve hidrasyon gibi faktörler derinin pH'sını etkiler. *Stratum corneum* (SC) tabakası içinde keskin bir pH gradienti olduğu, bu ölü tabakanın hemen altındaki canlı *epidermis*'in üst katmanlarında pH değerinin nötrale yaklaştığı tespit edilmiştir^{69,70}.

Derinin fiziksel bariyer özelliği, özellikle derinin en dış tabakası olan *stratum corneum* tarafından sağlanır⁷¹. *Stratum corneum* bariyeri korneosit hücreleri ve hücreler arası lipidlerin mükemmel şekilde organizasyonu sonucu oluşur. *Stratum corneum*'un altındaki tabakalarda yer alan epidermis hücreleri arasındaki sıkı bağlantı noktaları da bariyere destek verir⁷². Deride kimyasal ve biyokimyasal bariyeri ise antioksidanlar, enflamatuar mediyatörler, UV absorbe eden moleküller ve ksenobiotik metabolize edici enzimler sağlar^{68,73}.

Bütünlüğü bozulmamış deri yüzeyinde, deride mikro-kabartma olarak tanımlanabilen kesişen çizgilerin varlığına bağlı olarak karakteristik bir desen mevcuttur. Bu desenlere dermatoglifler adı verilir. *Sulcus cutis* veya hiyeroglif desenler olarak da adlandırılan bu ince kırışıklıklar, birbirini kesen kareler, dikdörtgenler, üçgenler ve yamuklar gibi çeşitli şekiller oluşturmaktadır. Deri yüzeyi, ayrıca ter bezleri ve kıl folikülleri açıklıklarının meydana getirdiği gözeneklerle kaplıdır. Bu gözenekler ve deri yüzey çizgileri vücudun her bölgesine kendine özgü ve karakteristik bir görünüm verir^{74,75}. Önkolda derinin mikroskop görüntüsü Şekil 2.1'de gösterilmektedir⁷⁶.

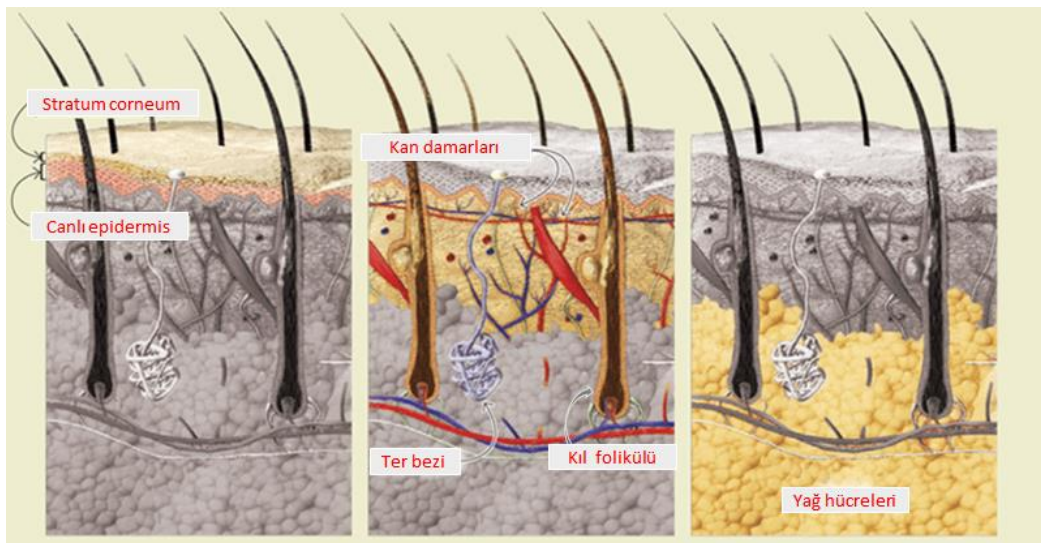


Şekil 2-1: Önkolda deriye özgü “hiyeroglif desenler”in mikroskop görüntüsü

2.1.2. Derinin Tabakaları

Deri morfolojisi gereği; *epidermis*, *dermis* ve *hipodermis* olmak üzere üç ana tabakadan oluşmaktadır⁷⁷. Vücutta bulunduğu bölgeye bağlı olarak, insan derisinin toplam kalınlığı 1-4 mm arasında değişir, yaşla birlikte azalır^{66,78}.

Epidermis, *dermis* ve en alttaki yağ dokusunun (*hipodermis*) kalınlığı ile kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerinin deri dokusundaki değişen dağılımları insan derisinin fizyolojik özelliklerini ve ilaçların perkütan penetrasyonunu etkiler⁷⁹. Derinin tabakaları Şekil 2.2’de gösterilmektedir⁸⁰.

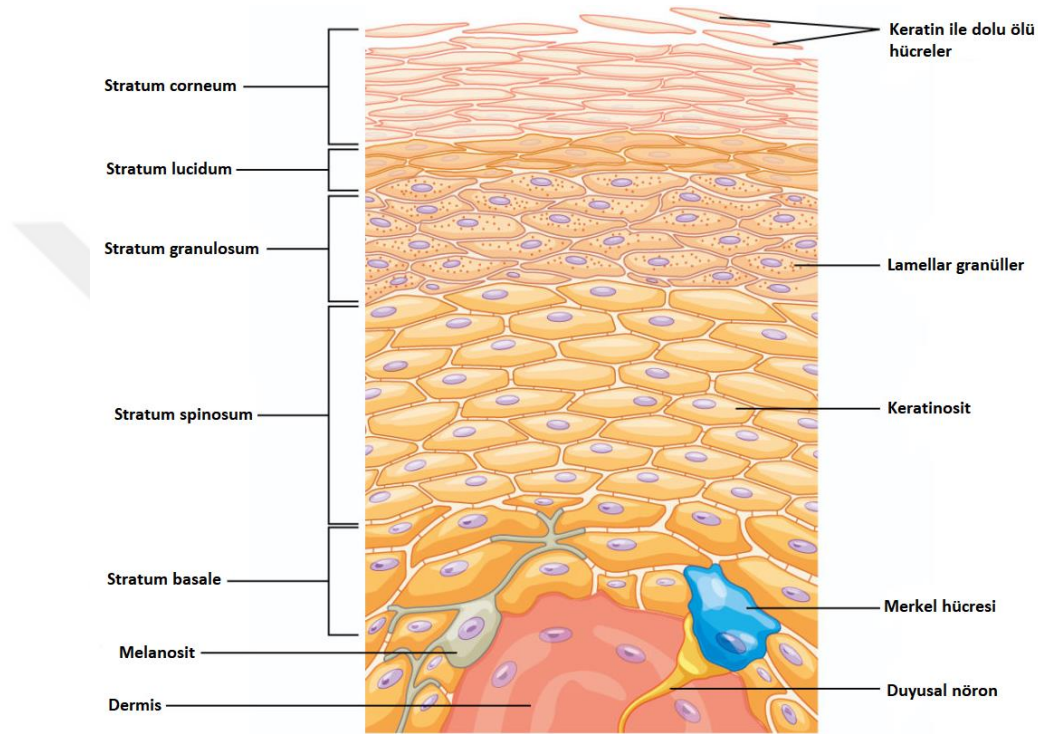


Şekil 2-2: Derinin morfolojik yapısı

(Soldan sağa doğru sırasıyla; epidermis, dermis ve hipodermis tabakaları)

2.1.2.1. Epidermis

Epidermis 0,06-0,8 mm kalınlığında; *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* ve *stratum basale* (*stratum germinativum*) olarak isimlendirilen tabakalardan ibarettir. *Epidermis*'in yapısı Şekil 2.3'te gösterilmektedir⁸¹.

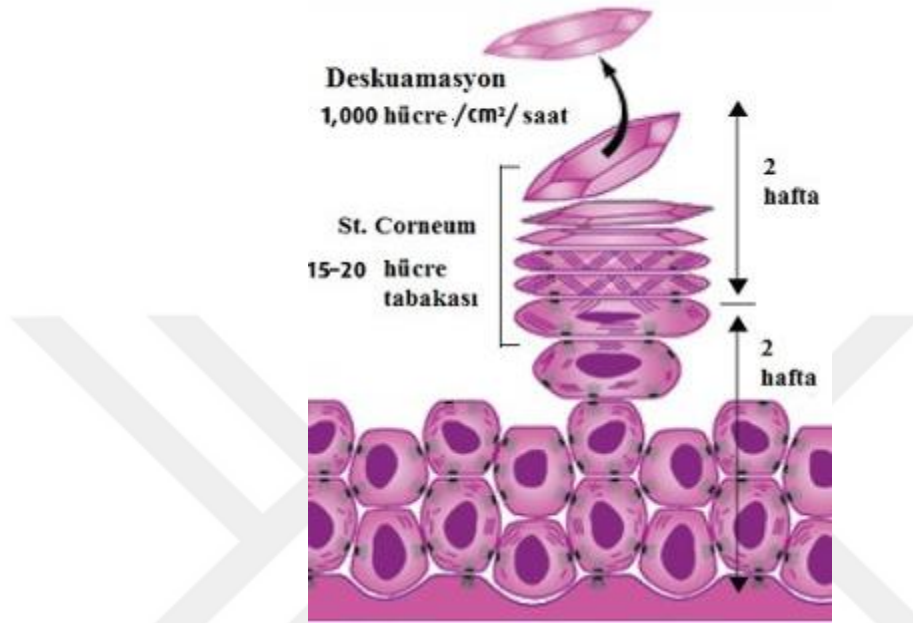


Şekil 2-3: *Epidermis*'in yapısı

İnsan epidermisinin başıca hücreleri keratinositlerdir. Ayrıca, bu tabakada Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri, lenfositler ve melanositler de bulunur⁷².

Epidermis kendi kendini sürekli yenileyen bir dokudur. Deskuamasyon olarak adlandırılan *stratum corneum* hücrelerinin deri yüzeyinden dökülmesi ve *epidermis* 'te daha alttaki tabakalarda gerçekleşen hücre büyümesi devamlılık gösterir⁸². *Stratum basale* tabakasından başlayan *stratum granulosum*'a doğru gerçekleşen hücre göçü ve farklılaşması süreci, iki hafta kadar sürerken *stratum corneum*'a geçiş ve deskuamasyon ile sonlanma sürecinin toplamda dört haftayı bulduğu düşünülmektedir. Bir başka deyiş ile bazal hücre tabakasından (*stratum basale*) başlayan yolculuğun, korneosit deskuamasyonunun son noktasına kadar geçen sürenin genel olarak yaklaşık dört hafta

sürdüğü, *stratum corneum*'un yenilenme süresinin ise iki hafta kadar olduğu tahmin edilmektedir^{79,83-85}. *Epidermis*'in yenilenme süreci temsili olarak Şekil 2.4'te gösterilmektedir⁸⁶.

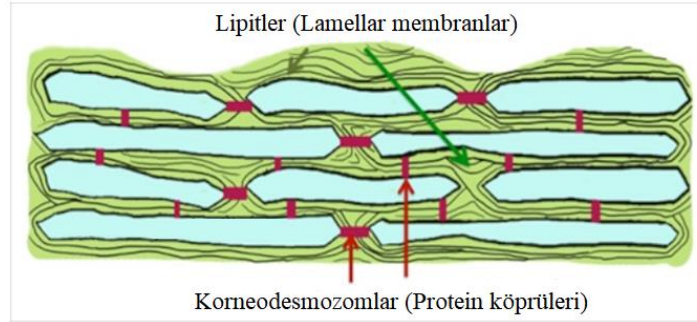


Şekil 2-4: *Stratum basale*'dan başlayan ve *stratum corneum* yüzeyinden deskuamasyonla sonlanan epidermisin yenilenme süreci

Stratum corneum, derinin canlı olmayan en üst tabakasıdır. Moleküllerin deriden geçişi için en önemli deri bariyeridir^{71,72}. *Stratum corneum* kalınlığı toplam deri kalınlığının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır⁸⁷. 15-20 kat yassılaştırmış ölü hücrelerden oluşur. *Stratum corneum*'u oluşturan korneosit adı verilen bu hücrelerin çekirdek ve organelleri lizozomal hidrolitik enzimler tarafından parçalanmıştır⁸⁸. Keratinositlerin farklılaşması ile oluşan, çekirdeklerini kaybetmiş ve yassılaştırmış korneositler ürettikleri protein ve lipidlerle *stratum corenum*'un su geçirmez bariyerini oluşturur⁷².

Stratum corneum'ın yapısı morfolojik açıdan “tuğlalar”a benzetilen, sitoplazması büyük ölçüde lifli protein (keratin) ağlarından oluşan korneosit hücrelerinden ve korneositler arasındaki, “harç” görevi gören, ağırlıklı olarak nötral lipidlerden oluşan hücreler arası matriksten ibarettir. Başka bir ifade ile *stratum corenum* tabakasında korneositler çift tabakalardan oluşan lipid matriksin içinde gömülü şekilde bulunmaktadır⁸⁸. Tuğla ve harç (*brick and mortar*) modeli ilk kez Elias tarafından

tanımlanmıştır⁸⁹. Hücreler arası bu lipidik yapı seramitler, kolesterol, kolesterol esterleri ve serbest yağ asitleri içermektedir⁹⁰. *Stratum corneum*'un “tuğla ve harç” modeli ile tanımlanan yapısı Şekil 2.5'te gösterilmektedir⁹¹.



Şekil 2-5: *Stratum corneum*'un “tuğla ve harç” modeli ile tanımlanan yapısı

Yassı ölü hücreler (tuğlalar) ve bunları bir arada tutan hücreler arası lipitler (harç) bir duvar gibi geçilmesi zor bir bariyer oluşturur ve etken maddelerin deriden geçişini önemli derecede etkiler. Ayrıca, korneositler birbirine korneodesmozomlar ile bağlıdır. Tüm bu özellikleri ile *stratum corneum*, moleküllerin deriden geçişini ve organizmadan su kaybını önleyen etkili bir bariyer görevi görür⁹².

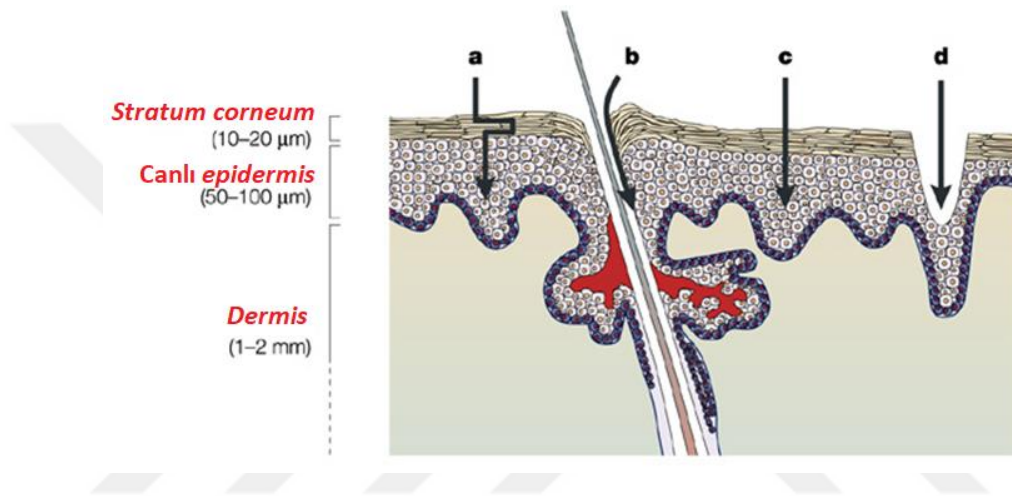
2.1.2.2. Dermis

Dermis tabakası, *corium* olarak da isimlendirilen, sıkıştırılabilir ve elastik yapıda bir dokudur. Yapısal bileşenleri esas olarak; mukopolisakkaritleri içeren yarı jel bir matriks içinde bulunan kolajen lifler ve elastik bağ dokusudur. Yapısındaki kolajen lifler deriye esneklik ve mekanik destek sağlar⁹³. Kuru dermisin yaklaşık %98'i kolajenden oluşur⁹⁴. Kalınlığı 1-2 mm olan *dermis* tabakasında bağ dokusu bileşenlerini üreten fibroblastlar, melanin pigmentini üreten melanositler ve enflamatuvar yanıt oluşumunda rolü olan *mast* hücreleri bulunur. Ayrıca, kan damarları, lenfatik yapılar, duyu sinirleri ile deri ekleri olan kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri de dermiste bulunmaktadır^{92,95}.

2.1.2.3. Hipodermis

Hipodermis ya da subkütan doku kolajen ve elastin lifleri ile *dermis* tabakasına bağlı bulunur. Ağırlıklı olarak adiposit adı verilen yağ hücrelerinden ibaret gevşek bir bağ dokusundan oluşur. Kan damarları ve sinirler deri dokusuna *hipodermis* ile bağlıdır.

olanlar *stratum corneum* tabakasında birikme eğilimi gösterirler. Hidrofilik moleküller için ise *stratum corneum* çok daha geçilmez bir engeldir^{2,87,98,99}. Bununla birlikte *stratum corneum* bariyeri, üzerindeki kıl folikülleri açıklıkları ve ter bezi kanallarının sağladığı porlar ile moleküller için bir yan geçit imkanı da sunar. Moleküllerin *stratum corneum*'dan penetrasyonu için esas olarak üç olası yol bulunmaktadır^{2,95,100}. Moleküllerin *stratum corneum* bariyerini aşmak üzere deriden olası geçiş yolları Şekil 2.7'de gösterilmektedir⁸⁷.



Şekil 2-7: Moleküllerin *stratum corneum* bariyerini aşmak üzere deriden geçiş yollarının temsili gösterimi: a) hücreler arası yol b) transfoliküler yol c) hücre içi yol d) mekanik olarak *stratum corneum*'da açılan yollar (ör. mikroiğne aracılı)

Moleküllerin pasif geçişte kullandığı bu yollar dışında *stratum corneum* bariyerinde mekanik olarak, örneğin mikro iğnelerle mikron boyutunda delikler açılarak geçiş için alternatif yollar oluşturulabilir⁸⁷.

2.1.4.1. Hücreler Arası Yol (İnterselüler/Paraselüler Yol)

Stratum corneum yapısını oluşturan hücreler arası lipidik yapı devamlılığı nedeni ile ilaç molekülleri için önemli bir geçiş yolu sağlamaktadır. Ekstrasellüler lipitler, deri yüzeyinden başlayarak *stratum corneum*'un en derin tabakasına kadar inen tek devamlı yoldur. İlaç moleküllerinin çoğu deri bariyerini aşmak için korneositler arasındaki lipit tabakadan penetre olarak bu hücreleri arası yolu kullanır. Bu yoldan özellikle küçük molekül ağırlıklı ve nötral moleküller daha kolay geçer^{101,102}.

2.1.4.2. Hücre İçi Geçiş Yolu (İntraselüler/Transselüler Yol)

Hücre içi geçiş yolunu kullanan ilaç molekülleri, hem hücreler arası lipid tabakayı hem de ölü keratinosit (korneosit) hücrelerinin yoğun şekilde keratin içeren stoplazmasından geçmek zorundadır. Hem lipofilik hem de hidrofilik ortamları aşmak zorunda olan ilaç molekülleri önemli bir direnç ile karşılaşır². Ancak küçük polar moleküller için bir geçiş yolu olabilir^{103,104}.

2.1.4.3. Yan Geçit Yolu (Transfoliküler Yol)

Yan geçit yolları (*shunt route* veya *appendageal route*) kıl folikülleri, ter kanalları ve yağ bezleri olarak tanımlanır. Yapısal olarak deri dokusunun çok küçük bir oranını oluştursalar da; örneğin insan derisi yüzeyindeki ortalama foliküler açıklıkların alanı, toplam deri yüzeyi alanının yaklaşık olarak sadece %0,1'dir¹⁰⁵, bazı durumlarda kıl foliküllerinin deriye penetrasyon için potansiyel bir yol olabileceği bildirilmektedir¹⁰⁶. Son yıllarda, kıl foliküllerinin foliküler birikim sağlayan nanopartiküler taşıyıcı sistemler ile taşınan ilaç moleküllerinin bu bölgelere hedeflendirilmesinde oldukça önemli bir yolak olabileceği öne sürülmektedir^{2,100,107}.

2.1.5. Deride esteraz aktivitesi

Deri dokularında hem endojen bileşiklerin hem de ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu çok sayıda enzim aktivitesi belirlenmiştir. Özellikle ester ön ilaçlarının deriye uygulanmasında deride var olan esteraz aktivitesinden yararlanılmaktadır. Esterazlar, ilaç metabolizmasında ve ön ilaç aktivasyonunda önemli bir rol oynar. *Epidermis* tabakasında bulunan bazal keratinositlerde, kıl folikülleri ve sebase bezlerde ve az bir miktarda *dermis*'te karboksilesteraz aktivitesi bulunduğu histokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca *stratum corneum*'da da esteraz aktivitesi tespit edilmiştir^{108,109}.

2.2. Deriden Penetrasyonu Etkileyen Faktörler

2.2.1. Derinin Bariyer Özelliğini Etkileyen Faktörler

Yaş, ırk, cinsiyet, anatomik bölge ve kütanöz bozukluklar gibi derinin mekanik bariyer özelliğini etkileyen fizyolojik faktörler moleküllerin deriden penetrasyon kabiliyetlerini etkiler⁹². Derinin mekanik özellikleri esas olarak ölü korneositlerin bulunduğu *stratum corneum* tabakasından kaynaklanır¹¹⁰. İlaç moleküllerinin geçişi için bariyer görevi yapan derinin içerdiği nem oranı, sıcaklığı veya deriye uygulanan

kimyasallar (ör, penetrasyon arttırıcılar) derinin mekanik özelliklerini etkileyerek^{110,111} deriden penetrasyon etkinliğini değiştirebilir.

2.2.1.1. Yaş, Irk, Cinsiyete Bağlı Fizyolojik Özellikler

Genel olarak epidermal kalınlık, özellikle *stratum corneum* tabakasının kalınlığı ile hücreler arası lipid içeriğinin fizyolojik faktörlere bağlı olarak değişmesi⁹² ile deri yüzeyinden uygulanan moleküllerin deriye penetrasyon/permeasyon özelliklerinin değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

2.2.1.2. *Stratum corneum*'un Hidrasyonu

Örneğin, su en etkili ve güvenli kabul edilen penetrasyon arttırıcı maddelerden biridir. *Stratum corneum*'un okluzif koşullarda hidrasyonu ile çoğu ilacın penetrasyonu arttırılabilir. Yine üre gibi nemlendiriciler ile *stratum corneum* tabakasının hidrasyonu arttırılarak hidrofilik ilaçların deriden geçişi arttırılabilir².

2.2.1.3. Anatomik Bölge

Deri yüzeyinin sıcaklığı vücudun farklı bölgelerinde değişiklik gösterir. Örneğin, yüzeysel arterlerin üzerinde derinin sıcaklığı altından yüzeysel venlerin geçtiği deri bölgelerine göre daha yüksektir. Kasların üzerindeki deri bölgelerindeki sıcaklık, kemik veya tendonların üzerindeki bölgelere göre aynı şekilde daha yüksektir. Burun, kulaklar, parmaklar ve ayak parmakları gibi çıkıntılı ve belirgin şekilde kavisli bölgelerde deri sıcaklığı daha düşüktür¹¹². Sıcaklığı fazla olan deri bölgelerinde hücre membran lipidlerinin esnekliği/akıcılığı daha fazla olacağı için deriden geçiş daha fazla olabilir¹¹¹. Sıcaklık farklılığına bağlı olarak hücreler arasındaki lipidlerin de esnekliği/akıcılığının daha fazla olması beklenir.

2.2.1.4. Dermatolojik Hastalıklar

Egzama (dermatit), psoriasis, ihtiyozis ve akne gibi yaygın görülen kütanöz bozukluklarda ve ayrıca impetigo, Herpes simpleks enfeksiyonları ve fungal enfeksiyonlarda derinin bariyer fonksiyonunun zayıflamasına⁹² bağlı olarak moleküllerin deriden penetrasyonunun sağlıklı deriye göre daha fazla olacağı düşünülebilir. Örneğin kronik otoimmün bir hastalık olan psöriyasis, deride kırmızı lezyonlar ve epidermal hiperproliferasiyona bağlı oluşan plaklarla karakterizedir. Psöriyatik deride transepidermal su kaybı (TEWL) ile birlikte elektrolitler¹¹³, steroidler¹¹⁴ ve makromoleküller¹¹⁵ gibi çeşitli bileşiklerin permeasyonunun normal deriye göre artış

gösterdiği bildirilmiştir⁹². Artan TEWL değerleri, derinin, *stratum corneum* tabakasının, bariyer fonksiyonunun azaldığının göstergesidir¹¹⁶.

2.2.2. Moleküle ait Fizikokimyasal Özellikler

Genel olarak ~2 civarında $\log K_{oct}$ ($\log P$) (oktanol (yağ)/su partisyona kat sayısı) değerine ve düşük bir erime noktasına (<200°C) sahip küçük moleküllerin ($M_A < 500$ Da) deriden daha iyi geçtiği bilinmektedir^{117,118}.

Deriden penetrasyonu/permeasyonu etkileyen moleküllere ait fizikokimyasal özellikler ayrıntılı olarak aşağıda açıklanmıştır.

2.2.2.1. Yağ/Su Partisyon Katsayısı

Stratum corneum bariyerini aşmak için moleküllerin ağırlıklı olarak kullandığı yolun hücreler arası lipit tabaka olduğu göz önünde bulundurulduğunda; penetrasyona uğrayan molekülün dolambaçlı bir yol izleyerek, hücre içi geçişte olduğu kadar kuvvetli bir dirençle karşılaşmasa da, bir dizi hidrofilik ve lipofilik bölgelerden geçmesi gerekir. Bu yüzden molekülün yağ-su partisyona özellikleri, deriden penetrasyonu üzerinde önemli derecede rol oynar¹¹⁷. Yağ/su partisyona özellikleri, $\log P$ değeri ile ifade edilir, molekülün lipofilitesi hakkında bilgi verir ve molekülün sudan ziyade yağ ile karışabilme yeteneğinin göstergesi olarak tanımlanmaktadır¹¹⁹. Lipofilik moleküller deriden daha kolay penetre olur. İlaçların deriden pasif yollarla geçişi için ideal kabul edilen yağ/su dağılım kat sayısı aralığı, $1 < \log P < 3$ olarak belirlenmiştir^{117,120}.

2.2.2.2. Molekül Ağırlığı

Genel bir kural olarak, 500 Da'dan küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerin deriden daha kolay penetre olacağı kabul edilir^{99,118,120}. Bu 500 Da sınırı, aslında *stratum corneum*'un lipit matrikste gömülü komşu korneositlerden oluşan özel yapısından kaynaklanır⁹⁹.

2.2.2.3. Çözünürlük/Erime Sıcaklığı

Moleküllerin deriden geçişini etkileyen diğer bir faktör penetre olan molekülün deri lipitlerindeki çözünürlüğüdür^{92,121}. Moleküllerin *stratum corneum*'da hücreler arası lipit tabakasındaki çözünürlüğü deri bariyerinden difüzyonunu etkiler. Lipofilik bileşiklerin hücreler arası yolda çözünürlüğü, buna bağlı olarak da deriden geçiş hızı daha fazladır. Molekülün *stratum corneum*'un hücreler arası bölgedeki çözünürlüğünü belirleyen sahip olduğu erime noktasıdır⁹².

Düşük erime sıcaklığı, genel olarak moleküllerin iyi çözünürlük özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Erime sıcaklığı ne kadar düşükse çözünürlüğün o kadar iyi olacağı belirtilmektedir¹¹⁷.

2.2.2.4. Konsantrasyon

Moleküllerin deriden penetrasyon/permeasyon etkinliği tek başına küçük ve lipofilik olmalarına bağlı değildir. Aynı zamanda uygulandıkları taşıyıcı ortamında çözünen moleküllerin konsantrasyonu da deriden geçişi etkiler. Molekülün taşıyıcı ortamındaki konsantrasyonu ne kadar yüksek ise deriden geçiş hızı o kadar yüksektir¹¹⁷. Bu noktada taşıyıcı ortamında bulunabileceği en yüksek konsantrasyon, molekülün o ortamdaki çözünürlüğüne bağlıdır.

2.2.2.5. İyonizasyon

Moleküller iyonize halde değilken deriden geçiş oranları daha yüksektir. Çünkü iyonize olmadıkları formda lipit tabakalarda ve membranlarda dağılımları daha fazla olur¹¹⁰. Moleküllerin iyonizasyonu sahip oldukları pKa değerlerine ve bulundukları ortamın pH'sına bağlıdır^{122,123}. Bununla birlikte örneğin, sulu çözelti formunda uygulanacak ilaçlar için iyonizasyonun artmasıyla deriye partisionun azalmasından ziyade çözünürlüğün artacağı; bu yüzden özellikle transdermal bir ilaç için iyonize olmadığı formundan ise tuz formunu seçmenin daha etkili olacağı da bildirilmiştir¹¹⁷. Her halükarda molekül üzerindeki yükün deriden penetrasyonu etkileyeceği ifade edilebilir. Elektriksel yükün deriden geçiş ile ilişkili olduğu literatürde gösterilmiştir¹²⁴.

Lipofilik doğası gereği *stratum corneum* yüklü moleküllere, yani iyonlara karşı geçilmesi zor bir bariyer özelliği gösterir. Bu yüzden genel olarak iyonların *stratum corneum*'dan geçişi zordur. Fakat yüklü hidrofilik moleküllerin, yan geçit yollarından geçebileceğini gösteren çalışmalar vardır⁹⁹. *Stratum corneum*'un taşıdığı net negatif yükten dolayı pozitif yüklü moleküllerin deriden penetrasyonunun genellikle negatif yüklü moleküllerden daha hızlı olduğu, *stratum corneum*'un katyon seçici olduğu da ifade edilmektedir⁹⁹.

2.2.2.6. Hidrojen Bağı Yapan Grup Sayısı

Molekül üzerindeki fonksiyonel gruplar da önemlidir. Molekül yapısındaki H bağı yapan grup sayısı (*hydrogen bonding groups*) molekülün deriden penetrasyonunu

etkiler. Genel olarak bu grupların sayısı arttıkça molekülün hidrofilik özelliği artacağı için log P değerinin düşmesine bağlı deriden geçişin azalacağı ifade edilmektedir¹¹⁷.

2.2.3. Formülasyona ait Özellikler

Deriden ilaç moleküllerinin geçişi için öncelikle uygulandıkları sıvağdan/taşıyıcı ortamdan salınması gerekir. Henüz deri yüzeyinde iken, moleküle ait pKa değeri, formülasyonun pH'sı, bunlara bağlı olarak molekülün ortamdaki iyonizasyon derecesi ve formülasyonda kullanılan herhangi bir penetrasyon arttırıcı madde *stratum corneum*'a partasyonu ve deriden geçişi etkiler¹¹⁰.

Deri yüzeyinden ilaçların perkütan absorpsiyonu temel olarak üç aşamalı bir süreci kapsar. İlk aşaması, molekülün *stratum corneum* tabakasındaki partasyonu yani dağılımıdır. İlaç moleküllerinin taşıyıcı ortamından *stratum corneum* tabakasına geçişini ifade eder. Bu aşamada *stratum corneum*'a geçişi sınırlayan faktör penetrantın *stratum corneum*'a oranla taşıyıcı ortamındaki termodinamik aktivitesidir. Termodinamik aktivite “fugasite” ya da moleküllerin bulundukları ortamdan ayrılma isteği olarak da tanımlanmaktadır. İkinci aşama termodinamik gradient ile penetrantın *stratum corneum*'dan difüzyonu, son aşama ise penetrantın *stratum corneum*'dan alttaki dokulara partasyonudur.

Termodinamik aktivite kavramı üzerinde durmak gerekirse; sulu bir taşıyıcı içinde çözündürülmüş lipofilik bir molekülün, *stratum corneum*'un lipofilik ortamı ile karşılaştığında hidrofilik bir moleküle göre daha büyük bir fugasite göstermesi ve termodinamik aktivitesinin daha yüksek olması beklenir. Bir taşıyıcı ortamında çözündürülen molekülün gösterebileceği en yüksek termodinamik aktivite, yani molekülün geçişi için itici güç, ortamdaki doymuluk konsantrasyonu ile sağlanır. İdeal koşullar altında, bir molekülün doymuluk konsantrasyonlarında bulunduğu farklı taşıyıcı ortamlarında termodinamik aktivitesinin aynı olduğu belirtilmektedir¹²⁵.

Bu noktada, örneğin su bazlı bir taşıyıcı ortamında uygulanan ve bu ortamda çözünürlüğü az olan lipofilik bir bileşik sıvağ ortamından *stratum corneum* tabakasına kolayca dağılabilir, fakat taşıyıcı ortamında hızla tükenmesine bağlı olarak termodinamik aktivitesi düşeceği için geçiş hızı da azalabilir. Bu sebeple deriden geçiş hızının arttırılması için moleküllerin lipit çözünürlüğünün yanında taşıyıcı ortamında da uygun çözünürlüğe sahip olması, bu şekilde yüksek donör konsantrasyonunun sağlanması önemlidir⁹².

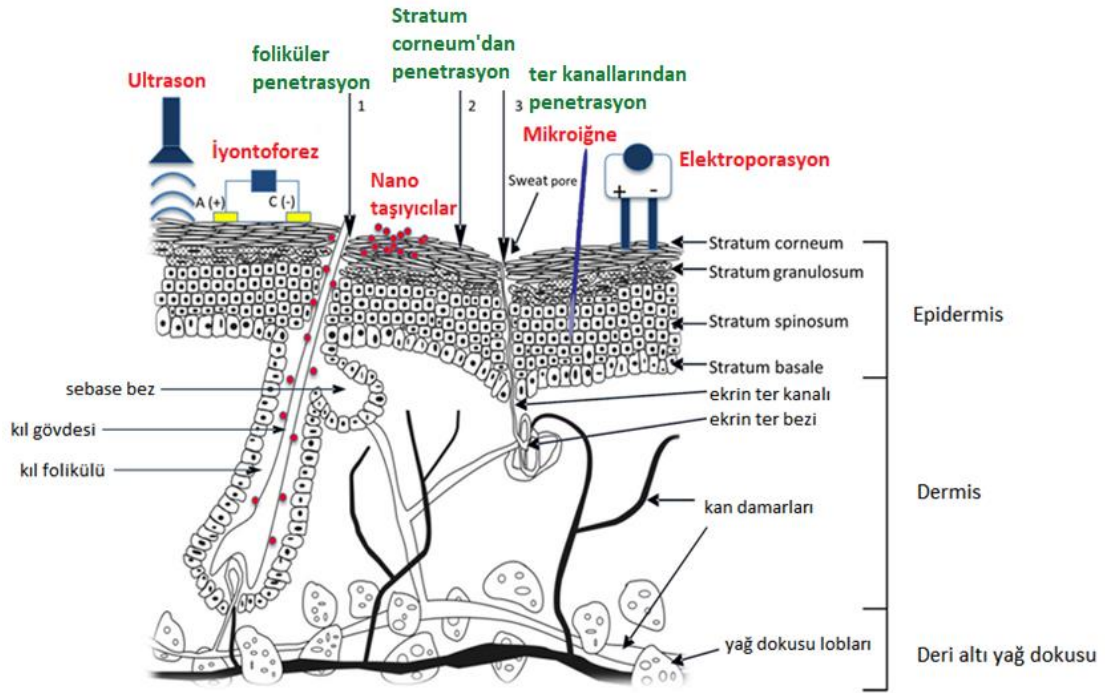
2.3. Deriden Geçişi Arttırmaya Yönelik Yaklaşımlar

Derinin geçirgenlik bariyerini (*permeability barrier*) aşmaya ve ilaçların deriden penetrasyon/permeasyonunu arttırmaya yönelik kimyasal, fiziksel, fizikokimyasal yöntemlerin kullanıldığı birtakım yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemler tek başına kullanılabileceği gibi bir arada da kullanılabilmektedir^{126,127}.

Kimyasal yöntemlerle penetrasyonun arttırılmasında çeşitli penetrasyon arttırıcılar (su, etanol, üre ve türevleri, izopropil miristat, sodyum lauril sülfat gibi çeşitli yüzey etkin maddeler, azon, dimetil sülfoksit, terpenler, propilen glikol, dietilen glikol monoetil eter, oleik asit, laurik asit, kaprik asit, monoolein vb.), ön ilaç stratejisi, süper doygun (*supersaturated*) sistemler ve yeni ilaç taşıyıcı sistemlerden faydalandığı görülmektedir^{126,127}. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlere veziküler taşıyıcı sistemlerden lipozomlar, niozomlar ve elastik veziküler sistemler (etozom, transferzom, transetazom, invazom vb.); lipid içerikli nanopartiküllerden katı lipid nanopartiküller, nanoyapılı lipid taşıyıcılar, kübozomlar; ayrıca nanokapsüller, nanoküreler, dendrimerler, miseller, nanoemülsiyonlar, mikroemülsiyon, nanosüspansiyonlar, fullerenler, kuantum noktaları örnek verilebilir¹²⁸⁻¹³⁴.

Fiziksel yöntemlerle penetrasyonun arttırılması *stratum corneum* tabakasının mekanik ya da elektrokimyasal yöntemlerle modifiye edilmesi ile sağlanır. Örnek olarak deriye çok kısa süreli yüksek şiddette elektrik akımı uygulanması ile geçici olarak derinin delindiği elektroporasyon^{110,135}, düşük miktarda ($<0,5 \text{ mA/cm}^2$) elektriksel akım uygulaması ile benzer yüklerin birbirini itme, farklı yüklerin birbirini çekme prensibinden yararlanılarak ilaç iyonlarının deriden içeriye doğru hızlı ve kontrollü olarak itildiği iyontoforez^{136,137}, ultrasonik ses dalgalarının uygulandığı sonoforez/fonoforez^{138,139}, manyetik alan uygulamasının yapıldığı magnetoforez^{140,149}; *stratum corenum* bariyerinin mekanik olarak bertaraf edildiği mikro iğne, dermabrazyon, termal ablasyon^{141,142}, radyo dalgaları kullanılarak yapılan radyofrekans ablasyon^{143,153}, basınçlı gaz kullanarak partiküllerin hızla deriden içeriye itildiği jet enjeksiyon (Powderject®)^{144,145} uygulamaları verilebilir.

İlaçların deriden geçişini arttırmaya yönelik sıklıkla başvurulanan yöntemlerden bazıları Şekil 2.8’de gösterilmektedir¹²⁶.



Şekil 2-8: İlaçların deriden penetrasyonunu arttırmaya yönelik bazı yöntemler ve deriden penetrasyon yolları

2.4. Nanotaşıyıcıların Deriye Uygulanması

Günümüzde nanotaşıyıcılar üzerine araştırmalar hastalıkların teşhisi, ilaçların hedeflendirilmesi, gen taşınması ve aşıların geliştirilmesine yönelik pek çok farklı biyomedikal uygulama alanında yoğunlaşmıştır. Nanotaşıyıcıların sağlayacağı avantajlar, uzatılmış ve kontrollü ilaç salımı, hızla degradasyona uğrayan bileşiklerin stabilite problemlerinin çözülmesi, artmış permeabilite ve retansiyon etkisi (EPR) ile tümör dokusunda sağlanan yüksek ilaç konsantrasyonu, taşıyıcı yüzeyine antikor ve peptit konjugasyonu ile hücre ve dokuya spesifik hedeflendirme ve ilaç-taşıyıcı kompleksleri ile genlerin hücre içine taşınması sayılabilmektedir¹⁴⁶.

1,8 m² yüzey alanı ile insan vücudunun en büyük organı olarak kabul edilen deri, dermatolojik hastalıkların topikal tedavisinde ilaçlar için doğrudan hedef bölgesidir. Aynı zamanda sistemik etki beklenen çeşitli hastalıkların tedavisinde de alternatif bir uygulama yoludur. Topikal tedavinin etkinliği aktif bileşenin deriden penetrasyonuna, derinin hedef bölgesinde etkili konsantrasyona ulaşmasına bağlıdır. Topikal olarak uygulanan moleküllerin deriden penetre olabilmesi için derinin en dış tabakasını oluşturan ve deriye mükemmel bir bariyer özelliği kazandıran *stratum corneum* engelini aşması

gerekmektedir. Bu durum ilaçların deriden penetrasyonunu arttırmaya yönelik birtakım yaklaşımların geliştirilmesini sağlamıştır. Nanotaşıyıcı sistemler vasıtasıyla deri bariyerini aşarak moleküllerin derinin belirli tabakalarına hedeflendirilmesi bu yaklaşımlar arasında yer almaktadır^{3,4}.

Dermal hedeflendirme üzerine son yıllarda yapılan çok sayıda araştırmada nanotaşıyıcı sistemlerin konvansiyonel formülasyonlara olan üstünlüklerinden bahsedilmektedir. Nanotaşıyıcılarla hazırlanan yenilikçi topikal dozaj formlarının geliştirilmesi; ilaçların derinin belirli bölgelerine hedeflendirilmesi, kütanöz penetrasyonunun iyileştirilerek topikal biyoyararlanımlarının ve tedavi etkinliğinin artırılması, derinin hedef bölgesinde kalış sürelerinin uzatılması, kimyasal ve fiziksel koruma ile degradasyonun önlenerek bileşiklerin stabilitelerinin artırılması, uzatılmış ve kontrollü salım ile toksik ilaçların yan etkilerinin azaltılması, olası yan etkilerin azaltılarak hasta uyuncunun sağlanması açısından umut vaatetmektedir^{146,147}.

Nanotaşıyıcı teknolojisinin ticari boyutta ilaç sanayinde uygulamaya geçirilmesi için çok çaba harcanmaktadır. Yapılan yoğun araştırmalar arasından, patentlenmiş misel nanopartikül teknolojisi ile estradiol hemihidratın enkapsülasyonuna dayanan bir topikal emülsiyon dozaj formu olarak Estrasorb™ 2003 yılında menopoz ile ilişkili orta-şiddetli vazomotor semptomların giderilmesine yönelik östrojen replasman tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Pazara sunulan nanopartikül temelli ilaçlar arasında Estrasorb™, transdermal amaçlı onaylanan ilk nanotaşıyıcı temelli üründür^{148,149}. Estrasorb™'da kullanılan formülasyon bileşenleri (soya fasulyesi yağı, polisorbat 80, etanol, su) GRAS (*generally recognized as safe*) listesindedir. Misel nanopartiküler emülsiyon teknolojisi ile; enkapsüle edilen hormonun çözünürlüğünün artırılması, deride iritasyona sebep olmayan bir formülasyon ile hasta uyuncunun kolaylaştırılması amaçlanmıştır¹⁴⁸.

Polimerik nanopartiküller (nanoküre ve nanokapsüller), mikroemülsiyonlar nanoemülsiyonlar, lipozomlar, transferzomlar, katı lipit nanopartiküller, polimerik miseller gibi nano boyutlu taşıyıcılar ilaçların deriden penetrasyonunu arttırmak için yaygın şekilde kullanılan topikal formülasyonlardır^{149,150}.

Topikal olarak uygulanan polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında, kitozan gibi doğal polimerler; poli (laktit-ko-glikolit) kopolimerleri (PLGA) ve poli (ε-kaprolakton) gibi biyolojik olarak parçalanabilen sentetik alifatik

polyesterler ya da poliakrilatlar gibi degrade olmayan sentetik polimerler kullanılmaktadır¹⁴⁶. Literatürde doğal kaynaklı polimerlerle hazırlanan polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere; kırışıklık tedavisine yönelik retinol enkapsüle edilen kitozan nanopartikülleri¹⁵¹, topikal gen terapisi için plazmit DNA yüklü kitosan-tripolifosfat (TPP) nanopartikülleri¹⁵², topikal antiviral tedaviye yönelik asiklovir içeren kitozan-TPP nanopartikülleri¹⁵³, topikal antioksidan olarak kuersetin yüklü lesitin-kitosan nanopartikülleri¹⁵⁴ örnek verilebilir. Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik alifatik polyesterler ile hazırlanan polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere; saç dökülmesini önleyici ve saç gelişimini destekleyici bir formülasyon olarak hazırlanan hinokitiol, glisiretinik asit ve 6-benzilaminopurin yüklü¹⁵⁵ ve topikal uygulanan lipofilik ilaçların derinin derin tabakalarına hedeflendirmesine yönelik model seçilen siklosporin A yüklü PLGA nanopartikülleri¹⁵⁶, kontakt dermatit ve psoriasis tedavisi için derinin derin tabakalarına penetrasyonun sağlanması amacıyla spantit II ve ketoprofen yüklü PLGA-kitozan nanopartikülleri¹⁵⁷, güneş koruyucu olarak oktil metoksisinamat içeren poli (ϵ -kaprolakton) nanopartikülleri¹⁵⁸ ve saç dökülmesine karşı minoksidil içeren poli (ϵ -kaprolakton)-blok PEG nanopartikülleri¹³⁰ örnek verilebilir. Biyoparçalanmayan sentetik polimerlerle hazırlanan polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere ise; yara iyileşmesinde kullanılmak üzere tasarlanan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı antibakteriyel etkinliği bulunan β -laktam türevi (*N-thiolated β -lactam*) antibiyotik yüklü poliakrilat nanopartikülleri¹⁵⁹ ve yara örtüsü olarak kullanıma yönelik bakterisit etkili siprofloksasin yüklü poliüretan-dekstran nano lifleri¹⁶⁰ örnek verilebilir.

Ayrıca, tirozin-temelli nanoküreler (TyroSpheres™) doğal olarak oluşan metabolitlerden sentezlenen polimerlerle hazırlanan biyoparçalanabilen yarı sentetik nanopartiküler sistemlere örnek olarak gösterilebilir. TyroSpheres™ olarak adlandırılan ABA tipi PEG5K-*b*-oligo(desaminotirosil-tirozin oktil ester suberat)-*b*-PEG5K triblok kopolimerlerle hazırlanan sistemler kendiliğinden oluşan nanoküreler olarak tanımlanmışlardır¹⁶¹. TyroSpheres™'lere model bileşik olarak Nil Kırmızısı ve diklofenak sodyum¹⁶², ayrıca psöriasis tedavisine yönelik paklitaksel¹⁶³ ve siklosporin A¹⁵⁶ yüklenmiş ve bu taşıyıcı sistemlerin lipofilik ilaçların derinin derin tabakalarına penetrasyonunu kolaylaştırdıkları sonucuna varılmıştır.

İlaçların deriden penetrasyonunu arttırmaya yönelik yapılan yenilikçi topikal formülasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan nano boyutlu taşıyıcılar ve bu taşıyıcılara yüklenen bazı ilaçlar Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: Deriye uygulanmak üzere hazırlanan yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler ve bu sistemlere yüklenen bazı ilaçlar

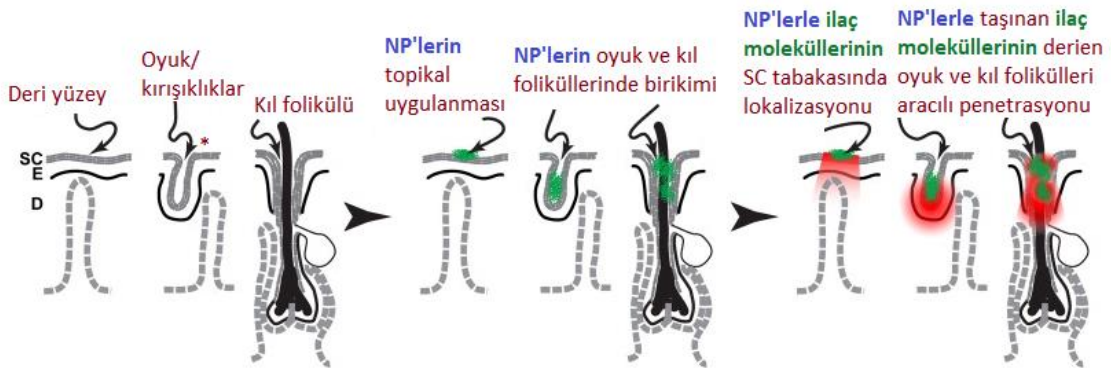
Nanotaşıyıcı sistem	Yüklenen ilaçlara örnekler
Mikroemülsiyon ^{164,165}	8-metoksalen, apomorfine HCl, NSAİ etkili ilaçlar, difenhidramin, felodipin, Prostaglandin E1, timolol, metil nikotinat, hidrokortizon, lidokain arbutin, kojik asit gibi farklı farmakolojik gruplardan çeşitli ilaçlar
Nanoemülsiyon ¹⁶⁶	gama-tokoferol, kafein, plazmid DNA, aspirin, metil salisilat, insülin, nimesulit
Lipozom ^{150,167-169}	melatonin, indinavir, metotreksat, amfoterisin B, ketoprofen, estradiol, klindamin hidroklorür, lignokain
Transferzom ^{150,170}	diklofenak, insülin, tetanoz toksoidi, kortikosteroidler, süperoksit dismutaz, DNA, triamsinolon-asetonid, ketoprofen, interlökin-2, ketotifen fumarat
Etazom ¹⁷¹⁻¹⁷⁶	metotreksat, takrolimus, 5-aminolevulinik asit (ALA) ketoprofen, takrolimus, minoksidil, klotrimazol, testosteron
Dendrimer ^{53-55,57,59,177-180}	tamsulosin, indometazin, ketoprofen, klotrimazol, ketokonazol, diflunisal, 5-florourasil, 8-metoksipsoralen, ditranol
Katı lipid nanopartiküller ^{181,182}	Podofilotoksin, retinoik asit, prednikarbat, triptolit, koenzim Q10, retinol, klobetasol propiyonat
Polimerik miseller ^{12,13,183-188}	siklosporin A, takrolimus, ketokonazol, ekonazol, koenzim Q10, benzoil peroksit, lidokain

2.5. Nanotaşıyıcıların Deride Potansiyel Birikim Bölgeleri

Nanotaşıyıcılar deriye üç farklı yoldan penetre olabilir: hücreler arası yol (keratinositler arasındaki hücreler arası lipid matriks), hücre içi yol (keratinositlerden) ya da yan geçit yolları (kıl folikülleri, ter kanalları, sebace bezler)^{189,190}. Kıl folikülleri ve ter kanalları, *stratum corneum* tabakasının gösterdiği sürekliliği bozarak penetre olacak moleküller/partiküller için deriye girişte alternatif bir yol sağlamaları¹⁹¹ sebebiyle

özellikle partiküler sistemler için önemlidir. Kıl foliküllerine odaklanarak yapılan pek çok çalışma göz önünde bulundurulduğunda, ilaçların veya partiküllerin deriden penetrasyonu için yan geçit yolağı deri yüzeyinin çok küçük bir alanını kaplıyor olsa bile, *stratum corneum*'dan penetrasyona alternatif bir yol olarak görülmesi gerçekçi kabul edilmektedir¹⁰. Bu yönde yapılan çalışmalarda nanopartiküler sistemlerin kıl foliküllerine hedeflendirilebileceği gösterilmiştir⁹⁻¹⁷. Kıl folikülleri topikal olarak uygulanan ilaçlar için rezervuar görevi görmesi sebebiyle umut vadetmektedir⁷.

Nanotaşıyıcıların topikal uygulama sonrası deride hedeflendirilebilecekleri potansiyel birikim bölgeleri olarak kıl folikülleri ile birlikte *stratum corneum* yüzeyi, çatlak/oyuk/korneosit kümeleri arası (*intercluster*) bölgelere de işaret edilmektedir^{10,184}. Nanopartiküllerin derideki birikimleri için potansiyel hedef bölgeler Şekil 2.9'da gösterilmektedir¹⁰.



Şekil 2-9: Nanopartiküllerin birikimi için deride potansiyel hedef bölgeler

Nanopartiküllerin deriden penetrasyonu hakkında devam eden tartışmalı durum derinin yapısı göz önünde bulundurularak kapsamlı bir şekilde ele alınmış ve partiküllerin penetrasyon mekanizmaları ve deri ile etkileşimlerinin aydınlatılmasına yönelik daha geniş çaplı multidisipliner yaklaşımlara ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır¹⁹².

Nanotaşıyıcı sistemler ile yapılan çalışmalar kapsamında, örneğin polimerik misellerle yapılan çalışmaların birinde MPEG-dihexPLA diblok kopolimeri ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarının *stratum corenum* bariyerini aşmadığı¹³; başka bir çalışmada azol grubu antifungallerin deriden penetrasyonunun MPEG-hexPLA diblok kopolimeri ile hazırlanan polimerik misellerle foliküler birikime bağlı olarak arttırıldığı

ve misellerin kıl foliküllerine fiziksel olarak bozulmadan ulaştığı konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) analizleri ile gösterilmiştir¹⁸⁵. Başka bir çalışmada ise MPEG-dihexPLA diblok kopolimeri ile hazırlanan polimerik misellerin geçiş yolu olarak korneositler ve korneosit kümeleri (*intercluster*) arasındaki bölgeleri tercih ettiği ve bu bölgelerde birikim gösterdiği ileri sürülmüştür¹⁸⁴.

20 ve 200 nm boyutlarında floresan özelliği olan polistiren nanopartiküllerinin uygulama sonrası derideki dağılımları CLSM ile incelendiğinde deri yüzeyinden alınan görüntülerde polistiren nanopartiküllerin özellikle foliküler açıklıklarda biriktiği, bu dağılımın zamana bağlı bir şekilde arttığı, foliküler lokalizasyon açısından daha küçük boyutlu partiküllerin avantajlı olduğu, ayrıca foliküler penetrasyonun yanı sıra nanopartiküllerin derideki çatlaklarda (*furrows*) belirgin derecede lokalize olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte kesit görüntülerinde, polimerik taşıyıcıların alternatif olarak bu folikül içermeyen bölgelerden (*furrows*) daha derine penetre olamadığı, *stratum corneum* engelini aşamadığı gösterilmiştir¹⁹³.

Topikal uygulamayı takiben fluoresein metakrilat ile kovalan bağlı bulunan polistiren ve poli (metil metakrilat) nanopartikülleri ile birlikte bu partiküllere lipofilik bir model aktif bileşen olarak yüklenen Nil Kırmızısının deri yüzeyinde ve deri içindeki dağılımını değerlendirmek üzere yapılan başka bir çalışmada, ortalama boyutları 100 nm'nin altında olan nanopartiküllerin deride çatlaklarda (*furrows*) ve kıl foliküllerinde lokalize olduğunu; Nil Kırmızısının deri yüzeyinde kısmen nanopartiküller ile kaldığını, fakat bir kısmının bir miktar salınarak *stratum corneum*'un daha derin katmanlarına penetre olduğu, özetle polimerik nanopartiküllerin *stratum corneum*'un yüzeyel katmanlarından öteye penetre olamadığı, kıl foliküllerine afinite gösterdiği ve model aktif bileşiği deriye saldırdığı sonucuna varılmıştır¹⁹⁴.

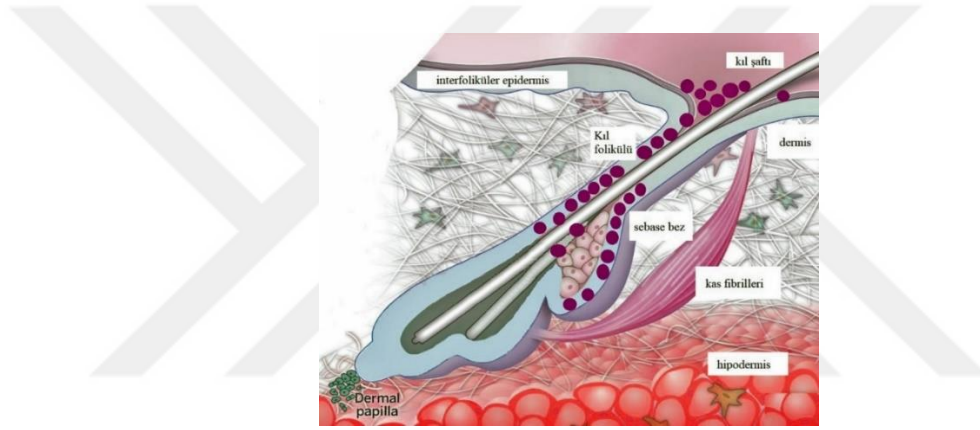
2.6. Nanotaşıyıcılar ile Foliküler Hedeflendirme/Transfoliküler Penetrasyon

Nano boyutlu yapıların deride kıl foliküllerinde biriktiğini ve ilaçların nano boyutlu taşıyıcılar ile kıl foliküllerine hedeflendirilebileceğini gösteren pek çok çalışma literatürde yer almaktadır¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Polimerik nanopartiküllerin yanı sıra transfoliküler penetrasyon açısından son yıllarda sıklıkla araştırılan diğer nano-sistemler, polimerik miseller¹⁹⁸⁻²⁰⁰, lipid nanotaşıyıcılar^{196,201-205} ve nanoemülsiyonlardır²¹⁷⁻²⁰⁷.

Lademann ve grubu nanopartiküllerin foliküler birikimini değerlendirdikleri araştırmaların sonucunda bu yan geçit yolağının (kıl folikülleri) ilaç yüklü bir depo olarak

uzun süreli bir rezervuar görevi görebileceği hipotezini ortaya koymuşlardır²⁰⁸. Nanopartiküllerin (320 nm) kıl foliküllerinde 10 güne kadar kalabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir, bu bölgede biriken nanopartiküllerle taşınan ilaçların bu süre zarfında salınacağı vurgulanmıştır²⁰⁹.

Nanotaşıyıcı sistemlerin kıl foliküllerinde birikebilmesi, örneğin etken maddenin hedef dokuda kalış süresini uzatma, kontrollü/uzatılmış ilaç salımı ve advers etkileri azaltarak terapötik etkinliği artırma gibi sağlayabileceği avantajlar bakımından son yıllarda çıkan yayınlarda sıklıkla vurgulanmaktadır^{12-14,210,211}. Nanopartiküllerin kıl foliküllerinde birikimi Şekil 2.10'da temsilen gösterilmektedir²¹².



Şekil 2-10: Nanopartiküllerin kıl foliküllerinde birikiminin temsili gösterimi

Farklı partikül büyüklüğüne (122-1000 nm) ve farklı yüzey özelliklerine sahip, farklı tipte materyallerle hazırlanan partiküllerin foliküler penetrasyonunun incelendiği bir çalışmada, yaklaşık 300-600 nm'lik partiküllerin kıl foliküllerinde daha derine penetre olabildikleri gösterilmiştir²¹³.

Kılların yüzey yapısının elektron mikroskobu ile analizi sonucu, kıl yapısına zigzaglı bir görünüm veren kütikula kalınlığının insanda ~530 nm (vellus ve terminal kıllarda benzer kütikula kalınlığı) ve domuz kulak derisinde ise ~320 nm civarında olduğu tespit edilmiştir²¹⁴. Kıl foliküllerine hedeflendirmede optimum olarak belirlenen 300-600 nm boyutlarında nanopartiküllerin masaj uygulaması ile foliküllerin derin bölgelerine iletebileceği ifade edilmektedir⁷. Bu boyutların insanlarda tespit edilen kıllara ait kütikula kalınlığı ve domuz kaynaklı kılların kütikula kalınlığı ile uyumlu olduğu, masaj uygulaması ile kılların hareketi sırasında dişli bir çark sisteminin çalışma prensibi gibi

kütikula yapısının sağladığı girintilere yerleşen partiküllerin böylece foliküllerde daha derine penetre olabilecekleri ileri sürülmüştür^{9,208,214}.

Vellus kılları olarak bilinen ince kıllarda 750 nm boyuttaki partiküllerin foliküllerde deri yüzeyine yakın bölgede lokalize olduğu yani ancak belli bir derinliğe inebildiği, 40 nm büyüklüğündeki partiküllerin ise foliküllerde daha derin bölgelere kadar penetre olabildiği gösterilmiştir¹⁵.

Sonuç olarak topikal uygulanan katı partiküllerin foliküler kanaldaki penetrasyon derinliğinin partiküllerin boyutuna ve kıl folikülünün tipine, yani büyüklüğüne bağlı olduğu ifade edilmektedir²¹⁵.

2.7. Akne Hakkında Genel Bilgiler

2.7.1. Tanımı ve Klinik Özellikleri

Acne vulgaris, kısaca akne primer olarak adolesan dönemde görülür. Ancak, yenidoğan, süt çocukluğu, prepubertal dönemde ve ileri yaşlarda da oluşabilir^{216,217}. Genellikle yüz, göğüs ve sırtta görülür. Bu bölgelerde çok sayıda *pilosebace* üniteleri bulunur. Akne, kıl-*pilosebace* ünitelerinin kronik seyirli enflamatuvar bir hastalığıdır²¹⁸. Deride komedon, püstül, papül, nodül, kist şeklinde lezyonlar oluşur ve iz bırakabilir²¹⁹. Akne gelişmesinde bazı hormonların ve büyüme faktörlerinin de katkısı vardır²²⁰. Akne basitçe “hafif”, “orta” veya “şiddetli” olarak sınıflandırılır²²¹. Hastalığın uzun seyirli olması, tekrarlaması ve oluşturduğu sosyal/psikolojik etki nedeniyle kronik hastalıklar grubuna alınması gerektiği ve idame tedavisinin yapılmasının önemli olduğu bildirilmiştir^{216,222}.

Acne vulgaris lezyonları enflamatuvar veya nonenflamatuvar özellikte olabilir. İlk oluşan lezyonlar nonenflamatuvar lezyonlardır. Bunlar açık ve kapalı komedon şeklinde olabilir. Aknenin enflamatuvar lezyonları ise, papül, püstül, nodül ve kistlerdir. Papül ve püstüller yüzeysel iken nodül ve kistler daha derin oluşumlu lezyonlardır. Genellikle bu lezyonların birkaçı bir arada bulunabilir^{222,223}.

2.7.2. Etiyolojisi ve Patogenezi

Şiddetli olgularda, tedavi edilmediği takdirde skar dokusu oluşumu ile kalıcı izlere sebep olan aknenin patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Akne ile sonuçlanan dermatolojik bozuklukta etkilenen kıl folikülünde birbirleriyle ilişkili en az dört patofizyolojik olayın rol aldığı belirlenmiştir. Birincisi sebase bez aktivitesinin androjen

aracılı uyarılması ile sebum üretiminde artış, ikincisi foliküler tıkanmaya yol açan anormal keratinizasyon ile komedon oluşumu, üçüncüsü *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) etkeninin folikülde proliferasyonu ve dördüncü olarak da eşlik eden enflamasyondur^{18,223,224}. Bu dört mekanizmaya ek olarak genetik faktörler²²⁶, stres ve diyet²²⁷ de akne gelişimini ve derecesini etkileyebilmektedir.

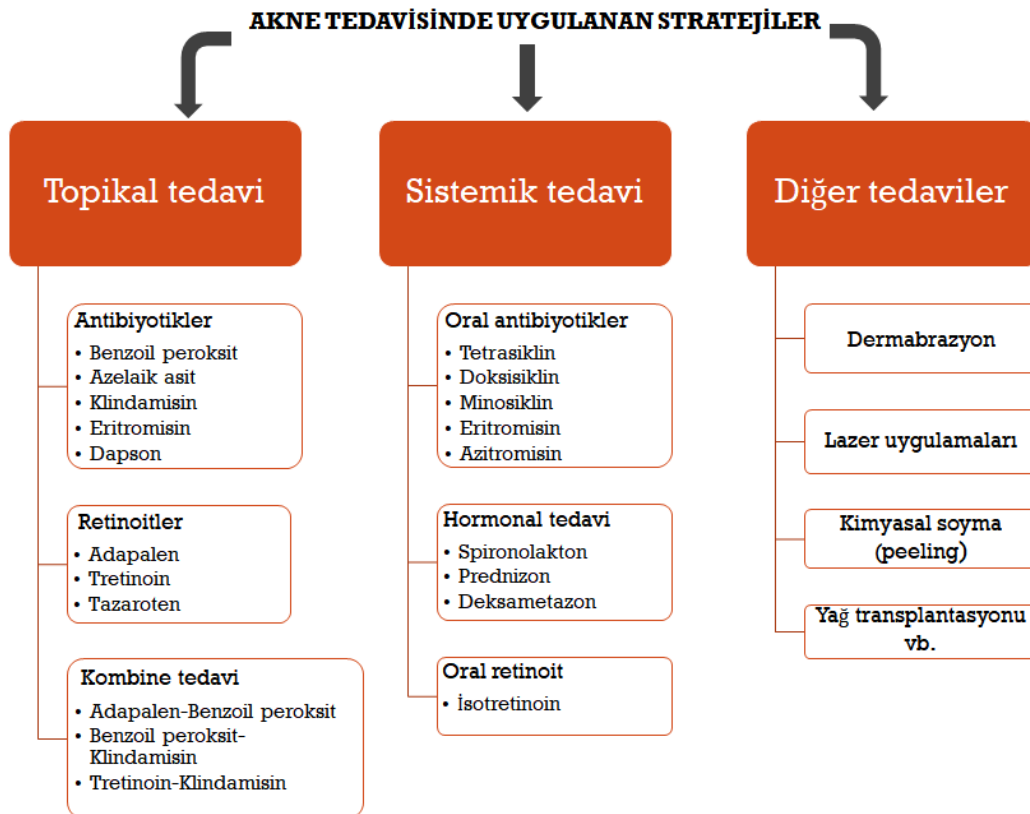
Sebase bezlerden salgılanan sebum; trigliseridler, yağ asitleri, skualen, balmumu esterleri, kolesterol ve kolesterol esterleri gibi kompleks yağdan oluşur²²⁸. Androjenler *sebase* bezlerdeki hücre büyümesini ve farklılaşmasını uyararak akne oluşumunda rol alır²²⁹. *Sebase* bezlerde bulunan androjen reseptörleri ile etkileşerek sebum üretimini arttıran bir testosteron metaboliti olan dihidrotestosteron (DHT) da akne oluşumunu kolaylaştırır; DHT oluşumunun foliküler keratinositlerde 5 α -redüktaz enzim aktivitesindeki artışa bağlı arttığı saptanmıştır^{230,231}. Aknede enflamatuvar lezyonların oluşma kaskadını başlatan primer olay mikrokomedon oluşumudur²²⁵. Korneositlerin *pilosebace* kanalda birikimiyle komedogenezis oluşmaya başlar²²⁴. Sebum üretimi artışı ile birlikte keratinositlerin proliferasyonu *pilosebace* ünite'nin tıkanması ile sonuçlanır. Mikrokomedon içinde sebum ve keratinosit artıklarının birikmesi sonucunda da açık ya da kapalı komedonlar oluşur. Foliküllerin *P. acnes* ile kolonizasyonu ve immunkompetan hücrelerin katılımıyla beraber perifoliküler dermise enflamatuvar mediatörlerin salınımı enflamatuvar lezyonların oluşumu ile sonuçlanır²²⁵.

Acne vulgaris'in etiyopatogenezinde en çok saptanan enfeksiyöz etken *P. acnes*'tir²¹⁹. Normal deri florasında bulunan, Gram (+) bir çomak olan *P. acnes*, aknesi olanlarda olmayanlara göre daha fazladır ve foliküllerde kolonize olur²³². *P. acnes*'in foliküler kolonizasyonu doğrudan ya da dolaylı olarak enflamasyon gelişimine sebep olur²³³. Lipitten zengin bir salgı olan sebum üretiminin artması *P. acnes* için uygun çoğalma ortamı oluşturur. Enflamatuvar süreç aynı zamanda sebum üretimini de arttırmaktadır²³⁴.

2.7.3. Aknede Tedavi Yaklaşımları

Acne vulgaris'te tedavi, etkilenen bölgeye, aknenin tipine ve şiddetine göre değişir. Hastanın psikolojik durumuna göre de farklı tedaviler uygulamak gerekebilir. Hafif ve orta şiddetli olguların tedavisinde ilk tercih topikal uygulama olmalıdır. Şiddetli formlarda ise sistemik tedavi uygulanmalıdır^{235,236}.

Akne tedavisinde topikal olarak retinoitler ve antimikrobiyaller; sistemik olarak oral antibiyotikler, hormonlar ve isotretinoin kullanılır. Komedonal akne de topikal retinoitler ilk seçenektir, hafif-orta şiddetteki akne semptomlarında topikal ve/veya sistemik antimikrobiyal ilaçlarla kombine kullanılabilir. Orta şiddette enflamatuvar akne de topikal veya sistemik antibiyotik kullanılması gerekir. Antibiyotiklerin topikal retinoitler ya da benzoil peroksit ile beraber kullanılması önerilir. Antibiyotik tedavisinin mümkün olduğu kadar kısa tutulması istenir. Enflamatuvar akne de ilk önce kombine tedavi, lezyonların düzelmesiyle de topikal retinoitler ile antienflamatuvar idame tedavisi önerilmektedir^{222,237}. Alternatif olarak kadınlarda tercihen oral kontraseptif etkinliği de bulunan hormonal tedavi de uygulanabilir. Hiperandrojenizm saptanan ya da ciltte aşırı yağlanma görülen veya ileri yaşlarda başlamış akne olgularında yine kadın hastalar için hormonal tedavi önerilebilir. Şiddetli akne olgularında aknenin dört ana patofizyolojik faktörüne de etki eden oral isotretinoin tedavisi yapılır²³⁷. Akne tedavisinde akne semptomlarının şiddetine göre tercih edilebilecek tedavi seçenekleri Şekil 2.11’de gösterilmiştir²³⁸.



Şekil 2-11: Akne tedavisinde tercih edilebilecek tedavi seçenekleri

2.7.3.1. Aknenin Topikal Tedavisi

Aknenin topikal tedavisinde benzoil peroksit, retinoitler (tretinoin, isotretinoin, retinaldehit, beta-retinol glukuronid, adapalen, tazaroten, motretinid), antibiyotikler, azelaik asit, salisilik asit ve dapson kullanılmaktadır^{222,239,240}. Topikal tedavinin başarısı tedavinin en az 1.5-2 ay uygulanmasına bağlıdır. Hastanın cilt tipine uygun dozaj formlarının (jel, losyon, krem vb.) seçilmesi hastanın tedaviye uyuncunun artırılması açısından önemlidir^{241,242}.

Yaygın olarak kullanılan bazı topikal anti-akne ajanları ve bildirilen yan etkileri Tablo 2.2’de gösterilmiştir^{238,243}.

Tablo 2-2: Yaygın olarak kullanılan topikal anti-akne ajanları ve dezavantajları

Etken madde	Suda çözünürlük problemi	Yan etkiler
Tretinoin ve türevleri	+	<i>işığa duyarlılık, eritem, pullanma, yanma, kaşıntı, döküntü</i>
Adapalen	+	<i>eritem, pullanma, kuruluk, yanma, batma, iritasyon</i>
Tazaroten	+	<i>eritem, pullanma, yanma</i>
Benzoil peroksit	+	<i>kuruluk, kızarıklık, kaşıntı, yanma, dermatit, deskuamasyon, kıl renginin açılması (“bleaching”)</i>
Klindamisin fosfat	-	<i>kaşıntı, kızarıklık, kuruluk, deskuamasyon</i>
Eritromisin	+	<i>eritem, pullanma, yanma, kuruluk, dermatit, deskuamasyon</i>
Dapson		<i>kaşıntı, kızarıklık, yanma, deskuamasyon</i>
Salisilik asit	+	<i>eritem, kuruluk, dermatit, deskuamasyon</i>
Azelaik asit	+	<i>döküntü, kaşıntı, deskuamasyon, batma</i>
Sodyum sülfasetamit	-	<i>Kuruluk, iritasyon, kızarıklık, pullanma, batma, yanma</i>

Topikal retinoitler aknenin başlangıç lezyonu olan mikrokomedonlara karşı en etkili ajanlardır, ancak zayıf antienflamatuar etki gösterirler²³⁵. Anormal foliküler deskuamasyonu düzelterek gelişimini tamamlamış komedonların açılmasını sağlamaları sebebiyle aknenin, özellikle de komedonal aknenin tedavisinde ilk tercih edilecek ilaç grubudur. Retinoitlerin deri bariyerini zayıflatıcı özellikleri ile diğer topikal ilaçların penetrasyonunu artırıcı etkileri vardır. Birlikte kullanıldığında, antibiyotiklere karşı *P. acnes* için direnç gelişimini azaltır^{216,244}.

Retinoitlerde en sık görülen yan etki deskuamasyon, kaşıntı, yanma, batma, eritem, kuruluk ile karakterize “retinoit dermatiti”dir. Tanımlanan ilk topikal retinoit olan tretinoin, ultraviyole ışınlarına karşı dayanıklı değildir, stabilite problemi gösterir. Benzer şekilde benzoil peroksitle beraber kullanıldığında da okside olarak aktivitesini kaybeder. Kullanım önerisi, gece tek doz uygulamadır ve benzoil peroksit ile aynı anda kullanılmaması için uyarı yapılmalıdır^{239,245}. Retinoit grubundan isotretinoinin farmakodinamik etkisi tretinoin ve adapalen ile karşılaştırıldığında benzer, iritasyon yan etkisi daha az bulunmuştur. Oral isotretinoinin sebum sekresyonunu azaltıcı etkisi topikal isotretinoinde gözlenmez. Tazaroten tolere edilebilirliği yüksek olan ve tretinoine göre açık komedonlar ve papüller üzerinde daha etkili olduğu bilinen bir retinoittir. Retinaldehit etkisini deride *all-trans* retinoik asite (ATRA) dönüştürerek gösterir. Retinol ve retinoik asit de, deride metabolize olur, metabolizasyon sonucu oluşan retinoil β -glukuronit ile farmakodinamik etkilerini gösterirler²³⁹.

Adapalen üçüncü jenerasyon sentetik bir retinoit olup, stabil ve lipofilik bir moleküldür. Tretinoinden farklı olarak ışıktan etkilenmez ve benzoil peroksit kaynaklı oksidasyona dirençlidir²³⁹.

Dermatolojik tedavide topikal olarak kullanılan farklı kuşak retinoitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.12’de gösterilmektedir³⁶. Bu ajanlardan bazılarının akne dışında farklı endikasyonları bulunmaktadır³⁶.

Sodyum sülfasetamid bakteriyostatik etkisi bulunan antimikrobiyal bir tedavi ajanıdır. Sodyum sulfasetamid, sülfür ile kombine olarak akne tedavisinde kullanılmaktadır²⁴⁸.

Salisilik asit zayıf antienflamatuar etkinliği bulunan komedolitik etkili bir ajandır. Aktif lezyonlar üzerinde kurutucu etki gösterir ve birlikte kullanıldığında diğer ajanların deriden penetrasyonunu artırır²¹⁶. Topikal retinoitlerin ya da benzoil peroksitin tedavi etkinliğini arttırmak ve aynı zamanda tedaviye cevabı hızlandırmak için oral antibiyotiklerle beraber kullanılması düşünülebilir²³⁵.

2.7.3.2. Sistemik Tedavi

Oral Antibiyotikler: Orta ve şiddetli enflamatuar akne tedavisinde önerilir²⁴¹. Antibiyotikler *P. acnes* kolonizasyonunu azaltır ve komedojenezisi tetikleyen perifoliküler lenfosit infiltrasyonunu önleyerek komedon oluşumunu azaltırlar. Tetrasiklin ve eritromisinin aynı zamanda antienflamatuar etkileri de vardır^{241,247}. En çok tetrasiklin ve türevleri, makrolidler, ko-trimokzasol ve trimetoprim tercih edilir. İlk tercih tetrasiklidir. İkinci tercih olan doksisiklin, minosiklin ve limeksilin birinci tercih tetrasikline göre daha hızlı cevap oluşturur. Genellikle tetrasiklinlere ve makrolidlere dirençli olgularda üçüncü sırada trimetoprim-sülfametoksazol kombine olarak veya tek başına trimetoprim seçilebilir. Tetrasiklinler, iskelet gelişimini inhibe ettikleri ve dişlerde kalıcı diskolorasyona neden oldukları için 12 yaş altında ve gebelerde kontrendikedir^{216,247}.

***P. acnes* direnci:** Topikal antibiyotiklerin 1980'li yıllarda kullanıma girmesi ile dirençli suşlar bildirilmiştir. Ülkemizde bir çalışmada *P.acnes*'e %8,5 oranında antibiyotik direnci saptanmıştır²⁴⁹. Eritromisine dirençli suşlar klindamisine de çapraz direnç geliştirebilir. *P. acnes* direnç oranı tedavi süresi ile doğru orantılıdır. Direnç gelişme riski sırasıyla eritromisin/tetrasiklin/doksisiklin/minosiklin şeklindedir^{222,250,251}.

Hormonal Tedavi: Herhangi bir sebeple (adet düzensizliği, kontrasepsiyon, oral isotretinoin tedavisi sırasında zorunlu kontrasepsiyon gibi) oral kontraseptif kullanması gereken kadınlarda iyi bir seçenektir. Gebelerde kullanımı kontrendikedir. Erkeklerde jinekomasti, libido azalması ve impotans gibi antiandrojenik yan etkileri nedeniyle kullanılamazlar²⁴¹. Hormonal tedavide kullanılan oral kontraseptifler dolaşımdaki androjenlerin miktarını azaltarak etki gösterir. Ovaryan ve adrenal androjen üretimini bloke eden ilaçlar da kullanılabilir. Ayrıca derinin androjen metabolizmasını etkileyen

enzim inhibitörlerinin tedavide umut verici sonuçları bildirilmiştir, hormonal tedavide alternatif bir seçenek olarak tercih edilebilirler^{216,252,253}.

Östrojenler, sebum üretimini suprese ettikleri için kullanılır, overlerden gonadotropin salınımını engelleyerek androjen üretimini baskılar. Ayrıca, hepatik seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) sentezini de arttırır. Anti-androjenler ve androjen reseptör blokörleri de androjen üretimini baskılamaları nedeniyle akne tedavisinde kullanılır^{216,252,253}. 1997'de, trifazik bir kombine oral kontraseptif (0,035 mg etinil estradiol+0,180 mg, 0,215 mg ve 0,250 mg halinde artan dozlarda norgestimat) tedavisi kadın hastalarda akne tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır²⁵⁴. Aknenin hormonal tedavisinde kullanılan ilaçlar; oral kontraseptifler, gonadotropin salgılatan hormon agonistleri (overyan androjen üretimini bloke eden ilaçlar); spironolakton, siproteron asetat, flutamid (anti-androjenler/ androjen reseptör blokörleri); glukokortikoidler (adrenal androjen üretimini bloke eden ilaçlar), 5- α redüktaz inhibitörleri ve östrojen olarak özetlenebilir²¹⁶.

Oral Retinoit Tedavisi: Sistemik retinoit tedavisi, akne patofizyolojisindeki dört basamağa birden etki eden tek tedavi ajanı olan isotretinoin ile yapılır. Şiddetli, inatçı, nodulokistik akne olgularında oral yoldan kullanılır. Etkili bir tedavinin sağlanabilmesi için genellikle kümülatif 120-150 mg/kg dozda uygulanması gereklidir^{216,255}. İsoetretinoin teratojen bir ilaçtır ve gebelikte kontrendikedir; kraniyofasiyal ve kardiyovasküler anomalilere neden olabilir. Tedavinin ilk ayında akne lezyonları alevlenebilir. Sistemik isotretinoin tedavisi sırasında retinoit toksisitesine bağlı yan etkiler görülebilir. Özellikle mukokutanöz yan etkiler hasta uyuncunu azaltır. Hipertrigliseridemi oldukça sık görülen bir yan etkidir. İsoetretinoin tedavisi sonrası hastalığın iki yıl içinde %20 oranında nüks riski mevcuttur^{237,256}.

2.8. Aknenin Topikal Tedavisinde Nanotaşıyıcıların Önemi

Aknenin topikal tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçların çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Nano boyutlu yeni taşıyıcı sistemler aknenin topikal tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltma açısından umut vadetmektedir²³⁸. Konvansiyonel dozaj şekilleri ile uygulanan topikal anti-akne ilaçları ile ağırlıklı olarak görülen kutanöz iritasyon, kızarıklık, kuruluk, soyulma ve pullanma gibi problemler bu ilaçların yenilikçi ve alternatif bir yaklaşımla nanotaşıyıcı sistemler içerisine enkapsülasyonu sayesinde en aza indirilebilir. Ayrıca, nanotaşıyıcı sistemlerle ilaçların

deriden penetrasyonu artırılabilir, böylece kullanılan ilacın dozu azaltılabilir²³⁸. Şiddetli olgularda çoğunlukla oldukça potent ve birçok ciddi yan etkiye sebep olan aktif farmasötik bileşenler ile uygulanması gereken sistemik tedavi, bu ilaçların geliştirilecek yeni nanotaşıyıcı sistemlere yüklenerek formüle edilmesiyle yerini topikal tedaviye bırakabilir²⁵⁷.

Vurgulanması gereken önemli bir nokta da nanotaşıyıcı sistemlerin kıl foliküllerinde birikme eğilimidir, nano boyutlu partiküllerin deride bu bölgelere hedeflendirilebileceği gösterilmiştir⁹⁻¹⁷. Foliküler yolak, akne gibi foliküller ile ilişkili bir kütanöz bozukluğun tedavisi için hem hedef bölge olması hem de topikal olarak uygulanan ilaçlar için rezervuar görevi görmesi sebebiyle olağanüstü bir fırsat sunmaktadır. Özetle, ilacın etkinliğini kaybetmeksizin derinin hedef bölgesinde kontrollü olarak salımı ve istenmeyen yan etkilerin önlenmesi potansiyelleri ile nanotaşıyıcılar konvansiyonel sistemlere göre aknenin topikal tedavisinde üstünlük sağlayabilir.

Aknenin topikal tedavisine yönelik en çok araştırılan nanotaşıyıcı sistemlere lipozomlar, niozomlar, mikroemülsiyonlar, polimerik miseller, katı lipit nanopartiküller, fullerenler örnek gösterilebilir^{17,257,258}.

2.9. Adapalen Hakkında Genel Bilgiler

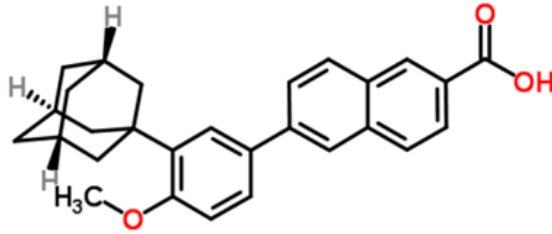
Üçüncü kuşak bir retinoit türevi türevi olan adapalen, akne tedavisinde topikal olarak kullanılan retinol (vitamin A) molekülünün sentetik bir analogudur. Yapısı gereği floresan özellik gösterir. Stabil karakteri sayesinde formülasyon geliştirme ve deride miktar tayini açısından avantaj sunmaktadır³⁷. Adapalen molekülü Fransız bir araştırmacı ilaç firması (*Galderma R&D S.N.C.*) tarafından bulunmuştur²⁵⁹. Differin® Jel (%0,1) (*Galderma Labs L.P.*) isimli orijinal farmasötik ürün olarak, aknenin topikal tedavisi için pazara sunulan bu molekül ilk kez 1996 yılında FDA tarafından onaylanmıştır²⁶⁰. Adapalenin Differin® ismiyle ayrıca; %0,1'lik solüsyon²⁶¹, %0,1'lik krem²⁶² ve %0,3'lük²⁶³ jel formları da FDA tarafından onaylanmıştır. Dünya ilaç pazarında halihazırda farklı firmaların ürettiği krem, jel, losyon ve solüsyon dozaj şekilleri bulunmaktadır³⁵.

Aşırı lipofilik karakteri nedeniyle, topikal uygulamanın ardından *stratum corneum*'un üst katmanlarında lokalize olduğu ve daha alt tabakalara geçişinin sınırlı olduğu bilinmektedir³⁷⁻³⁹. Adapalenin suda çözünürlüğünün olmaması topikal

formülasyonlarının geliştirilmesini güçleştirmektedir. Tedavi sırasında ortaya çıkan yan etkileri adapalen ile topikal tedaviyi kısıtlamaktadır.

2.9.1. Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Adapalenin kimyasal formülü ve fizikokimyasal özellikleri Şekil 2.13'te verilmiştir^{37,264}.



6-(3-(1-adamantyl)-4-metoksifenil)-2-naftoik asit, CD-271

6-(3-(adamantan-1-yl)-4-methoxyphenyl)naphthalene-2-carboxylic acid (IUPAC)

Kapalı formülü: C₂₈H₂₈O

Molekül ağırlığı: 412,52 g/mol

Erime noktası: >300°C

pKa: 4,23

log P: 8,04

Şekil 2-13: Adapalen molekülünün kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri

2.9.2. Farmakodinamik Özellikleri

2.9.2.1. Etki Mekanizması

Adapalen güçlü bir retinoit etki gösteren bir naftoik asit türevidir^{265,266}. Etki mekanizması akne patogenezinde ana faktörlerden biri olan mikrokomedon oluşumunu azaltmasına dayandırılmaktadır.

RAR selektif ligand özelliği göstererek nükleer transkripsiyon faktörü olarak görev yapan retinoik asit reseptörlerine (RAR β ve RAR γ) seçici bağlanıp akne gelişimine katkıda bulunan anormal epidermal keratinizasyon ve farklılaşma süreçleri üzerinde etki

gösterdiği²⁶⁷, epidermal morfogenezi düzenlediği belirtilmektedir^{34,268}. Foliküler epitelin deskuamasyonunu normalleştirerek yeni mikrokomedonların yani prekürsör akne lezyonlarının oluşumunu önler. Adapalenin komedolitik etkisi, keratinosit hiperproliferasyonunu ve farklılaşmasını normalleştirmesine bağlanmaktadır^{32,33}. Ayrıca nötrofil kemotaksisi ve lipoksijenaz yolağını inhibe ederek antienflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir^{32,34}.

Adapalenin tretinoinden farklı şekilde, seçici olarak nükleer retinoik asit reseptörlerine (RAR, subtip β ve γ) bağlanması sayesinde, tretinoinden daha fazla tolere edilebildiği düşünülmektedir^{32,34}.

2.9.2.2. Endikasyonu ve Tedavi Dozu

Adapalenin dünya pazarında %0,1 ve %0,3'lük topikal preparatları mevcuttur³⁵. Orta şiddetteki *acne vulgaris*'in topikal tedavisinde kullanılır^{269,270}.

Ayrıca, FDA onaylı olmayan diğer endikasyonları ise siğil, fotoyaşlanma, *alopeci areata*, aktinik keratoz, *Dowling-Degos* hastalığı, *molluscum contagiosum*, *Darier* hastalığı (*Darier-White* hastalığı, *keratosis follicularis*), *Fox-Fordyce* hastalığı, pigment bozuklukları olarak gösterilmektedir²⁷¹.

Günde bir kez tercihen gece yatmadan önce cilt temizlenip kurulandıktan sonra lezyonların olduğu bölgede ince bir tabaka halinde uygulanması önerilir. İyileşmenin ilk belirtileri, genellikle tedavinin 4-8. haftalarda görülmeye başlar. Tedavinin etkinliği, daha öncesinde herhangi bir advers etki olmaması halinde, 12. haftada değerlendirilmelidir. Işığa duyarlılığı arttırma ihtimaline karşı güneş ışığına mazuriyetin en aza indirilmesi ve gündüzleri komedon oluşumuna sebep olmayacak bir güneş koruyucu kullanılması önerilmektedir. Gebelik Kategorisi: C'dir. Sınırlı sayıda mevcut bulunan veriler ve adapalenin olası, ancak çok düşük seviyedeki perkütan absorpsiyonu göz önünde bulundurularak gebelik süresince kullanılmaması önerilir^{271,272}.

2.9.2.3. Yan Etkileri

Adapalenin topikal uygulanması ile uygulama bölgesinde doza bağlı olarak gelişen eritem, kuruluk, yanma hissi ve soyulma ile karakterize, "retinoit reaksiyonu" olarak tanımlanan advers etkiler yaygın olarak görülebilmektedir. Ayrıca ışığa duyarlılık, iritasyon ve kaşıntı da bildirilen yan etkiler arasında yer almaktadır^{36,271}.

2.9.3. Farmakokinetik Özellikleri

Adapalenin perkütan penetrasyon kabiliyeti zayıftır³⁷⁻³⁹. Akne tedavisi gören 6 hastada, 5 gün boyunca günde 1 kez 2 g/1000 cm² dozda adapalen uygulanması sonucu, hastaların kan plazmasında <0,35 ng/ml konsantrasyonda adapalene rastlanmıştır²⁶⁹.

2.9.4. Adapalenin Literatürde Kayıtlı Alternatif Formülasyon Yaklaşımları

Aşırı lipofilik karakterde olan adapalenin ticari preparatlarında yardımcı çözücü olarak propilen glikol, fenoksietanol gibi bazı alkollere ve sürfaktanlara yer verildiği görülmektedir. Bu yardımcı maddelerin, etken maddenin kendisinden kaynaklanan yan etkilerden bağımsız olarak, *stratum corneum* ile etkileşebileceği ve deride iritasyona sebep olabileceği belirtilmektedir^{16,40}. Deriden penetrasyon kabiliyeti zayıf³⁷⁻³⁹ olan adapalenin topikal etkinliğinin artırılması için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi özellikle ilacın derideki hedef bölgelere ulaşmasını sağlamak ve yan etkileri en aza indirmek açısından önem taşımaktadır.

İlaç konsantrasyonuna ve kullanılan yardımcı çözücülere bağlı iritasyon problemine çözüm olarak adapalenin mikropartiküler sistemlere yüklenmesi düşünülmüştür. Böylece yüksek dozda etken maddenin uygulama bölgesinde hızla salımını önlemek, kontrollü/uzatılmış salım sağlayarak yan etkilerin azaltılması hedeflenmiştir^{37,258,273}. Ayrıca 175 hastanın katıldığı klinik bir çalışmada mikropartiküler adapalen tedavisi uygulanan hastalarda konvansiyonel adapalen formülasyonlarına göre etkinlik kaybı olmaksızın toleransın arttığı ve iritasyonun azaldığı gösterilmiştir²⁷⁴.

Adapalenin lipit yapısında mikroboncuklara yüklendiği bir çalışmada hazırlanan mikropartiküler formülasyon adapalenin ticari jel ve krem formundaki iki farklı preparatı ile karşılaştırılmıştır. Formülasyonlardan salınan ve *stratum corneum*'a penetre olan miktarlar benzerlik bulunmuştur. Jel, krem ve adapalen yüklü boncuklardan uygulanan doz üzerinden deriye geçen etken madde oranları sırası ile 3.6±1.6, 2.3±1.6, ve 3.4±0.7% olarak saptanmıştır. Test edilen üç formülasyonda da adapalenin süspansiyon formunda olduğu ve kullanılan solvanlarda çok güç çözüldüğü; her ne kadar farklı ekspiyanlar kullanılmış olsa da adapalen molekülünün formülasyonlardaki durumu ve çözünürlük derecesi göz önünde bulundurulduğunda her üç taşıyıcıda da benzer termodinamik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır³⁷.

Adapalenin iritasyon yan etkisine çözüm olarak nanopartiküllerin kullanılması da alternatif bir yaklaşım olarak ele alınmıştır. Bir çalışmada adapalenin, yağ fazı olarak

oleik asit, yüzey aktif madde olarak tween 20, kosurfaktan olarak Transcutol® ve deiyonize su kullanılarak mikro emülsiyon (damlacık boyutu ~118 nm) formülasyonu hazırlanmıştır ve adapalenin oleik asitte hazırlanan kontrol çözeltisi (0,1% a/h) ile karşılaştırmalı olarak transfoliküler penetrasyonu *in vitro* deriden geçiş çalışmaları sonrasında diferansiyel bantla soyma (*differential tape stripping*) tekniği kullanılarak ve ayrıca konfokal mikroskop analizleri yapılarak değerlendirilmiştir. Kıl folikülerine penetre olan adapalen miktarının mikroemülsiyon sistemi ile $0,109 \pm 0,03$ 'ten $0,292 \pm 0,094$ µg'a yükseldiği tespit edilmiştir. Konfokal mikroskop görüntüleri ile adapalen mikroemülsiyonunun kıl foliküllerinden penetre olabildiği ifade edilmiştir⁴³.

Başka bir çalışmada adapalen, asit-duyarlı polimerik (Eudragit® EPO) nanotaşıyıcılara (~126 nm) enkapsüle edilmiş, nanotaşıyıcı sistemden salımı ve *in vitro* deriden penetrasyonu ve silikon membrandan geçişi incelenmiştir. pH 4'te adapalenin hızlı bir şekilde salındığı, silikon membrandan permeasyon hızının kontrol taşıyıcısına göre (Transcutol®) önemli derecede arttığı, deriden geçiş çalışmaları sonucunda ise *stratum corneum*'da saptanan ilaç miktarının penetrasyon artırıcı etkinliği bulunan pozitif kontrol (Transcutol®) ile benzer olduğu gösterilmiştir¹⁶.

Adapalen-TyroSpheres olarak isimlendirilen adapalen nanopartikülleri ile topikal bir jel formülasyonu geliştirilmiş ve klinik etkinliği değerlendirilmiştir. Akne tedavisinin tolere edilebilirliğini ve etkinliğini artırma amaçlanarak hazırlanan adapalen yüklü polimerik nanopartiküller (<40 nm) suda çözünür viskozite artırıcı bir ajan kullanılarak jel formülasyonu haline getirilmiştir. Sonuçta adapalenin TyroSpheres jel formülasyonunun, Differin® Jel tedavisine kıyasla, *in vivo* model olan rhino farelerinde açık utriküllerin boyutunu önemli ölçüde azaltarak komedolitik etkinliği arttırdığı gösterilmiştir. Araştırmacılar TyroSpheres teknolojisi ile, potansiyel olarak daha az iritasyon etkisi gösteren ve ticari üründen daha etkin alternatif bir adapalen formülasyonu geliştirdiklerini bildirmişlerdir²⁷⁵.

2.10. Dendritik Nanotaşıyıcılar Hakkında Genel Bilgiler

Dendrimerler ve diğer dendritik polimerlerin, özgün şekilde tasarlanabilen çok fonksiyonlu nano boyutlu taşıyıcı sistemler olarak biyomedikal uygulamalar için büyük bir potansiyelleri bulunmaktadır⁴⁷. Dendritik, yani ağaç benzeri⁴⁸ çok dallı, polimerler grubunda yer alan dendrimerler, lineer polimerlere göre daha yeni, çok sayıda dala ve

belli moleküler ağırlığa sahip monodispers yapıda polimerik nanopartiküller olarak tanımlanmaktadır⁵⁰.

Dendrimerler sentez yöntemi, sentezlenen jenerasyon derecesi ve yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak, 2–20 nm nanometre boyutlarda monodispers, düzenli dallanmaya sahip, çok sayıda periferel fonksiyonel gruba sahip esnek makromoleküllerdir^{276,277}. Konvansiyonel çok dallı polimerlerden farklı olarak, dendrimerlerin moleküler yapısı düzenlilik gösterir. Dallanma dereceleri kontrollü olarak artırılabilir ve yüzey grupları farklı kimyasal ve/veya biyolojik “aktif”lerle konjugasyon ile çok fonksiyonlu hale getirilebilir²⁷⁸⁻²⁸⁰. Son derece kontrol edilebilir yüzey grupları sayesinde multivalan bağlanma etkisi göstererek biyolojik hedeflere bağlanma gücünü artırma potansiyelleri söz konusudur²⁸¹. Kimyasal olarak merkezde bir çekirdek ve etrafında iki fonksiyonel alandan, dallar ve periferel gruplardan oluşur. Bu üç kısımda gerçekleştirilen değişiklikler ile dendrimerlerin molekül ağırlığı, jenerasyonu ve buna bağlı olarak boyutu ile yüzey yükü ve fonksiyonelliği ayarlanabilir⁴⁷.

Dendrimerlerin kayda değer potansiyelleri, dendrimerlerin yapısal bir parçası olarak tanımlanabilen dendronlar kullanılarak dendritik yapı içeren hibrit nanotaşıyıcıların tasarlanması fikrinin doğmasına yol açmıştır. Bu şekilde hazırlanan hibrit yapılarla dendrimerler ve diğer organik ve/veya inorganik materyallerin sağladığı avantajların bir araya getirilmesi amaçlanmaktadır²⁸².

Dendronların polimer yapı tasarımlarında yer alması dendrimerlerin multivalan ve multifonksiyonel özelliklerini taşıyan çok çeşitli ve özgün polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasını kolaylaştırmaktadır. Amfifilik lineer dendron temelli blok kopolimerler, özellikle kendiliğinden oluşan misel sistemlerinin hazırlanabilmesine imkan verdiği için umut vadeden nanotaşıyıcı sistemler olarak görülmektedir. Örneğin bu şekilde tasarlanan amfifilik blok kopolimerlerin sulu ortamda oluşturduğu misellerin hidrofobik çekirdeği birçok hidrofobik terapötik molekülün etkin bir şekilde enkapsülasyonuna imkan sağlayabilir^{47,283}.

2.11. Dendrimerlerin Yapısı ve Özellikleri

Dendrimerler, merkezdeki çekirdek kısmı etrafında bulunan fonksiyonel yüzey grupları ile ağaç benzeri dallanmış, “dendritik”, üç boyutlu, simetrik bir yapı sergilerler. Başlıca avantajları arasında; yüzeylerindeki fonksiyonel grupların kontrol edilebilir

olması, yüzey gruplarına bağlı olarak membran lipitleri ile etkileşme ve potansiyel permeasyon/penetrasyon arttırıcı özelliklerinin bulunması sayılabilir⁴⁹⁻⁵².

Dendrimerlerin permeasyon arttırıcı etkilerinin yüzey gruplarına bağlı olduğu, katyonik>yüksüz>anyonik sırasına göre permeasyon arttırıcı etkisi en fazla olanların katyonik yüzey gruplarına sahip dendrimerler olduğu bildirilmiştir. Permeasyon arttırma kabiliyetleri, lipit çift tabakaları ile etkileşebilmelerine bağlanmaktadır. Küçük jenerasyon dendrimerlerin hücreler arasında daha rahat hareket edebilmeleri sebebi ile permeasyon etkinliklerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir²⁸⁴.

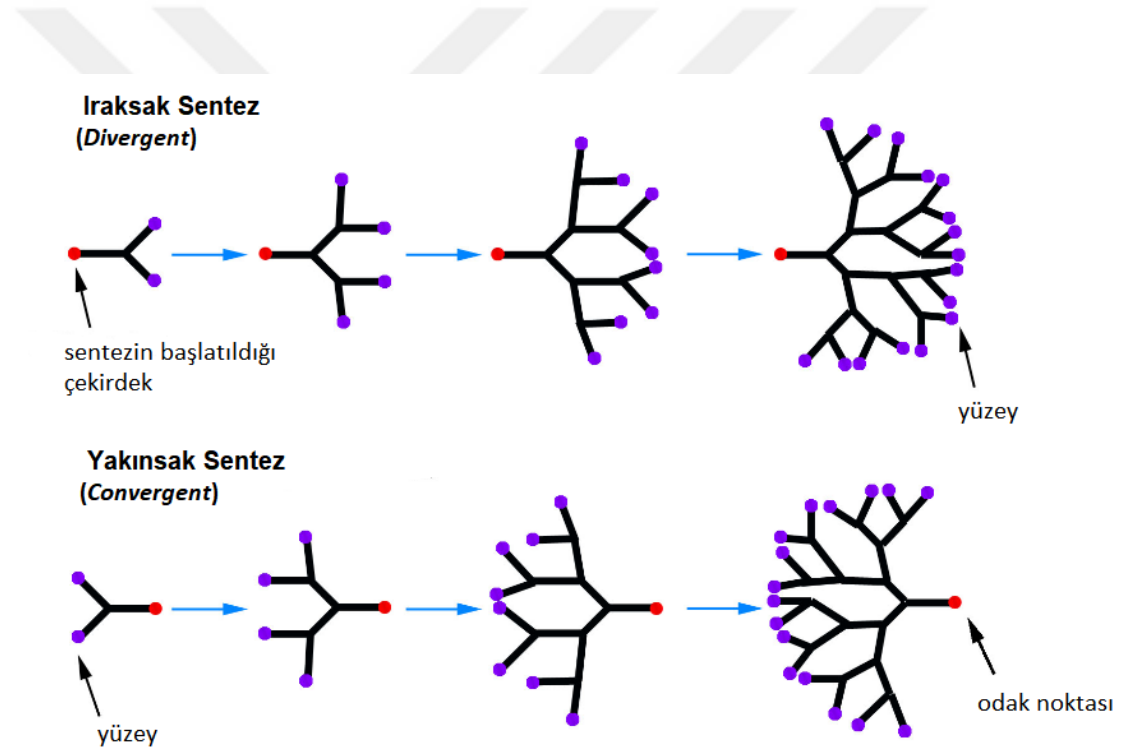
Yüzeyinde polar gruplar taşıyan suda çözünürlükleri yüksek dendrimer nanotaşıyıcılarının, özellikle iyonize küçük hidrofobik ilaçları bağlama ve sudaki çözünürlüklerini arttırma, kolay bozunan ilaç moleküllerinin kimyasal stabilitesini iyileştirme özellikleri bulunmaktadır. Hidrofilik dış kabuk ve hidrofobik bir iç boşluğa sahip bu yapılar misel benzeri davranış gösterirler ve her bir dendrimer tek molekülli misel (*unimolecular micelles*) olarak tanımlanır. Ortamdaki amfifilik moleküllerin belli bir konsantrasyona ulaşması sonucu bir araya gelen agregatların oluşturduğu diğer misel sistemlerinin aksine tek molekülli misel olarak adlandırılan dendrimerler için kritik misel konsantrasyonu (KMK) kriteri geçerli değildir. Bu özellikleri ile dendrimerler bulundukları her konsantrasyonda dendritik yapı içerisinde suda çözünürlük problemi olan hidrofobik ilaçların enkapsülasyonunu mümkün kılar²⁸⁵. Yüzey gruplarına bağlı olarak penetrasyon arttırıcı özelliği bulunan dendrimerler polimerik transdermal penetrasyon arttırıcı olarak nitelendirilmektedir⁵³⁻⁶⁰.

2.11.1. Dendrimerlerin Sentezlenmesi

Dendrimerlerin sentezlenmesinde iki temel yöntem kullanılmaktadır. Tomalia ve arkadaşları tarafından ilk kez geliştirilen ıraksak (*divergent*) sentezde²⁸⁶, çok fonksiyonlu öncü çekirdekten başlayarak ardışık aktivasyon ve kondenzasyon reaksiyonları ile dendrimer merkezden yüzeye doğru, öncü çekirdeğe monomer/dallanma ünitelerinin ardışık şekilde bağlanması ile radyal olarak büyür.

Hawker ve Fréchet tarafından geliştirilen yakınsak (*convergent*) yöntemde²⁸⁷ ise tam tersine, dendrimerler yüzeyden odak noktasına doğru radyal olarak sentezlenir. Sonuçta elde edilen yapılar aynıdır. Fakat her iki yöntemin de kendi içinde artıları ve eksileri vardır. ıraksak sentez en yaygın kullanılan, özellikle dendrimerlerin büyük ölçekli üretimi için tercih edilen yöntemdir. Ancak, bu yöntem ile sentezlenen son ürün

dendrimerlerin yapısında genellikle eksik dallar/kollar ya da dimerler/trimerler gibi bazı kusurlar bulunabilmektedir. Bu probleme daha çok, jenerasyon derecesi yükselirken her jenerasyon ile eşzamanlı gerçekleşen reaksiyon sayısı ile birlikte periferdeki sterik engelin artmasına bağlı olarak yüksek jenerasyon dendrimerlerde rastlanır. Yakınsak sentez yöntemi kullanılarak, dendrimer yapısındaki kusurlar en aza indirilebilir. Çünkü tek bir başlangıç noktasından tüm dendrimer yapısını sentezlemek yerine, önce dendron parçaları sentezlenir, saflaştırılır; arkasından çok fonksiyonlu çekirdek ile bu parçalar birleştirilerek dendrimer yapısı tamamlanır. Safsızlıkların ve kısa dalların uzaklaştırılması daha kolaydır ve nihai dendrimer daha monodispers olur⁴⁷. Dendritik yapıların sentezlenmesinde kullanılan iki temel yöntem Şekil 2.14’te gösterilmektedir⁴⁷.



Şekil 2-14: Dendrimer ve diğer dendritik polimerlerin sentezlenmesinde kullanılan iki temel yöntem

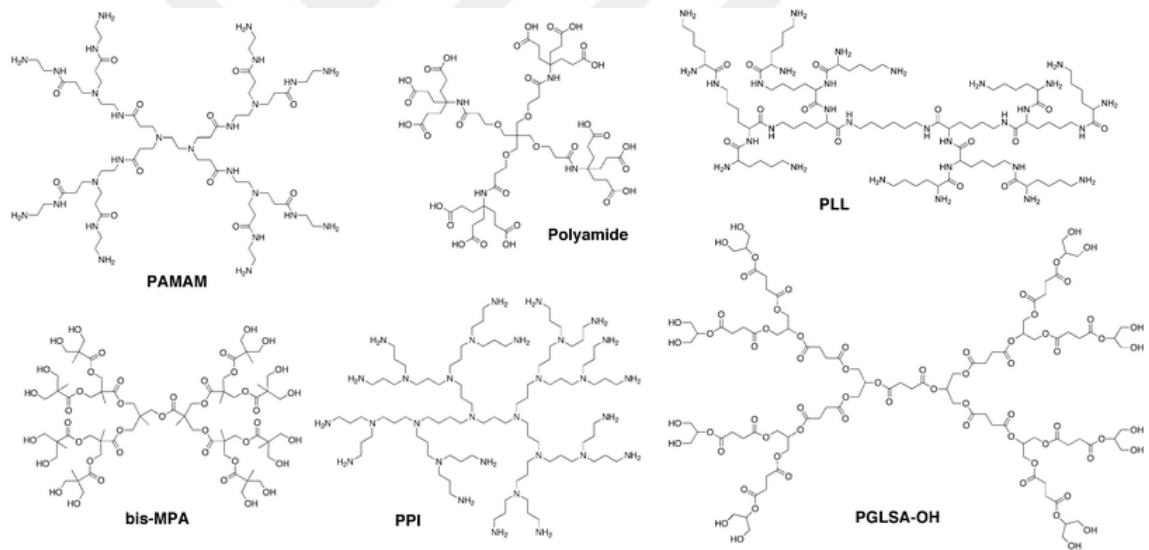
Iraksak yöntem: Dendrimer, çok fonksiyonlu bir çekirdekten bir dizi reaksiyonla merkezdeki çok fonksiyonlu öncü çekirdekten perifer/yüzeye doğru radyal büyüyecek şekilde sentezlenir. Yakınsak yöntem: Dendrimer, yüzeyden odak noktasına doğru sentezlenen dendron ünitelerinin en son aşamada bir araya getirilerek çekirdek yapısı ile birleştirilmesi yolu ile sentezlenir.

Kullanılan sentez yönteminden bağımsız olarak, dendrimer tasarımı ve buna bağlı boyut, yüzey yükü, polimer iskeleti gibi parametreler dendrimerlerin biyolojik etkileşimlerini doğrudan etkileyecek önemli faktörlerdir. Dendrimerlerin sitotoksisite ve

biyoyumrluluk özelliklerini belirleyen en önemli faktörler yüzey yükü ve jenerasyondur⁴⁷.

Poli(amidoamin) (PAMAM) ve poli(propilenimin) (PPI) dendrimerler, kolay fonksiyonelleştirilebilir ve ticari olarak pazarda bulundukları için kolay ulaşılabilir olmaları sebebi ile literatürde en yaygın ve kapsamlı şekilde incelenen dendrimerlerdir^{288,289}. PAMAM dendrimerlerin toksisitesi jenerasyon derecesi ile ilişkili bulunmuştur. Jenerasyon yükseldikçe, her bir molar konsantrasyon için pozitif yük sayısının artması ve dendrimerin hücre membranı ile temas eden yüzey alanının artmasına bağlı olarak toksisite de artış gösterir²⁸⁹.

Yaygın olarak kullanılan, ticari olarak temin edilebilen farklı dendrimerlerin kimyasal yapıları Şekil 2.15'te gösterilmiştir²⁹⁰.



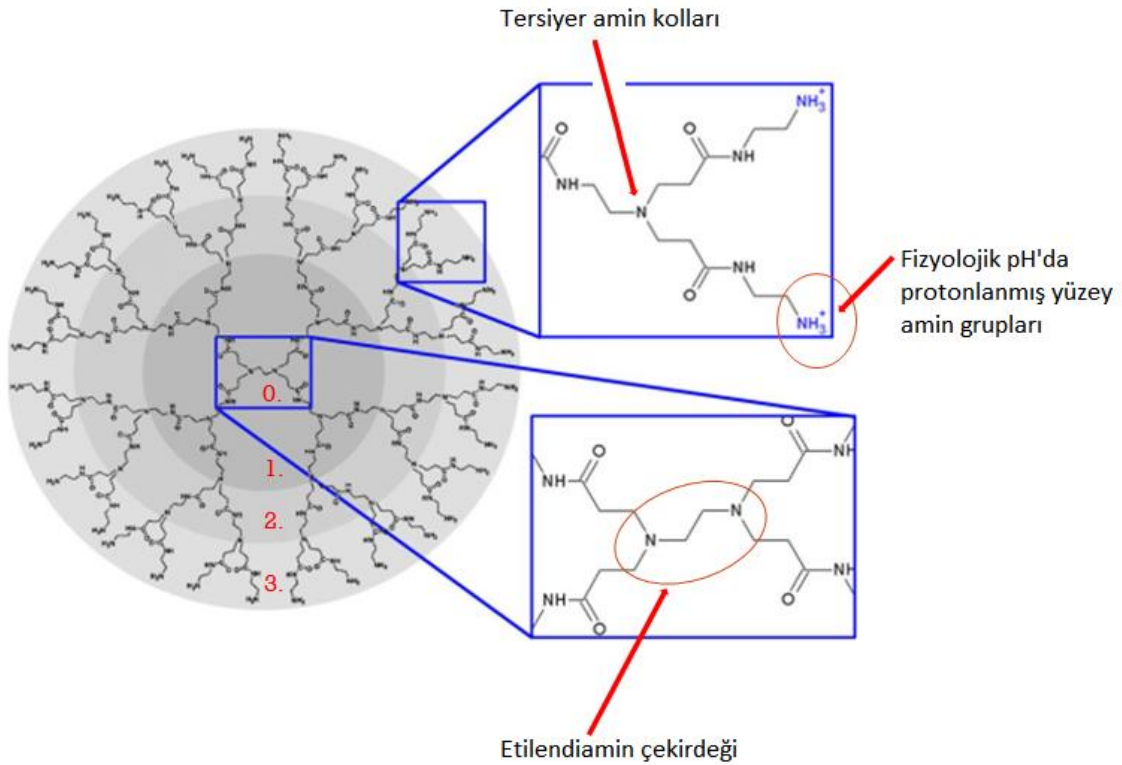
Şekil 2-15: Yaygın olarak kullanılan ticari dendrimerlerin kimyasal yapıları

Dendrimerlerin lineer polimerler ile kıyaslandığında genellikle yaygın kullanılan çözücülerde çözünürlüklerinin daha iyi olduğu belirtilmektedir. Fakat çözünürlük kabiliyeti özellikle yüzey gruplarına ve ayrıca tekrarlayan dalların ve çekirdeğin yapısına bağlıdır^{291,292}.

2.11.2. PAMAM Dendrimerler

PAMAM dendrimerler ilk kez Tomalia ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir²⁹³. En yaygın olarak araştırılan dendrimer ailesinden biridir. Sentez basamağına bağlı olmak üzere amin veya karboksilik asit ester yüzey gruplu PAMAM dendrimerler elde edilebilir. Hidroksil yüzey gruplu PAMAM dendrimerler de sentezlenebilir²⁸⁸. Neredeyse küresel yapıya sahip PAMAM dendrimerler ilaç taşıyıcı sistemler olarak, hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle üzerinde çokça araştırma yapılan bir gruptur. Farklı jenerasyonlarda farklı çekirdek ve yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimerler ticari olarak temin edilebilmektedir²⁹⁴.

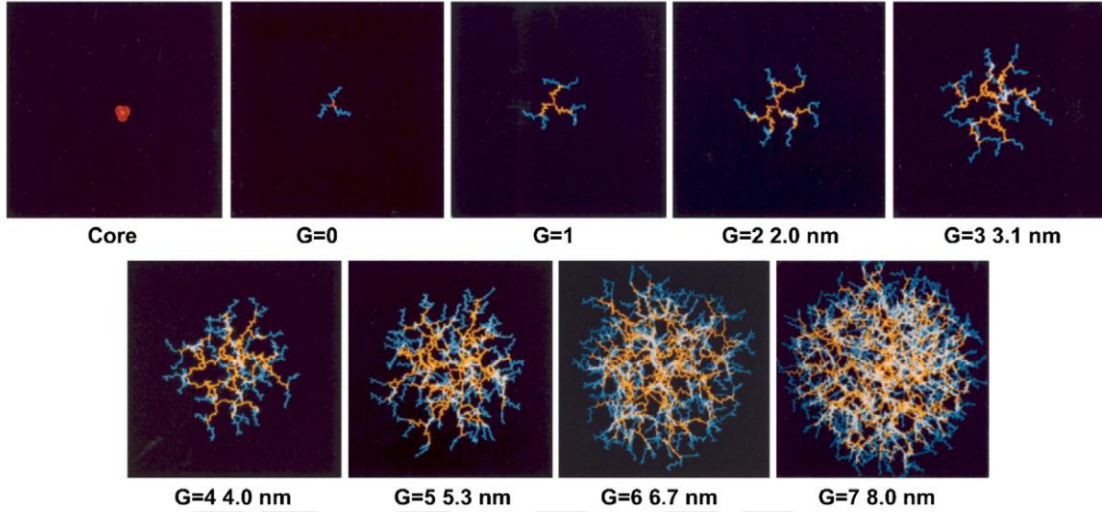
Amin yüzey gruplu PAMAM dendrimerlerin kimyasal yapısı Şekil 2.16'da gösterilmiştir²⁹⁵.



Şekil 2-16: PAMAM-NH₂ dendrimerlerin kimyasal yapısı

PAMAM dendrimerlerin yüzeyindeki reaktif fonksiyonel gruplara çeşitli ilaçlar ve görüntüleme ya da hedeflendirme ajanları kovalan olarak bağlanabilir. Ayrıca internal amin grupları ile kovalan olmayan etkileşimler yolu ile hidrofobik moleküllerin etkin şekilde enkapsülasyonu sağlanabilir²⁸⁸.

PAMAM dendrimerlerin jenerasyon derecesi arttıkça çapları/boyutları doğrusal; yüzey gruplarının sayısı ise üssel şekilde artar³¹⁷. PAMAM dendrimerlerin çekirdekten G7'ye doğru, artan boyutları Şekil 2.17'de gösterilmektedir³¹⁷.



Şekil 2-17: PAMAM dendrimerlerin çekirdekten G7'ye doğru, doğrusal şekilde artan çapları

PAMAM dendrimerlerin diğer dendrimer ailelerine kıyasla daha biyo-uyumlu oldukları, yüzey amin grupları ve internal amit bağları ile doğal biyolojik kimyayı andırdıkları, sahip oldukları yapıları ile globüler proteinlere benzedikleri belirtilmektedir. Sistematik, boyutsal uzunluk ölçeklendirme, elektroforetik ve diğer biyomimetik özelliklere dayanarak, genellikle "yapay proteinler" olarak adlandırılırlar. PAMAM dendrimerlerin, özellikle yüzeylerinde karboksilik veya hidroksilik gibi anyonik veya nötr gruplar bulunanların immünojenik olmadıkları ve memelilerde düşük toksisite gösterdikleri belirlenmiştir²⁹⁶. PAMAM dendrimerlerinin toksisitesinin doz/konsantrasyon, maruziyet süresi ve jenerasyon (/boyut) parameterlerine bağlı olduğu gösterilmiştir^{297,298}.

PAMAM dendrimerlerin topikal ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Deriye uygulandıklarında iritasyon yapmaksızın geçici bir etki oluşturdukları literatürde belirtilmektedir. İkinci (G2) ve üçüncü (G3) jenerasyon PAMAM-NH₂ dendrimerlerin dermal toksisitesini değerlendirmek üzere *in vivo* sıçan deri modelinde gerçekleştirilen deri iritasyon

çalışmalarında PAMAM-NH₂ dendrimerlerin yüksek dozlarda (≥ 6 mg/mL) epidermal hücrelerde anlamlı morfolojik değişikliklere yol açtığı, keratinositlerdeki sitomorfolojik değişiklikler ve dermisteki histopatolojik değişikliklerin doza bağlı olduğu gösterilmiştir. Sonuçta PAMAM dendrimerlerin topikal uygulamada düşük konsantrasyonlarda kullanılabileceği belirtilmiştir²⁹⁹.

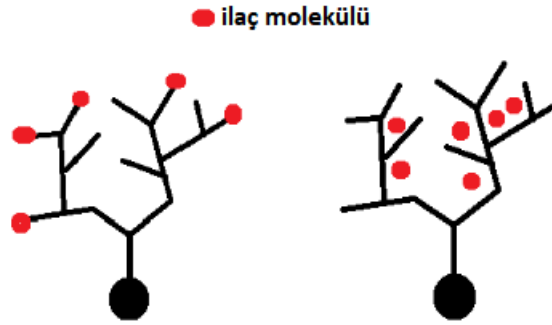
Amin yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimerlerin sahip oldukları pozitif yüklü terminal grupları ve negatif yüklü hücre membranları arasındaki etkileşim ile hem epidermal hem de dermal tabakalarda etkin şekilde biriktiği gösterilmiştir ve topikal tedavide potansiyel nanotaşıyıcılar olabilecekleri ifade edilmektedir^{55,61}.

G2 PAMAM-NH₂ dendrimerler 16 adet yüzey NH₂ grubuna ve ayrıca internal tersiyer amin grupları ile internal amit gruplarına sahiptir. İnternal tersiyer aminler ve yüzeydeki primer aminler Lewis bazlarıdır. Ortam pH'sına bağlı olarak iyonize olurlar³⁰⁰. Amin yüzey gruplu PAMAM dendrimerlerin sahip olduğu net pozitif yük ile anyon bağlamada elektrostatik etkileşim imkanı sunduğu literatürde açıklanmaktadır³⁰¹. PAMAM dendrimerlerin, iç boşluklarında küçük molekül ağırlıklı hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu söz konusu olabilir³⁰².

2.11.3. İlaç-Dendrimer Etkileşimleri

Dendrimerlerin terapötik moleküller için bir taşıyıcı sistem olabilmesi, iç boşluk hacimlerine ve kimyasal yapılarına bağlıdır^{50,288}. Sahip oldukları fonksiyonel gruplar sayesinde taşıdıkları moleküller ile hidrojen bağı, π - π etkileşimi, iyon-dipol etkileşimleri gibi birden fazla moleküller arası kuvvetlerin etkisi veya yüzey grupları ile molekül arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler sonucu kompleks oluşturabilir, çözünürlük artırıcı olarak davranabilirler. Ayrıca yükleme kapasitelerini arttırmak için moleküllerin dendrimerlerin yüzey gruplarına doğrudan konjugasyon stratejisi ile bağlanması da mümkündür^{50,288}.

Özetle, yüzey gruplarına bağlı olarak dendrimerlere iki farklı şekilde ilaç molekülleri yüklenebilir. Amaca bağlı olarak elektrostatik etkileşimler ile kompleks oluşumu veya kovalan bağlar ile ilaç moleküllerinin dendrimerin yüzey gruplarına konjugasyonu yöntemleri uygulanabilir. Ayrıca küçük ilaç moleküllerinin iç boşluklarda fiziksel olarak hapsedilmesi/enkapsülasyonu sonucunda da yükleme gerçekleşebilir³⁰³ (Şekil 2.18).



Şekil 2-18: Dendrimer-ilaç etkileşimleri

İlaç moleküllerinin elektrostatik etkileşimle veya kovalan bağlarla dendrimerin yüzey gruplarına bağlanması (soldaki); dendrimerin iç kısmında dalları arasında enkapsülasyonu (sağdaki)

2.11.4. Dendrimerlerin Dermal Uygulamaya Yönelik Değerlendirilmesi

Literatürde PAMAM dendrimerlerin, penetrasyon arttırıcı etkinliklerinin olduğu bildirilmektedir, çeşitli etken maddelerin deriden geçişini arttırmak üzere kullanıldıkları uygulamalar mevcuttur^{177,304,305}. Deriye penetrasyonun PAMAM dendrimerler ile arttırılmasında etkili olduğu ileri sürülen olası mekanizmalardan biri, ilaç-PAMAM dendrimer komplekslerinin hazırlanması ile dendrimerlere yüklenen ilacın suda çözünürlüğünün önemli ölçüde arttırılması, bir diğeri mühendislik teknikleri kullanılarak nanopartikül tasarımı yolu ile dendrimerlerin deriye penetrasyonunda foliküler yolağa seçiciliğin arttırılması, bir diğeri ise PAMAM dendrimerlerin yüzeyinde bulunan çok sayıda katyonik yüklü primer amin gruplarının derinin bariyer fonksiyonunu değiştirmesi şeklinde açıklanmaktadır^{180,306}.

Benzer şekilde 8-metoksipsoralenin deriye penetarasyonunun G3 PAMAM-NH₂ and G4 PAMAM-NH₂ dendrimerlerle arttırılabileceği, ilacın tek başına çözelti halinde uygulanmasına kıyasla PAMAM dendrimerler birlikte uygulandığı zaman 8-metoksipsoralenin deride daha derin tabakalara ulaşabildiği konfokal mikroskop görüntüleri ile gösterilmiştir⁵⁷.

PAMAM dendrimerlerin penetrasyon arttırıcı etkilerinin moleküler boyut, yüzey yükü ve konsantrasyona bağlı olduğu ifade edilmektedir. Penetrasyon arttırıcı etkinliğin katyonik yüzey gruplarına sahip dendrimerlerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir³⁰⁵.

Dendrimerlerle topikal/transdermal uygulamaya yönelik yapılan çalışmalardan bazıları Tablo 2.3 ve 2.4'te gösterilmektedir.

Tablo 2-3: Dermal uygulamaya yönelik dendrimerlerin kullanıldığı çalışmalar-1

İlaç molekülü	Farmakolojik Grup/ Hastalık	Dendrimer	Tanımlanan Formülasyon Özelliği	Kaynak
Ketokonazol	Antifungal	(G2/G3) PMM-NH ₂ , PMM-OH	Hidrojel formülasyonu (Karbopol 980)	54
Gümüş sulfadiazin (AgSD)	Topikal antibiyotik /Yara yanık tedavisi	(G4) PMM-NH ₂ -Ag ⁺ (G4.5)-PMM-COOH-SD	Ag-PMM ve SD-PMM kompleksleri ile AgSD nanopartikülleri hazırlama (mikrofluidizasyon yöntemi)	307
Tamsulosin	α 1A- adrenoseptor antagonist /Benign prostat hiperplazisi (BPH)	(G3) PMM-NH ₂ (penetrasyon artırıcı)	Polihidroksialkanoat (PHA)-PAMAM transdermal ilaç taşıyıcı sistem (TDDS)	179
Ditranol (DIT)	Antipsöriyatik	(5G) Polipropilen imin (PPI) dendrimer	DIT-PPI dendrimer kompleksleri	59
Klotrimazol (CLO)	Antifungal	(G2/G3) PMM-NH ₂ , PMM-OH	CLO-PAMAM kompleksleri	53

Tablo 2-4: Dermal uygulamaya yönelik dendrimerlerin kullanıldığı çalışmalar-2

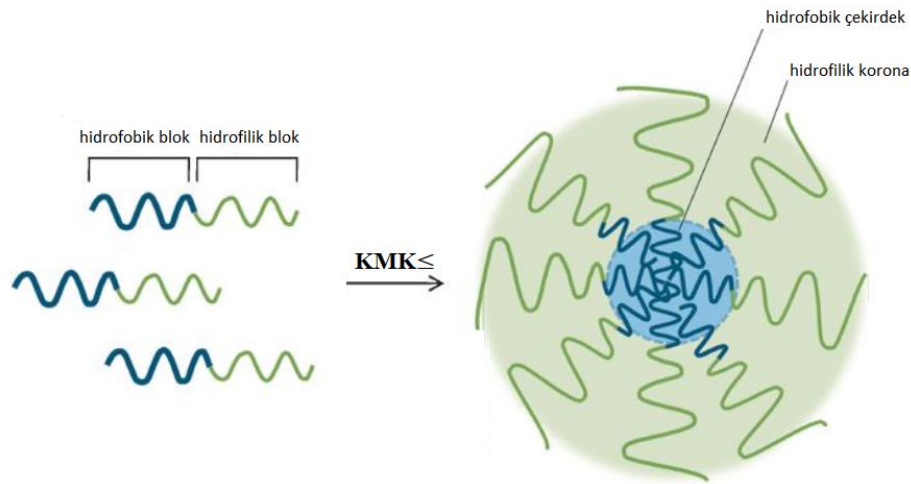
İlaç molekülü	Farmakolojik Grup/ Hastalık	Dendrimer	Tanımlanan Formülasyon Özelliği	Kaynak
İndometazin	NSAI	(G4) PAMAM-NH ₂ , PAMAM-OH	İndometazin-dendrimer	55
		(G4.5) PAMAM	kompleksleri	
Diklofenak sodyum (DS)	NSAI	(G1/G2) Janus tipi dendrimer Oleodendrimer (Oleik asit-dendron konjugat) (penetrasyon artırıcı)	DS'nin oleodendrimerlerle hazırlanan jel formülasyonu	56
				178
5-Fluorourasil (FU)	Antineoplastik (Psoriasis, Premalignan/malignan deri kanseri)	(G4) PAMAM-NH ₂ (penetrasyon artırıcı)	5FU ve dendrimer /üç tip taşıyıcıda (fosfat tamponu (PB), mineral yağ (MO), isopropil miristat (IPM).	
8-Metoksipsoralen (8-MOP)	Antipsoriatik /Hiperproliferatif deri hastalıkları (Psoriasis, vitiligo)	(G3/G4) PAMAM-NH ₂	8-MOP-dendrimer kompleksi	58

2.12. Dendritik Blok Kopolimerler ile Hazırlanan Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler: Dendron Temelli Miseller

2.12.1. Miseller Hakkında Genel Bilgiler

Miseller, bulundukları ortamda belli bir konsantrasyonun üzerinde kendiliğinden bir araya gelen amfifillerin oluşturduğu koloidal sistemler olarak tanımlanabilir¹³. Kendiliğinden oluşan bu sistemler amfifilik diblok (hidrofilik-hidrofobik) polimerlerle kolaylıkla hazırlanabilir ve nano boyutlu ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilir. Amfifilik diblok kopolimer ile sulu ortamda misel oluşumu Şekil 2.19’da gösterilmektedir³⁰⁹.

Sistemi oluşturan amfifilik molekül bu şekilde polimer temelli olduğunda polimerik misel olarak adlandırılırlar^{13,308}. Kendiliğinden oluşan sistemden kasıt, amfifilik moleküllerin agregasyonu ile supramoleküler, yani moleküllerarası kuvvetlerle bir arada tutulan, yapıların oluşumudur²⁸². Bu şekilde oluşan misel sistemi yapısal olarak hidrofobik ilaç moleküllerinin yüklenebileceği “çekirdek” ve hidrofilik kabuk olarak tanımlanan “korona” bölümlerinden ibarettir^{13,308}. Tasarlanan amfifilik blok kopolimerin kompozisyonu, blokları oluşturan polimerlerin özellikleri oluşan misellerin boyutunu, şeklini, salım ve stabilite özelliklerini etkiler^{308,309,310}.



Şekil 2-19: Amfifilik diblok kopolimer ünitelerinin sulu ortamda KMK üzerinde misel oluşturması

Misel oluşturabilme yeteneğine sahip amfifilik moleküller sulu ortamda belli bir konsantrasyona ulaştıklarında agregat oluşturarak misel yapısını meydana getirirler, bu

konsantrasyona kritik misel konsantrasyonu (KMK) adı verilir. KMK noktasında amfifilik polimerler sulu ortamda hidrobik zincirler bir araya gelerek çekirdeği oluşturacak şekilde hidrofilik zincirler ise sulu ortama doğru yönelecek şekilde dizilmeye başlarlar^{309,311,312}. Bu şekilde hidrofobik zincirlerin su ile etkileşmesi önlenir, polimer-su sisteminde arayüzey serbest enerjisi en aza indirilir, bu durum misel oluşumu için esas itici güçtür. Sulu çözeltilerde hidrofobik etki arayüzey serbest enerjisinin azaltılmasında rol alan en önemli mekanizmadır. Miselleri oluşturan ünitelerin sahip oldukları yapısal özellikler KMK değeri üzerinde belirleyici bir faktördür. Örneğin blok kopolimerin hidrofobisitesi KMK değerini etkiler³⁰⁹.

2.12.2. Dendritik Blok Kopolimerler ile Hazırlanan Miseller

Önceki bölümlerde vurgulandığı gibi, dendrimerlerin sunduğu avantajlardan yararlanmak üzere dendritik yapı içeren hibrit nanotaşıyıcıların tasarlanması fikri doğmuştur. Dendronlar ve diğer polimerlerin kombinasyonu ile, dendrimerlerde olduğu gibi benzer şekilde moleküler özellikleri kontrol edilebilen, farklı şekillerde tasarlanabilen hibrit yapılar sentezlenebilir. Hibrit yapılar arasında, özellikle amfifilik lineer dendron temelli blok kopolimerler (LDBK) ya da kısaca dendritik blok kopolimerler, çekirdek kısmında hidrofobik ilaçların enkapsüle edilebildiği kendiliğinden oluşan çok fonksiyonlu misel sistemlerinin hazırlanmasına olanak verdiği için dikkat çekmektedir⁴⁷. Dendritik blok kopolimerlerde hem dendritik yapının sunduğu avantajlar hem de lineer blok kopolimerlerin yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve farklı şekilde tasarlanabilme gibi avantajları bir araya getirilebilir. Modüler yaklaşımla tasarlanan LDBK'ler mühendisliğin sunduğu imkanlarla uygun hidrofilik-lipofilik dengelerin (HLB) sağlanması durumunda kendiliğinden oluşan potansiyel ilaç taşıyıcı sistemlerin, misellerin, elde edilmesine imkan vermektedir. Bu şekilde dendritik yapı içeren blok kopolimerler ile hazırlanan dendron temelli miseller, küçük boyutlu ve tek molekülü dendrimerlerin aksine, çok sayıda molekülün bir araya gelerek agregat oluşturması sebebi ile daha büyük sistemlerdir ve agregat oluşumu sırasında çekirdekleri içine yüksek yükleme oranları ile hidrofobik ilaçları enkapsüle edebilirler⁴⁷. Dendron temelli misellerde KMK'nın düşük^{313,314} olması, hidrofobik ilaçlarla termodinamik açıdan kararlı taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasını kolaylaştırır⁶².

Hidrofilik blok olarak PEG kullanılan lineer dendritik blok kopolimerle (PEGlenmiş dendron temelli kopolimer) hazırlanmış misellerde KMK değerinin benzer

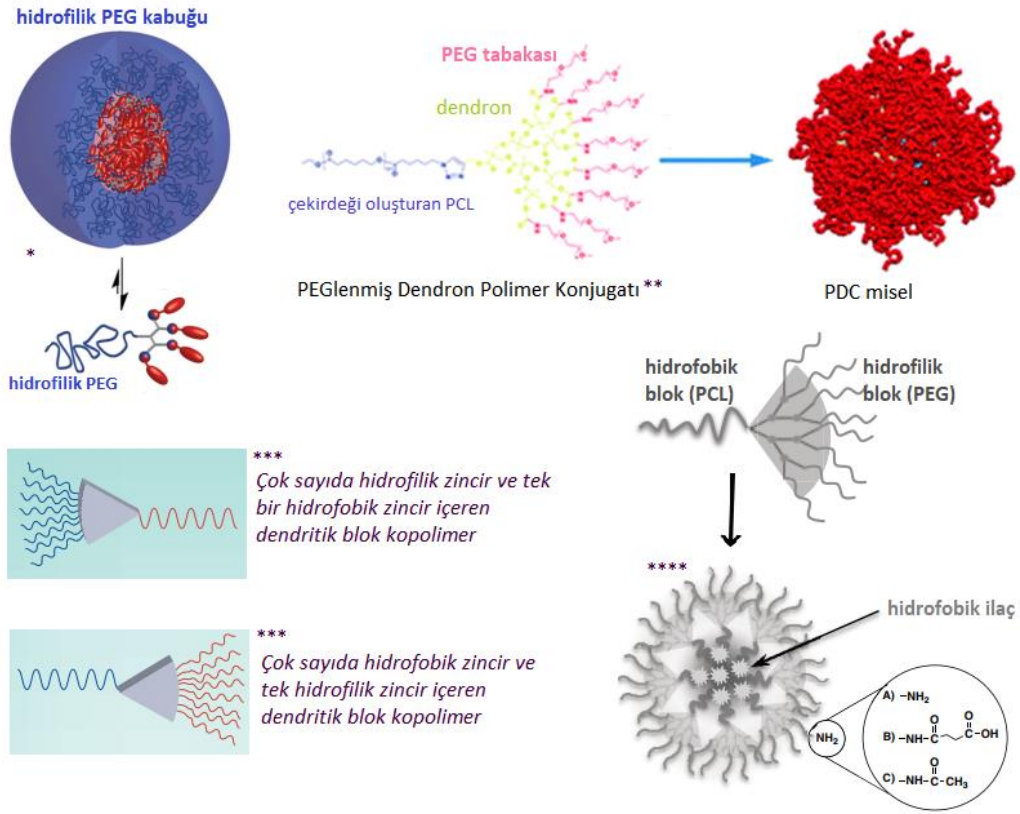
HLB değerine sahip lineer kopolimer temelli misellerdekine göre 10-100 kat daha düşük olduğu gösterilmiştir. Dendrondan kaynaklanan konik yapının, oluşan misellerin yapısını stabilize ettiği, böylece dendron temelli kopolimerlerle KMK değerleri ($\sim 10^{-8}$ M) düşük son derece kararlı sistemlerin hazırlanabildiği vurgulanmıştır^{47,313}.

Tek moleküllü misel yapısı sergileyen dendrimerlerin boyutunun enkapsülasyon ya da yüzey gruplarına konjugasyon yolu ile yüklenebilecek ilaç miktarını sınırlandıracağı göz önünde bulundurulduğunda, hibrit yapı olarak amfifilik karakterli dendritik polimer konjugatlarının tasarlanması ve böylece iç hacminde çok daha fazla ilaç molekülü yüklenebilecek kendiliğinden oluşan misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması umut verici bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Çünkü dendrimerlerde yükleme oranını arttırmak için dendrimer boyutunu büyütmek jenerasyon derecesini arttırmayı gerektirir ki bu yaklaşım ile dendrimer boyutunu arttırmak çok kolay değildir; yüksek jenerasyonda dendrimerlerin sentezi zor ve zaman alıcıdır, en önemlisi de dendrimer boyutu büyüdükçe, “iyi tanımlanmış” yapısında kusurlar görülmeye ve monodispers özellik kaybedilmeye başlanır. Amfifilik karakterli dendritik polimer konjugatlarının tasarlanması dendrimerlerde karşılaşılan bu probleme bir çözüm sağlar. Bu yaklaşımla, dendritik yapıların polimerler ile kombinasyonu sayesinde sulu ortamda nano boyutlu misel agregatları oluşturabilecek çok çeşitli ve kendine özgü amfifilik konjugatlar hazırlanabilir²⁸⁸.

Dendritik yapıların lineer blok kopolimerlerle hibridizasyonu sonucu elde edilen amfifilik karakterde farklı tip dendron temelli kopolimerlere; AB tipi hidrofilik dendron-hidrofobik polimer ya da tam tersi hidrofobik dendron-hidrofilik polimer blokları ile oluşturulan diblok dendron-polimer konjugatları ve ABA tipi dendron-polimer-dendron blokları ile oluşturulan amfifilik triblok konjugatları örnek verilebilir²⁸⁸.

Dikkate değer noktalardan biri olarak polimer-dendron konjugatlarının polyester yapısında biyoparçalanabilir dendritik yapılarla tasarlanması, hidrolizle parçalanabilen ester yapısı nedeniyle biyouyumlu ve biyoparçalanabilir taşıyıcı sistemlerin hazırlanması birçok biyomedikal uygulama açısından avantaj sağlaması yönü ile önemlidir³¹⁵⁻³¹⁷.

Nano ilaç taşıyıcı sistemler olarak literatürde kayıtlı bazı dendron temelli miselleri oluşturan amfifilik blok kopolimerlerin yapısı Şekil 2.15’te gösterilmektedir.



Şekil 2-20: Nano ilaç taşıyıcı sistemler olarak literatürde kayıtlı dendron temelli miseller ve misel agregatlarını oluşturan amfifilik blok kopolimerlere örnekler

*318 **313 ***47 ****62

PCL: poly-ε-caprolactone

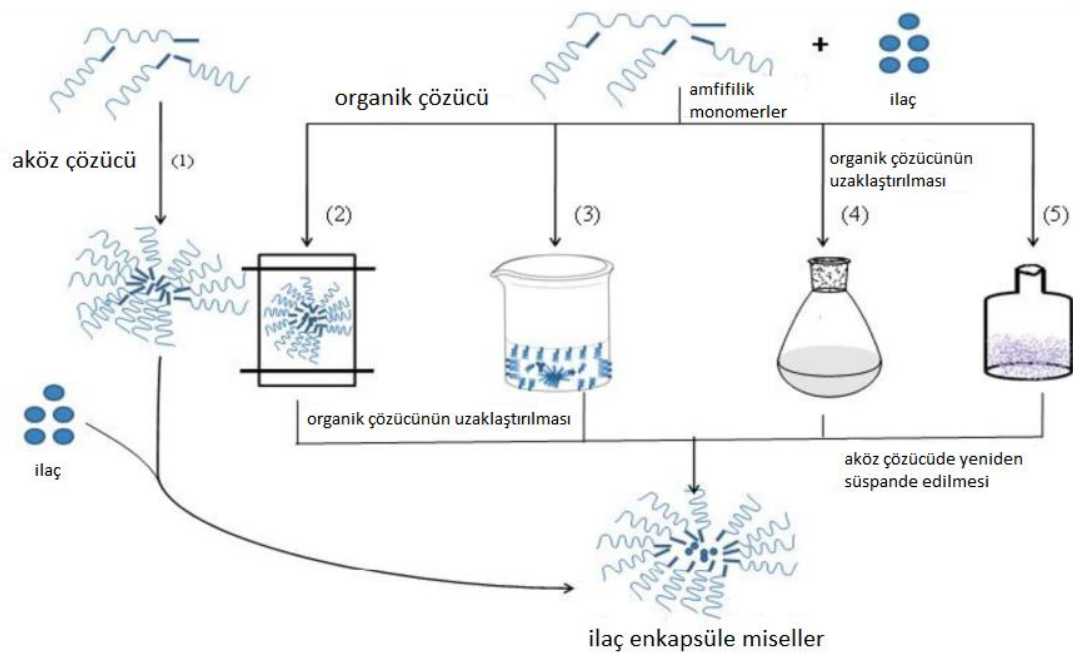
2.12.3. Misel Hazırlama Yöntemleri

Misellerin hazırlanmasına yönelik birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Uygun boyutta polimerik misellerin elde edebilmesi için iki ana strateji düşünülebilir^{131,319,320}. Birincisi, hem polimeri hem de ilacı sulu bir çözücü içinde doğrudan çözme yöntemidir. Bu yöntem ancak kullanılan kopolimer orta derecede hidrofobik ise tercih edilebilir. Doğrudan çözme kullanılan durumlarda çekirdeği oluşturan bloğun dehidrasyonu ile misel oluşumunu sağlamak için sulu çözücünün ısıtılması gerekebilir. Ayrıca ilacı misellere yüklemek için karıştırma ve/veya sonikasyon işlemi de gerekebilir³²¹⁻³²³.

İkincisi hem kopolimer hem de ilacın suda rahat çözünmediği durumlarda organik çözücülerin kullanımını gerektiren yöntemdir. Bu durumda, kopolimer ve ilaç ilk önce uygun bir organik çözücüde (N,N-dimetilformamit, dimetilsülfoksit, asetonitril, tetrahidrofuran, aseton veya dimetilasetamid gibi) çözündürülür, ardından çözücü

ortamdan uzaklaştırılır. Çözücünün ortamdan uzaklaştırılmasında farklı tekniklerden yararlanılabilir. Eğer çözücü su ile karışabiliyorsa organik çözücüyü yavaşça ortamdan uzaklaştırıp misel oluşumunu sağlamak için yerine sulu bir çözelti koymak üzere diyaliz yöntemi kullanılabilir^{324,325}. Endüstriyel ölçüde uygulamaya olanak vermese de literatürde ilaç yüklü polimerik misellerin suya karşı diyaliz etme yöntemi ile yaygın olarak hazırlandığı görülmektedir. Çözücünün su ile karışmadığı durumlarda (ör, diklorometan) ise su içinde yağ emülsiyonu yöntemi kullanılarak ilaç miseller içinde enkapsüle edilebilir³²⁶.

Alternatif olarak, misel oluşumunu sağlamak için solvan evaporasyon yöntemi kullanılabilir. Solvan evaporasyon iki farklı yöntem ile gerçekleştirilebilir. Organik bir çözücüde hem polimer hem de ilaç çözündürüldükten sonra ya damla damla sulu çözücüye ilave edilir ve doğrudan kosolvan olarak kullanılan çözücünün ortam koşullarında buharlaşmasına izin verilerek veya rotaevaporatör kullanılarak vakumla ortamdan uzaklaşması sağlanır (kosolvan evaporasyon)^{13,327}; ya da çözücü döküm (*solvent casting*) tekniği kullanılarak ilk önce ilaç moleküllerinin homojen dağıldığı ve iyi bir polimer-ilac etkileşiminin olduğu polimerik film oluşturulur, ardından bu filmin belli bir sıcaklıkta sulu bir çözücü ile hidrasyonu sonucu misel oluşumu sağlanır^{328,329}.



Şekil 2-21: (1) Basit çözündürme (2) Diyaliz (3) Yağ/Su emülsiyon (4) Solvan evaporasyon (5) Liyofilizasyon

Ayrıca liyofilizasyon yöntemi ile de miseller hazırlanabilir. Bu yöntemde kopolimer ve ilaç su ve organik çözücü karışımında çözündürüldükten sonra dondurularak kurutulur, sonrasında sulu ortamda ilaç yüklü miseller olarak tekrar geri kazanılır³³⁰. Misel hazırlama yöntemleri Şekil 2.21’de özetlenmiştir³²⁰.

Hazırlama yöntemi oluşan misellerin partikül boyutu ve dağılımını etkiler. Örneğin bir çalışmada polimerik miselleri hazırlamak için kosolvan evaporasyon yöntemi kullanıldığında daha küçük ve daha homojen dağılımlı (polidispersite indeksi=0,07) miseller oluşurken, diyaliz yöntemi kullanıldığında daha büyük ve heterojen dağılımlı (polidispersite indeksi=0,27) misellerin olduğu gözlenmiştir³³¹. Ayrıca seçilen organik çözücünün ilaç yükleme etkinliği gibi misellerin enkapsülasyon özelliklerini etkilediği³³²; kullanılan su/organik çözücü oranının da ilaç yükleme etkinliği, boyut ve stabilite parametreleri üzerinde etkili^{333,334} olduğu bilinmektedir.

2.12.4. Polimerik Misel Nanotaşıyıcıları ile Dermal Uygulamaya Yönelik Yaklaşımlar

Derinin en üst tabakası olan *stratum corneum*, topikal uygulanan ilaçların derinin hedef bölgesine etkili bir şekilde ulaşması için aşmaları gereken en önemli engeldir⁸⁷. Özellikle logP değeri deriden penetrasyon için ideal kabul edilen ($1 < \log P < 3$) değerlerin dışında olan ilaç moleküllerinin deri tabakalarını etkin şekilde geçebilmesi için uygulanan formülasyonda penetrasyon arttırıcı kullanımını gerektirir⁶². Örneğin etanol, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yardımcı maddeler çok sık kullanılan penetrasyon arttırıcılardır³³⁵. Ancak bunların penetrasyon arttırıcı etkinliklerine bağlı olarak deriyi kurutması ve/veya *stratum corneum* lipidlerini bozması sebebi ile sıklıkla önemli derecede iritasyon ve başka bazı yan etkilere sebep olduğu literatürde kayıtlıdır^{40,335}. Bu problemin üstesinden gelmek için potansiyel polimerik penetrasyon arttırıcıları olarak dermal uygulamalarda polimerik misel taşıyıcı sistemlerinin kullanılmasının çözüm olabileceği görülmektedir^{134,185,336,337}. Dendron temelli miseller veya diğer polimerik miseller gibi hidrofilik karakterli nanotaşıyıcılarla hem hidrofobik suda güç çözünen ya da çözünmeyen ilaçların çözünürlükleri arttırılabilir²⁸⁸ hem de bu ilaçların deriden penetrasyonları iyileştirilebilir ve/veya derinin hedef bölgesindeki birikimleri arttırılabilir; böylece formülasyonlarda istenmeyen yan etkilere neden olabilen yardımcı çözücü kullanımı ihtiyacı en aza indirilebilir ve deride etki beklenen bölgede lokalizasyon

sağlanarak ilaçların transdermal permeasyonu ile sistemik dolaşıma gereksiz katılımı önlenir¹³.

Dendron temelli misellerin dermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak incelendiği çalışmalardan birinde; çekirdeği oluşturan hidrofobik blok olarak poli-ε-kaprolakton (PCL) ile dallarına PEG zincirleri bağlanan polyester dendron (G3) yapısının kombinasyonu ile elde edilen diblok dendritik kopolimer kullanılarak endoksifen yüklü dendron miseller hazırlanmış ve misellerin, oral alındığında ciddi yan etkilere yol açan endoksifen molekülünün deriden penetasyonunu artırma ve derinin hedef tabakalarında lokalizasyonunu sağlamadaki performansları değerlendirilmiştir. Dendron misellerin endoksifeni *in vitro* çalışmalarda 6 günden daha uzun sürede kontrollü olarak saldığı saptanmıştır. Ayrıca kontrol olarak kullanılan endoksifenin etanoldeki çözeltisine göre dendron misellerin insan derisi örneklerinden endoksifenin permeasyonunu 4 kata kadar arttırdıkları gösterilmiştir. Hazırlanan dendron misellerin endoksifenin potansiyel bir alternatif uygulama yolu ile, topikal olarak uygulanması için uygun taşıyıcı sistemler oldukları belirtilmiştir⁶².

2.13. Yarı Katı Farmasötik Dozaj Şekillerinden Jeller Hakkında Genel Bilgiler

Jeller, çoğunlukla küçük veya büyük organik moleküllerin su bazlı sıvı bir çözücüdeki dispersiyonlarına bir jelleştirme ajanı/jel yapıcı maddenin eklenmesiyle jölemsi özellik kazanan şeffaf ya da opak görünümlü tek fazlı yarı katı preparatlardır. USP’de ise jeller, organik büyük moleküllerin sıvı fazda tamamen çözünmesi ile oluşan ya da inorganik küçük moleküllerin sıvı fazda süspande halde bulunduğu yarı katı preparatlar olarak tanımlanmaktadır.

Jeller tek veya iki fazlı sistemler olarak sınıflandırılabilirler. Sıvı fazda tamamen çözünmüş organik moleküllerden oluşan jeller tek fazlı sistemlerdir (karbomerler veya kitre zımkı içeren jeller). Tek fazlı jellerde organik moleküller çözücü içerisinde düzensiz zincirler şeklinde bulunur. Uygulama, kullanım ve temizleme kolaylığı sağladıkları için hem ilaç hem de kozmetik sektöründe sıklıkla kullanılırlar. İki fazlı jellerde, inorganik küçük moleküller çözünmedikleri sıvı faz içinde dispers halde bulunurlar.

Jeller hazırlama sırasında kullanılan çözücünün kimyasal yapısına göre sınıflandırıldığında ise hidrojel ve organojel olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Hidrojeller, su içeren ortamlarda şişen polimerlerle hazırlanan yarı katı sistemlerdir. Bu polimerler suyu absorbe eden hidrofilik matrisler olarak anılır. Karbopoller, selüloz eterler (metil selüloz, hidroksi propil selüloz, hidroksi propil metil selüloz gibi), sodyum aljinat, doğal zamklar hidrojel formülasyonlarında sıklıkla kullanılan polimerler arasındadır.

Organojeller ise, sıvı bileşen olarak su dışında bir organik çözücü ile jel yapıcı maddeden oluşmuş yarı katı sistemlerdir. Organojel formülasyonlarına çeşitli yağ asitleri, yüzey etkin maddeler, alkoller, üre, terpenler, glikoller gibi permeasyon arttırıcılar ilave edilebilmektedir. Topikal ve transdermal uygulamada en sık karşılan organojeller lesitin organojelleridir³³⁸.

Jelleştirici madde ve su içeriği dışında, jeller, bir etken madde, alkol ve/veya propilen glikol gibi çözücüler, metilparaben ve propilparaben veya klorheksidin glukonat gibi antimikrobiyal koruyucu maddeler ve edetat disodyum gibi stabilizatörler ilave edilerek formüle edilebilir³³⁹.

Kullanılan jelleştirici maddeler arasında, karbomer 934 gibi sentetik makromoleküller; karboksimetilselüloz veya hidroksipropil metilselüloz gibi selüloz türevleri ve kitre zımkı gibi doğal zamklar yer alır. Jelleştirici madde uygun çözücü ortamında üç boyutlu koloidal bir ağ yapısı oluşturur. Bu ağ yapısı jelin viskoelastik özelliklerini belirler³⁴⁰.

Karbomerler, yüksek moleküler ağırlıklı suda çözünen; sukroz ve/veya pentaeritritolün allil eterleri ile çapraz bağlanmış akrilik asit yapısında polimerlerdir. Viskoziteleri, polimerik kompozisyonlarına bağlıdır. Çeşitli formüller ve farmakopelerde kayıtlı (910, 934, 934P, 940, 941, 1342 vb) farklı tip karbomer monografları mevcuttur. Suda %0,5-2,0 konsantrasyonlarda jelleştirici maddeler olarak kullanılırlar. Örneğin, Karbomer 940'in %0,5'lik konsantrasyonda hazırlanan sulu dispersiyonlarında 40,000 ila 60,000 centipoise (cP) arasında viskozite değerlerine ulaşılmaktadır³³⁹.

Jeller üzerlerinde bir kuvvet uygulanmazken bekleme sırasında kalınlaşabilir, yani viskozite artarak kıvam koyulaşabilir. Jellerde görülebilen bu özellik, tiksotropi olarak adlandırılmaktadır, bu tip jeller uygulama kolaylığı için uygulanmadan önce çalkalanmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalar İngiltere’de Bath Üniversitesi Eczacılık ve Farmakoloji Bölümü öğretim üyesi, aynı zamanda ikinci tez danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Richard H. Guy ve Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Rana Sanyal ile işbirliği yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Model olarak seçilen adapalen molekülünün dendritik nanotaşıyıcı sistemlerden PAMAM dendrimerler ve dendron temelli misellere yüklenmesi, hazırlanan bu nanotaşıyıcıların optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmalarının önemli bir kısmı ve ayrıca adapalenin dendron temelli yapılara kovalan bağlı bulunduğu konjugatlar (PDC-ADA) ile misel formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu çalışmaları İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde yürütülmüştür. Adapalenin enkapsülasyon tekniği ile dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında kullanılan üçüncü jenerasyon (G3) polyester dendron-polimer konjugat (PDC) yapılarının sentez ve karakterizasyon çalışmaları ile adapalenin kovalan konjugasyon tekniği ile dendron dallarına bağlanmasını kapsayan PDC-ADA yapısının sentez ve karakterizasyon çalışmaları Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından gerçekleştirilmiştir. Adapalen yüklü PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının TEM görüntüleri Bath Üniversitesi Mikroskopi ve Analiz Birimi’nde yapılan analizler ile elde edilmiştir. Seçilen PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının topikal uygulamaya yönelik jel formülasyonlarının hazırlanması, dendritik sulu koloidal nanotaşıyıcılar ve bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarından adapalenin deriden penetrasyonunun ve kıl folikülerinde birikiminin kantitatif olarak ticari orijinal ürün (Differin®Jel) ile karşılaştırılmalı olarak *punch* biyopsi tekniği ile değerlendirilmesi çalışmaları İngiltere’de Bath Üniversitesi Eczacılık ve Farmakoloji Bölümü’nde Sayın Prof. Dr. Richard H. Guy’ın araştırma laboratuvarında yürütülmüştür. Nanotaşıyıcıların derideki penetrasyon derinliğinin ve kıl foliküllerindeki birikiminin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi çalışmaları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)’nde yapılan analizler ile elde edilmiştir. PDC-ADA yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ile adapalenin penetrasyonunun ve kıl folikülerinde birikiminin *punch* biyopsi tekniği ile değerlendirilmesi, PDC-ADA yapısı ve PDC-ADA yapısından serbestleşen adapalenin *stratum corneum* ve canlı *epidermis/dermis*’teki

lokalizasyonunun bantla soyuma tekniği kullanılarak incelenmesi çalışmaları İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yürütülmüştür.

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kimyasal Maddeler

- 1,2-Propandiol diasetat, PGDA (Merck)
- Adapalen (Sigma-Aldrich)
- Asetonitril (HPLC grade) (Merck)
- Bovin serum albumin, BSA, (Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit, DMSO (Sigma-Aldrich)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Merck)
- Domuz karaciğer esterazı (Porcine liver esterase, PLE) (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Floresein izotiyosiyanat (Sigma-Aldrich)
- Hidroksipropil selüloz, HPC (M_A : 1,000,000) (Sigma-Aldrich)
- Metanol (HPLC grade) (Merck)
- N,N-Dimetilformamid (Merck)
- Nil Kırmızısı (Sigma-Aldrich)
- PAMAM dendrimer (Poli(amido)amin)- NH_2 , (İkinci jenerasyon etilendiamin çekirdekli, amin yüzey gruplu %20'lik metanol çözeltisinde, a/a) (Sigma 412406-5G)
- Polietilen glikol 400 (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Merck)
- Potasyum klorür (Lachema)
- Sodyum klorür (Riedel de Haen)
- Tetrahidrofuran (HPLC grade) (Merck)
- Trifluoroasetik asit (Sigma-Aldrich)

- Tween 80 (Polietilen Glikol Sorbitan Monooleat) (Sigma-Aldrich)
- Ultra saf su, 25 °C'de 18.2 MΩ cm (Millipore Milli-Q)
- Uranil asetat (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Cihaz ve Malzemeler

3.1.2.1. Cihazlar

- ATR-FTIR Spektrum cihazı (Perkin Elmer ZnSe Spectrum One)
- Dijital reometre (Malvern-Bohlin Instruments C-VOR)
- Dijital pH metre (InoLab pH 720, WTW)
- Franz difüzyon hücreleri (PermeGear 25 mm çap, 1,77 cm² difüzyon alanı, 12 ml reseptör hacmi, V6A Stirrer)
- Hassas terazi (Sartorius CPA2P Microbalance)
- Hassas terazi (Sartorius Analytical Balance ENTRIS v224-1S)
- HPLC Kolonu (HiQ sil C18HS (5 µm) 4,6 mm x 150 mm, Kromatek, UK)
- HPLC Kolonu (LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART 4,6 x 150 mm, Merck, Germany)
- Isıticılı manyetik karıştırıcı (IKA-Werke, RT15)
- Konfokal lazer mikroskobu (Leica TCS SPE).
- Kriyotom cihazı (Thermo Scientific™ Cryotome™)
- Nüçe erleni süzme sistemi (Sartorius D-3400)
- Optik mikroskop (Motic BA210, 3W LED, EF-N Plan 4X objektif, Moticom 5.0 MP dijital kamera)
- Orbital çalkalayıcı (IKA, KS 501)
- Partikül boyutu ölçüm aleti (Malvern Zetasizer-Nano ZS, UK)
- pH metre (EuTech Instruments, PC 2700)
- Reometre (Thermo Scientific HAAKE RS1)
- Rota evaporatör (Rota evaporator Büchi R-210)

- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R)
- Santrifüj (Boeco, U-320, Type 1605-13)
- Santrifüj (Hettich, D-7200, Type 2041)
- Transmisyon elektron mikroskobu (TEM JEM-1011)
- Ultra saf su arıtma cihazı (Millipore Milli-Q Integral, Merck)
- Ultrasonik banyo (Bersonik)
- Ultrasonik prob (Branson Sonifier® 250, 200 watt, 20 kHz, 3 mm çap)
- Ultrasonik prob (Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap)
- Vakumlu desikatör
- Vorteks (IKA® Vortex Genius 3)
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, HPLC sistemi (Shimadzu LC 20AT) ve floresans dedektörü (Shimadzu RF-20A)

3.1.2.2. Malzemeler

- %70 izopropil alkol içeren ıslak mendil (FASTAID⁺ Pre-Injection swabs, 70% IPA alcohol, Robinson Healthcare)
- Biyopsi punch, 1 mm (Integra Miltex® Sterile Disposable Biopsy Punch)
- Bisturi
- Cam malzeme (Beher, Erlen, Mezür, Cam şişe, Lam, Cam viyaller, Balon joje, Petri kutusu vb.)
- Cerrahi makas
- Diyaliz membran (Dialysis tubing regenerated cellulose membrane (MWCO: 1000 Da) (SpectroPor, USA)
- Diyaliz membran (Dialysis tubing regenerated cellulose membrane (MWCO: 2000 Da) (SpectroPor, USA)
- Diyaliz membran (Dialysis tubing regenerated cellulose membrane (MWCO: 3500 Da) (SpectroPor, USA)
- Domuz derisi (abdominal kısmı)

- Amber renkli cam viyal, 4 ml (Fisherbrand™)
- HPLC viyalleri ve kapakları
- Manyetik balık, 8*3 mm (Superior)
- Otomatik mikropipet (100-1000 µl) ve pipet uçları (Eppendorf Research® Plus)
- Tek kullanımlık polistiren küveti (Fisherbrand™)
- Vivaspin 6 MW cut-off 3000 (Sartorius Centrifugal Concentrator)
- Yapışkan Bant (Scotch 845 Book Tape) (3M)
- Zeta potansiyel ölçüm hücresi (Folded Capillary Cell) (Malvern)
- 0,20 µm şırınga ucu filtre (PTFE) (Sartorius)
- 0,45 µm membran filtre (HVHP) (Millipore)
- 0,45 µm şırınga ucu filtre (Millex®-LH) (PTFE) (Millipore)
- Mikrosantrifüj tüpü (1,5 ve 2 ml) (Eppendorf)
- pH indikatör kağıtları (Fisherbrand™)
- pH indikatör kağıtları (MColorpHast™) (Merck Millipore)

3.1.3. Bilgisayar Programları

- GraphPad Prism 5
- Microsoft Office Excel 2016
- Microsoft Office Word 2016

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Analiz Yöntemi Geliştirme Çalışmaları

Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan örneklerdeki adapalen (ADA) içeriğinin kantitatif analizinde kullanılmak üzere, literatürde kayıtlı³⁷ yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yönteminin üzerinde geliştirme ve optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Geliştirilen HPLC yöntemi; adapalenin farklı ortamlardaki çözünürlüğünün belirlenmesinde, G2 PAMAM dendrimer ve G3 polyester dendron-polimer konjugatları (PDC) ile hazırlanan adapalen yüklü nanotaşıyıcıların yükleme etkinliği ile yükleme oranlarının saptanmasında, stabilite çalışmalarında, etken maddenin derideki birikiminin değerlendirildiği *in vitro* penetrasyon çalışmalarında örneklerde bulunan adapalenin miktar tayini analizlerinde kullanıldı.

HPLC analizlerinde standartların hazırlanacağı çözününün belirlenmesi için; ileride yapılacak *in vitro* penetrasyon çalışmaları dikkate alındı. Bu amaçla; etken maddenin deriden ekstraksiyonu işleminde kullanılabilecek farklı çözücü sistemleri (mobil faz olan asetonitril/tetrahidrofuran/su/trifloroasetik asit (43/36/21/0,02) (h/h/h/h) karışımı, metanol/asetonitril/tetrahidrofuran (20/45/35) (h/h/h/h) karışımı, asetonitril/tetrahidrofuran (70/30) (h/h) karışımı, asetonitril/tetrahidrofuran (60/40) (h/h) karışımı, asetonitril/dimetilformamit (60/40) (h/h) karışımında adapalenin çözünürlüğü incelendi. Bu çalışmalar ile; HPLC kromatogramlarında *in vitro* penetrasyon çalışmalarında kullanılacak domuz derisinden kaynaklanan pikler ile adapalen pikinin birbirinden net şekilde ayrılması dikkate alınarak, adapalenin alıkonma zamanı ile herhangi bir girişim saptanmayan en uygun ekstraksiyon çözücüsü belirlenmek üzere farklı çözücü sistemleri denendi.

Deri tabakalarında biriken düşük miktarlardaki etken maddeyi güvenilir bir şekilde ve uygun bir pik keskinliği ile saptamayı sağlayacak enjeksiyon hacmi belirlenerek, mobil fazın akış hızı da optimize edildi.

Optimize edilen HPLC yöntemi; Yöntem 3.2.15'te anlatıldığı gibi hazırlanan dendron temelli nanotaşıyıcılara kovalan bağlanan adapalenin, PDC-ADA yapısından *in vitro* koşullarda pH 5,5 fosfat tamponu çözeltisi (PBS, *phosphate buffer solution*) ortamında adapalenin miktar tayini için kullanıldı. Bu analizler için standartlar çözücü olarak, *in vitro* salım çalışmaları sırasında sink koşulu sağlayacak şekilde seçilen reseptör ortamında hazırlandı.

3.2.1.1. Hareketli Fazın Hazırlanması

Analizlerde hareketli faz olarak asetonitril/tetrahidrofuran/su/trifloroasetik asit (43/36/21/0,02) (h/h/h/h) çözücü sistemi kullanıldı. Analiz öncesi hareketli faz önce membran filtreden (0,45 µm, HVHP, Millipore) vakum uygulanarak süzüldü ve 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu.

3.2.1.2. Kromatografik Koşullar

Adapalen analizinde floresan detektörlü bir HPLC sistemi ($\lambda_{\text{abs}} = 320 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$) (Shimadzu) ve ters faz sıvı kromatografisi prensibi ile HPLC kolonu kullanıldı (HiQ Sil C18HS, 5 μm , 4,6 mm x 150 mm, Kromatek, UK). 0,9 ml/dk akış hızı, 20 μl enjeksiyon hacmi, 30 °C kolon sıcaklığının sağlandığı kromatografik koşullarda çalışıldı.

3.2.1.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

In vitro deriden penetrasyon çalışmaları, çözünürlük çalışmaları ve nanotaşıyıcılara ilaç yükleme etkinliği çalışmalarında, örneklerdeki adapalen miktarının saptanması için standart çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak asetonitril/dimetilformamit (ACN/DMF) (60:40) (h/h) kullanıldı. Standart kalibrasyon doğrusunun oluşturulması için hassas terazide tartılan adapalen asetonitril/dimetilformamit (ACN/DMF) (60:40) (h/h) çözücü karışımında vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü, ultrasonik banyoda bekletildi ve balon jojede gerekli hacme tamamlanarak stok çözelti (40 $\mu\text{g/ml}$) hazırlandı. Ardından aynı çözücü karışımı ile uygun seyreltmeler yapılarak ara stok (1 $\mu\text{g/ml}$) ve ara stok çözeltisinden de 1-1000 ng/ml konsantrasyon aralığında bir seri standart çözelti hazırlandı.

PDC-ADA yapısından adapalenin *in vitro* salım çalışmalarındaki örneklerdeki analizi için kullanılacak standart çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak, reseptör ortamı olan pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi kullanıldı. Standart kalibrasyon doğrusunun oluşturulması için, hassas terazide tartılan adapalen pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisinde çözündürülerek stok çözelti (1 $\mu\text{g/ml}$) hazırlandı. Uygun seyreltmeler yapılarak 25-500 ng/ml konsantrasyon aralığında bir seri standart çözelti hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltiler şırınga ucu filtreden (0,45 μm , 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) süzildükten sonra optimize edilen HPLC yöntemi ile analiz edildi. Her konsantrasyon için üç paralel örnek ile çalışıldı.

3.2.2. Adapalenin HPLC Analiz Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, bir analitik yöntemin belirlenen amaca hizmet ettiğini ve izlenen prosedürün kabul edilebilirliğini/uygunluğunu göstermek amacı ile yapılan, yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmalarını kapsayan işlemlerin bütünü olarak tanımlanır³⁴¹.

Geliştirilen miktar tayini yönteminin güvenilirliğini kanıtlamak için ilgili ICH kılavuzu doğrultusunda HPLC yönteminin validasyon çalışması yapıldı. Bu kapsamda; seçicilik (*specificity*), doğrusallık (*linearity*), doğruluk (*accuracy*), kesinlik (*precision*), teşhis limiti (*detection limit*) ve miktar tayini limiti (*quantitation limit*) tespiti için gereken testler yapılarak analizlerde kullanılan miktar tayini yönteminin geçerliliği doğrulandı³⁴².

Standartların hazırlanmasında Yöntem 3.2.1.3'te bahsedildiği gibi farklı çözücü ortamları kullanıldığı için iki farklı çözücü ortamında hazırlanan standartlarla ayrı ayrı validasyon çalışması yapıldı.

3.2.2.1. Seçicilik

Seçicilik, kullanılan yöntem ile bir analiti özgün bir şekilde belirleyebilme, analiz sırasında girişim yapma olasılığı olan diğer bileşenlerden (safsızlık, kirlilik, degradasyon/parçalanma ürünleri, yardımcı maddeler gibi) açık bir şekilde ayırabilme yeteneğidir³⁴³.

Optimize edilen HPLC analiz yönteminin seçiciliğinin değerlendirilmesi için bir seri çalışma yapıldı. Adapalen yüklenmemiş boş nanotaşıyıcı sistemler; nanotaşıyıcıların hazırlanmasında kullanılan her bir bileşen (PAMAM dendrimer, PDC ile yardımcı formülasyon bileşenleri); çözünürlük çalışmaları sırasında kullanılan etanol, polietilen glikol sorbitan monooleat (Tween 80), polietilen glikol 400 (PEG 400), sıgır serum albümini (BSA) ve DMSO; *in vitro* penetrasyon çalışmalarında kullanılan domuz derisi; bantla soyma (*tape stripping*) işleminde kullanılan yapışkan bant; örneklerin hazırlanmasında kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ile mobil faz kaynaklı olası piklerin, HPLC kromatogramında adapalenin alıkonma zamanında gelip gelmediği incelendi. Böylece kromatogramda adapalen piki ile girişim yapıp yapmadıklarını belirlendi. Yukarıda belirtilen bileşenlerin ekstraksiyon işleminde kullanılan ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan örnekleri ve mobil faz adapalen ilave edilmeden ayrı ayrı kolona enjekte edilerek HPLC yöntemi ile analiz edildi.

Bantla soyma (*tape stripping*) işlemine özgü olarak ekstraksiyon çözeltisi ile kör hazırlarken bantla soyma prosedüründe uygulanan işlemler aynı şekilde yapıldı, etken madde uygulanmamış deri örneği bant ile soyuldu. Soyma işleminde kullanılan bantlar (*tape*) ve ayrıca domuz derisi örnekleri ACN/DMF (60:40) (h/h) yöntem 3.2.14.3'te anlatıldığı gibi ekstraksiyon işlemine tabi tutularak örnekler hazırlandı ve analiz edildi.

PDC-ADA yapısından adapalenin *in vitro* salım çalışmalarında hazırlanan örnekler için yöntemin seçiciliği de incelendi. Bu amaçla, *in vitro* salım ortamından (pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)) gelen olası piklerin, kromatogramda adapalen piki ile girişim yapıp yapmadıklarını belirlemek üzere, salım ortamına adapalen ilave edilmeksizin hazırlanan örnekler HPLC yöntemi ile analiz edildi.

Hazırlanan bütün örnekler, şırınga ucu filtre (0,45 μ m, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzüldü. Adapalenin alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik olmadığını doğrulandı.

3.2.2.2. Doğrusallık

Analitik bir yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta örneklerdeki analit konsantrasyonları ile test sonuçlarının doğru orantılı elde edilebilmesidir³⁴³.

Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü ortamında hazırlanan çözeltileri için standart doğrunun oluşturulmasında; 1; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 1000 ng/ml konsantrasyonlarda standart çözelti serisi hazırlandı.

Adapalenin reseptör ortamında (pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)) hazırlanan çözeltileri için standart doğrunun oluşturulmasında; 25; 50; 100; 250; 500 ng/ml konsantrasyonlarda standart çözelti serisi hazırlandı.

Hazırlanan örnekler Yöntem 3.2.1.2’de belirtilen koşullarda analiz edildi. Her bir konsantrasyona karşılık gelen eğri altında kalan alan (AUC) değerleri ile kalibrasyon doğrusu çizildi ve regresyon analizi yapıldı, doğru denklemi oluşturularak determinasyon katsayısı (r^2) hesaplandı.

3.2.2.3. Kesinlik

Kesinlik, önceden belirlenen koşullar altında uygulanan analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini gösterir. Belirli çalışma koşullarında hazırlanan aynı örnek çözeltisinden birden fazla seyreltme ile elde edilen bir serinin ölçümleri arasındaki yakınlığı ifade eder³⁴². Ölçüm serilerinin yakınlığı genellikle standart sapma (SD) veya yüzde bağıl standart sapma (% RSD) olarak ifade edilir. Yöntemin kesinliği için kabul kriteri, RSD değerinin %2 ’den küçük olmasıdır³⁴³.

Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için, yöntemde geçerli aralığı kapsayan en az 9 tespit (her biri 3 kez tekrarlanan 3 farklı konsantrasyon) ya da seçilen test konsantrasyonunun %100 ü alınarak en az 6 tespit yapılması önerilir^{342,343}.

HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğini göstermek için; ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon ortamında ve reseptör ortamında (pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)) hazırlanan örnekler için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapıldı. Her seviyede en az 3 er seri ile çalışıldı ve her örnek için en az üç enjeksiyon yapıldı. Her bir konsantrasyon için elde edilen değerlerin ortalaması alınarak standart doğru çizildi, regresyon doğrusu denklemi oluşturularak determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SD) ve yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplandı.

Gün içi kesinlik: Adapalenin 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri için gerçekleştirilen HPLC analizi aynı gün içerisinde 3 kez tekrarlandı. Bunun için stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda 3 ayrı seri örnek hazırlandı.

Günler arası kesinlik: 3 farklı konsantrasyon için gerçekleştirilen HPLC analizinin farklı günlerde tekrarlanması ile elde edilen 3 farklı konsantrasyon için 3 farklı güne ait sonuçlar değerlendirildi.

3.2.2.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntem ile test edilen örneklerden elde edilen değerlerin gerçek değere veya referans kabul edilen değere yakınlığını ifade eder. Bu amaç ile uygulanan, örneğin, bilinen miktarda analitin geri kazanılması yöntemi analitin boş matris ortamına dışarıdan ilave edilmesi ve geri kazanımının bulunması prensibine dayanır. Analit için geri kazanma değerleri hesaplanarak yöntemin doğruluğu saptanır. Hazırlanan örneklerde geri kazanım çalışmaları hedef konsantrasyonun %50-150'sini kapsayan aralıkta ya da doğrusallığın sağlandığı aralıkta düşük, orta ve yüksek bölgelerden seçilen en az 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrar ile yapılır. Geri kazanımın hesaplanmasında, referans alınan analizde oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait denklem kullanılmalıdır³⁴².

HPLC yönteminin doğruluğunun değerlendirilmesi için; adapalenin 1000 ng/ml konsantrasyonda ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan stok çözeltisinden 25, 50 ve 500 µl hacimde alındı, üzerlerine nanotaşıyıcılarında kullanılan yardımcı maddelerden

(PAMAM dendrimer veya PDC) en yüksek oranda olacak şekilde ilave edildi. Polimerler öncelikle 1 ml suda çözündürülerek stok çözeltileri hazırlandı ve farklı konsantrasyondaki adapalen çözeltilerine 10 µl ilave edildi. Ekstraksiyon çözücüsü ile 1000 µl e tamamlanarak üç farklı konsantrasyonda (25; 50 ve 500 ng/ml) adapalen içeren örnekler hazırlandı ve şırınga ucu filtreden (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) süzüldü. HPLC yöntemi ile analizi yapılarak çözeltilerdeki adapalen konsantrasyonları hesaplandı. Geliştirilen yöntemin doğruluğu adapalenin % geri kazanım değerleri hesaplanarak belirlendi. Her seviyede en az 3'er ölçüm yapıldı.

In vitro salım ortamında (pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)) hazırlanan örnekler için doğruluk çalışması yapılmadı. Bu örneklerde diyaliz membrandan (MWCO: 2000 Da, SpectroPor, USA) sadece serbest adapalen (412,5 Da) difüze olabileceği, dolayısı ile örnkelerde sadece adapalen bulunacağı dikkate alındı.

3.2.2.5. Teşhis Limiti, TL (*Limit of Detection, LOD*)

Analitik bir yöntemin teşhis limiti, bir örnekteki analitin analiz edilebilen ancak hassas olarak tam değeri ölçülemeyen en düşük miktardır. Bu değerin belirlenmesinde farklı yaklaşımlardan faydalanılabilir³⁴².

Görsel olarak değerlendirme: Analitin bilinen düşük konsantrasyonlu örneklerinde yapılan analizler sonucu güvenilir şekilde saptanabilecek belirgin en küçük konsantrasyon değeri tespit edilir.

Sinyal/Gürültü oranı: Analitin bilinen düşük konsantrasyonlu örneklerinde yapılan analizlerde ölçülen sinyallerin boş örneklerden gelen gürültü ile karşılaştırılmasına ve analitin güvenilir şekilde teşhis edilebileceği en küçük konsantrasyonun belirlenmesine dayanır. 3 veya 2:1 arasındaki bir sinyal/gürültü oranı genellikle teşhis limiti için kabul edilir.

Cevabın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile hesaplama: Aşağıdaki formül kullanılarak teşhis limiti hesaplanabilir.

$$TL = (3,3 \sigma) / S \quad (3-1)$$

σ = Cevabın standart sapması (Boş örneklerden alınan cevapların ya da teşhis limiti seviyesinde çok düşük konsantrasyonlarda hazırlanan örnek serilerinin analizi sonucu elde edilen regresyon doğrularında kesişim değerlerinin standart sapması)

S = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.2.6. Miktar Tayini Limiti, MTL (*Limit of Quantitation, LOQ*)

Analitik bir yöntemin miktar tayini limiti ise, bir örnekteki analitin uygun hassasiyetle, kabul edilebilir bir kesinlik ve doğruluk ile, nicel olarak saptanabilen en düşük miktardır³⁴².

Görsel olarak değerlendirme: Analitin bilinen düşük konsantrasyonlu örneklerinde yapılan analizler sonucu kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle nicel olarak tayin edilebilecek en küçük konsantrasyon değeri tespit edilir.

Sinyal/Gürültü oranı: Analitin bilinen düşük konsantrasyonlu örneklerinde yapılan analizlerde ölçülen sinyallerin boş örneklerden gelen gürültü ile karşılaştırılmasına ve analitin güvenilir şekilde ölçülebileceği en küçük konsantrasyonun belirlenmesine dayanır. 10:1 sinyal/gürültü oranı genellikle miktar tayini limiti için kabul edilir.

Cevabın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile hesaplama: Aşağıdaki formül kullanılarak miktar tayini limiti hesaplanabilir.

$$MTL = (10 \sigma) / S \quad (3-2)$$

σ = Cevabın standart sapması (Boş örneklerden alınan cevapların ya da teşhis limiti seviyesinde çok düşük konsantrasyonlarda hazırlanan örnek serilerinin analizi sonucu elde edilen regresyon doğrularında kesişim değerlerinin standart sapması)

S = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

HPLC yönteminin teşhis ve miktar tayin limiti için; teşhis limiti seviyesinde en az 3 kalibrasyon doğrusu çizilerek oluşturulan doğru denklemi eğimlerinin ortalaması ve kesişim noktalarına ait değerlerin standart sapması (SD) kullanıldı ve formüller (3-1 ve 3-2) ile hesaplanarak belirlendi. Ayrıca, düşük konsantrasyonda adapalen içeren örneklerin HPLC analizi sonucu elde edilen sinyal, boş çözeltiden elde edilen gürültü ile karşılaştırılarak güvenilir şekilde okunabilecek en düşük konsantrasyon doğrulandı.

3.2.2.7. Örneklerde Adapalenin Stabilitesi

In vitro penetrasyon ve *punch* biyopsi çalışmalarında kullanılan ekstraksiyon çözücüsünde adapalenin deney ve analiz süresince kararlı kaldığını doğrulamak için stabilite çalışması yapıldı. ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında, adapalen içeren (25 ng/ml) örnekler hazırlandı. Taze hazırlanan örneklerde adapalenin miktarı HPLC ile analiz edildi. Ayrıca hazırlanan örneklerde adapalenin stabilitesi, tamamen ışıktan

korunarak (amber renkli viyalde), banko üzerinde (şeffaf viyalde) veya pencere önünde gün ışığına maruz bırakılarak üç farklı koşulda takip edildi. 1. ve 5. gün sonunda örneklerin analizi yapılarak, çözeltilerdeki adapalen konsantrasyonu hesaplandı.

Adapalenin PDC-ADA yapısından *in vitro* salım ortamında (pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)) deney ve analiz süresince reseptör kararlı kaldığını doğrulamak için örnekler 32°C'de su banyosunda bekletilerek adapalenin stabilitesi incelendi. Salım ortamında adapalen içeren (100 ng/ml) örnekler hazırlandı. Bunun için, adapalenin DMSO'da hazırlanan stok çözeltisinden pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) ile uygun seyreltmeler yapıldı. 8, 24 ve 72 saat sonunda örneklerin analizi yapılarak, çözeltilerdeki adapalen konsantrasyonu hesaplandı.

3.2.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmaları

In vitro koşullarda gerçekleştirilecek salım ve penetrasyon çalışmalarında reseptör faz olarak; fizyolojik koşula en yakın ortamı sağlamak amacı ile çoğunlukla izotonik hale getirilmiş pH 7,4 PBS kullanılır. Ancak, adapalen gibi suda çözünürlüğü son derece düşük olan bir etken madde söz konusu ise, çözünme ortamının *sink* koşulun (sonsuz seyrelmenin) sağlanması için PBS ortamında yardımcı çözücüler veya çözünürlük artırıcı bazı maddeler ilave edilerek ilacın daha iyi çözüldüğü bir çözücü sistemi kullanılmaktadır³⁴⁴.

In vitro penetrasyon ve *in vitro* salım çalışmalarında kullanılmak üzere uygun reseptör fazın tespit edilmesi için adapalenin farklı pH ve bileşenlerden oluşan çözücü ortamlarında çözünürlük çalışmaları yapıldı.

Yöntem 3.2.18'de anlatılan çalışmalarda adapalen salımının değerlendirilmesi için kullanılacak salım ortamının seçilmesi amacı ile pH 5,5 ya da pH 7,4 PBS ortamlarına farklı oranlarda yardımcı maddeler (Etanol, Tween 80, PEG-400, DMSO) ilave edilerek adapalenin çözünürlüğü belirlendi. Çözünürlük çalışmalarında adapalenin çözünürlüğünün belirlenmesinde çalkalama yöntemi (*shake-flask*) kullanıldı. 15 ml'lik santrifüj tüplerindeki her bir çözünme ortamına (5 ml), çözünebileceğinden çok fazla miktarda adapalen ilave edildi. Örnekler oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 48 saat boyunca 250 rpm'de çalkalandıktan sonra 15 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısımdan alınan örnekler şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzülerek ACN/DMF (60:40) (h/h) ile uygun oranlarda seyreltildi. Her aşamada örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra, hazırlanan örnekler HPLC yöntemi ile

analiz edildi ve çözünen adapalen miktarları tespit edildi. Bu çalışma n=3 paralel olacak şekilde tekrarlandı.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında, sink koşulu sağlamak için adapalenin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla reseptör faza alkol veya sürfaktan ilave edilmesinin membranın (domuz derisinin) geçirgenliğini değiştireceği dikkate alındı. Bu nedenle, *in vitro* penetrasyon çalışmalarında kullanılacak reseptör ortam olarak *in vivo* koşulu da yansıtacak pH 7,4 PBS çözeltisi kullanılmasına karar verildi. Adapalenin bu çözünme ortamında çözünürlüğünü arttırmak için, lipofilik etken maddelerin çözünürlüğünün artırılmasında kullanılan sığır kaynaklı serum albümini³⁴⁵ (BSA) ilave edildi. Sink koşulun sağlanmasını değerlendirmek için BSA ilave edilen pH 7,4 PBS çözeltisinde yapılan çözünürlük çalışmaları için; bir gece önceden pH 7,4 PBS çözeltisi üzerine BSA (%4) ilave edildi, 1 saat yavaş yavaş manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 1 gece +4 °C’de saklandı. Ertesi gün 10 ml’lik cam kapaklı tüplere alınan çözünme ortamı (2 ml) üzerine aşırı miktarda adapalen ilave edildi ve örneklerin köpürmesini önlemek için oda sıcaklığında düşük devirde manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı.

Örneklerdeki BSA içeriğinin HPLC analizini etkilememesi için BSA’nın çöktürülmesi işlemi uygulandı. Çözeltilerden 1,5 ml santrifüj tüplerine alındı, üzerlerine buz banyosunda (0 °C) 4,5 ml ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon çözeltisi ilave edildi ve 15000 rpm’de 15 dk. santrifüj edildiererek BSA çöktürüldü. Örnekler ACN/DMF (60:40) (h/h) ile seyreltildi ve şırınga ucu filtreden (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) süzildükten sonra HPLC yöntemi ile analiz edildi.

Adapalenin çözünürlüğünün değerlendirildiği farklı çözücü sistemleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3-1: Çözünürlük çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri ve kullanılan oranlar

Fosfat Tamponu	Yardımcı çözücü/ çözünürlük arttırıcı	Yardımcı madde oranı (%)
pH 5,5 PBS	Etanol	40 (h/h)
pH 5,5 PBS	Etanol	50 (h/h)
pH 5,5 PBS	Tween 80	1,75 (a/h)
pH 7,4 PBS	PEG 400	40 (h/h)
pH 7,4 PBS	DMSO	10 (h/h)
pH 7,4 PBS	BSA	4 (a/h)

3.2.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyonu Çalışmaları

Adapalenin PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında amin yüzey gruplarına sahip ikinci jenerasyon PAMAM (G2-PAMAM-NH₂) dendrimerler kullanıldı. Çalışmalar kapsamında, öncelikle etken madde yüklenmeden PAMAM dendrimerlerin partikül boyutu karakterizasyonu yapıldı. Hazır olarak metanol içerisinde temin edilen PAMAM dendrimerler (metanol içerisinde, ağırlıkça % 20; Sigma Aldrich) kendi dispersiyon ortamı olan metanol ile %0,1'lik konsantrasyona seyreltilerek, herhangi bir işlem yapılmadan doğrudan ve ayrıca şırınga ucu filtreden (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) süzüldükten sonra, PAMAM dendrimerlerin dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılarak ortalama partikül boyutu ve dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ölçümleri gerçekleştirildi (ZetaSizer NanoZS, Malvern, Worcestershire, UK).

Ayrıca, temin edilen PAMAM dendrimerlerin su ortamındaki partikül boyutu ve dağılımı analizi yapıldı. PAMAM dendrimerlerin metanoldeki çözeltisinden cam bir viyale bir miktar alındı, bileşindeki metanol önce azot gazı altında uçuruldu. Üzerine saf su eklenerek, PAMAM dendrimerin saf sudaki çözeltisi (%0,1'lik) hazırlandı ve filtrasyon yapılmadan örneklerin partikül boyutu ve dağılımı (polidispersite indeksi) ölçümleri gerçekleştirildi.

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında; adapalenin amin yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimerlere elektrostatik etkileşim mekanizmasına bağlı kompleks oluşturulması esasına³⁴⁶⁻³⁴⁸ dayanarak yüklenmesi yaklaşımı ile; karboksil grubu ($-COOH$) taşıyan ve aşırı lipofilik karaktere ($\log P$: 8,6³⁴⁹; $\log P$: 8,11³⁵⁰ sahip adapalen molekülünün PAMAM dendrimerlere ait yüzeyel amin grupları ile etkileşmesi öngörülerek PAMAM-ADA komplekslerinin oluşturulması çalışmaları yürütüldü. Adapalenin PAMAM dendrimer komplekslerinin hazırlanmasında denenilen farklı yöntemler aşağıda ilgili başlıklar altında sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi Yöntemi ile Yapılan Yükleme Çalışmaları

PAMAM (G2-PAMAM-NH₂) dendrimerler metanol içerisinde (ağırlıkça, % 20) temin edildi. Dendrimerin bu çözeltisinden 50 µl (8,6 mg PAMAM) alınarak amber renkli cam bir viyaldeki 8,6 ml saf su üzerine ilave edildi. Bu karışım çeker ocak altında 1 gece bekletilerek metanolün uçması sağlandı. Böylece, PAMAM dendrimerin sudaki çözeltisi (% 0,1, a/h) hazırlandı. Bu stok çözeltiden 2 ml alındı, saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek PAMAM'ın sudaki ikinci çözeltisi (%0,05, a/h) hazırlandı. PAMAM dendrimerlerin farklı konsantrasyonlardaki suda hazırlanan çözeltilerinden 1'er ml otomatik pipet yardımıyla çekilerek, amber renkli cam viyalere alındı. Farklı konsantrasyonlardaki (%0,05 ve %0,1) dendrimer çözeltilerine ve ayrıca kontrol olarak 1 ml saf suya aşırı miktarda (2 mg) adapalen ilave edildi ve karanlık ortamda 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde 500 rpm hızda karıştırıldı. 24 saat sonunda 15000 rpm'de 5 dakika sanrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısımdan alınan örneklerde Yöntem 3.2.1.2'de belirtilen koşullarda yapılan HPLC analizleri ile nanotaşıyıcılara yüklenen adapalen miktarları hesaplandı.

Bu yöntem ile hazırlanan nanotaşıyıcı formülasyonlarının kodları ve kullanılan PAMAM oranları Tablo 3.2'de belirtilmektedir.

Tablo 3-2: Adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine katı halde ilavesi ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon kodu	PAMAM (%)	ADA ilavesi (mg/1ml)
PMM 0 K	0	2
PMM 0.05 K	0,05	2
PMM 0.1 K	0,1	2

3.2.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltisine İlavesi Yöntemi ile Yapılan Yükleme Çalışmaları

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında ikinci bir yöntem olarak; adapalenin rahat çözünebildiği uçucu bir organik çözücü içinde (tetrahidrofuran, THF) çözündürülüp dendrimerin metanoldeki çözeltisine damlatma tekniği kullanılarak ilave edilmesi düşünüldü. Bu amaçla Yöntem 3.2.4.1’de en yüksek yükleme etkinliğini sağlayan formülasyonda kullanılan PAMAM oranı seçildi.

Adapalenin THF’de hazırlanan stok çözeltisi (0,5 mg/ml), oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılan PAMAM dendrimeri içeren metanoldeki çözeltisi (%0,1) üzerine otomatik pipet yardımı ile damla damla ilave edildi. Son hacmi 1 ml olan PAMAM dendrimer ile birlikte adapalen içeren bu karışım, amber renkli cam viyallerde oda sıcaklığında 24 saat 500 rpm hızda karıştırıldı. Adapalen ve PAMAM dendrimerin organik çözücü karışımında çözünmesi sağlandı. Daha sonra kaynama noktası ve buhar basıncı birbirine çok yakın olan iki organik çözücünden ibaret karışım (tetrahidrofuran ve metanol) azot gazı altında uçuruldu. Elde edilen ADA-PAMAM ko-presipitatındaki organik çözücünün tamamen uzaklaştırılması için vakum pompasında 2 saat bekletildi. Elde edilen kompleks yapı üzerine 1,2 ml ultra saf su ilave edilerek hidrasyonu sağlandı. 1,5 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra, en az 2 saat 500 rpm hızda manyetik karıştırıcıda da karıştırılarak hidrasyon ortamında ADA-PAMAM dendrimer kompleksi ekstrakte edildi. En son aşamada 15000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.

Bu yöntem ile hazırlanan nanotaşıyıcı formülasyonunun kodu, kullanılan PAMAM oranı ve ilave edilen adapalen miktarı ile birlikte Tablo 3.3’te belirtilmektedir.

Tablo 3-3: Adapalenin tetrahidrofuranda çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilavesi ile hazırlanan formülasyon

Formülasyon kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.1 C	0,1	100	800	200

3.2.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Problu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklenmesi Çalışmaları

Adapalenin PAMAM dendrimerlere yükleme çalışmaları kapsamında, tercih edilen partikül boyutu ve dağılımı değerlerine sahip nanotaşıyıcılar elde edilmesi ve aynı zamanda yükleme etkinliğinin de arttırılması için sonikasyon işlemi uygulandı.

Bu kapsamda Yöntem 3.2.4.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan ADA-PAMAM dendrimer kompleksleri en son aşamada santrifüj edilmeden temiz viyallere alındı ve bir ultrasonik prob (Branson Sonifier® 250, 3 mm çap) ile buz banyosunda sonikasyon işlemi uygulandı.

Sonikasyon sırasında tekrarlı titreşimler uygulandı. Bunun için “*Duty cycle*” 60 olarak ayarlandı. Böylece, uygulama süresi boyunca 1 saniye aralıklarla her bir saniyenin %60 kadarı süre örneğe ultrasonik dalga uygulandı.

Sonikasyon işleminin optimizasyonu sırasında 3 farklı seviyede güç uygulandı. Uygulanan güç *Output* (OP) olarak ifade edilmektedir. Sonikasyon şiddetinin göstergesi olarak her seviyeye karşılık gelen gücün Watt birimi cinsinden değeri Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3-4: Sonikasyon işlemi sırasında uygulanan güç seviyeleri ve Watt birimi cinsinden karşılığı

Uygulanan güç seviyesi (OP)	Karşılık gelen Watt değeri
1	10
2	25
3	40

3.2.4.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Optimizasyonu

Sonikasyon yöntemi ile hazırlana adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı sistemlerinde kullanılan formülasyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3.5'te gösterilmektedir.

Tablo 3-5: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan bileşenler

Formülasyon bileşenleri	Kullanım miktarı (1,2 ml)
PAMAM dendrimer	% 0,05-0,2
ADA (Başlangıç)	100-1000 µg
MetOH	500-800 µl
THF	200-500 µl
PEG 400	% 0-10
Gliserin	% 0-1
PGDA	% 0-1
Benzil alkol	% 0-1

Formülasyon çalışmaları sırasında su fazı olarak, ultra saf su ya da % 0-10 (a/h) PEG 400 çözeltisi olmak üzere farklı dispersiyon ortamları denendi.

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında aşamalı olarak, hazırlama sırasında uygulanan sonikasyon parametreleri (uygulanan güç ve süre), formülasyon bileşenlerinin oranları ve kullanılan çözücü hacimleri denenerek bir seri çalışma yapıldı. Bu çalışmalar sırasında basamak basamak denenen optimizasyon parametrelerine göre çalışılan formülasyon kodları sırası ile aşağıda ilgili tablolarda verilmiştir.

Öncelikle daha önce denenen yöntemlerle hazırlanan formülasyonlarda kullanılan PAMAM oranları dikkate alınarak; üç farklı konsantrasyonda PAMAM (%0,05-0,2) ve

adapalen (0,1 mg) ile kompleksler oluşturuldu ve hazırlanan formülasyonlarda aynı prosedür (OP 1, 1 dk) ile sonikasyon uygulandı. Bu şekilde hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonlarının bileşenleri Tablo 3.6’da verilmiştir.

Adapalenin PAMAM dendrimerler ile hazırlanan formülasyonlarında kullanmak üzere en yüksek PAMAM konsantrasyonu 2 mg/ml (%0,2) olarak belirlenmiştir. Bu değer, literatürde ikinci (G2) ve üçüncü (G3) jenerasyon PAMAM-NH₂ dendrimerlerin epidermal hücrelerde anlamlı morfolojik değişikliklere yol açtığı belirtilen konsantrasyonun (≥ 6 mg/ml) altındadır. PAMAM dendrimerlerin keratinositler ve dermis üzerindeki etkilerinin doza bağlı olduğu gösterilmiş ve PAMAM dendrimerlerin topikal uygulamada düşük konsantrasyonlarda kullanılabileceği ifade edilmiştir²⁹⁹. Bu yüzden optimizasyon çalışmalarında PAMAM oranları mümkün olduğunca düşük tutulmuştur.

Tablo 3-6: Farklı oranlarda PAMAM içeren 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	Sonikasyon işlemi		PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	MetOH (µl)	THF (µl)
	OP	Süre (dk)				
PMM 0.05	1	1	0,05	100	800	200
PMM 0.1	1	1	0,1	100	800	200
PMM 0.2	1	1	0,2	100	800	200

Seçilen oranda PAMAM içeren formülasyonlarda sonikasyon gücü sabit tutularak sonikasyon süresi arttırıldı. Sonikasyon süresini belirlemek için % 0,1 konsantrasyonda PAMAM içeren ve aynı miktarda adapalen (0,1 mg) ile hazırlanan formülasyonlarda 10 Watt güç ile (OP 1) farklı sürelerde sonikasyon uygulandı (Tablo 3.7).

Tablo 3-7: Farklı sürelerde OP 1’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	Sonikasyon işlemi		PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	MetOH (µl)	THF (µl)
	OP	Süre (dk)				
PMM 0.1	1	1	0,1	100	800	200
PMM 0.1-3d	1	3	0,1	100	800	200
PMM 0.1-6d	1	3+3*	0,1	100	800	200

* Sonikasyon 3’er dakikalık 2 set şeklinde uygulanmıştır. Setler arasında 1 dakikalık dinlenme süresi ayrılmıştır.

Sonikasyon gücünün partikül boyutu ve dağılımı üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere, sonikasyon süresi sabit tutularak, %0,1 konsantrasyonda PAMAM içeren ve aynı miktarda adapalen (0,1 mg) ile hazırlanan formülasyonlarda farklı güçte sonikasyon uygulandı (Tablo 3.8).

Tablo 3-8: Farklı güçte sonikasyon işlemi ile hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	Sonikasyon işlemi		PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	MetOH (µl)	THF (µl)
	OP	Süre (dk)				
PMM 0.1	1	1	0,1	100	800	200
PMM 0.1-G2	2	1	0,1	100	800	200
PMM 0.1-G3	3	1	0,1	100	800	200

Sonikasyon gücünün arttırılması ile daha kabul edilebilir partikül boyutu ve dağılımı değerleri elde edilince, daha yüksek seviyede belirlenen (OP 2) sonikasyon gücü sabit tutularak bu güç seviyesinde sonikasyon süresi tekrar optimize edildi.

25 Watt güç (OP 2) için optimum sonikasyon süresini belirlemek üzere seçilen oranda (%0,1) PAMAM içeren ve aynı miktarda adapalen (0,1 mg) ile hazırlanan formülasyonlarda farklı sürelerde sonikasyon uygulandı (Tablo 3.9).

Tablo 3-9: Farklı sürelerde OP 2’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	Sonikasyon işlemi		PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	MetOH (µl)	THF (µl)
	OP	Süre (dk)				
PMM 0.1-G2	2	1	0,1	100	800	200
PMM 0.1-G2-2d	2	2	0,1	100	800	200
PMM 0.1-G2-3d	2	3	0,1	100	800	200
PMM 0.1-G2-6d [#] (PMM 0.1-S)	2	3+3 [*]	0,1	100	800	200

[#] Kodlamada kısaltmaya gitmek için bu ve sonraki formülasyonlarda G2-6d, S olarak ifade edilmiştir.

^{*} Sonikasyon 3’er dakikalık 2 set şeklinde uygulanmıştır. Setler arasında 1 dakikalık dinlenme süresi ayrılmıştır.

Bu aşamadan sonra tüm formülasyonlar optimize edilen sonikasyon prosedürü ile hazırlandı. Bu nedenle, sonikasyon işlemine ait güç (OP) ve süre parametreleri sonraki tablolarda verilmemiştir.

Sonikasyon gücü ve süresinin optimizasyonundan sonra; dispersiyon ortamına farklı yardımcı bileşenler (%1, a/h) ilave edilerek hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı değerlendirildi (Tablo 3.10).

Tablo 3-10: Farklı yardımcı bileşenler ilave edilerek hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Yardımcı bileşen	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.1-S	0,1	100	-	800	200
PMM 0.1-S-1Gli	0,1	100	Gliserin	800	200
PMM 0.1-S-1PEG	0,1	100	PEG 400	800	200
PMM 0.1-S-1PGDA	0,1	100	PGDA	800	200
PMM 0.1-S-1BA	0,1	100	Benzil alkol	800	200

Tüm yardımcı bileşenler %1 (a/h) oranında kullanılmıştır. PGDA: Propilen Glikol Diasetat

Sonikasyon prosedürünün optimizasyonu sağlandıktan sonra, kullanılan PAMAM konsantrasyonunun hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve dağılımına etkisinin tekrar değerlendirilmesi amacı ile, altı farklı konsantrasyonda (%0,002-0,1) PAMAM dendrimer çözeltileri ve adapalen (0,1 mg) ile kompleksler oluşturuldu. Hazırlanan formülasyonlarda önceki aşamada optimize edilen sonikasyon prosedürü (OP 2, 3+3 dakika) uygulandı. Bu şekilde hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonlarının bileşenleri Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3-11: Farklı oranlarda PAMAM içeren adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.1-S	0,1	100	0,7	800	200
PMM 0.05-S	0,05	100	1,3	800	200
PMM 0.02-S	0,02	100	3,3	800	200
PMM 0.01-S	0,01	100	6,6	800	200
PMM 0.004-S	0,004	100	16,4	800	200
PMM 0.002-S	0,002	100	32,9	800	200

Farklı oranlarda PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonlarının partikül boyutu ve dağılımı sonuçlarına göre, ADA/PAMAM mol oranları da dikkate alınarak optimum PAMAM konsantrasyonu (%0,02) seçildi. Bu konsantrasyondaki PAMAM dendrimer çözeltisine farklı miktarda (0,1-1 mg) adapalen yüklendi. PAMAM dendrimeri içeren metanol çözeltisine adapalenin THF'deki farklı konsantrasyondaki (0,5 mg/ml ya da 2,5 mg/ml) stok çözeltilerinden ilave edildi (Tablo 3.12).

Tablo 3-12: Farklı miktarlarda adapalen ve seçilen konsantrasyonda (%0,02) PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.02-S	0,02	100	3,3	800	200
PMM 0.02-S-A5	0,02	500	16,4	800	200
PMM 0.02-S-A10	0,02	1000	32,9	600	400

PMM 0.02-S-A5 kodlu formülasyon esas alınarak, ADA/PAMAM mol oranını düşürmek üzere bir sonraki formülasyondaki PAMAM oranı arttırıldı (Tablo 3.13).

Tablo 3-13: Farklı oranlarda PAMAM içeren 0,5 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.02-S-A5	0,02	500	16,4	800	200
PMM 0.05-S-A5	0,05	500	6,6	800	200

Dendirmerlere yüklenen adapalen miktarını arttırmaya yönelik olarak; daha sonra yapılacak çalışmalarda da hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı sonuçları, kullanılan ADA/PAMAM mol oranları ile birlikte değerlendirildi.

Stabilizan olarak PEG 400'ün formülasyon üzerindeki etkisi daha kapsamlı incelemek üzere, PAMAM (%0,05) içeren ve aynı miktarda adapalen ile hazırlanan formülasyonların dispersiyon ortamı olarak farklı oranlarda PEG 400 kullanıldı (Tablo 3.14). Aynı zamanda PAMAM (%0,05-0,07) içeren ve farklı miktarlarda adapalen (0,5-1 mg) ile hazırlanan nanotaşıyıcılara yüklenen adapalen miktarının partikül boyutu ve dağılımı üzerine etkisi de ayrıca değerlendirildi (Tablo 3.14).

Tablo 3-14: %0,05 ve %0,07 PAMAM ve farklı oranlarda kullanılan PEG 400 ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	PEG 400 (%)
PMM 0.05-S-A5	0,05	500	6,6	-
PMM 0.05-S-A5-1PEG	0,05	500	6,6	1
PMM 0.05-S-A5-3PEG	0,05	500	6,6	3
PMM 0.05-S-A5-5PEG	0,05	500	6,6	5
PMM 0.05-S-A7.5	0,05	750	9,9	-
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	0,05	750	9,9	1
PMM 0.05-S-A7.5-5PEG	0,05	750	9,9	5
PMM 0.05-S-A10-1PEG	0,05	1000	13,2	1
PMM 0.05-S-A10-5PEG	0,05	1000	13,2	5
PMM 0.05-S-A10-10PEG	0,05	1000	13,2	10
PMM 0.07-S-A5-1PEG	0,07	500	4,7	1
PMM 0.07-S-A7.5-1PEG	0,07	750	7	1
PMM 0.07-S-A10-1PEG	0,07	1000	9,4	1

Optimizasyon çalışmalarında hazırlama aşamasında kullanılan MetOH/THF oranının nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımı üzerindeki etkisini değerlendirmek için, önceki çalışmalarda optimum partikül boyutu ve dağılımı değerlerini veren nanotaşıyıcı formülasyonları seçildi. PAMAM konsantrasyonu ile başlangıçta ilave edilen adapalen miktarı sabit tutularak farklı oranlarda MetOH/THF ilave edildi (Tablo 3.15 ve 3.16).

Tablo 3-15: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 0,75 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	0,05	750	9,9	800	200
PMM 0.05-S-A7.5-1:1-1PEG	0,05	750	9,9	500	500

Tablo 3-16: Farklı çözücü oranları kullanılarak seçilen oranlarda PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer formülasyonları

Form. kodu	PAMAM (%)	Başlangıç ADA (µg)	Mol oranı (ADA/PMM)	MetOH (µl)	THF (µl)
PMM 0.05-S-A10-1PEG	0,05	1000	13,2	600	400
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	0,05	1000	13,2	750	250
PMM 0.07-S-A10-1PEG	0,07	1000	9,4	600	400
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	0,07	1000	9,4	750	250

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasına yönelik formülasyon geliştirme aşamasının bir parçası olan optimizasyon çalışmaları kapsamında kullanılan uygulanan sonikasyon gücü ve süresi, PAMAM konsantrasyonu, formülasyona ilave edilen adapalen miktarı gibi parametrelerin hazırlanan dendrimerik

taşıyıcı sistemin boyut ve yükleme oranı üzerindeki etkileri değerlendirilerek adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonlarının optimizasyonu sağlandı.

Bu amaçla hazırlanan bütün PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları görsel olarak ve partikül boyutu ve dağılımı incelenerek değerlendirildi. Optimize edilen sonikasyon yöntemi ile hazırlanan ilk formülasyonda (PMM 0.1-S) ve son aşamalarda hazırlanan formülasyonlarda ayrıca PAMAM dendrimerlere yüklenen adapalen miktarını belirlemek için Yöntem 3.2.1’de anlatılan yöntem ile HPLC analizleri yapıldı. Seçilen formülasyonlar üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımının (Polidispersite İndeksi) Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının ortalama partikül boyutu (hidrodinamik $\text{\AA}$) ve polidispersite indeksi (PDI), dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği kullanılarak 25°C ’de ölçüldü (ZetaSizer NanoZS, Malvern, Worcestershire, UK). Formülasyonlar seyreltilmeden analiz edildi. Ölçümler cihaz tarafından 173° açı ile 11 taramayla 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Her örnek için tek kullanımlık polistiren küvetler kullanıldı. Her formülasyon için 3 kez tekrarlanan ölçüm sonuçları, ortalama partikül boyutu ve standart sapma ($\pm\text{SD}$) değerleri olarak verildi.

3.2.6. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Stabilitte Çalışmaları

Hazırlanan naanotaşıyıcılar arasından partikül boyutu ve dağılımı sonuçlarına göre ve kullanılan adapalen /PAMAM mol oranları da dikkate alınarak seçilen farklı konsantrasyonlarda (%0,02-0,05-0,07) PAMAM ve farklı oranlarda adapalen içeren formülasyonların fiziksel stabilitesi 6 hafta süreyle buzdolabı koşullarında ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) saklanarak izlendi. Formülasyonların 2., 4., 6. haftalarda partikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel kararlılıkları değerlendirildi. Ayrıca, stabilite çalışmaları kapsamında seçilen bazı formülasyonlarda etken madde miktar tayini çalışması yapılarak adapalenin geri kazanımı tespit edildi.

3.2.7. Seçilen Adapalen yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının karakterizasyonu için partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel, yapı ve morfoloji ile yükleme oranları incelendi. Partikül boyutu ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri Zetasizer (NanoZS,

Malvern, Worcestershire, UK) cihazı ile saptandı. Morfoloji ve yüzey özelliklerini belirlemek için Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, JEM-1011); PAMAM dendrimer ve adapalen arasındaki etkileşimi göstermek için Fourier Dönüşüm İnfrared Spektroskopisi (FT-IR, Perkin-Elmer Spectrum 100) cihazlarından yararlanıldı. Ayrıca; partikül boyutu ve dağılımı ile formülasyondaki adapalen miktarının tespitine yönelik stabilite çalışmaları yapıldı. Adapalenin nanotaşıyıcı sisteme yüklenme etkinliği, HPLC ile miktar tayini analizi sonucu hesaplanan adapalen miktarları hesaplanarak saptandı.

3.2.7.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ile Analizi

G2-PAMAM-NH₂ ve adapalen arasında sahip oldukları fonksiyonel gruplara bağlı (PAMAM dendrimerlerin amin yüzey grupları ve adapalenin karboksilik asit grubu) beklenen elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşumunu göstermek için; optimizasyonu tamamlanan ve deriden penetrasyon çalışmalarında kullanılması planlanan nanotaşıyıcı formülasyonuna iki farklı adapalen yükleme miktarı seçilerek (100 ve 500 µg) hazırlanan PAMAM dendrimer komplekslerinin (PMM 0.05-S ve PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyonlar) ATR-FTIR (Hafifletilmiş Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi, *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared*) (Perkin-Elmer Spectrum 100) spektroskopisi cihazı ile analizi yapıldı.

Adapalen, PAMAM dendrimer ve seçilen ADA-PAMAM komplekslerinin ayrı ayrı, 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı arasında 4 cm⁻¹ spektral çözünürlük ile, 100 Newton kuvvet uygulanarak IR spektrumları alındı. Spektrumlar absorpsiyon modunda incelendi.

3.2.7.2. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında Zeta Potansiyelin Ölçülmesi

Formülasyon optimizasyon çalışmaları sırasında partikül boyutu ve dağılımı ile stabilite açısından seçilen ve farklı yükleme oranları kullanılan nanotaşıyıcılarda zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Ayrıca kontrol olarak, C-PMM (0.05) kodlu; %0,05 oranında saf suda adapalen yüklenmeden hazırlanan PAMAM dendrimer çözeltisinin de zeta potansiyeli ölçüldü. Boş ve adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonlarında partiküllerin yüzey yükleri, zeta potansiyel değerleri, Zetasizer cihazı ile 25°C’de ölçüldü (ZetaSizer NanoZS, Malvern, Worcestershire, UK).

Her formülasyon için 20’şer taramayla en az üç ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları ortalama zeta potansiyel ve standart sapma (±SD) değerleri olarak verildi. Örnekler

hücrelere enjektör yardımı ile hava kabarcığı oluşmasına izin vermeden dikkatli bir şekilde dolduruldu ve analiz etmeden önce dengelenene kadar 5 dakika beklendi.

3.2.7.3. PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarına Yüklenen Adapalen Miktarının Belirlenmesi

Adapalen yüklü dendrimer formülasyonlarının karakterizasyonu kapsamında PAMAM dendrimerler ile hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlere yüklenen adapalen miktarını saptamak için seçilen formülasyonlardan alınan örnekler ACN/DMF (60:40) (h/h) ile 100 kat seyreltilerek ekstrakte edildi. Örneklerdeki adapalen konsantrasyonu HPLC analizi (Yöntem 3.2.1) ile belirlendi. Böylece formülasyona başlangıçta ilave edilen etken madde miktarına kıyasla “geri kazanılan” etken madde miktarı saptanarak adapalenin yüklenme oranı tespit edildi.

Ultrafiltrasyon Yöntemi: Nanotaşıyıcı sistem içinde enkapsüle olan adapalen miktarını saptamak için, dendrimerlere yüklenmeyen serbest adapalen moleküllerinin ayrılması için ultrafiltrasyon yöntemi kullanıldı³⁵¹. Bu amaçla, filtre bölmesi içeren özel santrifüj tüplerine (Vivaspin® 6- Sartorius Centrifugal Concentrator, MWCO 3000) yerleştirilen örnekler oda sıcaklığında 9000 rpm hızda 20 dakika süre santrifüj edildi (BOECO, Germany). Filtrattan alınan örnekler, ACN/DMF (60:40) (h/h) ile 1:1 oranında seyreltilerek Yöntem 3.2.1’de belirtilen miktar tayini yöntemi kullanılarak HPLC ile analiz edildi. Çalışma üç kez tekrarlandı. Dendrimerlere yüklenmeyen serbest adapalen miktarının belirlendi ve nanotaşıyıcı sistemlerde bulunan toplam “geri kazanılan” adapalen miktarından çıkarılarak nanotaşıyıcı sistem tarafından enkapsüle olan adapalen miktarı dolaylı olarak saptandı.

Adapalenin PAMAM dendrimerlere yüklenme oranı ve yükleme etkinliği aşağıda bahsedilen denklemler yardımıyla hesaplandı^{44,352}.

Yüklenme Oranının (YO) Hesaplanması: PAMAM dendrimerlerle hazırlanan nanotaşıyıcı sistemde, dendrimerlere yüklenen etken madde miktarını, nanotaşıyıcı sistemde etken madde ile birlikte bulunan dendrimer miktarına oranı şeklinde ifade etmek üzere yükleme oranı hesaplandı. Yükleme oranının hesaplanması için Denklem 3.3 kullanıldı.

$$YO(\%) = \frac{\text{Dendrimerlere yüklenen etken madde miktarı}}{\text{Dendrimer} + \text{Dendrimerlere yüklenen etken madde miktarı}} * 100 \quad (3-3)$$

Dendrimerlere yüklenen etken madde miktarı; formülasyonda geri kazanılan etken madde miktarından, ultrafiltrasyon işlemi sonrasında tespit edilen serbest etken madde miktarı çıkarılarak bulunmuştur.

Yükleme Etkinliğinin (YE) Hesaplanması: PAMAM dendrimerlerle hazırlanan nanotaşıyıcı sistemde, dendrimerlere yüklenen etken madde miktarını, formülasyon hazırlama sırasında ortama eklenen etken madde miktarına oranı şeklinde ifade etmek üzere enkapsülasyon etkinliği hesaplandı. Yükleme Etkinliğinin hesaplanması için Denklem 3.4 kullanıldı.

$$YE(\%) = \frac{\text{Dendrimerlere yüklenen etken madde miktarı}}{\text{Formülasyona başlangıçta ilave edilen etken madde miktarı}} * 100 \quad (3-4)$$

Dendrimerlere yüklenen etken madde miktarı; formülasyonda geri kazanılan etken madde miktarından, ultrafiltrasyon işlemi sonrasında tespit edilen serbest etken madde miktarı çıkarılarak bulunmuştur.

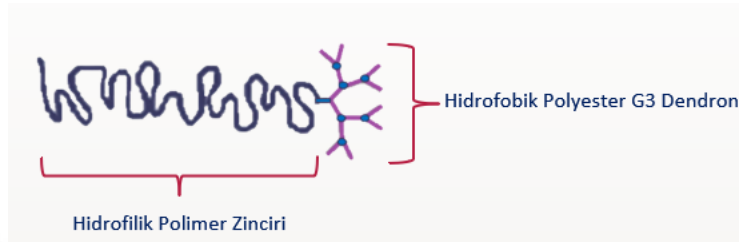
3.2.7.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında TEM Analizi

Adapalen yüklü dendrimerik taşıyıcıların şekil ve yüzey morfolojileri TEM (JEM-2100Plus, Jeol, İngiltere) analizleri ile görüntülendi. Karbon kaplı bakır gritler üzerine seyreltilen koloidal dendrimer formülasyonundan bir damla damlatıldı ve 5 dakika UV-ozon altında tutuldu. Sıvının fazla kısmı emdirilerek uzaklaştırıldı ve hazırlanan örnekler ortam koşullarında kurumaya bırakıldı. Negatif boyama amacıyla uranil asetat çözeltisi kullanıldı.

3.2.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyonu

Adapalen yüklü dendron temelli misel yapısındaki nanotaşıyıcılar, Boğaziçi Üniveristesi Kimya Bölümü'nde sentezlenip karakterizasyonu yapılan G3 polyester dendron-polimer konjugatları (PDC) ile hazırlandı. G3 PDC, kimyasal olarak polyester yapıda üçüncü jenerasyon bir dendronun poli(metil metakrilat) yapısında lineer bir polimer zincirine konjugasyonu ile oluşturuldu.

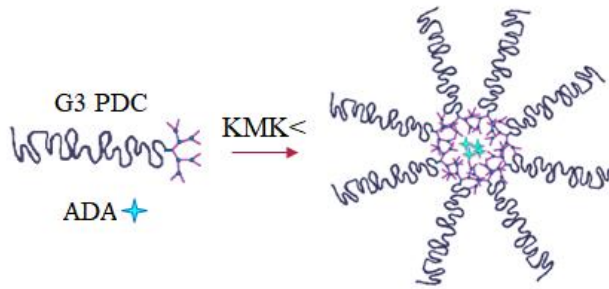
İki bloktan oluşan G3 PDC'nin temsili yapısı Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Polyester dendron yapısı hidrofobik özellikte olup lipofilik karakterde maddelerin enkapsüle edilebileceği misel çekirdeğini oluşturmaktadır. Geriye kalan uzun polimer zinciri ise misel oluşumunu sağlayan PDC yapısının hidrofilik kuyruk kısmını oluşturmaktadır.



Şekil 3-1: G3 PDC yapısı

G3 PDC M_n :13415,7 g/mol (Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde karakterize edilmiştir).

G3 PDC yapısı ile hazırlanan misellerde adapalenin enkapsülasyonu temsili olarak Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3-2: G3 PDC yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarında adapalenin enkapsülasyonu

KMK: Kritik Misel Konsantrasyonu: 10^{-7} M (Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde karakterize edilmiştir).

Adapalenin enkapsülasyon yöntemi ile G3 PDC'lerle hazırlanan nanotaşıyıcı sisteme yüklenmesi için yapılan çalışmalarda etken maddenin yüklenmesinde ultrasonik banyoda sonikasyon, film oluşturma ve kosolvan evaporasyon teknikleri denendi. Hazırlanan misellerin partikül boyutu ve dağılımı ölçümleri gerçekleştirildi, seçilen formülasyonlarda geri kazanılan etken madde miktarları saptandı.

3.2.8.1. Ultrasonik Banyoda Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması

Ultrasonik banyoda sonikasyon yöntemi³¹⁵ ile adapalen yüklü dendron temelli misellerin hazırlanması için; adapalen (50 µg) ve PDC (0,5 mg) THF içinde (1 ml) birlikte çözündürülerek 2 saat süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, THF 37°C’de 200 rpm’lik dönüş hızı uygulanarak rotaevaporatör (Büchi R-210, Büchi Labortechnik, Switzerland) yardımı ile uçuruldu. Organik kalıntısını uzaklaştırmak için 2 saat vakum altında da bekletildi ve 1,2 ml su ilave edilerek 70°C’deki ultrasonik banyoda 1 saat boyunca sonikasyona maruz bırakıldı.

3.2.8.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi ile Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması

İnce film hidrasyon yöntemi³⁵³ ile yükleme çalışmalarında; 1 ml organik çözücü (THF) içinde çözündürülen PDC ve adapalen 25 ml’lik bir balonda 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra organik çözücü 37°C’de 200 rpm’lik dönüş hızı ile bir rotaevaporatör (Büchi R-210, Büchi Labortechnik, Switzerland) ile ince bir film tabakası oluşacak şekilde uçuruldu. Balon içinde oluşturulan ince film bir gece vakum altında bekletildikten sonra 1,2 ml su ilave edilerek oluşan film hidrate edildi ve 2 saat 200 rpm’lik dönüş hızında rotaevaporatörde karıştırıldı. Hazırlanan miseller 1 gece dinlendirildi ve en son aşamada 5 dakika süre ile 15000 rpm de 1,5 ml’lik eppendorf tüpleri kullanılarak 25°C de santrifüj edildi.

İnce film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonun kodu, kullanılan PDC oranı ve ilave edilen adapalen miktarı ile birlikte Tablo 3.17’de gösterilmektedir.

Tablo 3-17: İnce film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan dendron temelli misel formülasyonu

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (başlangıç) (µg)
DMC 0.7 A35 FH.C	0,7	35

3.2.8.3. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması

Dendron temelli misellerin ko-solvan evaporasyon yöntemi^{13,184} ile hazırlanmasında ilk aşamada PDC ve adapalen tetrahidrofurunda ayrı ayrı çözöldürölerek stok çözölteiler hazırlandı. Sonrasında bu stok çözölteilerden uygun hacimlerde alınarak bir araya getirildi (190 µl PDC ve 50 µl adapalen çözölteileri) ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Homojen karışım sağlandıktan sonra PDC ve adapaleni içeren 240 µl organik çözöcücü karışımı mikropipet ile alındı ve cam bir viyal içindeki 1,2 ml su fazına yüzeyinden damla damla ilave edildi. Organik çözöcücünün buharlaşarak formölasyondan tamamen uzaklaşmasını için 18 saat çeker ocak altında bırakıldı. Formölasyonlar hazırlandıktan sonra 25°C de 5 dakika 15000 rpm de santriföl edildi.

Ko-solvan evaporasyon yöntemi ile hazırlanan formölasyonun kodu, kullanılan PDC oranı ve ilave edilen adapalen miktarı ile birlikte Tablo 3.18’de gösterilmektedir.

Tablo 3-18: Ko-solvan evaporasyon yöntemi ile hazırlanan dendron temelli misel formölasyonu

Formölasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (başlangıç) (µg)
DMc 0.5 A35 C	0,7	35

3.2.8.4. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Optimizasyonu

Yularıdaki bölümlerde anlatıldığı gibi çalışarak ön denemeler sonucunda, farklı hazırlama yöntemleri arasından en başarılı sonuçlar ko-solvan evaporasyon yöntemi ile elde edildiği için, adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının optimizasyon çalışmaları bu yöntem üzerinden yapıldı.

Bu kapsamda; hazırlama sırasında kullanılan PDC ve adapalen miktarı, dispersiyon ortamı ve hazırlama yöntemi parametrelerinin dendron temelli misellerin boyutu ve enkapsölasyon verimi üzerindeki etkileri değörlendirilerek formölasyon optimizasyonu sağlandı. Dendron temelli misel formölasyonlarının partiköl boyutu ve dağılımları incelendi ve yüklenen adapalen miktarları tespit edildi. Uygun olan formölasyonlar karakterizasyon çalışmaları yapılmak üzere seçildi.

Adapalen yüklü polyester dendron temelli misel nanotaşıyıcı sistemlerinde kullanılan formülasyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3.19’da gösterilmektedir.

Tablo 3-19: Adapalen yüklü dendron temelli misellerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler

Formülasyon Bileşenleri	Kullanım miktarı (1,2 ml)
PDC	0,5-3 mg
Adapalen	35-1000 µg
Stabilizan (PEG 400)	%0-5

Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonlar ve bileşenleri kodları ile birlikte aşağıda ilgili tablolarda verilmiştir.

Çalışmalar sırasında öncelikle 5 farklı (0,5-3 mg/1,2 ml) oranda PDC kullanılarak adapalen yüklü misel nanotaşıyıcıları hazırlandı (Tablo 3.20).

Tablo 3-20: Farklı oranlarda PDC ile hazırlanan adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonları ve bileşenleri

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (µg) (başlangıç)
DMc 0.5 A35 C	0,5	35
DMc 0.7 A35 C	0,7	35
DMc 0.7 A80 C	0,7	80
DMc 1 A80 C	1	80
DMc 1.5 A80 C	1,5	80
DMc 3 A80 C	3	80

Stabilizan olarak olarak kullanılan PEG 400'ün etkisini incelemek üzere, adapalen miktarı sabit tutularak seçilen iki farklı PDC konsantrasyonu ile hazırlanan dendron temelli misellerin oluşturulmasında dispersiyon ortamına ilave edilen PEG 400'ün (%1) misel boyutu ve dağılımı üzerindeki etkisi değerlendirildi (Tablo 3.21).

Tablo 3-21: Dispersiyon ortamına ilave edilen %1 (a/h) PEG 400'ün etkisinin incelendiği dendron temelli misel formülasyonları

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (µg) (başlangıç)	Dispersiyon ortamı
DMc 0.7 A80 C	0,7	80	Su
DMc 0.7 A80 1PEG C	0,7	80	%1 (a/h) PEG 400-Su
DMc 1 A80 C	1	80	Su
DMc 1 A80 1PEG C	1	80	%1 (a/h) PEG 400-Su

Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonların hazırlama yönteminin optimizasyonu çalışmaları kapsamında, uygun stabilite bulguları gösteren kabul edilebilir boyut ve PDI değerlerine sahip miseller hazırlayabilmek için daha başarılı sonuçlar verecek ve aynı zamanda yükleme etkinliğini arttıracak bir yöntem arayışı ile ultrasonik prob kullanılarak sonikasyon uygulanmasına karar verildi.

Sonikasyon işleminin etkisini ortaya çıkarmak için; adapalen miktarı sabit tutularak seçilen iki farklı konsantrasyonda PDC ile hazırlanan dendron temelli misel formülasyonlarında dispersiyon ortamında stabilizan olarak PEG 400 kullanılmasının partikül boyutu ve dağılımı üzerindeki etkisi santrifüj uygulanmadan değerlendirildi. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları kapsamında elde edilen misel formülasyonların santrifüj edilmeden partikül boyutu ve dağılımı ölçüldü (Tablo 3.22).

Tablo 3-22: Dispersiyon ortamına farklı oranlarda PEG 400 ilave edilen dendron temelli misel formülasyonları

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (µg) (başlangıç)	Dispersiyon ortamı
DMc 0.7 A80	0.7	80	Su
DMc 0.7 A80 1PEG	0.7	80	%1 (a/h) PEG 400-Su
DMc 1 A80	1	80	Su
DMc 1 A80 1PEG	1	80	%1 (a/h) PEG 400-Su
DMc 1 A80 5PEG	1	80	%5 (a/h) PEG 400-Su

Bu formülasyonlarda hazırlama sonrasında santrifüj işlemi uygulanmamıştır.

Sonikasyon işleminin hazırlama prosedürüne dahil edilmesi

Sonikasyon işleminin hazırlama prosedürüne dahil edilmesi aşamasında 2 farklı yöntem denendi.

Organik faz uçurulmadan sonikasyon uygulaması: İlk denemede, misel formülasyonları kosolvan evaporasyon yöntemine göre yukarıda anlatıldığı gibi hazırlandı. PDC ve adapalen içeren organik çözücü karışımdan 240 µl alınarak cam bir viyal içindeki 1,2 ml su fazına damla damla ilave edildikten sonra organik faz uçurulmadan ultrasonik prob (Branson Sonifier® 250, 3 mm çap) ile buz banyosunda 3 dakika sonikasyon uygulandı. Organik çözücünün formülasyondan tamamen uzaklaşması için 18 saat çeker ocak altında bekletildi.

Organik faz tamamen uçurulduktan sonra sonikasyon uygulaması: Kosolvan evaporasyon yöntemine göre hazırlanan formülasyonlara en son aşamada ultrasonik proba sonikasyon uygulanmasına karar verildi. Organik çözücünün tamamen uzaklaşmasını sağlamak üzere 18 saat çeker ocak altında bekletilen formülasyona ultrasonik prob (Branson Sonifier® 250, 3 mm çap) ile buz banyosunda 3 dakikalık 2 set şeklinde sonikasyon işlemi uygulandı. Sonikasyon işleminin etkisini değerlendirmek için, seçilen formülasyonlar hazırlandıktan sonra santrifüj edilmeden partikül boyutu ölçüldü. Aynı formülasyonlar sonikasyon uygulaması ile hazırlandı ve partikül boyutu ölçümleri

yapıldı. Tablo 3.23'te verilen formülasyonların hazırlanmasında sonikasyon işleminin partikül boyutu ve dağılımı üzerine etkisini incelendi.

Tablo 3-23: Hazırlama sonrasında uygulanan sonikasyon işleminin etkisinin incelendiği dendron temelli misel formülasyonları

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (µg) (başlangıç)	Dispersiyon ortamı	Sonikasyon
DMc 0.7 A80 1PEG	0,7	80	%1 (a/h) PEG 400-Su	-
DMc 0.7 A80 1PEG S	0,7	80	%1 (a/h) PEG 400-Su	+
DMc 1 A80 1PEG	1	80	%1 (a/h) PEG 400-Su	-
DMc 1 A80 1PEG S	1	80	%1 (a/h) PEG 400-Su	+
DMc 1 A80 5PEG	1	80	%5 (a/h) PEG 400-Su	-
DMc 1 A80 5PEG S	1	80	%5 (a/h) PEG 400-Su	+
BoşMisel-1PEG	1	0	%1 (a/h) PEG 400-Su	-
BoşMisel-1PEG S	1	0	%1 (a/h) PEG 400-Su	+

Sonikasyonun hazırlama prosedürüne dahil edilmesiyle birlikte optimizasyon çalışmalarında son aşamada; dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ilave edilen adapalen miktarının boyut üzerindeki etkisini değerlendirmek ve yüklenen adapalen miktarlarını belirlemek için, seçilen konsantrasyonda PDC içeren formülasyonlara farklı miktarlarda adapalen ilave edildi (Tablo 3.24).

Tablo 3-24: Farklı miktarlarda adapalen yüklenen hazırlama sonrasında sonikasyon uygulanan dendron temelli misel formülasyonları

Formülasyon Kodu	PDC (mg/1,2 ml)	ADA (µg) (başlangıç)
DMc 1 A80 1PEG S	1	80
DMc 1 A200 1PEG S	1	200
DMc 1 A500 1PEG S	1	500
DMc 1 A1000 1PEG S	1	1000

Optimizasyonu tamamlanan adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3-3: Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının hazırlanması

3.2.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Partikül Dağılımının (Polidispersite İndeksi) Belirlenmesi

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının ortalama partikül boyutu (hidrodinamik çap) ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri Yöntem 3.2.5'te anlatıldığı şekilde çalışılarak ölçüldü.

3.2.10. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Stabilité Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar arasından partikül boyutu ve dağılımı sonuçlarına göre seçilen formülasyonların fiziksel stabilitesi buzdolabı koşullarında ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$) saklanarak izlendi.

DMc 0.7 A8 C, DMc 0.7 A8 1PEG C, DMc 1 A8 C ve DMc 1 A8 1PEG C kodlu formülasyonların 2. hafta sonunda partikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel kararlılıkları değerlendirildi.

Diğer formülasyonların ve ayrıca adapalen yüklenmeden hazırlanan boş misel nanotaşıyıcılarının stabilitesi 4 ay süreyle izlendi. 1. ve 4. ay sonunda partikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel kararlılıkları değerlendirildi.

3.2.11. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının optimizasyon aşamasında hazırlanan formülasyonlar görsel olarak, partikül boyutu dağılımı ve yüklenen adapalen miktarı incelenerek değerlendirildi ve daha kapsamlı karakterizasyon çalışmaları için uygun olan formülasyonlar seçildi. Seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonları üzerinde zeta potansiyel, adapalenin nanotaşıyıcı sisteme yüklenme oranı, enkapsülasyon etkinliği, morfolojik özellikler gibi diğer karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Ayrıca, partikül boyutu ve dağılımı ile formülasyondaki adapalen miktarı açısından stabilite değerlendirme çalışmaları yapıldı. Adapalenin nanotaşıyıcı sisteme yüklenme etkinliği tespit edildi.

3.2.11.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında Zeta Potansiyelin Ölçülmesi

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partiküllerin yüzey yükleri, yani zeta potansiyel değerleri Yöntem 3.2.7.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak ölçüldü.

3.2.11.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Yüklenen Adapalen Miktarının Belirlenmesi

PDC ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarındaki toplam adapalen miktarını saptamak için formülasyonlardan alınan örnekler ACN/DMF (60:40) (h/h) ile seyreltilerek ekstrakte edildi ve örneklerdeki adapalen konsantrasyonu HPLC analizi

(Yöntem 3.2.1) ile belirlendi. Böylece formülasyona başlangıçta ilave edilen etken madde miktarına kıyasla “geri kazanılan” etken madde miktarı saptandı.

Dendron temelli miseller tarafından enkapsüle edilmeyen ortamda serbest bulunan adapalen miktarını tespit ederek dendron temelli misellere yüklenen adapalen miktarını dolaylı olarak saptamak üzere yöntem 3.2.7.3'te anlatıldığı şekilde ultrafiltrasyon işlemi yapıldı.

Adapalenin dendron temelli misellere yüklenme oranı ve yükleme etkinliği aşağıdaki denklemler yardımıyla hesaplandı.

Yükleme Oranının (YO) Hesaplanması: Dendron temelli misellere yüklenen adapalen miktarını, nanotaşıyıcı sistemde etken madde ile birlikte bulunan PDC miktarına oranı şeklinde ifade etmek üzere yükleme oranı hesaplandı. Yükleme oranının hesaplanması için Denklem 3.5 kullanıldı.

$$YO(\%) = \frac{\text{Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarı}}{G3\ PDC + \text{Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarı}} * 100 \quad (3-5)$$

Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarı; formülasyonda geri kazanılan etken madde miktarından, ultrafiltrasyon işlemi sonrasında tespit edilen serbest etken madde miktarı çıkarılarak bulunmuştur.

Yükleme Etkinliğinin (YE) Hesaplanması: Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarını, formülasyon hazırlama sırasında ortama eklenen etken madde miktarına oranı şeklinde ifade etmek üzere enkapsülasyon etkinliği hesaplandı. Yükleme Etkinliğinin hesaplanması için Denklem 3.6 kullanıldı.

$$YE(\%) = \frac{\text{Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarı}}{\text{Formülasyona başlangıçta ilave edilen etken madde miktarı}} * 100 \quad (3-6)$$

Dendron temelli misellere yüklenen etken madde miktarı; formülasyonda geri kazanılan etken madde miktarından, ultrafiltrasyon işlemi sonrasında tespit edilen serbest etken madde miktarı çıkarılarak bulunmuştur.

3.2.11.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında TEM Analizi

Adapalen yüklü misel nanotaşıyıcılarının şekil ve yüzey morfolojileri TEM (JEM-2100Plus, Jeol, İngiltere) analizleri ile Yöntem 3.2.7.4'te bahsedildiği şekilde görüntülenerek karakterize edildi.

3.2.12. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları (PAMAM Dendrimer ve Dendron Temelli Miseller) İçeren Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcı sistemlerin topikal uygulanması için konvansiyonel bir formülasyon ile kombine edilmesi düşünüldü. Bunun için, optimize edilen adapalen yüklü nanotaşıyıcıların son aşamada bir jel sistemine dahil edilmesine karar verildi. Böylece, adapalenin derideki birikiminin değerlendirilmesine yönelik *in vitro* penetrasyon çalışmaları ile kıl foliküllerine hedeflenmesi açısından geliştirilen formülasyonların performansının pazarda bulunan jel farmasötik formundaki ticari orijinal ürün ile (Differin®Jel) karşılaştırılması amaçlandı. Optimize edilen iki farklı dendritik nanotaşıyıcı sistemi (adapalen yüklü PAMAM dendrimer ve adapalen yüklü dendron temelli miselleri) içeren jel formülasyonları hazırlandı.

3.2.12.1. Dendritik Nanotaşıyıcı Sistemleri İçeren Formülasyonların Jelleştirilmesi

Optimize edilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer ya da adapalen yüklü dendron temelli misellerin jel formülasyonlarının hazırlanması için hidroksi propil selüloz (HPC) polimeri jelleştirici ajan olarak kullanıldı.

Kullanılacak polimer yüzdesi ön denemeler yapılarak belirlendi. Bunun için HPC saf suya ilave edilip düşük devirde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak oda sıcaklığında şişmesi sağlandı. Farklı konsantrasyonlarda HPC (%1-2) ile hazırlanan etken madde ya da nanotaşıyıcı içermeyen jellerde tek noktalı viskozite ölçümleri yapıldı (Tablo 3.25).

Tablo 3-25: Farklı oranlarda HPC ile hazırlanan jeller ve kullanılan jel yapıcı madde yüzdeleri

Formülasyon kodu	HPC (%) (a/h)
1 HPC	1
1.5 HPC	1,5
2 HPC	2

Seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı sistemi ile hazırlanan jeller PAMAM-Jel ve seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcı sistemi ile hazırlanan jeller PDC-misel-Jel olarak adlandırıldı. PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel'in hazırlanmasında sırasıyla; PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları ve DMC 1 A50 1PEG S kodlu adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıları kullanıldı.

PAMAM-Jel ya da PDC-misel-Jel formülasyonlarını hazırlamak için; 5 ml'lik cam viyallerin darası alındıktan sonra, hassas terazide 12 mg HPC (%1,5 a/h) tartıldı üzerine 800 µl adapalen yüklü sulu koloidal PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı (PAMAM-AQ) ya da adapalen yüklü sulu koloidal dendron temelli misel nanotaşıyıcı (Dendron-AQ) mikropipet yardımıyla yavaş yavaş ilave edildi ve terazi ekranında okunan değer jel formülasyonunun ağırlığı olarak kaydedildi. Teflon balık kullanılarak 2 saat boyunca en düşük devirde manyetik karıştırıcıda (IKA®-Werke, RT15) karışmaya bırakıldı, hazırlandıktan sonra bir gece dinlendirildi.

3.2.12.2. Jel Formülasyonlarının Viskozite Ölçümleri ve Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Viskozite ölçümlerinden bir gün önce hazırlanan jeller hava kabarcığı olmayacak şekilde ölçüm tablasında ilgili noktaya uygulandı. Ölçümler dijital bir reometre (Bohlin C-VOR, Malvern Instruments) ile 25°C'de gerçekleştirildi. Ölçümlerde, Koni ve Plaka (cone/plate) geometrisi ölçüm sistemi (CP 1°/20 mm, gap: 0,070 mm) ile çalışıldı. Sabit kayma hızı oranı (shear rate) seçilerek tek noktalı viskozite ölçümü yapıldı (Shear rate: 5,00 s⁻¹). Her bir örnekte 7'şer ölçüm yapıldı. Ölçümler 3 kez tekrarlandı.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarına dahil edilmek üzere seçilen sulu koloidal nanotaşıyıcı sistemlerle hazırlanan jel formülasyonları (PAMAM-Jel ya da PDC-misel-Jel) ile bu nanotaşıyıcı sistemlerin bulunduğu dispersiyon ortamında (%1 PEG 400-Su) aynı oranda HPC ile hazırlanan plasebo jel formülasyonu (1.5 HPC-1PEG) ve Differin® Jel üzerinde tek noktalı viskozite ölçümleri de yapıldı.

Örneklerin reolojik özelliğinin incelenmesinde, stres kontrollü reometre kullanıldı (HAAKE™ RheoStress™ 1 Rheometer, Thermo Scientific™, Karlsruhe, Germany). Koni ve Plaka (*cone/plate*) ölçüm geometrisi (CP 1°/35 mm, gap: 0,053 mm) ile 25°C’de çalışıldı. Reolojik ölçümler, 100 saniye boyunca lineer-devamlı artan şekilde ayarlanan kayma hızı oranına (1-100/s) karşı oluşan kayma gerilimi (σ) değerlerinin kaydedilmesiyle gerçekleştirildi (Haake RheoWin software). Kayma hızı oranına (γ) karşı viskozitenin (η) değişimini gösteren reogramlar elde edildi.

3.2.12.3. Jel Formülasyonlarında Yayılabilirliğin (*Spreadability*) Değerlendirilmesi

Darası alınmış bir lam üzerinde 25 mg jel tartıldı. Jelin tartıldığı lamın üzerine temiz ikinci bir lam dikkatli bir şekilde yavaşça bırakıldı ve üzerine 50 g ağırlık yerleştirildi. 5 dakika sonra iki lam arasında kalan jel örneğinin yayıldığı alan cetvel yardımıyla en az 3 noktada yapılan çap ölçümleri ile hesaplandı³⁵⁴, işlem her formülasyon için 3 kez tekrarlandı.

3.2.12.4. Jel Formülasyonlarının pH’sının Ölçülmesi

Jel formülasyonların pH değerleri pH endikatör kağıtları (Fisherbrand/Merck) kullanılarak tespit edildi. Her formülasyon için en az 3 pH endikatörü kullanıldı.

Plasebo (1.5 HPC-1PEG) jelin pH’sı dijital pH-metre (InoLab pH 720, WTW, Weilheim Germany) kullanılarak 25°C’de ölçüldü. 5 kez tekrarlanan ölçümlerin ortalama ve SD değerleri hesaplandı.

3.2.12.5. Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarından ve Differin® Jel’den Adapalenin Geri Kazanımı

Jel formülasyonlarında karakterizasyon çalışmaları kapsamında; buzdolabı koşullarında ($5\pm 3^\circ\text{C}$) 1 hafta süre ile saklanan jellerde adapalen miktarları saptandı ve geri kazanım yüzdeleri hesaplandı. Differin® Jel’de bulunan adapalen oranı ayrıca yapılan geri kazanım çalışmaları ile saptandı.

Jelleştirme öncesinde sıvı formda bulunan nanotaşıyıcı sistemlerdeki adapalen konsantrasyonu bilindiğinden hazırlanan jel formülasyonlarında bulunan teorik adapalen yüzdesi (a/a) hesaplandı. Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarında ve Differin® Jel'de bulunan adapalen oranları Tablo 3.26'da verilmiştir.

Tablo 3-26: Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarında ve Differin® Jel'de bulunan adapalen yüzdesi

Formülasyon kodu	Adapalen (% a/a)
PAMAM-Jel	0,03
PDC Misel-Jel	0,04
Differin® Jel	0,1

Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarında ve Differin® Jel'de bulunan adapalen miktarlarının geri kazanım çalışması ile belirlenmesi için darası alınan cam viyallerde en az 8 mg formülasyon tartıldı. Üzerlerine 4 ml ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımı ilave edildi ve ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi. Böylece ekstrakte esile edilen karışım 10 ml'lik balon jöjelere aktarılarak aynı çözücü karışımı ile hacmine tamamlandı. Şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzülerek HPLC viyallerine alınan örnekler, Yöntem 3.2.1'de belirtildiği gibi HPLC yöntemi ile analiz edildi.

3.2.12.6. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarının ve Differin® Jel'in Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

Adapalen etken maddesinin kendisi mavi floresan özellik göstermektedir³⁷. Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonları ile Differin® Jel'deki etken maddenin fiziksel durumu bir merkür lambası kullanılarak floresan mikroskobu ile görüntülendi (Leica Microsystems, LasV 4.30 Software, 40X 0,55 objective, Switzerland, eksitasyon filtresi: BP 340-380 nm ve emisyon filtresi: LP 425).

3.2.13. In Vitro Deriden Penetrasyon Çalışmaları

Adapalenin deriye penetrasyonu ve derideki foliküler bölgelerde birikimini değerlendirmek için *in vitro* koşullarda deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı. Yüklenen

adapalen miktarı ve hazırlama yöntemi parametrelerinin formülasyonların stabilite, yükleme oranı ve enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri ve hazırlanan formülasyonların zeta potansiyelleri değerlendirildikten sonra, *in vitro* penetrasyonu değerlendirilecek en uygun nanotaşıyıcı formülasyonları seçildi. Adapalenin sulu dispersiyon şeklinde PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel formülasyonlarından ve ayrıca jelleştirilen formülasyonlarından *in vitro* penetrasyonu etken maddenin ticari jel tipi farmasötik ürün (Differin® Jel) ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren formülasyonlardan etken maddenin *in vitro* deriden penetrasyonun değerlendirilmesi için, membran olarak morfolojik yapısı, kalınlık ve kıl folikülü içeriği, geçirgenliği bakımından insan derisine benzerliği yüksek, literatürde sıklıkla kullanılan ve memeli derisi olarak domuz derisi³⁵⁵ kullanıldı.

3.2.13.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması

Kesim evinden temin edilen tam kalınlıkta abdominal domuz deri dokusu eksizyon sonrası akan su altında temizlendi. Daha sonra subkütan yağ tabakası olan adipoz deri altı dokusu çıkartıldı. Bir peçete ile kurutulduktan sonra uygun boyutta kesilen deri parçaları hemen difüzyon hücrelerine monte edildi ya da -20°C 'de dondurularak maksimum 3 ay süre ile saklandı.

Franz hücrelerine yerleştirilen deri örneklerindeki kıllar mümkün olduğunca yüzeye yakın bir mesafeden yaklaşık 1 mm boyunda cerrahi makas yardımı ile kesilerek uzaklaştırıldı. Deri parçaları kullanılacağı zaman oda sıcaklığına gelmesi beklenerek hücrelere yerleştirilmeden önce 20 dakika PBS (pH 7,4) çözeltisinde bekletilerek hidrasyonu sağlandı.

3.2.13.2. *In vitro* Penetrasyon Çalışması Prosedürü

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında 7 ml reseptör hacmi ve $2,01\text{ cm}^2$ difüzyon alanına sahip Franz difüzyon hücreleri (PermeGear, Hellertown, PA, ABD) kullanıldı. *In vitro* penetrasyon çalışmalarında sıklıkla başvuru olan bir teknik olarak Franz hücrelerinin kullanımı için kabul edilen standart yöntem ilgili OECD rehberinde açıklanmaktadır³⁵⁶. Buna göre, Franz hücrelerinin boyutuna uygun olarak kesilerek hazırlanan tam kalınlıkta abdominal domuz derisi örnekleri, sirkülasyonlu bir su banyosu ile 37°C 'ye getirilmiş Franz difüzyon hücrelerinde her bir deri parçasının epidermal yüzü donöre bakacak şekilde donör ve reseptör faz arasına yerleştirildi.

Franz hücrelerinde reseptör faz sink koşulu sağlayacak çalışma şartlarına göre uygun çözücü ortamı ile dolduruldu. Çözünürlük çalışması sonuçları göz önünde bulundurularak, adapalenin reseptör fazda yeterince çözünmesini (*sink* koşul) sağlamak üzere reseptör faz olarak %4 BSA içeren pH 7,4 PBS kullanıldı. Hücreler etrafındaki ceketten sirkülasyonlu bir su banyosu kullanılarak geçirilen sıcak su ile 37°C'ye getiren reseptör faz manyetik karıştırıcı ile devamlı olarak karıştırıldı. Reseptör faz hücrelere yerleştirmeden önce ultrasonik banyoda 15 dakika degaze edildi.

Donör fazda ise; karakterizasyonu yapılan adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcılar (G2 PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları ve G3 PDC yapısı ile hazırlanan dendron temelli miseller) doğrudan su bazlı koloidal dispersiyon halinde veya bu nanotaşıyıcı sistemlerin HPC (%1,5) ile jelleştirilmesi ile hazırlanan jel formu halinde uygulandı. Kontrol olarak adapalenin pazarda bulunan ticari ürünü (Differin®Jel) kullanıldı.

Jeller uygulanırken darası alınmış temiz birer cam viyalin arkası kullanıldı. Bu yöntem ile jellerin uygulandıkları deri yüzeyinde homojen yayıldığını doğrulamak için nanopartiküler sistemlerin jelleştirilmesinde kullanılan taşıyıcı ortama az miktarda boya (Nil Kırmızısı) ilave edildi ve karıştırılarak boya ortamda iyice dağıtıldı. Nil Kırmızısı içeren HPC (%1,5) jel Franz hücresine sabitlenen domuz derisi örneğine viyallerin arkası ile uygulandı.

In vitro penetrasyon çalışmasında formülasyonlar domuz derisi üzerine 24 saat süre ile uygulandı (n=5). 24 saat sonunda, hücrelerden alınan deri örneklerinin yüzeyinde kalan formülasyonların fazlası %70 izopropil alkol içeren ıslak mendillerle (FASTAID⁺ Pre-Injection swabs-70% IPA alcohol, Robinson Healthcare) dikkatlice temizlenerek uzaklaştırıldı. Deri örnekleri temiz kuru bir mendil ile kurulandı. Deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deri örneklerindeki adapalenin foliküler birikimini değerlendirmek için *punch* biyopsi ve *stratum corneum*'daki konsantrasyon profilini belirlemek için bantla soyma işlemi uygulandı.

3.2.13.3. Adapalenin *In Vitro* Penetrasyonunun *Punch* Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesi

Deriye uygulanan formülasyonlardan deriye geçen madde miktarlarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, literatürde geçen, güncel “*punch* biyopsi” tekniği¹⁹⁸ kullanılarak adapalenin kıl foliküllerinde birikimi kantitatif olarak

değerlendirildi. Adapalenin nanotaşıyıcılar ile foliküler hedeflendirilmesini değerlendirmek için; hem sadece nanotaşıyıcıları içeren su bazlı koloidal formülasyonların (PAMAM-AQ ve PDC-misel-AQ) hem de nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarının (PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel) hem de ticari ürünün (Differin® Jel) gösterdiği performans değerlendirildi.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben Yöntem 3.2.13.2’de bahsedilen temizleme prosedürünün ardından adapalenin foliküler birikimini değerlendirmek üzere *punch* biyopsi tekniği kullanıldı. *Punch* biyopsi uygulamalarında, bir kıl folikülü ile birlikte yağ (*sebase*) bezlerinden oluşan piloseböz ünite (PSU)’yi içeren foliküler birikim bölgeleri ve kontrol grubu olarak da kıl folikülü içermeyen deri alanları kullanıldı. Deri örneklerinden 1 mm çapındaki (0,785 mm²) tek kullanımlık biyopsi zımbaları (Integra Miltex®) yardımı ile 10’ar adet kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve 10’ar adet kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örnekleri alındı.

Biyopsi dokularında bulunan adapalen miktarlarını saptamak için; *punch* biyopsi zımbaları kullanılarak alınan 10’ar adet KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örnekleri eppendorf tüplerine alındı ve üzerlerine ilave edilen 500 µl ACN/DMF (60:40) ile ekstraksiyon yapıldı. *Punch* biyopsi uygulaması sonrasında kalan deri örnekleri de makasla küçük parçalara ayrılarak 5 ml aynı çözücü karışımı ile ekstrakte edildi. Ayrıca, penetrasyon süresi sonunda deri yüzeyinde kalan formülasyonun temizlenmesi için kullanılan mendiller de 15 ml aynı çözücü karışımı ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işleminde, hazırlanan örnekler oda sıcaklığında 15 saat süre ile 210 rpm de orbital karıştırıcıda (IKA KS 501, Staufen, Germany) çalkalandı. Karışımlar şırınga ucu filtreden (0.45 µm, PTFE, Millex-LH, Milipore, Darmstadt, Germany) süzülerek hazırlanan örneklerdeki adapalen miktarı HPLC analizi (Yöntem 3.2.1) ile hesaplandı.

3.2.13.4. Adapalenin *Stratum Corneum*’daki Birikiminin Bantla Soyma (*Tape Stripping*) Yöntemi ile İncelenmesi

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyonu çalışması sonrası *stratum corneum*’daki birikiminin değerlendirilmesi için “*Tape Stripping*” olarak bilinen bant ile soyma yöntemi²⁸ kullanıldı. Bu amaçla yapışkan bantlar (Scotch Book Tape 845, 3M) 2x2 cm ebatında kesilerek önceden hazırlandı. Deri örnekleri, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarını takiben Yöntem 3.2.13.2’de bahsedilen temizleme prosedürü sonrasında, *stratum corneum* tabakası üstte kalacak

şekilde köpük levhalar üzerine iğnelerle sabitlendi. Her bir deri örneği 20 adet bandın arka arkaya yapıştırılıp pens yardımıyla tek seferde çekilmesi yöntemi ile tabakalar halinde soyuldu. İlk iki bant ayrı bir tüpe alındı, daha sonraki bantlar dört ayrı grup olarak dört farklı tüpte toplandı (3-5; 6-10; 11-15; 16-20). Böylece 5'erli gruplar halinde ayrılan tüplere 3 ml ACN/DMF (60:40) ilave edilerek ekstraksiyon yapıldı. Bantlardan ekstraksiyonu yapılan adapalen miktarı *stratum corneum* tabakalarında etken maddenin lokalizasyonunu gösterdi. Adapalenin *stratum corneum*'daki birikiminin karşılaştırılmasında kontrol olarak Differin® Jel kullanıldı.

Bant örneklerindeki adapalenin ekstraksiyonu için tüpler oda sıcaklığında 15 saat süre ile 210 rpm de orbital karıştırıcıda çalkalandı. Ekstraksiyon işlemi öncesi ve sonrasında tüpler 1'er dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra şırınga ucu filtre (0.45 µm, PTFE, Millex-LH, Milipore, Darmstadt, Germany) ile süzüldü. *Stratum corneum*'da biriken adapalen miktarları Yöntem 3.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak HPLC analiz yöntemi ile hesaplandı.

3.2.13.5. Adapalenin Deri Örneklerinden ve Bantlardan Ekstraksiyon İşlemi ile Geri Kazanımı

Ekstraksiyon yönteminin etkinliğini belirlemek için *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarını takiben *punch* biyopsi ve bantla soyma uygulamaları sonrasında, adapalenin deriden ve bantlardan ekstraksiyonu için uygulanan yöntem kullanılarak deri ve yapışkan bant örneklerinden adapalen geri kazanımı çalışması yapıldı. Bu amaçla, *in vitro* penetrasyon çalışmalarında Franz hücrelerine yerleştirilen deri ebatı ve bantla soyma işleminde kullanılan bantların ebatına uygun boyutlarda kesilen tam kalınlıkta domuz derisi ve yapışkan bant (Scotch® 845 Book Tape, 3M) örnekleri üzerine adapalenin 3 farklı konsantrasyonda THF'de hazırlanan çözeltilerinden ayrı ayrı ilave edildi (n=3). Bu şekilde hazırlanan örnekler çeker ocakta bekletilerek organik çözücü uçuruldu ve her birine 5'şer ml ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü ilave edilerek, 1 gece oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 250 rpm de çalkalanarak ekstrakte edildi. Deri ve bant ekstraktları şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzüldü. Örneklerdeki adapalen miktarı Yöntem 3.2.1'de anlatıldığı şekilde HPLC yöntemi ile saptandı. Elde edilen veriler ile deri ve bant örnekleri üzerine ilave edilen adapalen miktarı üzerinden geri kazanım oranları hesaplandı.

3.2.13.6. Reseptör Fazda BSA'nın Çöktürülmesi ve Adapalenin Geri Kazanımı

Adapalenin deriden geçerek reseptöre ulaşip ulaşmadığını, dolayısı ile uğrayan etken madde miktarının saptanması için, 24 saat süre ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarının sonunda, Yöntem 3.2.1'de anlatılan HPLC yöntemi kullanılarak reseptör fazdan alınan örneklerde adapalen miktar tayini analizi yapıldı. Ancak, HPLC analizlerinden önce reseptör ortamında bulunan BSA çöktürüldü. Bu amaçla, reseptör fazdan (pH 7,4 PBS, %4 BSA, a/h) çözeltisi 1,5 ml hacimde alınan örnekler santrifüj tüplerine aktarıldı. Buz banyosuna yerleştirilen tüplere 4,5 ml ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon çözeltisi (buzdolabında bekletilmiş) ilave edildi ve ortamdaki BSA çöktürüldü.

Reseptör fazda BSA'nın çöktürülmesinin ardından, örneklerdeki adapalen analizi için, adapalenin pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisinde 20; 100; 400 ng/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyondaki 3 seri örnek çözeltisi hazırlandı. Bunun için adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan stok çözeltisinden (40 µg/ml) 100 µl alındı, 10 ml'lik balon jojede hacmine pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisi ile tamamlanarak seyreltildi ve manyetik karıştırıcıda düşük hızda karıştırıldı. Elde edilen ara stoktan (400 ng/ml) da aynı çözücü ile uygun seyreltmeler yapılarak iki farklı konsantrasyonda çözelti (20 ve 100 ng/ml) hazırlandı. Ardından her bir seri çözeltiden 1,5 ml alınarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Buz banyosuna yerleştirilen tüplere 4,5 ml ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon çözeltisi (buzdolabında bekletilmiş) ilave edildi ve ortamdaki BSA çöktürüldü. Örnekler 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra şırınga ucu filtreden (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) geçirilerek elde edilen süzüntü HPLC yöntemi (Yöntem 3.2.1) ile analiz edildi. HPLC analizi sırasında standartlar hazırlanırken çözücü ortamı olarak su ve ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon çözeltisinin 1:3 oranında hazırlanan karışımı kullanıldı. Kalibrasyon doğrusuna ait doğru denklemi yardımıyla çözeltilerdeki adapalen konsantrasyonu hesaplandı. Örneklerin çöktürme işlemi sırasında 4 kat seyreltilmiş olduğu göz önünde bulundurularak HPLC ile elde edilen sonuçların 4 katı alınarak gerekli hesaplamalar yapıldı ve % geri kazanım değerleri tespit edildi.

3.2.13.7. Reseptör Fazda Adapalenin Stabilitesi

In vitro deriden penetrasyon çalışmaları süresince deneyler sırasında reseptör ortamı olarak kullanılan pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisinde adapalenin kararlı

kaldığını doğrulamak için 37°C’de su banyosuna yerleştirilen örneklerde 24 saat süre ile stabilitesi incelendi.

pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisi ile 100 ng/ml konsantrasyonda adapalen içeren örnekler hazırlandı. Adapalenin DMSO’daki stok çözeltisinden (10 µg/ml) 10 µl alınarak % pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisi ile 100 kat seyreltildi ve örnekler 37°C’de beklemeye bırakıldı. Belirlenen bekleme süreleri sonunda Yöntem 3.2.13.6’da anlatıldığı gibi çalışılarak ‘reseptör fazdaki BSA’nın çöktürülmesi’ işleminden sonra hazırlanan örnekler HPLC yöntemi ile analiz edildi. Bekleme süreleri sonunda örneklerden elde edilen pik alanları ile taze hazırlanarak kolona enjekte edilen standarda ait pik alanları karşılaştırılarak örneklerdeki adapalen konsantrasyonunda değişiklik olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.13.8. Adapalenin Foliküler Birikiminin Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deriye uygulanan formülasyonlardan adapalenin foliküler birikimini doğrudan, adapalen molekülünün kendisinin gösterdiği floresan özellikten yararlanarak Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile incelemek istememize rağmen ön çalışmalar sırasında, herhangi bir adapalen formülasyonu uygulanmamış olan kontrol olarak kullanılan derinin kendisinin otofloresansa sebep olduğu ve otofloresans kabul edilebilir derecede önlenemediği için alternatif olarak, deri örneklerindeki adapalen, z ekseninde 3 boyutlu tarama (z-stacks) özelliği bulunan modüle sahip bir epifloresan mikroskop (Leica Dmi8 Inverted Microscope, UK) kullanılarak görüntülendi (20x).

Epifloresan mikroskopi analizleri, Yöntem 3.2.13.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen *in vitro* deriden geçiş çalışmalarının ardından deri yüzeyi dikkatlice temizlendikten sonra yapıldı. 24 saat süre ile adapalen yüklü formülasyonların uygulandığı deri örneklerinin floresan mikroskop görüntüleri alındı. Adapalen, floresan mikroskobunda bir merkür lamba (200 watt) (X-Cite® 200DC) ile uyarıldı (DAPI floresans küp, eksitasyon filtresi: BP 325-375 nm ve emisyon filtresi: LP 460/50). Adapalenden gelen mavi floresan sinyali, deri kaynaklı otofloresanstan açıkça ayırt edilebildi.

3.2.14. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Yapılan Görüntüleme Çalışmaları

Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) analizleri ile tarama yapılan deri örneklerinde floresan özellikte bir maddenin lokalize olduğu bölge ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi edinilebilmektedir³⁵⁷.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deriye uygulanan formülasyonlardan adapalenin foliküler birikimini incelemek için adapalen molekülünün kendisinin gösterdiği floresan özellikten yararlanılarak doğrudan CLSM ile görüntüleme çalışması yapıldı. Fakat ön çalışmalar sırasında, herhangi bir adapalen formülasyonu uygulanmamış olan kontrol olarak kullanılan derinin kendisinin otofloresansa sebep olduğu ve otofloresans kabul edilebilir derecede önlenemediği için dendritik nanotaşıyıcı sistemlerle deriye penetrasyonun ve kıl folikülerinde birikimin değerlendirilmesi kapsamında Floresein İzotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen PAMAM dendrimerler ve Nil Kırmızısı (*Nile Red*) (NK) yüklenen dendron temelli miseller ile CLSM çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.14.1. PAMAM Dendrimerler ile Yapılan CLSM Çalışmaları

PAMAM dendrimerlerin derideki birikiminin ve penetrasyonunun değerlendirilmesi ve penetrasyon derinliğinin aydınlatılması amacı ile; floresan boya (FITC) ile işaretlenen PAMAM dendrimerler *in vitro* koşullarda Franz difüzyon hücreleri kullanılarak tam kalınlıkta domuz derisine uygulandı ve floresan boya yüklenen PAMAM dendrimerlerin deriye penetrasyonu CLSM tekniği ile incelendi. Bu kapsamda yapılan çalışmalar aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

PAMAM dendrimerlerin uygulandıkları deri yüzeyinden penetrasyonunu değerlendirmek için, amin yüzey grubuna sahip ikinci jenerasyon PAMAM dendrimer (G2-PAMAM-NH₂) yapısı konfokal görüntülemeye sıklıkla kullanılan bir floresan boya olan FITC ile işaretlendi. PAMAM dendrimerlerin Floresan boya ile işaretlenmesi Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü ile iş birliği yapılarak gerçekleştirildi. Literatürde yer alan yöntemle benzer olarak 100 mg PAMAM dendrimer (5 ml) kuru DMSO içerisinde çözündürüldü³⁵⁸. Ayrı bir viyalde 5 ml kuru DMSO da çözündürülen FITC manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan dendrimer çözeltisi üzerine damla damla ilave edildi. 24 saat reaksiyon süresi sonrasında DMSO ve serbest boyadan kurtulmak için FITC ile işaretlenen PAMAM dendrimerlerin metanol ortamında diyaliz (MWCO: 1000 Da) (SpectroPor, USA) edildi. En son diyaliz torbasındaki madde uçurularak 1 gece

vakumda bekletildi. Böylece, PAMAM dendrimerlerin kovalan konjugasyon olanağı sağlayan yüzey gruplarına floresan boya (FITC) bağlanarak G2 PAMAM(NH₂)-FITC (1:2) konjugatı oluşturuldu.

Yöntem 3.2.13.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak floresan boya (FITC) bağlı PAMAM dendrimerler ile *in vitro* deriden geçiş çalışması yapıldı.

PBS (pH 7,4) çözeltisinde çözündürülerek hazırlanan G2 PAMAM(NH₂)-FITC konjugat (5 µM) formülasyonu *in vitro* koşullarda Franz difüzyon hücreleri kullanılarak domuz derisine 200 µl hacimde uygulandı³⁵⁹. Donör kompartmanın üstü alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunması sağlandı. En az iki Franz hücresinde çalışıldı.

Kontrol grubu olarak; serbest FITC’in PBS (pH 7,4)’deki 10 µM çözeltisi kullanıldı. Kontrol FITC çözeltisi hazırlanırken 3,9 mg FITC tartıldı, 1 ml etanolde çözündürüldü. 10 µl çözelti PBS (pH 7,4) çözeltisi ile 1000 kat seyreltildi.

Uygulandıkları deri örneklerinde 8 saat bırakıldıktan sonra deri yüzeyinde kalan formülasyon PBS (pH 7,4) çözeltisi ile yıkanarak ve temiz bir bez ile kurularak uzaklaştırıldı.

Deri dokusundan keskin bir bisturi yardımı ile küçük parçalar ayrıldı, ardından doku gömme ortamı (*tissue embedding medium*) olarak bilinen OCT matrikste (TissueTek™ Cryo) kriyotom cihazı Thermo Scientific™ Cryotome™, USA) içerisinde -20°C’de donduruldu ve kesit alma bölmesinde sabitlenerek deri örneklerinden 20 µm kalınlığında dikey kesitler alındı.

Lam üzerine alınan kesitler bir CLSM (Leica TCS SPE) yardımı ile incelenerek FITC bağlı PAMAM dendrimerlerin derideki birikimi ve deri tabakalarındaki lokalizasyonu görüntülendi. CLSM görüntülerde 10x ya da 40x büyütme ölçeği uygulandı.

Sahip olduğu maksimum eksitasyon (λ_{ex} :490 nm) ve emisyon (λ_{em} :520 nm) dalga boyları dikkate alınarak, örneklerdeki FITC Argon lazer kullanılarak 488 nm dalga boyunda uyarıldı ve alınan sinyaller (emisyon) uygun dalga boyunda filtrelendi³⁵⁹.

3.2.14.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları ile Yapılan CLSM Çalışmaları

Deriden penetrasyonun incelendiği görüntüleme çalışmalarında, özellikle lipofilik karakterde etken maddeler için model floresan boya olarak Nil Kırmızısı (NK) yaygın

olarak kullanılmaktadır. NK'nin en önemli özelliği, deri bileşenlerinin sinyal verdiği dalga boyu aralığından uzak olan 630 nm dalga boyunda floresan sinyali vermesidir. Bu sayede derinin kendisinden gelen otofloresanstan kaçınılması mümkün olmaktadır³⁶⁰.

Dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının derideki kıl foliküllerine hedeflendirilme potansiyelinin değerlendirilmesinde; model olarak seçilen lipofilik karakterdeki floresan bir boya olan NK Yöntem 3.2.8.3'te anlatıldığı şekilde nanotaşıyıcı sisteme kosolvan evaporasyon tekniği ile yüklendi.

In vitro koşullarda domuz derisine uygulanan dendron temelli misellerden NK'nin penetrasyonu sonrası gerçekleştirilen CLSM çalışması ile model boyanın derideki lokalizasyonunun görüntülenmesi amaçlandı. Model boyanın derideki birikiminin ve penetrasyonunun değerlendirilmesine yönelik yapılan CLSM analizleri için 8 saat maruziyet süresi ile Yöntem 3.2.13.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak NK yüklü dendron temelli miseller ile *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı.

NK yüklenen (128 µg/ml, a/h) dendron temelli miseller Franz difüzyon hücreleri kullanılarak domuz derisine 150 µl hacimde uygulandı. Donör fazın üzeri alüminyum folyo sarılarak ışıktan korunması sağlandı. En az iki Franz hücresinde çalışıldı.

Çalışma sırasında kontrol olarak NK'nin PBS (pH 7,4)'te hazırlanan dispersiyonu kullanıldı. Bunun için nanotaşıyıcı sistemde kullanılan NK konsantrasyonu dikkate alınarak aynı konsantrasyonda NK (128 µg/ml, a/h) PBS içinde süspande edildi. Uygulamayı takiben penetrasyon süresi sonunda deri yüzeyinde kalan formülasyonlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve deri örnekleri temiz bir bez ile kurulandı.

Yöntem 3.2.11.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak deri örnekleri doku gömme ortamında kriyotom cihazı içerisinde -20°C'de donduruldu ve kesit alma bölümünde sabitlenerek deri örneklerinden 20 µm kalınlığında dikey ve 7 µm kalınlığında yatay kesitler alındı. Deriden *stratum corneum* yüzeyinden başlamak sureti ile yatay olarak alınan her bir kesit dikkatli bir şekilde sayıldı; böylece uzaklaştırılan doku ile beraber deride inilen derinlik yaklaşık olarak saptandı.

Lam üzerine alınan kesitler bir CLSM (Leica TCS SPE) yardımıyla incelenerek model boyanın, NK, derideki birikimi ve deri tabakalarındaki lokalizasyonu görüntüledi. Konfokal görüntüler, 7 µm kalınlığındaki kesitlerin 2 µm lik aralıklar şeklinde taranması

ile xy ve xz (z-stack mode) düzlemlerinde elde edildi. Uygun objektif lenslerle 10 x büyütme ölçeği uygulandı.

Sahip olduğu maksimum eksitasyon (λ_{ex} :549 nm) ve emisyon (λ_{em} :630 nm) dalga boyları dikkate alınarak; örneklerde NK, HeNe lazer kullanılarak 543 nm eksitasyon dalga boyunda uyarıldı ve alınan sinyaller (emisyon) uygun dalga boyunda filtrelendi³⁶¹.

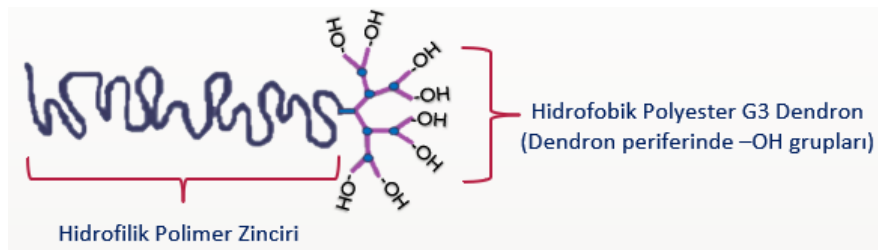
3.2.15. Adapalenin Dendron Temelli Yapılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Polyester dendron-polimer konjugat (PDC) temelli nanotaşıyıcılar ile adapalenin deriden penetrasyon profilinin araştırılması ve derideki birikiminin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar kapsamında; adapalenin dendron temelli nanotaşıyıcılara yüklenmesinde alternatif olarak ester bağı ile kimyasal olarak bağlanması planlandı. Adapalenin dendron temelli yapılarla kovalan bağlanmasıyla oluşturulan konjugatlar, Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde hazırlandı.

Adapalen moleküllerinin PDC yapısına konjugasyon ile bağlanması ile ön ilaç yaklaşımı uygulandı. Bu amaçla sentezlenen hidroksil yüzey gruplarına sahip polyester dendron polimer konjugat yapısı ve adapalen fizyolojik ortamda kopması ön görülen ester bağı ile kovalan bağlanarak “PDC-ADA” konjugat yapısı oluşturuldu.

3.2.15.1. Adapalen Bağlı Polyester Dendron Polimer Konjugat (PDC-ADA) Yapısının Hazırlanması

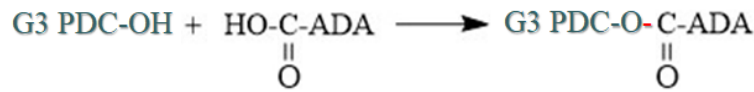
İlk olarak, uç dallarında hidroksil grupları bulunan üçüncü jenerasyon polyester dendron yapısı sentezlendi. Ardından bu yapıya poli(metil metakrilat) yapısında lineer bir polimer zinciri konjuge edilerek AB tipi dendritik lineer diblok kopolimer yapısında G3 polyester dendron-polimer konjugat (PDC-OH) yapısı oluşturuldu. G3 PDC-OH'nin temsili yapısı Şekil 3.4'te gösterilmektedir.



Şekil 3-4: Hidroksil yüzey gruplu G3 PDC-OH yapısı

G3 PDC-OH (M_A): 11890 g/mol (Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde karakterize edilmiştir).

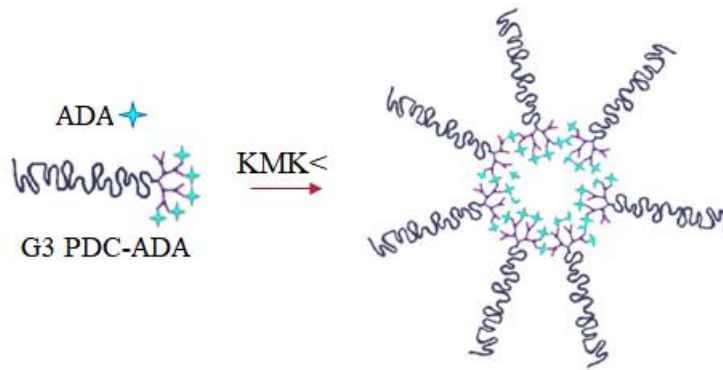
Ardından adapalen molekülleri G3 PDC-OH yapısına ester bağı ile kovalan bağlanarak PDC-ADA yapısı sentezlendi. Sentez için, G3 PDC-OH yapısındaki hidroksil yüzey grupları (-OH) ve adapalen molekülü yapısındaki karboksil grubundan (-COOH) yararlanıldı (Şekil 3.5). Sentez ve karakterizasyon çalışmaları Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirildi.



Şekil 3-5: PDC-ADA'nın kimyasal sentezi

3.2.15.2. PDC-ADA Yapısı ile Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması

Sentezlenen PDC-ADA yapısı ile laboratuvarımızda Yöntem 3.2.8.3'te anlatılan kosolvan evaporasyon yöntemi kullanılarak misel nanotaşıyıcıları hazırlandı. 1,1 mg PDC-ADA, 200 µl THF'de çözündürüldü ve PDC-ADA'nın THF'deki çözeltisi cam bir viyal içindeki 1 ml ultra saf suya damla damla ilave edildi (PDC-ADA'nın sudaki son konsantrasyonu $>10^{-7}$ M (*kritik misel konsantrasyonu*) 18 saat süre ile organik çözücünün çeker ocak altında uçması beklenerek misel yapısının oluşumu sağlandı. Adapalen bağlı polyester dendron polimer konjugat (PDC-ADA) yapısı ve PDC-ADA yapısı ile hazırlanan miseller temsili olarak Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3-6: PDC-ADA yapısı ile misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması

3.2.16. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımı (Polidispersite İndeksi) ile Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi

PDC-ADA yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarının ortalama partikül boyutu (hidrodinamik χ ap) ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri ile zeta potansiyel değerleri sırasıyla yöntem 3.2.5 ve yöntem 3.2.7.2’de anlatıldığı gibi χ alışılarak ölçüldü.

3.2.17. PDC-ADA Yapısının Miktar Tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Yöntemi ve Validasyon χ alışmaları

Örneklerde bulunan PDC-ADA içeriğinin kantitatif olarak belirlenmesinde Yöntem 3.2.1’de belirtilen analiz yöntemi kullanıldı. Yalnız bu yöntemde farklı olarak PDC-ADA konjugat yapısında bulunan ester bağının analiz şartlarında kopmaması için hareketli faz trifloroasetik asit ilave edilmeksizin hazırlandı.

Optimize edilen HPLC yöntemi PDC-ADA’nın derideki birikiminin değerlendirilmesi için, *in vitro* deriden penetrasyon χ alışmalarını takiben hazırlanan *punch* biyopsi örneklerinde ve *stratum corneum*’un soyulması işleminde kullanılan bantlarda bulunan konjugat miktarı analizlerinde kullanıldı.

3.2.17.1. Hareketli fazın hazırlanması

Analizlerde hareketli faz olarak, yukarıda da belirtildiği gibi PDC-ADA yapısının analiz şartlarında hidrolizini önlemek için yöntem 3.2.1.1’de belirtilen χ özücü karışımından farklı olarak trifloroasetik asit ilave edilmemiş asetonitril/tetrahidrofuran/su (43/36/21) (h/h/h) karışımı kullanıldı.

3.2.17.2. PDC-ADA’nın HPLC Analizinde Kromatografik Koşullar

Analizler Yöntem 3.2.1.2’de belirtilen kromatografik koşullarda yapıldı. Aynı şekilde floresan dedektörlü bir HPLC sistemi ($\lambda_{\text{abs}} = 320 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$) (Shimadzu) ve sabit faz olarak HPLC kolonu (LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) LiChroCART 4,6 x 150 mm, Merck, Germany) kullanıldı.

3.2.17.3. Standart χ özeltilerin Hazırlanması

Standart kalibrasyon doğrusunun oluşturulması için, hassas terazide tartılan PDC-ADA ekstraksiyon ortamı olarak kullanılan asetonitril/dimetilformamit (ACN/THF) (60:40) (h/h) χ özücü karışımında vorteks ile karıştırılarak χ özündürüldü, birkaç dakika ultrasonik banyoda bekletildi ve balon jojede hacmine tamamlanarak stok χ özelti (15 $\mu\text{g/ml}$) hazırlandı. Aynı χ özücü karışımı ile uygun seyreltmeler yapılarak farklı

konsantrasyonlarda (0,25-3 µg/ml) bir seri standart çözelti hazırlandı. Örnekler şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzöldükten sonra HPLC yöntemi ile analiz edildi. Her konsantrasyon için üç paralel örnek ile çalışıldı.

3.2.17.4. PDC-ADA'nın HPLC Analizi Yöntemi Validasyonu

Geliştirilen miktar tayini yönteminin güvenilirliğini kanıtlamak için yöntem 3.2.2'de anlatıldığı şekilde validasyon çalışmaları yapıldı.

Seçicilik: Analiz yönteminin seçiciliğinin değerlendirilmesi amacı ile; PDC-ADA yapısının sentezlenmesi aşamasında kullanılan her bir bileşen (G3 PDC-OH, G3 polyester dendron, poli(metil metakrilat) temelli lineer polimer, adapalen) ve ayrıca domuz derisi, yapışkan bant, ekstraksiyon çözücüsü ya da mobil faz kaynaklı olası piklerin, kromatogramda PDC-ADA'ya ait alıkonma zamanında gelip gelmediği yöntem 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak kontrol edildi. Ekstraksiyon çözücüsü ortamında hazırlanan örnekler PDC-ADA ilave edilmeksizin ayrı ayrı kolona enjekte edilerek HPLC yöntemi ile analiz edildi. Örnekler analiz öncesinde şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzöldü.

Doğrusallık: PDC-ADA için standart doğrunun oluşturulması için, stok çözeltiden (15 µg/ml) uygun seyreltmeler yapılarak, 0,25-3 µg/ml konsantrasyon aralığında standart çözelti serisi hazırlandı.

Yöntem 3.2.2.2'de belirtildiği gibi çalışılarak, kalibrasyon doğrusu çizildi ve regresyon analizi yapıldı. Regresyon doğru denklemi oluşturularak determinasyon katsayısı (r^2) hesaplandı.

Kesinlik: PDC-ADA miktar tayininde kullanılan analiz yönteminin tekrarlanabilirliğini test etmek için, yöntem 3.2.2.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapıldı.

Teşhis Limiti, TL ve Miktar Tayini Limiti: Yöntem 3.2.2.5 ve 3.2.2.6'da belirtilen geçen formüller (3-1 ve 3-2) kullanılarak hesaplandı.

Örneklerin Stabilitesi: *In vitro* deriden penetrasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan örneklerdeki PDC-ADA'nın ekstraksiyon ortamında ve analiz süresince kararlı kaldığını doğrulandı. PDC-ADA'nın ekstraksiyon ortamı olarak kullanılan (ACN/THF) (60:40) çözücüsü ile 1 µg/ml konsantrasyonda örnek çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan örneklerin belirlenen süre (0., 24. ve 72. saat) sonunda HPLC yöntemi ile

analizi yapıldı. Elde edilen pik alanları ile taze hazırlanarak kolona enjekte edilen örneğe ait pik alanı karşılaştırıldı. Her zaman noktası için üç paralel örnek ile çalışıldı.

3.2.18. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından *In Vitro* Salımı Çalışmaları

In vitro salım çalışmaları için adapalenin çözünürlük verileri göz önünde bulundurularak reseptör fazda sink koşulu sağlayacak çalışma şartlarına göre uygun çözücü ortamı belirlendi ve donör fazda kullanılacak maksimum konsantrasyonu hesaplandı.

Hazırlanan PDC-ADA yapısından adapalen salımını değerlendirmek için *in vitro* salım çalışmalarında kullanmak üzere derinin pH sınırı taklit edecek bir salım ortamı kullanıldı. Akneli derinin pH'sının 5,5-6 aralığında olduğu bilinmektedir³⁶². Bu nedenle, *in vitro* salım çalışmalarında reseptör ortam olarak pH 5,5 PBS çözeltisi kullanıldı. Sink koşulu sağlamak için, bu çözünme ortamına lipofilik etken maddelerin çözünürlüğü arttırmak için *in vitro* salım çalışmalarında olarak sıklıkla kullanılan^{363,364} Tween 80 (%1,75, a/h) ilave edildi.

Epidermis 'te ve kıl foliküllerinde aktivite gösteren esterazlar ilaç metabolizması ve ön ilaç aktivasyonunda büyük rol oynamaktadır³⁶⁵. Ön ilaç olarak hazırlanan taşıyıcı sistemlerden ilaç salımı pH-bağımlı olabileceği gibi enzimatik hidroliz mekanizması ile de gerçekleşebilir^{366,367}.

Adapalen bağlı dendritik konjugatlardan (PDC-ADA) adapalen salımını değerlendirmek üzere, derideki esterazlara bağlı enzimatik aktiviteyi taklit edecek bir salım ortamı da kullanıldı. *In vitro* salım çalışmaları kapsamında derideki enzimatik aktivite göz önüne alınarak, reseptör ortama esteraz ilavesi yapılması düşünüldü. Bu amaçla, enzim ortamında yapılan salım çalışmaları, kovalan olarak ester bağı ile adapalen bağlanarak hazırlanan konjugatlardan etken maddenin, hidrolitik biyotransformasyondan sorumlu enzimler olan esterazlar aracılığıyla salım profilininin gösterilmesi şeklinde tasarlandı.

3.2.18.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmalarında sentetik membran olarak diyaliz membran (MWCO: 2000 Da) (SpectroPor, USA) kullanıldı. 50 µl formülasyon (1,1 mg/ml) alınarak pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi ile 1 ml'ye tamamlandı ve diyaliz torbasına (3,9x10⁻

⁶ M PDC-ADA; 8,6 µg adapalen) dolduruldu. Diyaliz torbalar sıcaklığı 32°C de sabit tutulan 50 ml reseptör faz pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi bulunan beherlere yerleştirildikten sonra manyetik bir karıştırıcı ile karıştırıldı. Önceden belirlenen zaman noktalarında reseptör fazdan 1 ml örnek alınarak her defasında, alınan hacim kadar aynı sıcaklıktaki reseptör faz ilave edildi.

Kontrol olarak, adapalenin DMSO'da hazırlanan stok çözeltisinden pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi ile seyreltmeler yapıldı ve PDC-ADA yapısında bulunan adapalen ile aynı başlangıç konsantrasyonunda (8,6 µg/ml) serbest adapalen içeren örnekler ile de aynı şekilde çalışılark *in vitro* salım çalışması yapıldı.

In vitro salım çalışmalarında konjugattan salınan adapalen miktarları Yöntem 3.2.1'de belirtildiği gibi çalışılarak HPLC analizi ile saptandı.

3.2.18.2. Esteraz içeren Ortamda *In Vitro* Salım Çalışmaları

Konjugatlardan enzimatik aktiviteye bağlı adapalen salımının araştırılması için, domuz karaciğer esterazı (*Porcine Liver Esterase*: PLE) ilave edilen pH 7,4 PBS ortamında salım çalışmaları yapılarak değerlendirildi¹⁰⁹.

Enzim ortamında yapılan *in vitro* salım çalışmaları, 10 ml'lik cam viyaller ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılarak ile 37°C'de yürütüldü (DAIHAN® Systematic Multi-Hotplate Stirrers SMHS-6). Enzim içeren reseptör ortamı hazırlamak için, 5,6 mg PLE (18 IU/mg) tartıldı ve 5 ml PBS içinde çözündürüldü (20 IU/ml). Hidroliz için ortamda 2 ve 5 IU/ml konsantrasyonlarında esteraz, PLE, kullanıldı. Her bir viyale 37°C de su banyosunda 15 dakika boyunca inkübe edilen pH 7,4 PBS (0,01 M)'ten 3,160 µl kondu. Üzerine pH 7,4 PBS (37°C'de inkübe edilmiş) ortamında taze hazırlanan PLE nin stok çözeltisinden (20 U/ml ya da 50 U/ml PLE) 400 µl alınarak ilave edildi. 250 rpm hızda yavaşça karıştırılan PBS ortamına 400 µl DMSO ilave edildi. Böylece viyallerde 3,96 ml %10 DMSO içeren pH 7,4 PBS ortamı hazır bekletildi.

Ardından PDC-ADA yapısı ile hazırlanan misel formülasyonundan (1,1 mg/ml= $7,9 \times 10^{-5}$ M) 40 µl alındı ve viyallerde hazır bulunan PLE içeren pH 7,4 PBS ortamına ilave edilir edilmez reaksiyon başlatıldı (Viyallerdeki son hacim 4 ml, PDC-ADA konjugat konsantrasyonu= $7,9 \times 10^{-7}$ M). Belli saat aralıklarında alınacak örnekleri temsilen her bir saat için ayrı viyale aynı başlangıç konsantrasyonunda misel formülasyonu konmuş oldu. Reaksiyonun başlatıldığı 0. zaman noktasından itibaren her

viyalde reaksiyonun önceden belirlenen zaman boyunca sürmesine izin verildi. Böylece her bir saat örneği için reaksiyon ayrı viyallerde sürdürüldü.

Uygun zaman aralıklarında viyallerden 150 µl örnekler alınarak 1,5 ml lik ependorflara aktarıldı. Üzerlerine enzim ektivitesinin sonlandırılması ve protein yapısının çöktürülmesi için buz banyosunda hazır bekletilen 600 µl soğuk ACN/DMF (60:40) (h/h) organik çözücü karışımı derhal ilave edildi, vortekslendi. Enzim ektivitesinin sonlandırılması ve protein yapısının çöktürülmesi sonrasında örnekler 5 dakika süre ile 15.000 rpm hızda santrifüjlendi ve şırınga ucu filtre (0,45 µm, 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) yardımıyla süzülerek Yöntem 3.2.1’de anlatıldığı gibi çalışılarak HPLC yöntemi ile analiz edildi. Enzimatik hidroliz reaksiyonu sonucu ortamda açığa çıkan adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ekstraksiyon ortamında konsantrasyonu tespit edildi.

Kontrol olarak PLE ilave edilmeksizin %10 DMSO içeren pH 7,4 PBS salım ortamında aynı çalışmalar yürütüldü.

Yapılan ön denemelerde PBS ortamına çalışma sırasında enzim aktivitesini sonlandırma basamağında protein yapısını çöktürmek için kullanılan oranlarda organik ACN/DMF (60:40) çözücü ilave edildiğinde tuz içeriğinin çöktüğü için standartlar hazırlanırken çözücü olarak, 9:1 oranında Su:DMSO (40 µl miselden gelen su+3560 µl PBS’ten gelen Su+400 µl DMSO) karışımına hacminin 4 katı kadar ACN/DMF (60:40) ekstraksiyon çözücüsü ilave edilmesi ile hazırlanan çözücü ortamı kullanıldı.

Çalışma sırasında enzim aktivitesinin sonlandırıldığından emin olmak için 1. saat sonunda ortamdan alınan örnekte enzim aktivitesi yukarıda anlatıldığı şekilde derhal sonlandırıldı ve hemen Yöntem 3.2.1’de anlatıldığı gibi çalışılarak HPLC ile miktar tayini analizi yapıldı. Enzim aktivitesi sonlandırılmış aynı örnek 1 saat sonra tekrar HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.19. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarının *in vitro* koşullarda deriye uygulanması ile deriye geçen PDC-ADA ve PDC-ADA yapısından serbestleşen etken maddenin penetrasyonu Franz difüzyon hücreleri kullanılarak incelendi.

Deri örnekleri yöntem 3.2.13.1’de anlatıldığı şekilde hazırlandı. PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarında kesim evinden temin edilen taze deri bekletilmeden iki gün içerisinde kullanıldı.

Taze domuz derisinden *in vitro* penetrasyonun değerlendirilmesi amacı ile yöntem 3.2.13.2’de belirtilen koşullarda çalışıldı. Reseptör faz sink koşulu sağlamak üzere pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) çözeltisi ile dolduruldu. Donör faza 240 µl PDC-ADA yapısını içeren sulu misel formülasyonu (1,1 mg/ml) (264 µg PDC-ADA yapısı ile uygulanan eşdeğer ADA miktarı=23,3 µg/cm²) ya da Differin® Jel (23,3 µg ADA/cm²) uygulandı.

24 saat sürdürülen *in vitro* penetrasyon çalışmalarının sonunda deriden permeasyona uğrayan etken maddenin saptanması için reseptör fazdan alınan örneklerde ACN/THF (60:40) (h/h) ekstraksiyon çözeltisi ile Yöntem 3.2.13.6 anlatıldığı gibi BSA’nın çöktürülmesi işleminden sonra Yöntem 3.2.1’de anlatılan koşullarda HPLC analizi yapıldı.

In vitro penetrasyon çalışmalarının ardından deri yüzeyinde kalan formülasyon fazlası dikkatli bir şekilde silinerek uzaklaştırıldı. Adapalenin kıl foliküllerinde ve folikül içermeyen deri bölgelerindeki birikimi Yöntem 3.2.13.3’te anlatıldığı gibi çalışılarak *punch* biyopsi yöntemi ile incelendi. Adapalenin *stratum corneum*’daki birikimi ise Yöntem 3.2.13.4’te anlatıldığı gibi çalışılarak bantla soyma yöntemi ile incelendi.

3.2.19.1. Adapalenin *In Vitro* Deriden Penetrasyonunun Punch Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesi

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarının *in vitro* koşullarda 24 saat deriye uygulanması ile deriye geçen PDC-ADA ile birlikte deride serbestleşen adapalen miktarlarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, PDC-ADA konjugat yapısında bağlı bulunan ve serbestleşen adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi kantitatif olarak değerlendirildi. Karşılaştırma amacıyla kontrol olarak adapalenin ticari ürünü de (Differin® Jel) kullanıldı.

Temizleme prosedürünün ardından foliküler birikimi değerlendirmek üzere *punch* biyopsi tekniği kullanıldı. *Punch* biyopsi yöntem 3.2.13.3’te anlatıldığı şekilde uygulandı.

Biyopsi dokularında bulunan PDC-ADA konjugat ve adapalen miktarlarını belirlemek için; *punch* biyopsi ile 10’ar adet alınan KF-Poz (PSU içeren) ve KF-Neg

(PSU içermeyen) örnek grupları 500'er µl ACN/THF (60:40) ile eppendorf tüplerde Yöntem 3.2.13.3'te anlatıldığı şekilde ekstraksiyona tabi tutuldu. *Punch* biyopsi uygulaması sonrasında kalan deri makasla küçük parçalara ayrılarak 5 ml ACN/THF (60:40) ile ayrıca ekstrakte edildi. Biyopsi örneklerinde ve kalan deride bulunan adapalen ve PDC-ADA konjugat miktarları sırasıyla Yöntem 3.2.1 ve Yöntem 3.2.17'de belirtilen koşullarda yapılan HPLC analizleri ile saptandı.

3.2.19.2. Adapalenin *Stratum Corneum*'daki Birikiminin Bantla Soyma (*Tape Stripping*) Yöntemi ile İncelenmesi

Yöntem 3.2.13.4'te anlatıldığı gibi çalışılarak *stratum corneum* tabakası 20 kez bantla soyuldu ve ekstraksiyon işlemi yapıldı. Bantla soyma işlemi sonrasında kalan deri (*canlı epidermis/dermis*) de ayrıca küçük parçalar halinde kesilerek ayrı bir tüpte 3 ml ekstraksiyon çözücüsü ile aynı şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon sonunda bant gruplarını içeren tüplerdeki ekstraksiyon sıvıları bir araya getirildi (20 bant) ve 3'er dakika vortekslelendikten sonra HPLC analizleri gerçekleştirildi. Bantlardan bir araya getirilerek ekstrakte edilen miktarlar *stratum corneum*'daki toplam birikimi, kalan deride ekstrakte edilen miktarlar ise *epidermis/dermis* tabakalarındaki birikimi gösterdi.

Stratum corneum (SC) ve canlı *epidermis/dermis* tabakalarında biriken adapalen ve PDC-ADA miktarları sırasıyla Yöntem 3.2.1 ve Yöntem 3.2.17'de belirtilen koşullarda yapılan HPLC analizleri ile saptandı.

3.2.20. İstatiksel Analiz

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında, veri gruplarına ait sonuçlar GraphPad Prism 6 bilgisayar programı yardımıyla *One Way ANOVA* analizi yapılarak *Dunnet's multiple comparison* test veya *Tukey's multiple comparisons* test ile istatistiksel açıdan değerlendirildi, anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Geliştirilmesine Ait Bulgular

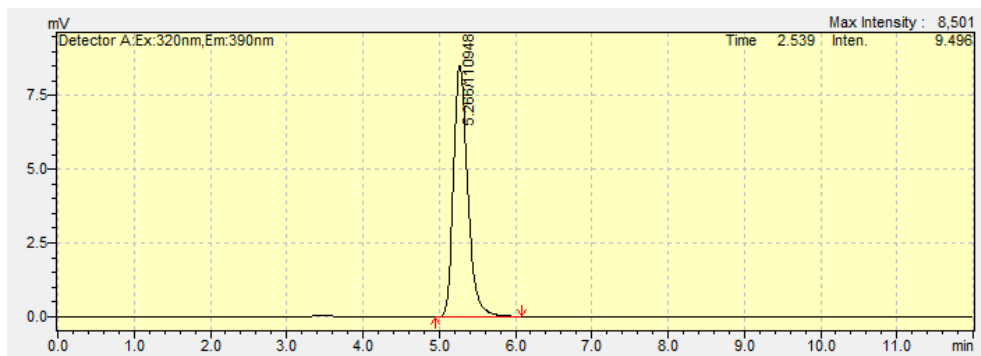
HPLC analizlerinde standart çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacak çözücünün belirlenmesi için *in vitro* penetrasyon çalışmalarındaki deri örneklerinden adapalenin ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü dikkate alındı. Bu amaçla farklı çözücü sistemleri arasından asetonitril/dimetilformamit (ACN/DMF) (60/40) (h/h) çözücü karışımının ekstraksiyonlarda kullanılmasına karar verildi. Seçilen bu çözücü sistemi ile hazırlanan örneklerle ait kromatogramlarda; domuz derisinden kaynaklanan pikler ile adapalen pikinin birbirinden net şekilde ayrıldığı ve adapalenin alıkonma zamanında herhangi bir girişim olmadığı saptandı.

HPLC cihazı her ne kadar klimalı ortamda bulunsu da yaz aylarında da sürdürülecek analizler göz önüne alınarak pik alanlarında sıcaklığa bağlı herhangi bir dalgalanma, değişiklik olmaması için kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı.

Alıkonma zamanı kısa olan adapalenin HPLC analizleri için akış hızı 0,9 ml/dk. olarak belirlendi. Bu akış hızı ile iyi bir pik çözünürlüğü ve keskin pikler elde edildiği saptandı. Düşük konsantrasyonların tespit edebilmesi ve aynı zamanda düzgün bir pik keskinliği sağlanabilmesi için uygun enjeksiyon hacminin 20 µl olduğu saptandı.

4.2. Adapalenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1'de anlatılan miktar tayini yöntemi kullanılarak elde edilen adapalene ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



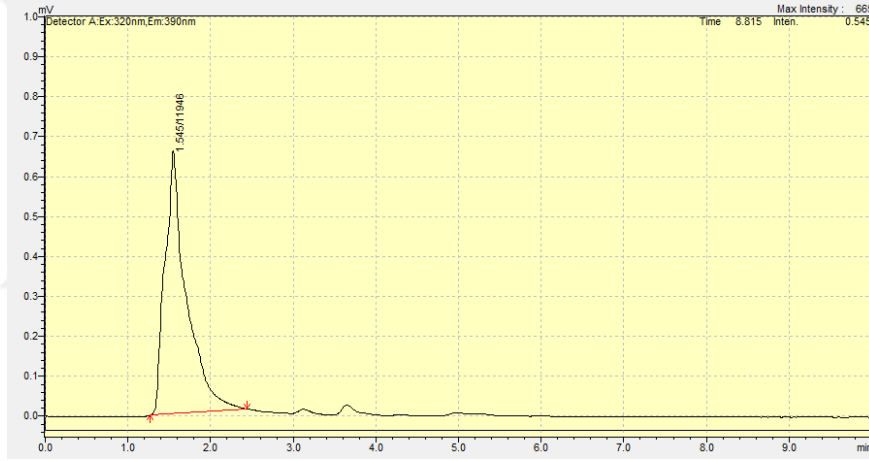
Şekil 4-1: HPLC analizinde adapalene ait kromatogram

Ekstraksiyon ortamı olan ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında hazırlanan örnekten gelen adapalen piki (500 ng/ml). Çalışılan kromatografik koşullarda adapalenin alıkonma zamanı 5,26 dakika olarak saptandı.

4.2.1. Seçicilik

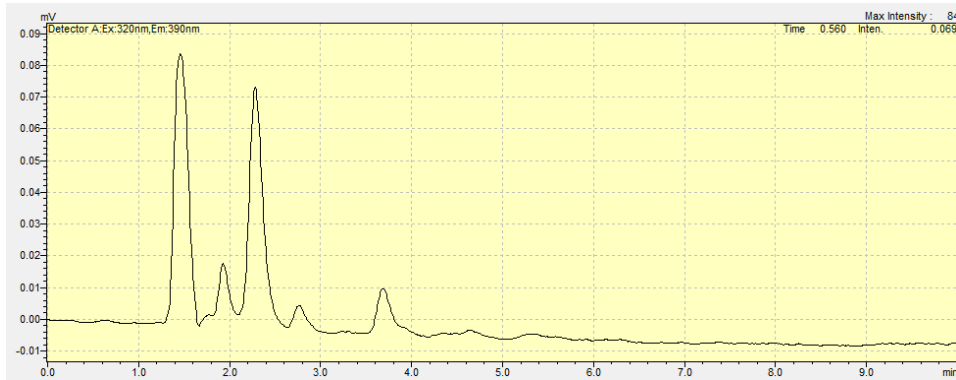
Yöntem 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde çalışılarak yöntemin seçiciliği belirlendi. Yapılan HPLC analizlerinde, ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan örneklerin kolona enjeksiyonu sonucu penetrasyon çalışmalarında kullanılan domuz derisi ve bantlardan kaynaklanan piklerle, adapelen piki arasında bir girişim olmadığı; ayrıca formülasyon bileşenleri, mobil faz ve çözücü ortamından kaynaklı, adapalenin alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik olmadığı saptandı.

ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında ekstraksiyon işlemi ile hazırlanan deri ve bant örneklerine ait kromatogram görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te gösterilmektedir.



Şekil 4-2: HPLC analizinde kontrol deri örneğinden gelen pik görüntüsü

ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan deri örneğinden gelen pik



Şekil 4-3: HPLC analizinde kontrol bant örneğinden gelen pik görüntüsü

ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan bant örneğinden gelen pik

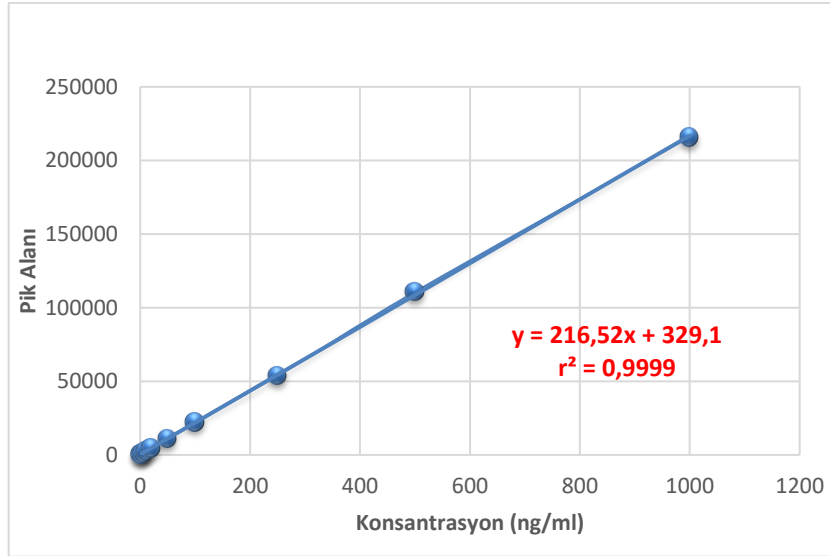
Aynı şekilde *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan reseptör ortamı, pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h), kaynaklı adapalen piki ile girişim yapan veya adapalenin alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik olmadığı doğrulandı.

4.2.2. Doğrusallık

ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında hazırlanan standartlarla konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan (AUC) değerlerinin ortalamaları, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Regresyon doğrusuna ait denklem ve hesaplanan determinasyon katsayısı (r^2) Şekil: 4.4’te verilmiştir.

Tablo 4-1: Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında HPLC ile analizi yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan	SD ($\pm$)	RSD (%)
1	295,2	42,2	17,2
5	1226,4	84,6	6,9
10	2351,2	79,9	3,4
25	4645,1	190,4	4,1
50	10976,9	153,7	1,4
100	22273,4	623,7	2,8
250	53839,9	861,4	1,6
500	110785,4	1369,4	1,2
1000	215891,7	3454,3	1,6

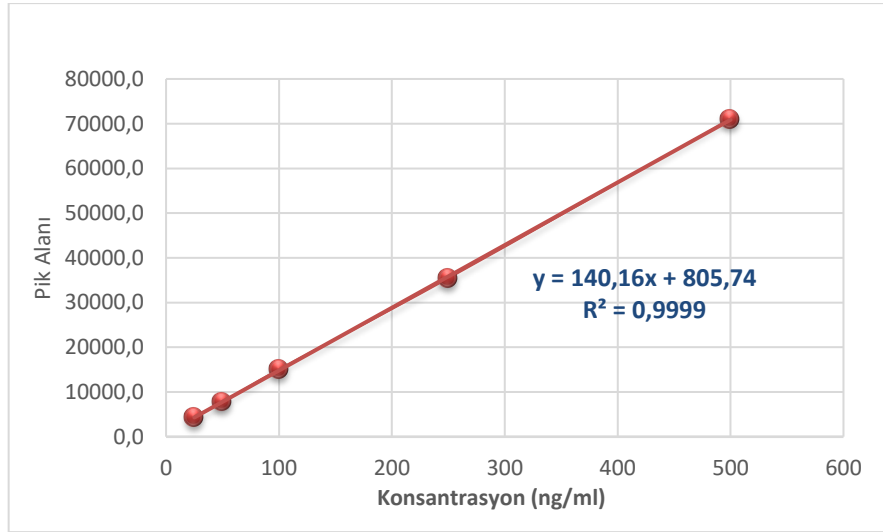


Şekil 4-4: Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı

In vitro penetrasyon çalışmalarında reseptör ortamı olarak kullanılması planlanan pH: 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisinde hazırlanan standartlarla konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan (AUC) değerlerinin ortalamaları, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Regresyon doğrusuna ait denklem ve hesaplanan determinasyon katsayısı (r^2) Şekil: 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4-2: Adapalenin pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) ortamında HPLC ile analizi yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan	SD ($\pm$)	RSD (%)
25	4375,0	133,6	3,1
50	7753,3	174,9	2,3
100	15086,0	266,4	1,8
250	35383,7	563,6	1,6
500	71053,3	1031,3	1,5



Şekil 4-5: Adapalenin pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) ortamında kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı

4.2.3. Kesinlik

Adapalenin HPLC ile analiz yönteminin validasyonu kapsamında, yöntem 3.2.2.3'te anlatılan kesinlik çalışmalarında ACN/DMF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan standart çözeltiler için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4-3: Adapalenin HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
5	1259,8	76,6	6,1
50	10782,7	138,4	1,2
500	109319,6	1750,3	1,6

Tablo 4-4: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan			Ortalama alan	SD ($\pm$)	RSD (%)
	1. gün	2. gün	3. gün			
5	1259,8	1323,1	1194,3	1259,1	64,4	5,1
50	10782,7	11133,7	11307,1	11074,5	267,2	2,4
500	109319,6	105774,4	107816,2	107636,7	1779,4	1,7

Yöntem 3.2.3.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisinde hazırlanan standart çözeltiler için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4-5: Adapalenin HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan	SD ($\pm$)	RSD (%)
25	4345,7	168,6	3,9
50	7681,3	124,1	1,6
250	35084,7	597,3	1,7

Tablo 4-6: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama alan			Ortalama alan	SD ($\pm$)	RSD (%)
	1. gün	2. gün	3. gün			
25	4345,7	4229,7	4452,0	4342,4	111,2	2,6
50	7681,3	7884,7	7697,7	7754,6	113,0	1,5
250	35084,7	35948,3	35774,0	35602,3	456,7	1,3

4.2.4. Doğruluk

Yöntem 3.2.2.4'te anlatıldığı gibi çalışılarak, ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında hazırlanan standart çözeltiler için elde edilen doğru denkleminin üç farklı konsantrasyon için geri kazanma (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4-7: Adapalenin HPLC ile analiz yöntemine ait doğruluk bulguları (n=3)

Kullanılan taşıyıcı (plasebo)	Teorik konsantrasyon (ng/ml)	Hesaplanan ort. konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama geri kazanım (%)	SD (±)	RSD (%)
PAMAM dendrimer	25	24,8	99,4	1,4	1,4
	50	50,7	101,3	4,7	4,6
	500	498,5	99,7	1,0	1,0
PDC	25	26,3	105,0	5,8	5,5
	50	49,7	99,3	2,8	2,8
	500	501,4	100,3	0,7	0,7

4.2.5. Teşhis Limiti

ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımı ile hazırlanan standart çözeltiler için adapalenin teşhis limiti, Yöntem 3.2.2.5'te anlatıldığı gibi cevabın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile ilgili formül kullanılarak hesaplandı ve 0,4 ng/ml olarak belirlendi (3-1).

pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi ile hazırlanan standart çözeltiler için adapalenin teşhis limiti, aynı şekilde hesaplandı ve 2,4 ng/ml olarak belirlendi (3-1).

4.2.6. Miktar Tayini Limiti

ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımı ile hazırlanan standart çözeltiler için adapalenin miktar tayini limiti, Yöntem 3.2.2.6'da anlatıldığı gibi cevabın standart

sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile ilgili formül kullanılarak hesaplandı ve 1,2 ng/ml olarak belirlendi (3-2).

pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi ile hazırlanan standart çözeltiler için adapalenin miktar tayini limiti, aynı şekilde hesaplandı ve 7,3 ng/ml olarak belirlendi (3-2).

4.2.7. Örneklerin Stabilitesi

Yöntem 3.2.2.7’de belirtildiği şekilde çalışılarak ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında adapalen ile hazırlanan örnek çözeltilerde 0. gün, 1. gün ve 5. günde yapılan HPLC analizi sonucu stabilite bulguları Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4-8: Adapalenin ekstraksiyon ortamında hazırlanan örnek çözeltilerine ait stabilite bulguları (n=3)

Zaman (gün)	Teorik konsantrasyon (ng/ml)	Hesaplanan konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama konsantrasyon (ng/ml)	SD (±)	RSD (%)
Karanlık ortam					
0		25,0			
1	25	24,9	24,8	0,2	1,0
5		24,5			
Oda koşulları					
0		25,2			
1	25	25,4	25,0	0,6	2,2
5		24,4			
Pencere önü					
0		25,2			
1	25	25,1	24,9	0,4	1,5
5		24,5			

Reseptör ortamı olan pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisinde adapalen ile hazırlanan örnek çözeltilerde ise 0., 8. 24. ve 72. saatte yapılan HPLC analizleri ile elde edilen stabilite bulguları Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4-9: Adapalenin *in vitro* salım ortamında stabilite bulguları

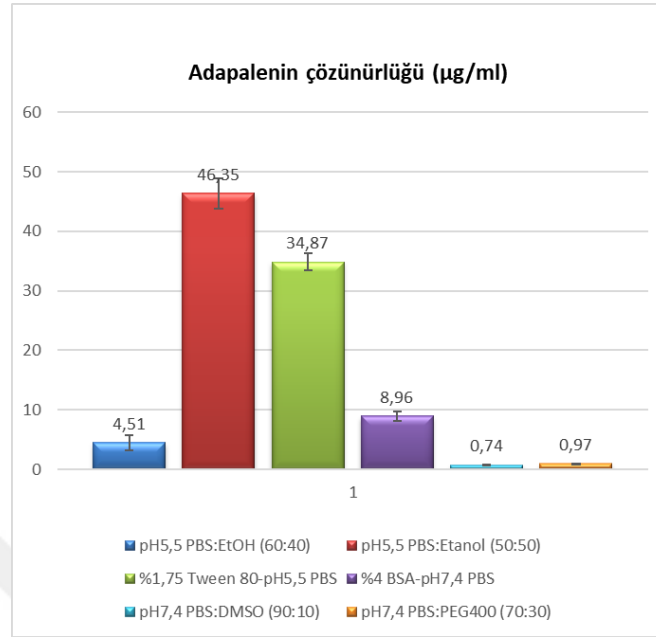
Zaman (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	Alan	Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
0.		28591,3			
8.	100	27493,0	26874,9	1471,5	5,5
24.		26178,3			
72.		26236,9			

4.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.3’te anlatıldığı gibi çalışılarak, adapalenin farklı çözücülerdeki çözünürlüğü belirlendi. Çözünürlük bulguları Tablo 4.10’da ve ilgili grafik Şekil 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4-10: Farklı çözünme ortamlarında adapalenin çözünürlüğü (n=3)

Çözünme ortamı	Doymuş Adapalen konsantrasyonu (µg/ml)
pH 5,5 PBS:Etanol (60:40) (h/h)	4,51±1,25
pH 5,5 PBS:Etanol (50:50) (h/h)	46,35±2,53
pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h)	34,87±1,38
pH 7,4 PBS:PEG 400 (70:30) (h/h)	0,97±0,03
pH 7,4 PBS:DMSO (90:10) (h/h)	0,74±0,08
pH 7,4 PBS (%4 BSA a/h)	8,96±0,83



Şekil 4-6: Farklı çözücü ortamlarında adapalenin çözünürlüğü

4.4. Adapalenin PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının hazırlanması çalışmaları kapsamında, etken madde yüklenmeyen dendrimerlerin partikül boyutu karakterizasyonunu yapmak için; metanol içerisinde temin edilen PAMAM (G2-PAMAM-NH₂) dendrimerlerin kendi dispersiyon ortamı olan metanolde herhangi bir filtrasyon işlemi uygulanmadan gerçekleştirilen ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi ölçümlerinde dendrimerlerin agregat oluşturma eğiliminde olduğu görüldü. Bu ölçümlerde μm boyutlarında (2000-3000 nm) (PDI:1) sonuçlar alındı.

Metanol ortamındaki örneklerin şırınga ucu filtre (0,45 μm , 4 mm, PTFE, Millex®-LH, Millipore) ile süzülmesi ile tekrarlanan partikül boyutu ölçümlerinde alınan sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4-11: PAMAM dendimerlerin metanol ortamında ölçülen partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Boyut (nm)	PDI
PAMAM-G2-NH ₂ (MetOH)	12,3±4,0	0,31±0,05

%0,1'lik konsantrasyonda hazırlanan etken madde içermeyen PAMAM-G2-NH₂ dendimerlerin boyut ölçümü metanol ortamında gerçekleştirilmiştir. Filtrasyon uygulanmıştır.

Ayrıca temin edilen PAMAM dendimerlerin su ortamındaki partikül boyutu ve dağılımını incelemek üzere yapılan ölçümlere ait sonuçlar Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4-12: PAMAM dendimerlerin saf su ortamında ölçülen partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Boyut (nm)	PDI
PAMAM-G2-NH ₂ (Saf su)	379,7 ±92,2	0,51±0,1

%0,1'lik konsantrasyonda hazırlanan etken madde içermeyen PAMAM-G2-NH₂ dendimerlerin boyut ölçümü saf su ortamında gerçekleştirilmiştir. Filtrasyon uygulanmamıştır.

4.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi ile Hazırlanan Formülasyonlara ait Bulgular

Adapalenin, PAMAM dendimerlerin sudaki çözeltisine katı halde ilave edilmesi ile yapılan yükleme çalışmaları bulgularına göre, bu yöntem ile adapalenin dendimerlere yüklenme oranının düşük olduğu saptandı (Tablo 4.13).

Tablo 4-13: Adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine toz halde ilavesi ile hazırlanan nanotaşıyıcılardan adapalenin geri kazanım bulguları

Formülasyon kodu	ADA (µg/ml)
PMM 0 K	0,28±0,04
PMM 0.05 K	3,36±0,24
PMM 0.1 K	7,06±0,27

4.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltilisine İlavesi ile Hazırlanan Formülasyonlara ait Bulgular

İkinci yöntem olarak; adapalenin rahat çözünebildiği uçucu bir organik çözücü içinde çözündürülerek formülasyona ilave edildiğinde, adapalen ve PAMAM dendrimerin organik çözücü karışımında beraber daha iyi çözündüğü saptandı. Adapalenin PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının hazırlanması sırasında dispersiyon ortamı olarak PBS (pH 7,4) kullanıldığında formülasyonlarda çökme gözlemlendiği için, bu ve diğer tüm çalışmalarda ultra saf su (18.2Ω) kullanılmasına karar verildi. Bu yöntemle hazırlanan formülasyonlarda ilk yöntemle göre daha başarılı sonuçlar alınsa da adapalenin dendrimerlere yüklenme oranının düşük olduğu saptandı (Tablo 4.14). Bu formülasyonda santrifüj edilmeksizin elde edilen ortalama partikül boyutu 819 ± 116 nm ve PDI değeri $0,26 \pm 0,16$ olarak tespit edildi.

Tablo 4-14: Adapalenin tetrahidrofuranda çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltilisine ilavesi ile hazırlanan nanotaşıyıcılara ait bulgular

Formülasyon kodu	ADA ($\mu\text{g/ml}$)	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1 C	$28,4 \pm 4,1$	$364 \pm 14,6$	$0,28 \pm 0,06$

4.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Problu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklendiği Nanotaşıyıcılara ait Bulgular

Adapalenin PAMAM dendrimerlere yüklenmesi çalışmaları kapsamında yapılan ilk denemelerde beklenen adapalen yükleme oranı sağlanamayınca, yükleme etkinliğinin artırılması için sonikasyon işlemi uygulandı. Sonikasyon işlemi ile başarılı sonuçlar elde edildiği görüldü. Yüklenemeyen etken maddenin vial çeperlerinde biriktiği gözlemlendi.

Nanotaşıyıcıların optimizasyonu amacıyla basamak basamak yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri aşağıda ilgili tablolarda sırasıyla verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda PAMAM içeren 0,1 mg adapalen ile hazırlanan ve 10 Watt (OP 1) güçte 1 dakika süre ile sonikasyon PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı bulguları Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4-15: Farklı oranlarda PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (Sonikasyon: OP 1, 1 dk) (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05	528±109	0,42±0,07
PMM 0.1	706±307	0,44±0,1
PMM 0.2	2796±214	0,27± 0,16

Hazırlanan nanotaşıyıcıların ortalama partikül boyutu ve PDI değerleri yüksek bulunduğu için, seçilen konsantrasyonda PAMAM içeren formülasyonlarda sonikasyon gücü sabit tutularak sonikasyon süresinin artırılmasına karar verildi. Bu amaçla yapılan çalışmalara ait sonuçlar Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4-16: Farklı sürelerde OP 1’de sonikasyon işlemi uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1	706±307	0,44±0,1
PMM 0.1-3d	434±188	0,36±0,12
PMM 0.1-6d	391±26	0,27±0,05

Sonikasyon süresi sabit tutularak, sonikasyon gücü artırıldığında elde edilen bulgular Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4-17: Farklı şiddette sonikasyon işlemi ile hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1	706±307	0,44±0,1
PMM 0.1-G2	682±34	0,39±0,08
PMM 0.1-G3*	-	-

*Bu formülasyon sonikasyon şiddeti fazla geldiği için köpürdü.

Sonikasyon gücünün artırılması ile daha kabul edilebilir partikül boyutu ve dağılımı değerleri elde edildiği için, daha yüksek seviyede belirlenen 25 Watt sonikasyon gücü (OP 2) sabit tutularak, bu güç seviyesinde farklı sürelerle sonikasyon uygulanmasıyla elde edilen bulgular Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4-18: Farklı sürelerde OP 2’de sonikasyon uygulanarak hazırlanan adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1-G2	682±34	0,39±0,08
PMM 0.1-G2-2d	499±163	0,34±0,08
PMM 0.1-G2-3d	411±27	0,29±0,09
PMM 0.1-G2-6d [#] (PMM 0.1-S)	368±8	0,27±0,01

[#] Kodlamada kısaltmaya gitmek için bu ve sonraki formülasyonlarda G2-6d, S olarak ifade edilmiştir.

PMM 0.1-S kodlu formülasyonda yapılan HPLC analizleri sonucunda yüklenen adapalen miktarı 48,4±2,6 µg/ml olarak saptandı.

İlerleyen çalışmalarda farklı dispersiyon ortamlarında %0,1 konsantrasyonda PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı değerleri Tablo 4.19’da verilmiştir.

Tablo 4-19: Farklı dispersiyon ortamlarında %0,1 PAMAM ve 0,1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1-S	368±8	0,27±0,01
PMM 0.1-S-1Gliserin	578±67	0,41±0,10
PMM 0.1-S-1PEG	319±40	0,12±0,09
PMM 0.1-S-1PGDA	603±221	0,54±0,11
PMM 0.1-S-1BA	567±71	0,36±0,17

Sonikasyon prosedürünün optimizasyonu sağlandıktan sonra, PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarında kullanılan PAMAM konsantrasyonunun partikül boyutu ve dağılımına etkisinin tekrar değerlendirilmesi amacıyla, farklı konsantrasyonlarda PAMAM ve adapalen (0,1 mg) ile hazırlanan, optimize edilen sonikasyon prosedürü (OP 2, 3+3 dk) uygulanan nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımı değerleri Tablo 4.20’de verilmiştir.

Tablo 4-20: Farklı oranlarda PAMAM içeren adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (Sonikasyon: OP 2, 3+3 dk) (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.1-S	368±8	0,27±0,01
PMM 0.05-S	315±58	0,28±0,05
PMM 0.02-S	265±19	0,27±0,04
PMM 0.01-S	227±12	0,20±0,04
PMM 0.004-S	223±10	0,26±0,02
PMM 0.002-S	391±67	0,47±0,05

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.1-S, PMM 0.05-S, PMM 0.02-S, PMM 0.01-S, PMM 0.004-S ve PMM 0.002-S kodlu formülasyonlar için sırasıyla 0,7; 1,3; 3,3; 6,6; 16,4 ve 32,9.

Formülasyondaki PAMAM konsantrasyonuna bağlı ortalama partikül boyutu ve PDI değerleri saptandıktan sonra çalışmaların devamında kullanmak üzere PAMAM konsantrasyon aralığı daraltıldı.

Elde edilen partikül boyutu ve dağılımı ile kullanılan adapalen/ PAMAM mol oranları dikkate alınarak öncelikle 3,3 mol oranı ile hazırlanan, PMM 0.02-S kodlu formülasyon baz alınarak kullanılan %0,02 PAMAM konsantrasyonu sabit tutuldu ve formülasyona ilave edilen adapalen miktarı kademeli olarak arttırıldı. Bu nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımı değerleri Tablo 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4-21: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,02 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.02-S	265±19	0,27±0,04
PMM 0.02-S-A5	349±65	0,29±0,10
PMM 0.02-S-A10	365±16	0,36±0,06

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.02-S, PMM 0.02-S-A5 ve PMM 0.02-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 3,3; 16,4 ve 32,9.

Adapalen miktarındaki artışa bağlı olarak artan mol oranları (Tablo 4.21) ile birlikte formülasyonlarda ortalama partikül boyutu ve PDI değerleri artış gösterince; çalışmaların devamında PMM 0.02-S-A5 kodlu formülasyon baz alınarak ADA/PAMAM mol oranını düşürmek üzere PAMAM oranının arttırılması sonucu hazırlanan nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı değerleri Tablo 4.22’de verilmiştir.

Tablo 4-22: Farklı oranlarda PAMAM ve 0,5 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.02-S-A5	349±65	0,29±0,10
PMM 0.05-S-A5	284±42	0,27±0,09

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.02-S-A5 ve PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 16,4 ve 6,6.

Stabilizan olarak PEG 400'ün formülasyon üzerindeki etkisinin daha kapsamlı incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda; seçilen konsantrasyonda PAMAM (%0,5) içeren, aynı miktarda adapalen ve dispersiyon ortamında farklı oranlarda PEG 400 ile hazırlanan nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı değerleri Tablo 4.23'te verilmiştir.

Tablo4-23: Farklı oranlarda kullanılan formülasyon bileşenleri ile %0,05 PAMAM içeren PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A5	284±42	0,27±0,09
PMM 0.05-S-A5-1PEG	255±22	0,21±0,03
PMM 0.05-S-A5-3PEG	276±9	0,22±0,04
PMM 0.05-S-A5-5PEG	284±9	0,19±0,03
PMM 0.05-S-A7.5	299±25	0,24±0,05
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	277±17	0,21±0,02
PMM 0.05-S-A7.5-5PEG	296±13	0,23±0,03
PMM 0.05-S-A10-1PEG	285±8	0,25±0,05
PMM 0.05-S-A10-5PEG	325±10	0,26±0,02
PMM 0.05-S-A10-10PEG	404±33	0,25±0,03

PAMAM konsantrasyonu (%0,05 ve %0,07) sabit tutularak formülasyona ilave edilen adapalen miktarı kademeli olarak arttırıldığında; PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı bulguları sırasıyla Tablo 4.24 ve Tablo 4.25'te verilmiştir.

Tablo 4-24: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,05 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A5-1PEG	255±22	0,21±0,03
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	277±17	0,21±0,02
PMM 0.05-S-A10-1PEG	285±8	0,25±0,05

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.05-S-A5, PMM 0.05-S-A7.5 ve PMM 0.05-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 6,6; 9,9 ve 13,2.

Tablo 4-25: Farklı miktarlarda adapalen ve %0,07 PAMAM ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.07-S-A5-1PEG	269±5	0,17±0,02
PMM 0.07-S-A7.5-1PEG	272±14	0,18±0,03
PMM 0.07-S-A10-1PEG	294±33	0,22±0,05

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.07-S-A5, PMM 0.07-S-A7.5 ve PMM 0.07-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 4,7; 7 ve 9,4.

Optimizasyon çalışmaları sırasında hazırlama aşamasında kullanılan MetOH/THF oranının elde edilen nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımını etkilediği fark edildi. Seçilen nanotaşıyıcılarda farklı oranlarda MetOH/THF bir araya getirildiği zaman elde edilen partikül boyutu ve dağılımı bulguları sırasıyla Tablo 4.26-Tablo 4.28'de verilmiştir.

Tablo 4-26: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 0,75 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	MetOH (μ l)	THF (μ l)	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	800	200	277 $\pm$ 17	0,21 $\pm$ 0,02
PMM 0.05-S-A7.5-1:1-1PEG	500	500	325 $\pm$ 69	0,33 $\pm$ 0,09

MetOH/THF oranı düşürüldüğünde, nanotaşıyıcıların ortalama partikül boyut ve PDI değerlerinde artış olduğu saptandı. Bu sebeple sonraki çalışmalarda adapalenin THF’te çözünürlüğü dikkate alınarak, bu oran mümkün olduğunca yüksek tutuldu.

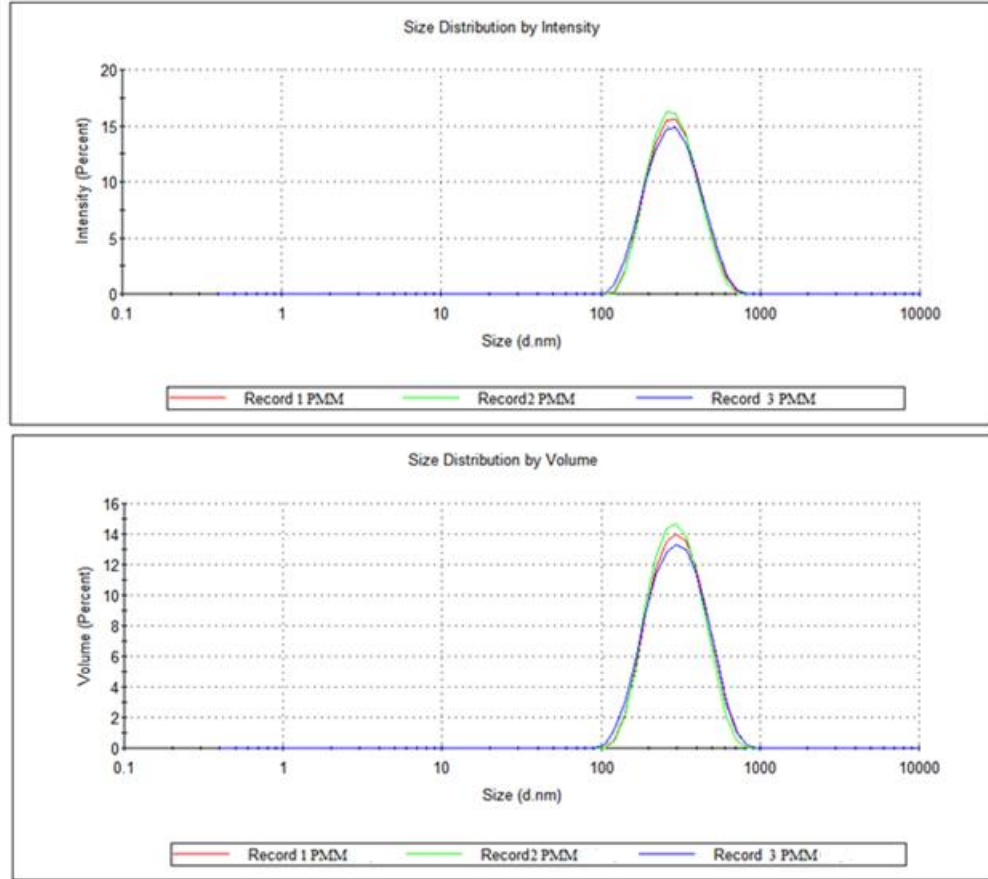
Tablo 4-27: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,05 PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	MetOH (μ l)	THF (μ l)	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A10-1PEG	600	400	285 $\pm$ 8	0,25 $\pm$ 0,05
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	750	250	256 $\pm$ 12	0,19 $\pm$ 0,01

Tablo 4-28: Farklı çözücü oranları kullanılarak %0,07 PAMAM ve 1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	MetOH (μ l)	THF (μ l)	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.07-S-A10-1PEG	600	400	294 $\pm$ 33	0,22 $\pm$ 0,05
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	750	250	245 $\pm$ 13	0,20 $\pm$ 0,03

PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait partikül boyutu dağılım grafiği Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4-7: PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimerlere ait partikül boyutu dağılım grafiği

4.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Stabilité Çalışmalarına ait Bulgular

Optimizasyon çalışmaları sonuçlarına göre uygun bulunarak seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 6 hafta süre ile takip edilen partikül boyutu ve dağılımına ait stabilite bulguları, Tablo 4.29-Tablo 4.32’de verilmiştir.

Tablo 4-29: PAMAM (%0,02) ve farklı miktarlarda adapelen ile hazırlanarak 5 ± 3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.02-S	0. hafta	265±19	0,27±0,04
	2. hafta	269±21	0,23±0,05
	4. hafta	278±60	0,23±0,06
	6. hafta	283±6	0,20±0,01
PMM 0.02-S-A5	0. hafta	349±65	0,29±0,10
	2. hafta	398±101	0,29±0,10
	4. hafta	444±134	0,27±0,08
	6. hafta	483±299	0,34±0,15
PMM 0.02-S-A10	0. hafta	365±16	0,36±0,06
	2. hafta	746±109	0,31±0,10
	4. hafta	813±128	0,25±0,09
	6. hafta	_*	_*

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.02-S, PMM 0.02-S-A5 ve PMM 0.02-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 3,3; 16,4 ve 32,9. *Bu ölçümler yapılamamıştır.

Tablo 4-30: PAMAM (%0,05), adapalen (0,5 mg) ve farklı oranlarda PEG 400 ile hazırlanarak 5 ± 3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A5	0. hafta	284±42	0,27±0,09
	2. hafta	283±26	0,26±0,09
	4. hafta	278±44	0,23±0,05
	6. hafta	280±73	0,22±0,04
PMM 0.05-S-A5-1PEG	0. hafta	255±22	0,21±0,03
	2. hafta	254±18	0,19±0,03
	4. hafta	267±18	0,23±0,06
	6. hafta	269±9	0,19±0,03
PMM 0.05-S-A5-3PEG	0. hafta	276±9	0,22±0,04
	2. hafta	272±11	0,20±0,03
	4. hafta	271±23	0,19±0,04
	6. hafta	270±3	0,19±0,04
PMM 0.05-S-A5-5PEG	0. hafta	284±9	0,19±0,03
	2. hafta	318±22	0,22±0,05
	4. hafta	294±23	0,27±0,06
	6. hafta	355±48	0,31±0,19

Formülasyonlarda ADA/PMM mol oranı: 6,6.

Tablo 4-31: PAMAM (%0,05), farklı miktarda adapalen (0,75 ve 1 mg) ve PEG 400 ile hazırlanarak 5 ± 3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	0. hafta	277±17	0,21±0,02
	2. hafta	277±34	0,19±0,02
	4. hafta	279±58	0,19±0,05
	6. hafta	289±37	0,20±0,04
PMM 0.05-S-A7.5-1:1-1PEG	0. hafta	325±69	0,33±0,09
	2. hafta	437±174	0,41±0,10
	4. hafta	-*	-*
	6. hafta	-*	-*
PMM 0.05-S-A7.5-5PEG	0. hafta	296±13	0,23±0,03
	2. hafta	371±94	0,49±0,28
	4. hafta	-*	-*
	6. hafta	-*	-*
PMM 0.05-S-A10-1PEG	0. hafta	285±8	0,25±0,05
	2. hafta	294±5	0,26±0,06
	4. hafta	290±10	0,22±0,05
	6. hafta	295±7	0,21±0,03
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	0. hafta	256±12	0,19±0,01
	2. hafta	277±24	0,20±0,03
	4. hafta	271±15	0,19±0,02
	6. hafta	267±2	0,19±0,03
PMM 0.05-S-A10-5PEG	0. hafta	325±10	0,26±0,02
	2. hafta	1261±256	0,78±0,31
	4. hafta	-*	-*
	6. hafta	-*	-*
PMM 0.05-S-A10-10PEG	0. hafta	404±33	0,25±0,03
	2. hafta	2350±459	0,63±0,45
	4. hafta	-*	-*
	6. hafta	-*	-*

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.05-S-A7.5 ve PMM 0.05-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 9,9 ve 13,2. *Bu ölçümler yapılmamıştır.

Tablo 4-32: PAMAM (%0,07), PEG 400 (%1) ve farklı oranlarda adapalen ile hazırlanarak 5 ± 3 °C’de 6 hafta süre ile takip edilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
PMM 0.07-S-A5-1PEG	0. hafta	269 $\pm$ 5	0,17 $\pm$ 0,02
	2. hafta	273 $\pm$ 2	0,19 $\pm$ 0,01
	4. hafta	270,6 $\pm$ 7	0,19 $\pm$ 0,02
	6. hafta	277 $\pm$ 5	0,19 $\pm$ 0,01
PMM 0.07-S-A7.5-1PEG	0. hafta	272 $\pm$ 14	0,18 $\pm$ 0,03
	2. hafta	275 $\pm$ 7	0,19 $\pm$ 0,03
	4. hafta	256 $\pm$ 5	0,18 $\pm$ 0,01
	6. hafta	279 $\pm$ 7	0,18 $\pm$ 0,02
PMM 0.07-S-A10-1PEG	0. hafta	294 $\pm$ 33	0,22 $\pm$ 0,05
	2. hafta	278 $\pm$ 32	0,21 $\pm$ 0,03
	4. hafta	278 $\pm$ 17	0,18 $\pm$ 0,02
	6. hafta	287 $\pm$ 21	0,19 $\pm$ 0,02
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	0. hafta	245 $\pm$ 13	0,20 $\pm$ 0,03
	2. hafta	278 $\pm$ 2	0,29 $\pm$ 0,01
	4. hafta	259 $\pm$ 14	0,25 $\pm$ 0,02
	6. hafta	267 $\pm$ 19	0,23 $\pm$ 0,03

ADA/PMM mol oranları; PMM 0.07-S-A5, PMM 0.07-S-A7.5 ve PMM 0.07-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 4,7; 7 ve 9,4.

Kabul edilebilir partikül boyutu ve PDI değerlerinin elde edilmesi ile seçilen nanotaşıyıcılarda etken madde miktar tayini çalışması yapılarak geri kazanılan adapalen miktarları belirlendi. Stabilite çalışmaları kapsamında seçilen bu formülasyonlarda altıncı

haftada adapalenin geri kazanım çalışması tekrarlandı. Geri kazanılan adapalen miktarları Tablo 4.33 ve Tablo 4.34'te sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4-33: %0,05 PAMAM ve 0,5-1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarından geri kazanılan adapalen miktarları (n=3)

Formülasyon kodu	ADA ($\mu\text{g/ml}$)	
	0. hafta	6. hafta
PMM 0.05-S-A5-1PEG	159,5 $\pm$ 21,1	149,9 $\pm$ 22,2
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	190,0 $\pm$ 22,3	188,9 $\pm$ 32,5
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	283,3 $\pm$ 29,9	284,1 $\pm$ 42,1

Tablo 4-34: %0,07 PAMAM ve 0,5-1 mg adapalen ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarından geri kazanılan adapalen miktarları (n=3)

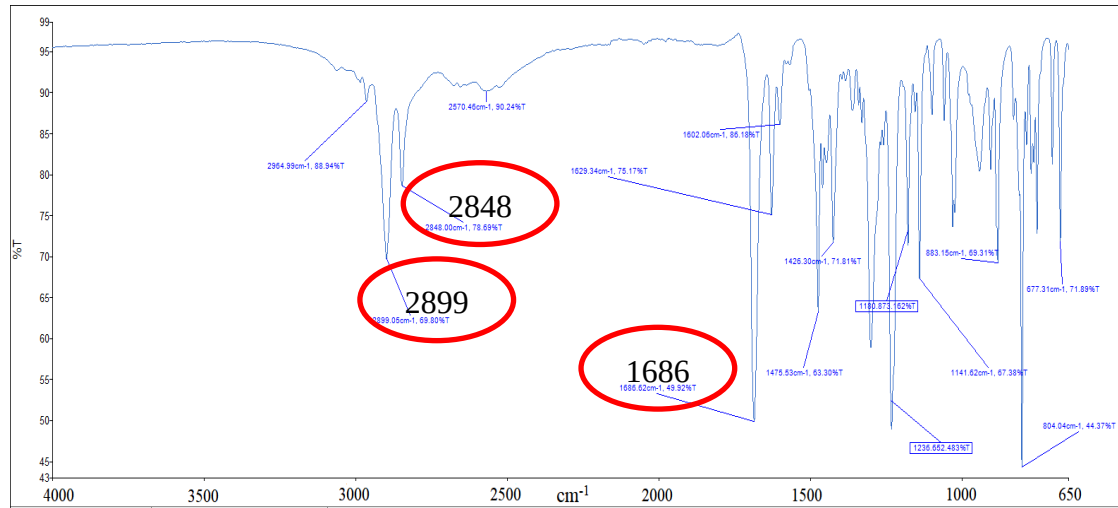
Formülasyon kodu	ADA ($\mu\text{g/ml}$)	
	0. hafta	6. hafta
PMM 0.07-S-A5-1PEG	183,4 $\pm$ 23,2	175,1 $\pm$ 29,8
PMM 0.07-S-A7.5-1PEG	218,8 $\pm$ 38,9	208,7 $\pm$ 36,8
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	278,5 $\pm$ 17,1	273,1 $\pm$ 45,9

4.6. Seçilen Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Hazırlanan naanotaşıyıcılar arasından partikül boyutu ve dağılımı sonuçlarına göre ve adapalen/PAMAM mol oranları da dikkate alınarak seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında FTIR analizleri gerçekleştirildi. Ayrıca zeta potansiyel, yükleme oranı, yükleme etkinliği ile yapı ve morfoloji karakterizasyonu yapıldı.

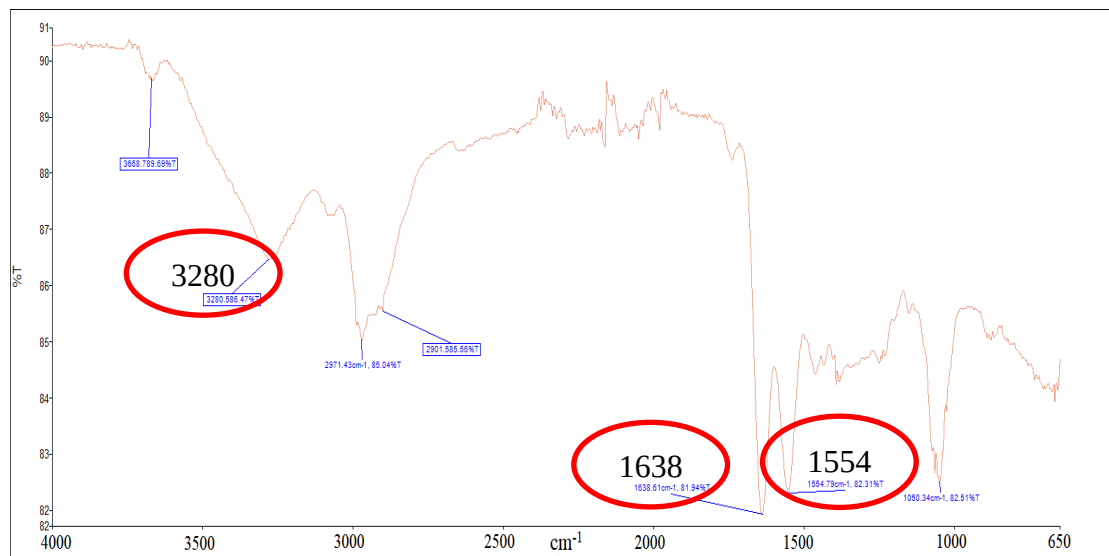
4.6.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların FTIR Spektroskopisi ile Analiz Bulguları

Yöntem 3.2.7.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilen adapalene ait FT-IR spektrumu Şekil 4.8’de ve G2 PAMAM-NH₂’ye ait FT-IR spektrumu Şekil 4.9’da gösterilmektedir.



Şekil 4-8: Adapalenin IR spektrumu

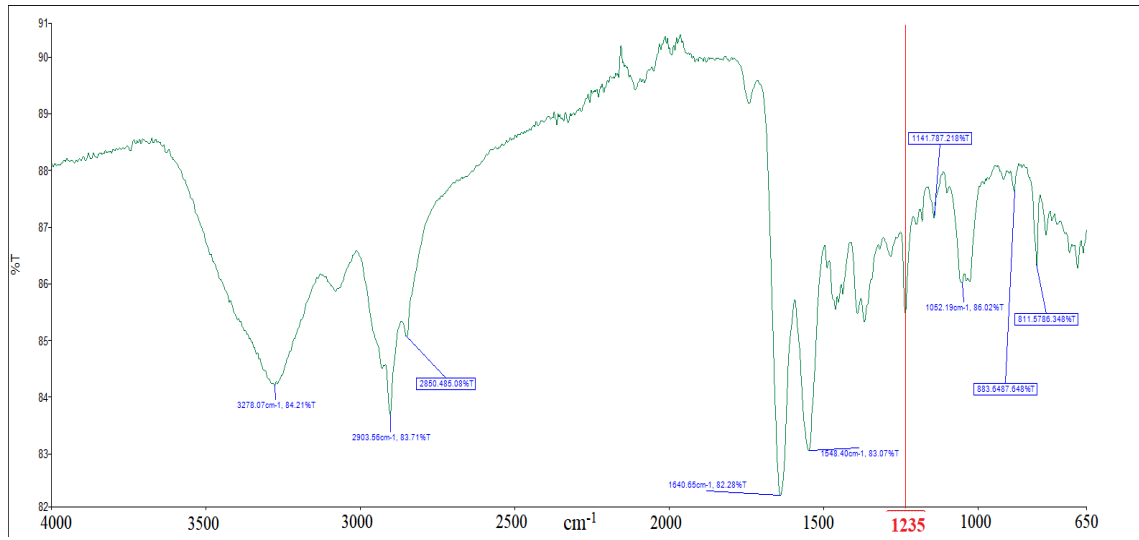
1686 cm⁻¹’de adapalene ait COOH fonksiyonel grubundan kaynaklanan güçlü karbonil bandı; 2899 ve 2848 cm⁻¹’de adamantan grubundan kaynaklı güçlü pikler görülmektedir.



Şekil 4-9: G2 PAMAM-NH₂’nin IR spektrumu

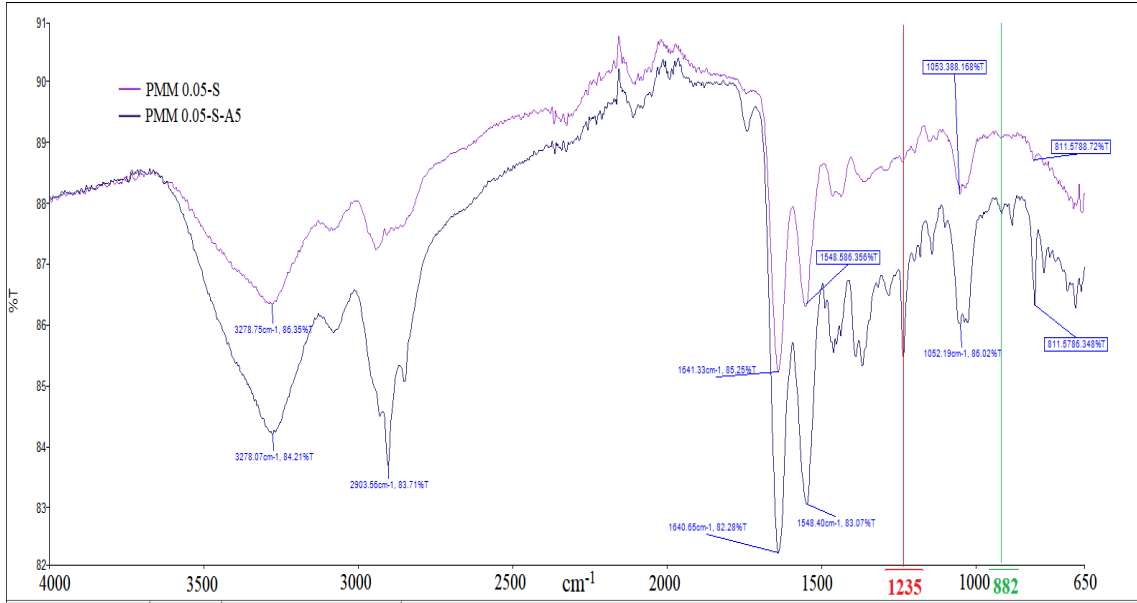
Dendrimerin karakteristik pikleri: 1638 cm^{-1} 'de amit I bandı: amit gruplarından kaynaklanan karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gerilme (*stretching*), 1554 cm^{-1} 'de amit II bandı: N-C gerilme (*stretching*) ve N-H eğilme (*bending*) titreşimleri; ayrıca 2901, 2971, 3074, 3280 bantları görülmektedir.

PAMAM dendrimer ve adapalen arasındaki etkileşimi göstermek amacıyla yapılan FTIR analizi ile elde edilen bulgular aşağıda sırayla verilmiştir (Şekil 4.10-Şekil 4.13).



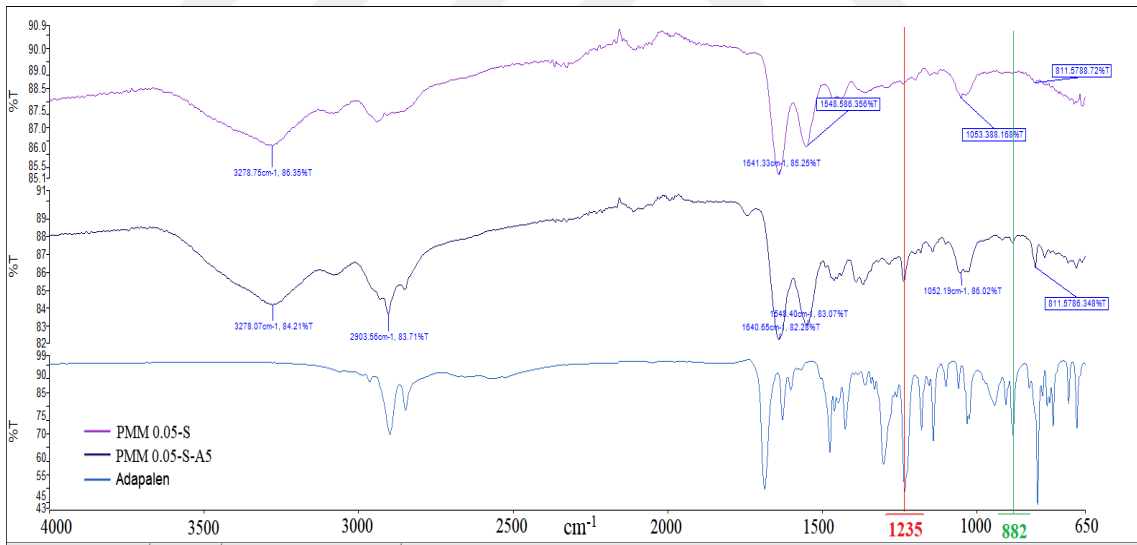
Şekil 4-10: Adapalenin PAMAM dendrimer kompleksinin IR spektrumu

PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyona ait FTIR karakterizasyonu



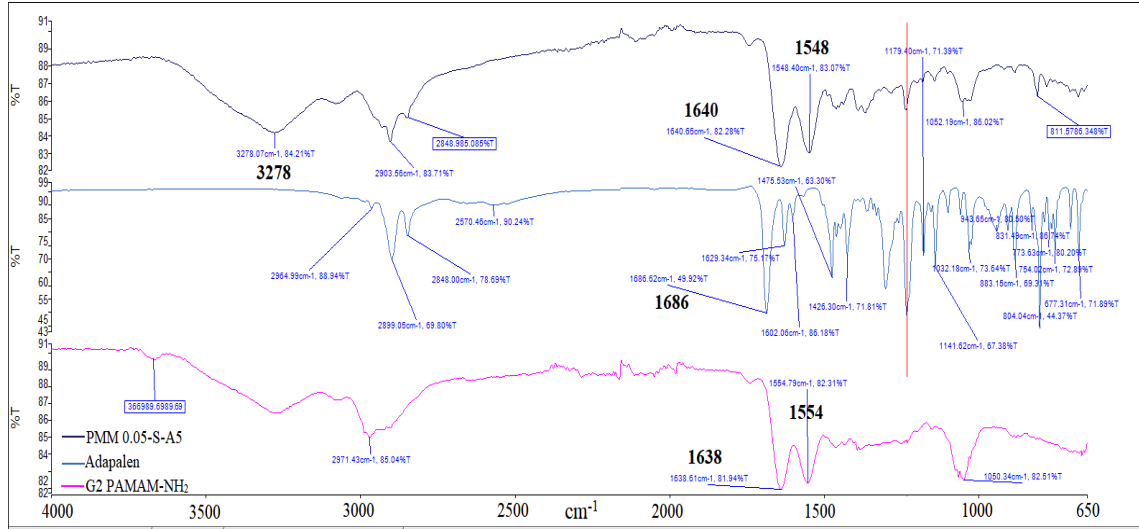
Şekil 4-11: Farklı miktarda adapalene yüklenen PAMAM dendrimer komplekslerinin IR spektrumu

Üstteki 100 µg adapalene ile hazırlanan PMM 0.05-S kodlu formülasyon ve alttaki 500 µg adapalene ile hazırlanan PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyon



Şekil 4-12: Farklı miktarda adapalene yüklenen PAMAM dendrimer kompleksleri ile beraber adapalene karşılaştırmalı IR spektrumu

Üstteki 100 µg adapalene ile hazırlanan PMM 0.05-S kodlu formülasyon ve ortadaki 500 µg adapalene ile hazırlanan PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyon ve en alttaki adapalene



Şekil 4-13: PMM 0.05-S-A5 kodlu dendrimer kompleksi, adapalene ve PAMAM dendrimere ait (sırasıyla yukarıdan aşağıya doğru) karşılaştırmalı IR spektrumu

Yapılan FTIR analizlerinde komplekslerde adapalene ait karbonil bandının (1686) kaybolduğu (1686'dan 1640'a kayma), serbest adapalene kristallerinin bulunmadığı saptandı.

4.6.2. Adapalene Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarına ait Zeta Potansiyel Bulguları

Seçilen adapalene yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları ile Yöntem 3.2.7.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilen zeta potansiyel sonuçları Tablo 4.35'te verilmiştir.

Tablo 4-35: Seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Formülasyon kodu	Zeta potansiyel (mV)
C-PMM (0.05)	25,4±2,0
PMM 0.05-S	24,4±6,4
PMM 0.05-S-A5	20,2±2,6
PMM 0.05-S-A7.5	18,5±4,9
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	20,3±2,2
PMM 0.05-S-A10-3:1	18,4±3,5
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	19,0±3,1
PMM 0.07-S-A10-3:1	29,7±2,5
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	27,6±2,3

4.6.3. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarında Yükleme Bulguları

Yöntem 3.2.7.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak ve 3.3 ve 3.4 nolu denklemler kullanılarak adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılara ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları Tablo 4.36'da verilmiştir.

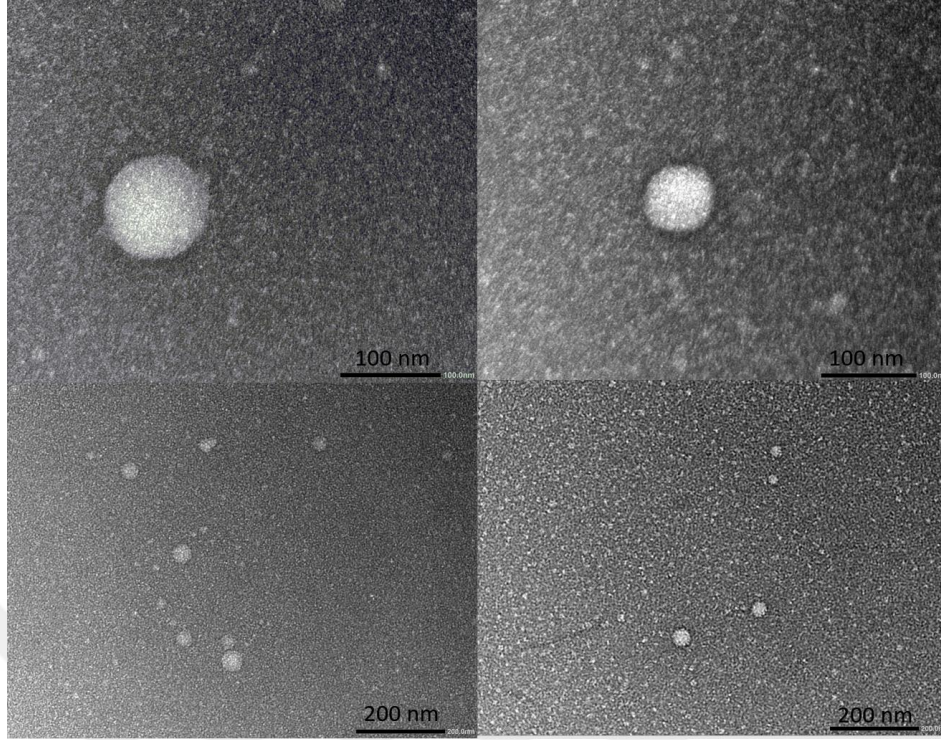
Ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta ihmal edilecek derecede düşük bulunan adapalen miktarları ile yüklemenin %99,99 oranında gerçekleştiği belirlendiği için; yükleme oranı ve yükleme etkinliği değerleri doğrudan nanotaşıyıcılarda bulunan toplam "geri kazanılan" adapalen miktarı üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 4-36: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)

Formülasyon kodu	Yükleme oranı (%)	Yükleme etkinliği (%)
PMM 0.05-S-A5-1PEG	24,9±1,5	42,7± 3,5
PMM 0.05-S-A7.5-1PEG	28,6±2,9	34,5±4,9
PMM 0.05-S-A10-1PEG	32,5±1,5	31,1±2,1
PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG	34,3±1,0	33,7±1,6
PMM 0.07-S-A5-1PEG	24,5±2,1	50,4±5,6
PMM 0.07-S-A7.5-1PEG	25,1±2,9	34,8±5,3
PMM 0.07-S-A10-1PEG	20,2±0,6	19,6±0,8
PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG	30,2±0,5	33,4±0,9

4.6.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların TEM Analizi Bulguları

Yöntem 3.2.7.4’te bahsedilen TEM analizleri sonucunda elde edilen PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıların TEM görüntüleri Şekil 4.14’te gösterilmektedir.



Şekil 4-14: PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına ait TEM (JEM-1011) görüntüleri

4.7. Adapalenin Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Adapalenin dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında etken maddenin yüklenmesi için ultrasonik banyoda sonikasyon, film oluşturma ve kosolvan evaporasyon teknikleri denendi. Hazırlanan misellerin partikül boyutu ve dağılımı ölçümleri gerçekleştirildi, seçilen formülasyonlarda geri kazanılan etken madde miktarları saptandı.

4.7.1. Ultrasonik Banyoda Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.8.1’de anlatıldığı şekilde uygulanan yöntem ile elde edilen dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının boyut ölçümlerde başarılı sonuçlar elde edilemedi (ortalama partikül boyutu: $692,4 \pm 229,3$; PDI: $0,72 \pm 0,14$).

4.7.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.8.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen DMc 0.7 A35 FH.C kodlu nanotaşıyıcı ile, yöntem 3.2.8.3’te anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen DMc 0.7

A35 C kodlu nanotaşıyıcıya ait PDI değerleri ve geri kazanılan adapalen miktarları Tablo 4.37’de verilmiştir.

Tablo 4-37: İki farklı yöntemle göre hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.7 A35 FH.C	97,12±12,7	0,29±0,04	0,9±0,3
DMc 0.7 A35 C	192,8±11,3	0,19±0,02	7,3±3,2

4.7.3. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular

Adapalenin dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması ve optimizasyonu amacıyla basamak basamak yapılan çalışmalar kapsamında elde edilen ortalama partikül boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri aşağıdaki tablolarda sırasıyla verilmiştir (Tablo 4.38-4.42).

Tablo 4-38: Farklı oranlarda PDC ve 35 µg adapalen ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.5 A35 C	168,1±15,7	0,28±0,05	2,9±1,3
DMc 0.7 A35 C	192,8±11,3	0,19±0,02	7,3±3,2

Tablo 4-39: Farklı miktarlarda adapalen ve 0,7 mg PDC ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.7 A35 C	192,8±11,3	0,19±0,02	7,3±3,2
DMc 0.7 A80 C	218,4±14,2	0,26±0,01	11,0±4,9

Tablo 4-40: Farklı oranlarda PDC ve 80 µg adapalen ile hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.7 A80 C	218,4±14,2	0,26±0,01	11,0±4,9
DMc 1 A80 C	231,5±14,2	0,34±0,01	23,2±5,8
DMc 1.5 A80 C	194,9±22,8	0,43±0,05	26,8±8,6
DMc 3 A80 C*	185,9±23,6	0,21±0,03	19,5±2,7

* DMc 3 A8 C kodlu misel formülasyonunda hazırlama esnasında santrifüj edilmeden sulu fazda çökme gözlemlendi.

Tablo 4-41: Dispersiyon ortamına ilave edilen %1 (a/h) PEG 400'ün etkisinin incelendiği dendron temelli misel nanotaşıyıcıların partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.7 A80 C	218,4±14,2	0,26±0,01	11,0±4,9
DMc 0.7 A80 1PEG C	187,0±5,8	0,21±0,01	12,5±3,1
DMc 1 A80 C	231,5±14,2	0,34±0,01	23,2±5,8
DMc 1 A80 1PEG C	181,2±10,6	0,23±0,01	27,8±4,7

Tablo 4-42: Seçilen oranlarda PDC ile ve dispersiyon ortamına farklı oranlarda PEG 400 ilave edilerek hazırlanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
DMc 0.7 A80	363,1±19,2	0,46±0,07
DMc 0.7 A80 1PEG	345,4±33,3	0,37±0,04
DMc 1 A80	393,7±53,9	0,51±0,07
DMc 1 A80 1PEG	360,4±31,7	0,36±0,10
DMc 1 A80 5PEG	294,5±36,4	0,35±0,07

Bu formülasyonlarda hazırlama sonrasında santrifüj işlemi uygulanmamıştır.

4.7.3.1. Sonikasyon Uygulaması ile Hazırlanan Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına Ait Bulgular:

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıları hazırlanırken organik çözücü ortamdan uzaklaştırılmadan yapılan sonikasyon uygulaması ile etkili sonuç alınamadı.

Misel formülasyonları hazırlandıktan sonra en son aşamada yöntem 3.2.8.4’te “Organik faz tamamen uçurulduktan sonra sonikasyon uygulaması” başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılan sonikasyon işleminin boyut açısından dendron temelli misel nanotaşıyıcıları üzerindeki etkisini gösteren sonuçlar Tablo 4.43’te verilmiştir.

Sonikasyonun hazırlama prosedürüne dahil edilmesiyle birlikte optimizasyon çalışmalarında son aşamada; seçilen oranda PDC içeren ve ilave edilen adapalen miktarının kademeli olarak arttırıldığı dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı değerleri ile seçilen formülasyonlarda ayrıca miktar tayini analizleriyle belirlenen geri kazanılan etken madde miktarları ilgili tablolarda gösterilmektedir (Tablo 4.44-Tablo 4.46).

Tablo 4-43: Hazırlama sonrasında uygulanan sonikasyon işleminin etkisinin incelendiği dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
DMc 0.7 A80 1PEG	345,4±33,3	0,37±0,04
DMc 0.7 A80 1PEG S	289,1±20,6	0,25±0,04
DMc 1 A80 1PEG	360,4±31,7	0,36±0,10
DMc 1 A80 1PEG S	301,0±29,5	0,22±0,04
DMc 1 A80 5PEG	294,5±36,4	0,35±0,07
DMc 1 A80 5PEG S	261,2±26,4	0,22±0,07
DMc 1 A80	393,7±53,9	0,51±0,07
DMc 1 A80 S	313±41,2	0,27±0,05
BoşMisel-1PEG	160,4±4,6	0,23±0,01
BoşMisel-1PEG S	252,4±29,1	0,40±0,04

Tablo 4-44: Farklı oranlarda PDC ve %1 (a/h) PEG 400 ile hazırlanan ve sonikasyon uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 0.7 A80 1PEG S	296,1±27,6	0,25±0,04	53,4±3,1
DMc 1 A80 1PEG S	301,0±29,5	0,22±0,04	62,3±2,3

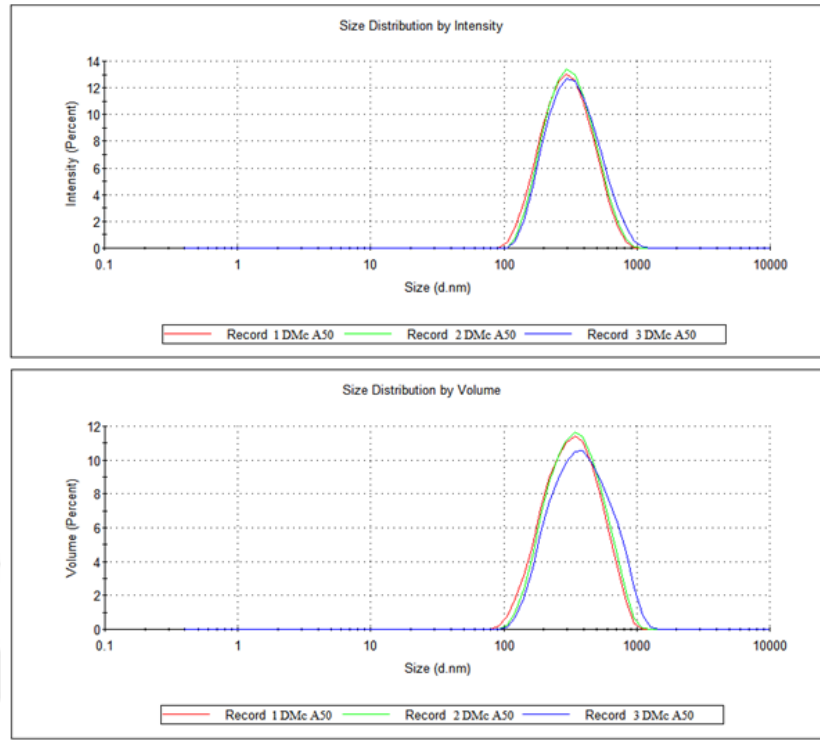
Tablo 4-45: Farklı oranlarda PEG 400 ilave edilen ve sonikasyon işlemi uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 1 A80 1PEG S	301,0±29,5	0,22±0,04	62,3±2,3
DMc 1 A80 5PEG S	261,2±26,4	0,22±0,07	65,5±3,2

Tablo 4-46: Farklı miktarlarda adapalen yüklenen hazırlama sonrasında sonikasyon uygulanan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının partikül boyutu ve dağılımı ile geri kazanılan ADA miktarı (n=3)

Formülasyon kodu	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI	ADA (µg/ml)
DMc 1 A80 1PEG S	301,0±29,5	0,22±0,04	62,3±2,3
DMc 1 A200 1PEG S	306,2±43,8	0,21±0,03	156,4±11,1
DMc 1 A500 1PEG S	297,1±21,3	0,19±0,02	394,3±7,6
DMc 1 A1000 1PEG S	294,4±21,7	0,19±0,03	757,3±53,1

DMc A500 1PEG S kodlu dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait partikül boyutu dağılım grafiği Şekil 4.15'te gösterilmektedir.



Şekil 4-15: DMc A500 1PEG S kodlu dendron temelli misellere ait partikül boyutu dağılım grafiği

4.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Stabilité Çalışmalarına ait Bulgular

Optimizasyon çalışmaları kapsamında; partikül boyutu ve dağılımı sonuçlarına göre uygun bulunarak seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının 5 ± 3 °C’de takip edilen partikül boyutu ve dağılımına ait stabilite bulguları Tablo 4.47 ve Tablo 4.48’de verilmiştir.

Tablo 4-47: Sonikasyon uygulanmadan hazırlanan seçilmiş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları

Formülasyon kodu	0.hafta		2.hafta	
	Ortalama partikül boyutu (nm)	(PDI)	Ortalama partikül boyutu (nm)	(PDI)
DMc 0.7 A80 C	218,4±14,2	0,26±0,01	607,3±36,2	0,38±0,06
DMc 0.7 A80 1PEG C	187,0±5,8	0,21±0,01	441,4±42,2	0,59±0,07
DMc 1 A80 C	231,5±14,2	0,34±0,01	881,5±168,9	0,58±0,09
DMc 1 A80 1PEG C	181,2±10,6	0,23±0,01	1261±157,6	0,96±0,04

Tablo 4-48: Sonikasyon uygulanarak hazırlanan seçilmiş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
DMc 1 A80 1PEG S	0. ay	301,0±29,5	0,22±0,04
	1. ay	302,8±37,5	0,23±0,10
	4. ay	311,2±40,3	0,25±0,09
DMc 1 A200 1PEG S	0. ay	306,2±43,8	0,21±0,03
	1. ay	342,6±49,7	0,23±0,02
	4. ay	397,1±19,1	0,26±0,04
DMc 1 A500 1PEG S	0. ay	297,1±21,3	0,19±0,02
	1. ay	281,3±11,0	0,22±0,03
	4. ay	298,7±29,2	0,25±0,04
DMc 1 A1000 1PEG S	0. ay	294,4±21,7	0,19±0,03
	1. ay	341,0±27,2	0,31±0,11
	4. ay	342,8±45,0	0,32±0,14

Adapalen yüklenmeden hazırlanan boş misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları Tablo 4.49’da verilmiştir.

Tablo 4-49: Adapalen yüklenmeden hazırlanan boş dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilite bulguları

Formülasyon kodu	Zaman	Ortalama partikül boyutu (nm)	PDI
	0	160,4±4,6	0,21±0,01
BoşMisel-1PEG	1. ay	178,0±13,4	0,18±0,03
	4. ay	712,9±136,0	0,62±0,18

PDC (1 mg/1,2 ml); bu formülasyonda sonikasyon uygulanmamıştır.

4.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Optimizasyon çalışmalarında görsel olarak, partikül boyutu dağılımı ve yüklenen adapalen miktarı incelenerek uygun olduğu değerlendirilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıları seçilerek hazırlanan formülasyonlar zeta potansiyel, adapalenin nanotaşıyıcı sisteme yüklenme oranı, enkapsülasyon etkinliği, morfolojik özellikler açısından karakterize edildi.

4.9.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarına ait Zeta Potansiyel Bulguları

Seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının zeta potansiyel sonuçları Tablo 4.50’de verilmiştir.

Tablo 4-50: Seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Formülasyon kodu	Zeta potansiyel (mV)
DMc 1 A20 1PEG S	-0,3±0,04
DMc 1 A500 1PEG S	-1,2±0,7
DMc 1 A1000 1PEG S	-17,7±1,2
BoşMisel-1PEG	-1,9±0,2

4.9.2. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarında Yükleme Bulguları

Yöntem 3.2.11.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak ve 3.5 ve 3.6 nolu denklemler kullanılarak adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları Tablo 4.51’de verilmiştir.

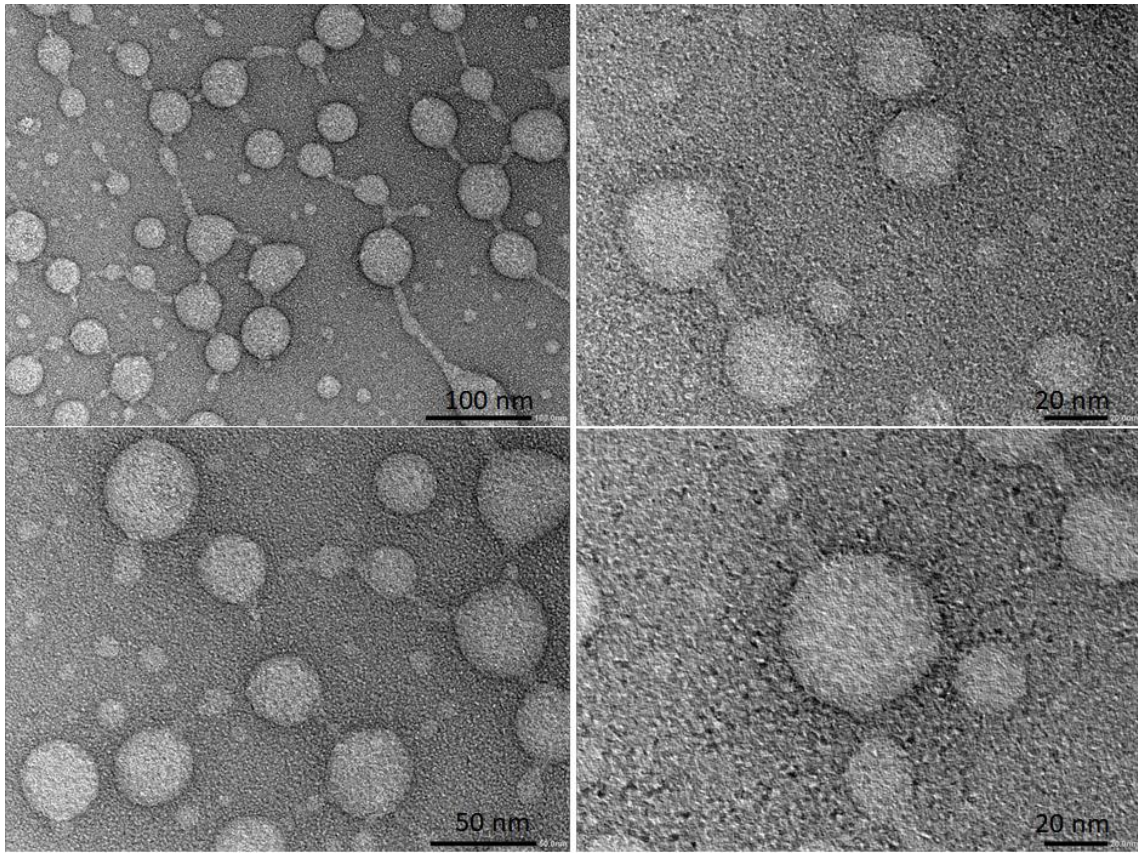
Ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta ihmal edilecek derecede düşük bulunan yüklenmeyen adapalen miktarları ile yüklemenin %99,99 oranında gerçekleştiği belirlendiği için; yükleme oranı ve yükleme etkinliği değerleri doğrudan nanotaşıyıcılarda bulunan toplam geri kazanılan adapalen miktarı üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 4-51: Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait yükleme oranı ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)

Formülasyon kodu	Yükleme oranı (%)	Yükleme etkinliği (%)
DMc 0.7 A80 1PEG S	8,4±0,5	80,2±4,7
DMc 1 A80 1PEG S	7,0±0,2	93,5±3,5
DMc 1 A200 1PEG S	15,8±0,9	93,9±6,7
DMc 1 A500 1PEG S	32,1±0,4	94,2±1,7

4.9.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların TEM Analizi Bulguları

Yöntem 3.2.11.3'te belirtildiği gibi çalışılarak yapılan TEM analizleri sonucunda elde edilen DMc 1 A500 1PEG S kodlu adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıların görüntüleri Şekil 4.16'da gösterilmektedir.



Şekil 4-16: DMc 1 A500 1PEG S kodlu adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına ait TEM (JEM-1011) görüntüleri

4.10. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcılar (PAMAM Dendrimer ve Dendron Temelli Miseller) ile Hazırlanan Jel Nanotaşıyıcılarının Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.10.1. Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Reolojik Özelliklerine ait Bulgular

Yöntem 3.2.12.2’de anlatıldığı şekilde yapılan tek nokta viskozite ölçümleri (Tablo 4.52 ve Tablo 4.53) ile reolojik özelliklerin belirlenmesine (Tablo 4.54) ait bulgular sırasıyla verilmiştir.

In vitro deriden penetrasyon çalışmaları için seçilen jel formülasyonlarının reolojik özelliklerini gösteren reogramı Şekil 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4-52: Farklı oranlarda HPC ile hazırlanan jellerde yapılan tek noktalı viskozite tayinine ait bulgular ($\gamma=5 \text{ s}^{-1}$) (n=3)

Formülasyon kodu	Viskozite (Pa s)
1 HPC	2,40±0,12
1.5 HPC	9,19±0,09
2 HPC	16,26±0,19

Jel formunda deriye sürülerek uygulanabilecek, ama aynı zamanda nanopartiküler sisteme yüklenen etken maddenin salımını geciktirmeyecek bir taşıyıcı ortamı sağlamak için minimal konsantrasyonda jelleştirici madde kullanılması amaçlandı. % 1,5 (a/h) oranında HPC içeren jel formülasyonun uygun olduğuna karar verildi.

Tablo 4-53: Farklı jel formülasyonlarında yapılan tek noktalı viskozite tayinine ait bulgular ($\gamma=5 \text{ s}^{-1}$) (n=3)

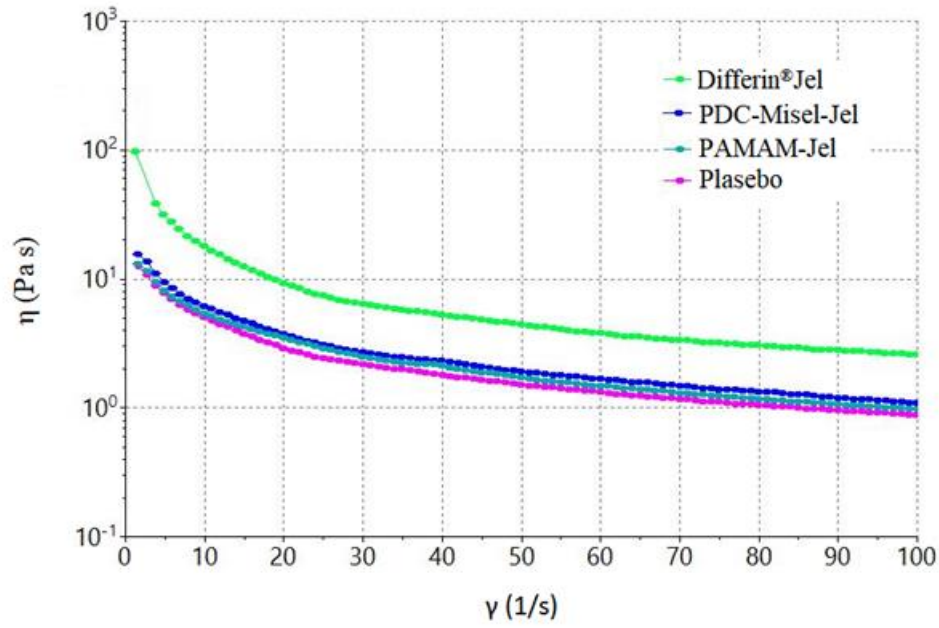
Formülasyon kodu	Viskozite (Pa s)
1.5 HPC	9,19±0,09
1.5 HPC-1PEG	4,23±0,12
PAMAM-Jel	4,72±0,21
PDC-misel-Jel	5,70±0,19
Differin®Jel	24,44±0,17

Tablo 4-54: Farklı jel formülasyonlarının reolojik özelliklerine ait bulgular ($\gamma=1-100 \text{ s}^{-1}$) (n=3)

Formülasyon Kodu	Plastik viskozite (η_c) (Pa s)	Eşik kayma gerilimi (τ_0) (Yield stress) (Pa)
Plasebo	0,16±0,01	33,1±2,7
PAMAM-Jel	0,17±0,01	35,8±1,9
PDC-misel-Jel	0,21±0,01	36,8±3,2
Differin®Jel	0,28±0,02	121,6±7,3

Plasebo: 1.5 HPC-1PEG kodlu formülasyon

Plastik vizkozite ve eşik kayma geriliminin Casson modeli kullanılarak hesaplanmıştır⁴⁴².



Şekil 4-17: Hazırlanan jel formülasyonları ve Differin®Jel'e ait reogram

Kontrol olarak 1.5 HPC-1PEG kodlu, adapalen veya nanotaşıyıcı sistem içermeyen, plasebo sadece dispersiyon ortamının %1,5 HPC ile jelleştirilmesi ile hazırlanmıştır.

4.10.2. Jel Formülasyonlarının Yayılabilirlik (*Spreadability*) Bulguları

Yöntem 3.2.12.3'te belirtildiği gibi çalışılarak elde edilen yayılabilirlik bulguları Tablo 4.55'te verilmiştir.

Tablo 4-55: Farklı jel formülasyonlarının yayılabilirlik bulguları (n=3)

Formülasyon kodu	Yayılabilirlik (cm ²)
PAMAM-Jel	5,2±0,2
PDC-misel-Jel	5,4±0,4
Differin®Jel	2,4±0,3

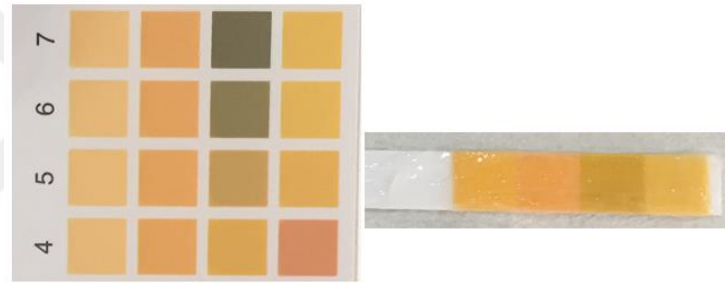
4.10.1. Jel Formülasyonlarının pH Bulguları

Yöntem 3.2.12.4'de belirtildiği gibi çalışılarak elde edilen pH ölçümleri sonucunda plasebo (1.5 HPC-1PEG) jelin pH'sı 6,4±0,2 olarak belirlenmiştir.

PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel'e ait pH bulguları Şekil 4.18'de, Differin® Jel'e ait pH bulgusu ise Şekil 4.19'da gösterilmektedir.



Şekil 4-18: pH indikatör skalası ile beraber elde edilen pH sonuçları a) PAMAM-Jel b) PDC-misel-Jel



Şekil 4-19: pH indikatör skalası ile beraber Differin® Jel ile elde edilen pH sonucu

4.10.2. Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarından ve Differin® Jel'den Adapalenin Geri Kazanımı Bulguları

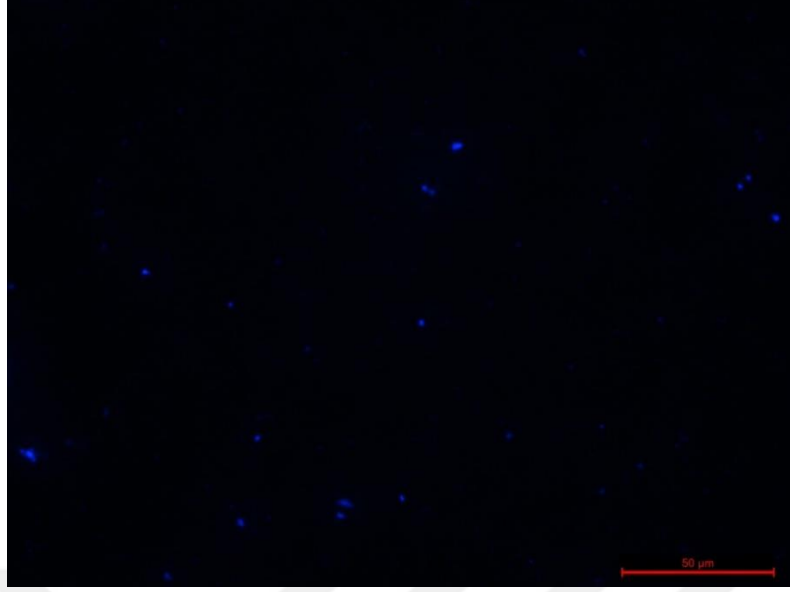
Yöntem 3.2.12.5'te belirtildiği gibi çalışılarak elde edilen geri kazanım bulguları Tablo 4.56'da verilmiştir.

Tablo 4-56: Nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarından ve Differin®Jel'den adapalenin geri kazanım oranları (n=3)

	Tartılan miktar (mg)	Teorik ADA miktarı (µg)	Bulunan ADA miktarı (µg)	Geri kazanım (%)
	9,67	9,67	9,79	
Differin®Jel	9,64	9,64	9,60	98,31±3,74
	8,48	8,48	7,98	
	11,91	3,42	3,27	
PAMAM Jel	7,99	2,26	2,29	96,49±4,47
	9,35	2,54	2,35	
	8,00	3,24	2,99	
PDC-misel Jel	9,09	3,68	3,71	97,25±4,44
	9,16	3,71	3,66	

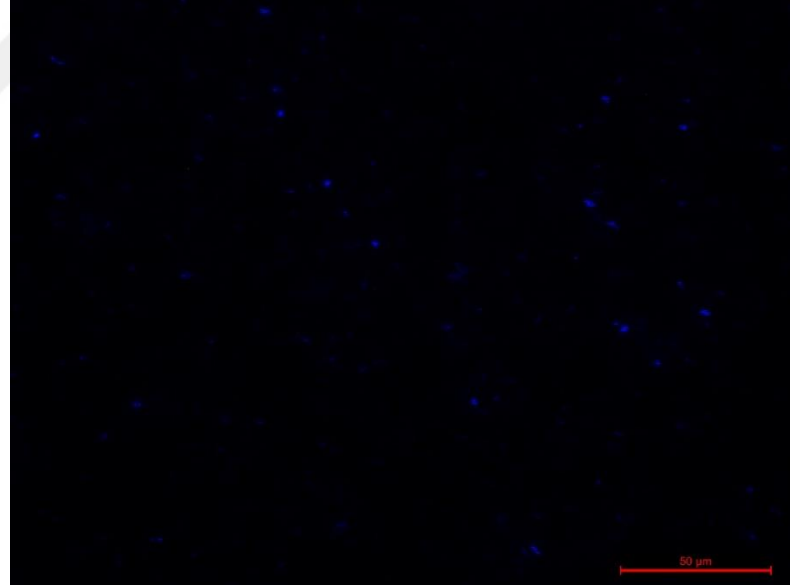
4.10.3. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıları İçeren Jel Formülasyonlarının ve Differin®Jel'in Floresan Mikroskop Bulguları

Yöntem 3.2.12.6'da anlatıldığı gibi floresan mikroskop ile yapılan analizler kapsamında PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG (PAMAM-AQ) ve DMc 1 A500 1PEG S (Dendron-AQ) kodlu nanotaşıyıcılarda; bu nanotaşıyıcılar ile hazırlanan jel formülasyonlarında ve Differin®Jel'de bulunan adapalenin fiziksel durumu Şekil 4.20-4.24'te gösterilmektedir.



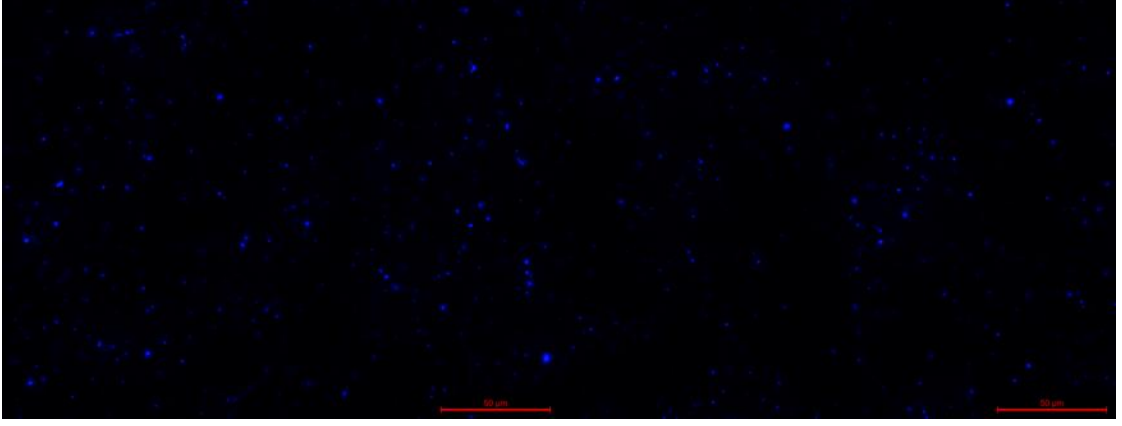
Şekil 4-20: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarında (PAMAM-AQ) bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüsü

Ölçek çubuğu: 50 μm



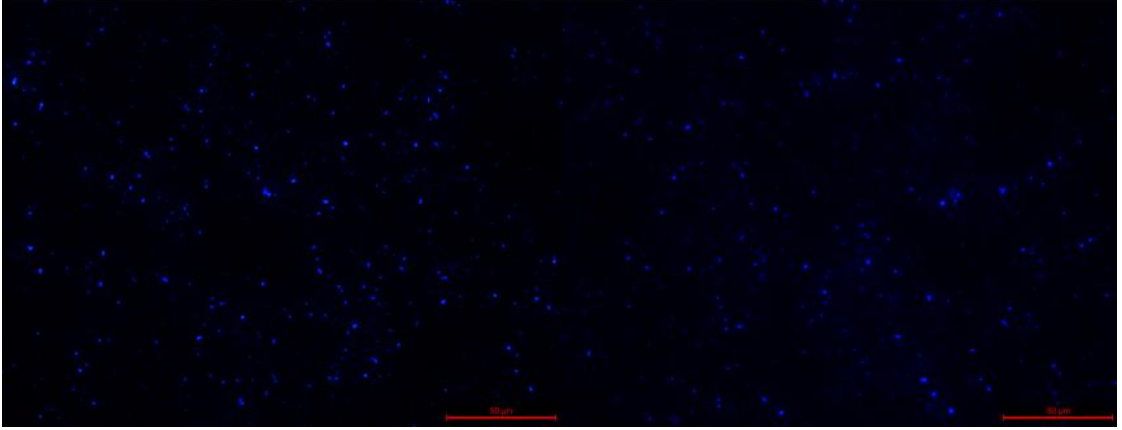
Şekil 4-21: PDC misel nanotaşıyıcılarında (Dendron-AQ) bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüsü

Ölçek çubuğu: 50 μm



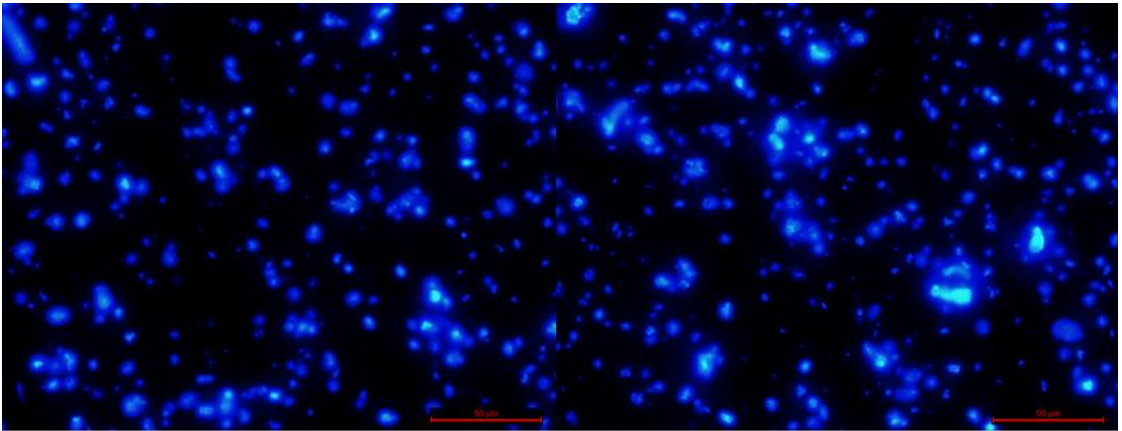
Şekil 4-22: PAMAM Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri

Ölçek çubuğu: 50 µm



Şekil 4-23: PDC Misel Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri

Ölçek çubuğu: 50 µm



Şekil 4-24: Differin® Jel’de bulunan adapalenin floresan mikroskop görüntüleri

Ölçek çubuğu: 50 µm

4.11. *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

In vitro deriden geçiş çalışmalarında kullanılacak jel formülasyonlarının deri yüzeyine homojen şekilde yayılmasını sağlanması açısından uygulanabilirliğini göstermek için; Nil Kırmızısı içeren HPC (%1,5) ile hazırlanan jel örneği Franz hücresine sabitlenen domuz derisine cam bir vialin dış tabanı ile uygulandığında elde edilen görünüm Şekil 4.25'te gösterilmektedir.

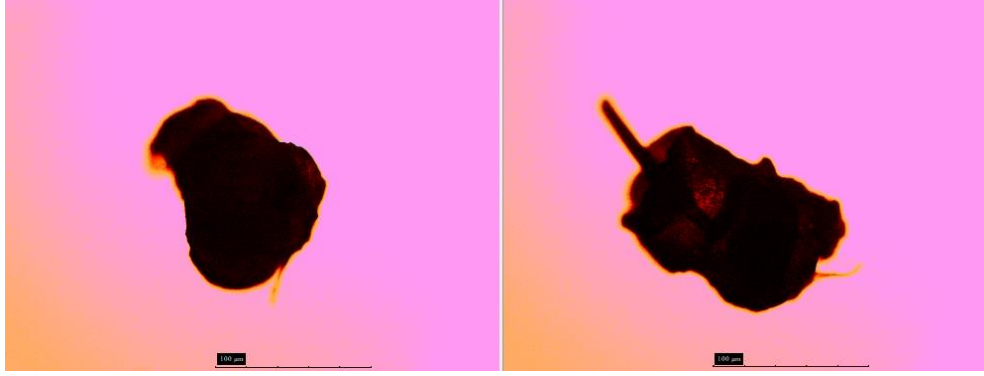


Şekil 4-25: Nil Kırmızısı içeren HPC (%1,5) jellerin deriye uygulanması ile deri yüzeyinde oluşan görünüm

In vitro penetrasyon çalışmaları sonunda, adapalenin deriden geçişinin değerlendirilmesi için reseptör fazdan (pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h)) alınan örnekler yöntem 3.2.13.6'da anlatıldığı gibi BSA'nın çöktürülmesi işlemi sonrasında HPLC ile analiz edildi. Kullanılan analitik yöntemin adapalen için teşhis limiti 0,4 ng/mL olarak belirlenmişti. Adapalen yüklü nanotaşıyıcılar ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında 24 saat sonunda reseptör fazda adapalen tespit edilmedi.

4.11.1. Adapalenin *In vitro* Deriden Penetrasyonunun *Punch* Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular

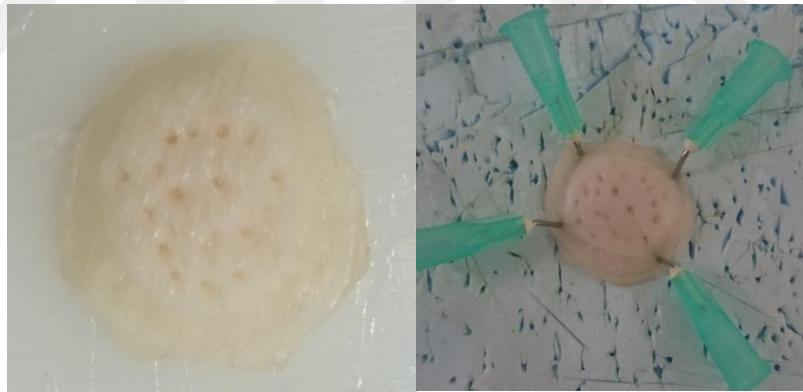
Adapalenin nanotaşıyıcılar ile foliküler hedeflendirilmesini değerlendirmek için; sadece nanotaşıyıcıları içeren su bazlı koloidal formülasyonların (PAMAM-AQ ve PDC-misel-AQ); nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarının (PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel) ve ticari ürünün (Differin®Jel) gösterdiği performansı incelenmiştir. Alınan biyopsi örneklerinin mikroskop altında görünümü Şekil 4.26'da gösterilmektedir.



Şekil 4-26: *Punch* Biyopsi tekniği ile deriden alınan örneklerin mikroskop altındaki görüntüsü: Kıl folikülü içermeyen biyopsi örneği, KF-Neg (Soldaki) ve kıl folikülü içeren biyopsi örneği, KF-Poz (Sağdaki)

Işık mikroskobu yardımıyla 100X büyütme ile görüntülenmiştir (Motic BA210, 3W LED, EF-N Plan Achromatic objectives 4X, Moticam 5.0 MP dijital kamera, Motic Images Plus 3.0 software (Wetzlar, Germany)).

Yöntem 3.2.13.3'te anlatılan şekilde yapılan *punch* biyopsi uygulamalarında deri görünümü Şekil 4.27'de gösterilmektedir.



Şekil 4-27: *Punch* biyopsi uygulamalarında deri örneğindeki görünüm

PAMAM dendrimerler ile hazırlanan adapalen yüklü nanotaşıyıcıyı içeren su bazlı koloidal nano formülasyonu (PAMAM-AQ); bu nanotaşıyıcıyı içeren jel formülasyonu (PAMAM-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparatından (Differin® Jel), adapalenin *in vitro* penetrasyonun *punch* biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyonlar ile bu formülasyonlardaki adapalen miktarları Tablo 4.57'de gösterilmektedir.

Tablo 4-57: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyonunun *punch* biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyon ve adapalen miktarları

Formülasyonlar	ADA (%)	Uygulanan formülasyon miktarı (cm ²)	Uygulanan ADA miktarı (µg/cm ²)
PAMAM-Jel	0,03	3,6±0,38 mg	1,1±0,11
PAMAM-AQ	0,03	11,5 µl	3,4
Differin® Jel	0,1	3,4±0,14 mg	3,4±0,14

Karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış, adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarını içeren su bazlı koloidal formülasyon (PAMAM-AQ), bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonu (PAMAM-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparatından (Differin® Jel) adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonu sonrasında *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.58 ve 4.59’da verilmiştir.

Tablo 4-58: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-1 (n=5)

Formülasyon kodu	KF-Poz (PSU+) (ng/7,85 mm ^{2#})	KF-Neg (PSU-) (ng/7,85 mm ^{2#})	Kalan deri (ng/cm ²)	FHF (KF-Poz/KF-Neg)
PAMAM-Jel	9,6±5,2	1,3±0,4	71,3±28,4	8,8±2,6
PAMAM-AQ	15,5±4,7	2,2±1,2	203,0±50,2	7,4±2,1
Differin® Jel	7,3±2,9	1,9±1,0	72,4±26,2	5,9±2,5

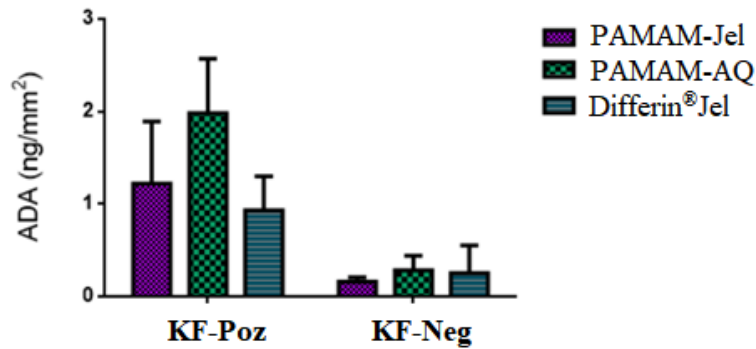
#7,85 mm²=10*biyopsi alanı

FHF: Foliküler Hedefleme Faktörü

Tablo 4-59: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-2 (n=5)

Formülasyonlar	Uygulanan ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Deri yüzeyinde kalan* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Deriye geçen miktar (ng/cm^2)	Toplam geri kazanılan (%)	Deriye penetrasyon etkinliği (%)
PAMAM-Jel	1,1 $\pm$ 0,11	0,89 $\pm$ 0,16	76,7 $\pm$ 28,6	91,8 $\pm$ 7,4	7,3 $\pm$ 2,7
PAMAM-AQ	3,4	2,50 $\pm$ 0,18	211,9 $\pm$ 51,0	81,7 $\pm$ 2,3	6,4 $\pm$ 1,5
Differin® Jel	3,4 $\pm$ 0,14	2,85 $\pm$ 0,15	77,0 $\pm$ 29,2	86,9 $\pm$ 5,7	2,3 $\pm$ 0,8

Adapalen yüklü PAMAM-AQ, PAMAM-Jel ve Differin® Jel ile yapılan çalışmalarda, kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.28’de gösterilmektedir.



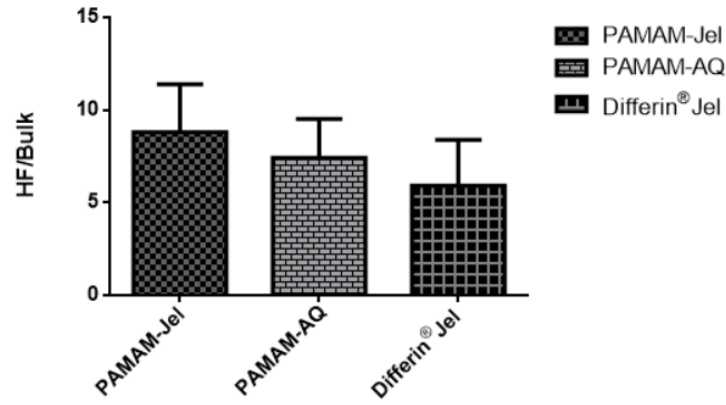
Şekil 4-28: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=5)

Holm-Sidak metodu ile multiple t test (KF-Poz ve KF-Neg bulgularının karşılaştırılması): PAMAM-Jel*p=0,0078; PAMAM-AQ*p=0,0002; Differin®Jel*p=0,0128

Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA) (KF-Poz bulgularının karşılaştırılması): PAMAM-AQ vs. Differin®Jel * p<0,05

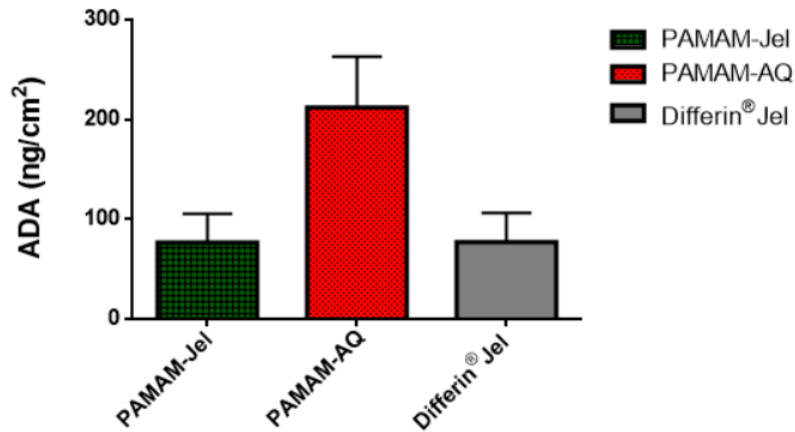
Adapalen yüklü PAMAM-AQ, PAMAM-Jel ve Differin® Jel ile yapılan çalışmalarda, foliküler hedefleme faktörü (FHF) olarak ifade edilen kıl folikülü içeren biyopsilerde bulunan adapalen miktarının kıl folikülü içermeyen biyopsilerde bulunan

adapalen miktarına oranını (KF-Poz/KF-Neg) gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.29'da gösterilmektedir.



Şekil 4-29: Foliküler hedefleme açısından adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparata ait KF-Poz/KF-Neg oranları (n=5)

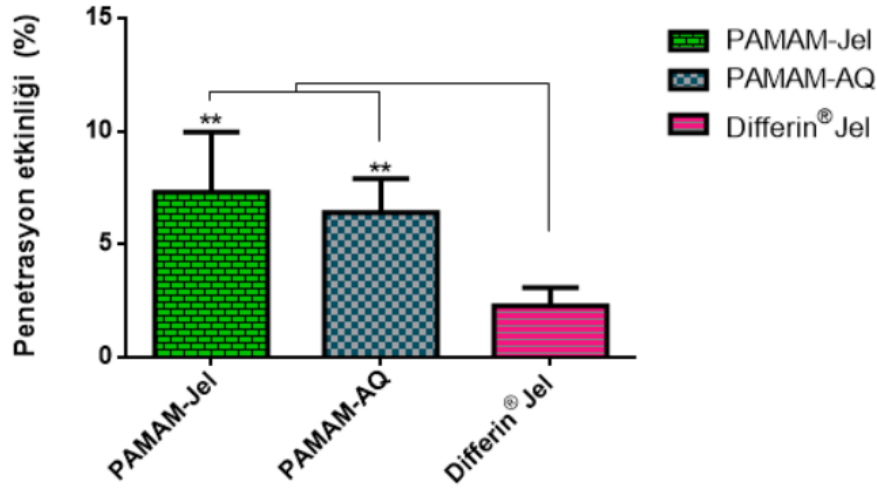
Adapalen yüklü PAMAM-AQ, PAMAM-Jel ve Differin® Jel'den deriye geçen adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.30'da gösterilmektedir.



Şekil 4-30: Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan deriye geçen etken madde miktarları (n=5)

Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA); Differin® Jel vs. PAMAM-AQ *** p<0,001; PAMAM-Jel vs. PAMAM-AQ *** p<0,001

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları (PAMAM-AQ, PAMAM-Jel) ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinliklerini gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.31’de gösterilmektedir.



Şekil 4-31: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri (n=5)

Dunnett's multiple comparisons test (One Way ANOVA): Differin®Jel vs. PAMAM-Jel **p<0,01 ve Differin®Jel vs. PAMAM-AQ ** p<0,01

PDC ile hazırlanan adapalen yüklü misel nanotaşıyıcılarını içeren su bazlı koloidal formülasyon (PDC-misel-AQ); bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonu (PDC-misel-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparatından (Differin® Jel), adapalenin *in vitro* penetrasyonun *punch* biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyonlar ile bu formülasyonlardaki adapalen miktarları Tablo 4.60'ta gösterilmektedir.

Tablo 4-60: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyonunun *punch* biyopsi yöntemi ile incelenmesi için deriye uygulanan formülasyon ve adapalen miktarları

Formülasyonlar	% ADA	Uygulanan formülasyon miktarı (cm ²)	Uygulanan ADA miktarı (µg/cm ²)
PDC-misel-Jel	0,04	3,5±0,09 mg	1,4±0,04
PDC-misel-AQ	0,04	8 µl	3,4
Differin® Jel	0,1	3,4±0,14 mg	3,4±0,14

Karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış, adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarını içeren su bazlı koloidal formülasyonu (PDC-misel-AQ), bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonu (PDC-misel-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparatından (Differin® Jel) *in vitro* deriden penetrasyonu sonrasında *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.61 ve 4.62’de verilmiştir.

Tablo 4-61: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-1 (n=5)

Formülasyon kodu	KF-Poz (PSU+) (ng/7,85 mm ^{2#})	KF-Neg (PSU-) (ng/7,85 mm ^{2#})	Kalan deri (ng/cm ²)	FHF (KF-Poz/KF-Neg)
PDC-misel-Jel	5,1±1,3	0,5±0,1	29,3±6,5	13,3±4,1
PDC-misel-AQ	7,7±2,8	0,7±0,2	106,1±21,9	11,7±4,0
Differin® Jel	7,3±2,9	1,9±1,0	72,4±26,2	5,9±2,5

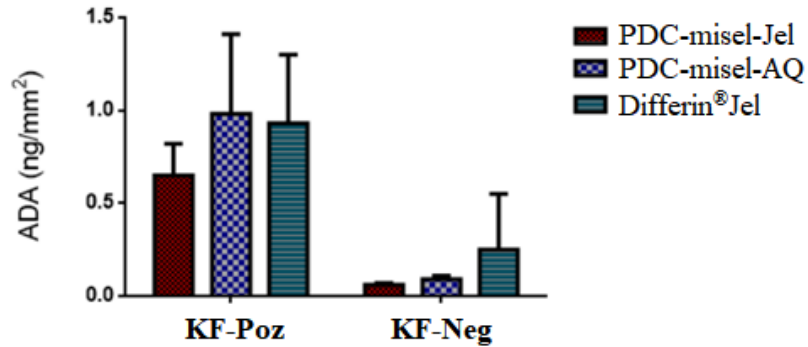
#7,85 mm²=10*biyopsi alanı

FHF: Foliküler Hedefleme Faktörü

Tablo 4-62: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonunun incelenmesine yönelik *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular-2 (n=5)

Formülasyonlar	Uygulanan ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Deri yüzeyinde kalan* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Deriye geçen miktar (ng/cm^2)	Toplam geri kazanılan (%)	Deriye penetrasyon etkinliği (%)
PDC-misel-Jel	1,4 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,05	32,1 $\pm$ 6,2	83,1 $\pm$ 5,8	2,3 $\pm$ 0,5
PDC-misel-AQ	3,4	2,71 $\pm$ 0,11	110,3 $\pm$ 22,7	84,4 $\pm$ 5,6	3,2 $\pm$ 0,7
Differin® Jel	3,4 $\pm$ 0,14	2,85 $\pm$ 0,15	77,0 $\pm$ 29,2	86,9 $\pm$ 5,7	2,3 $\pm$ 0,8

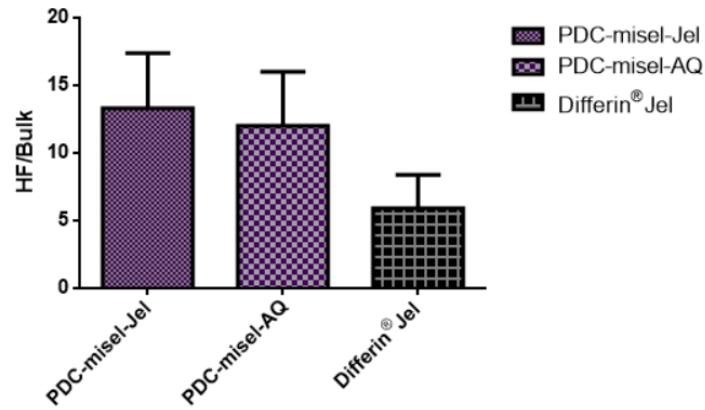
Adapalen yüklü PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel ve Differin® Jel ile yapılan çalışmalarda, kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.32’de gösterilmektedir.



Şekil 4-32: PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=5)

Holm-Sidak metodu ile multiple t test (KF-Poz ve KF-Neg bulgularının karşılaştırılması): PDC-misel-Jel*p<0,0001; PDC-misel-AQ*p=0,0061; Differin® Jel*p=0,0128

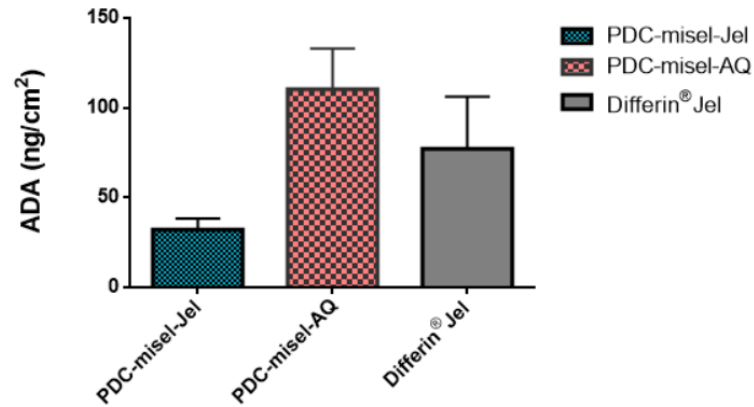
Adapalen yüklü PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel ve Differin® Jel ile yapılan çalışmalarda, kıl folikülü içeren biyopsilerde bulunan adapalen miktarının kıl folikülü içermeyen biyopsilerde bulunan adapalen miktarına oranını (KF-Poz/KF-Neg) gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.33’te gösterilmektedir.



Şekil 4-33: Foliküler hedefleme açısından adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparata ait KF-Poz/KF-Neg oranları (n=5)

Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA): PDC-misel-Jel vs. Differin® Jel * p<0,05

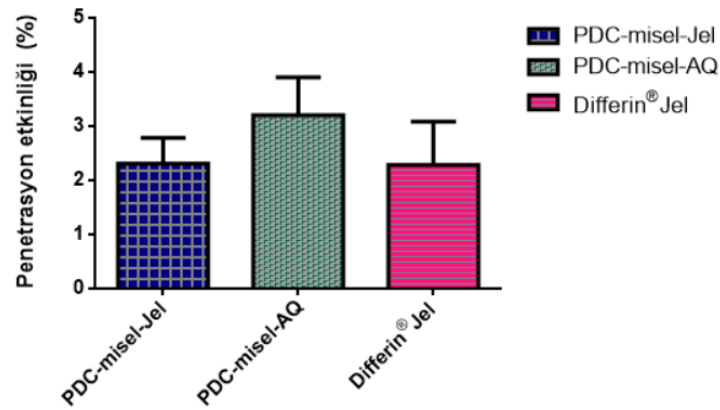
Adapalen yüklü PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel ve Differin® Jel'den deriye geçen adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.34'te gösterilmektedir.



Şekil 4-34: Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan deriye geçen etken madde madde miktarları (n=5)

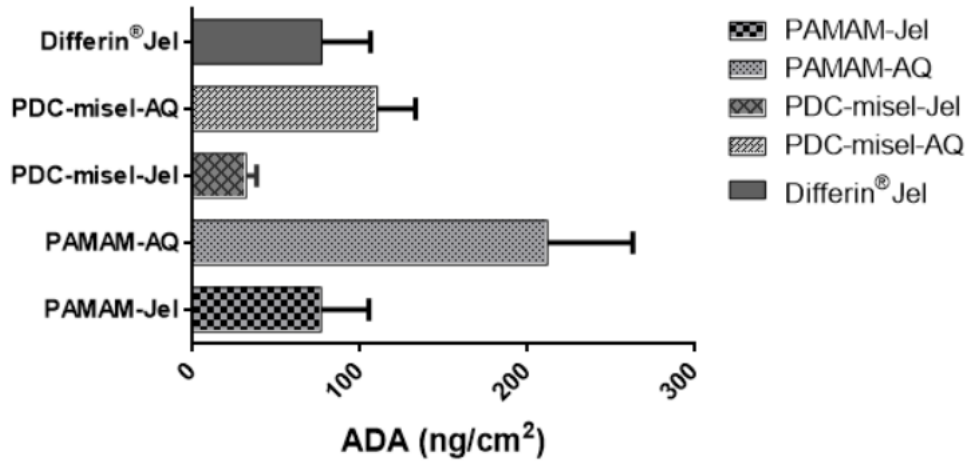
Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA): Differin® Jel vs. PDC-misel-Jel * p<0,05; PDC-misel-Jel vs. PDC-misel-AQ * p<0,001

Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları (PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel) ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinliklerini gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.35'te gösterilmektedir.



Şekil 4-35: Dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ve ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri (n=5)

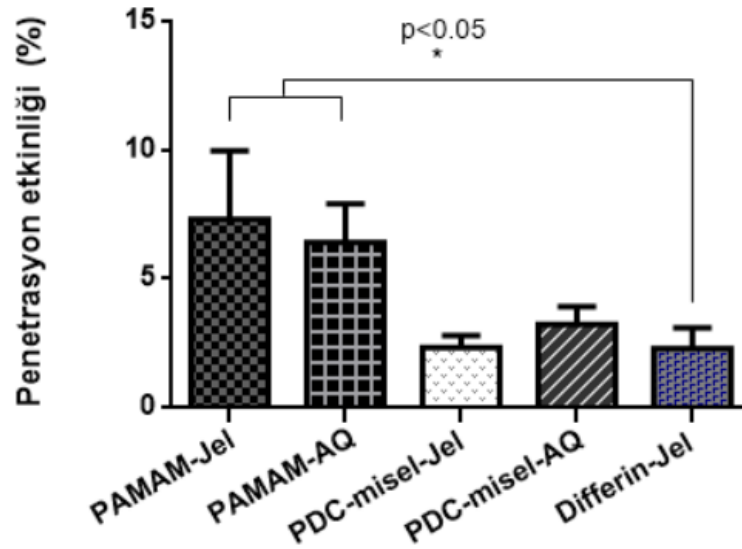
PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları (PAMAM-AQ, PAMAM-Jel) ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları (PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparattan deriye geçen adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.36’da gösterilmektedir.



Şekil 4-36: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonlarından ticari preparat ile karşılaştırmalı olarak deriye geçen adapalen miktarları (n=5)

Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA); Differin®Jel vs. PAMAM-AQ **** p<0,0001; PAMAM-Jel vs. PAMAM-AQ **** p<0,0001; PAMAM-AQ vs. PDC-misel-AQ ** p<0,01; PDC-misel-Jel vs. PDC-misel-AQ * p<0,05

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları (PAMAM-AQ, PAMAM-Jel) ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları (PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel) ve pazarda bulunan ticari preparatından adapalenin deriye penetrasyon etkinliklerini gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.37’de gösterilmektedir.



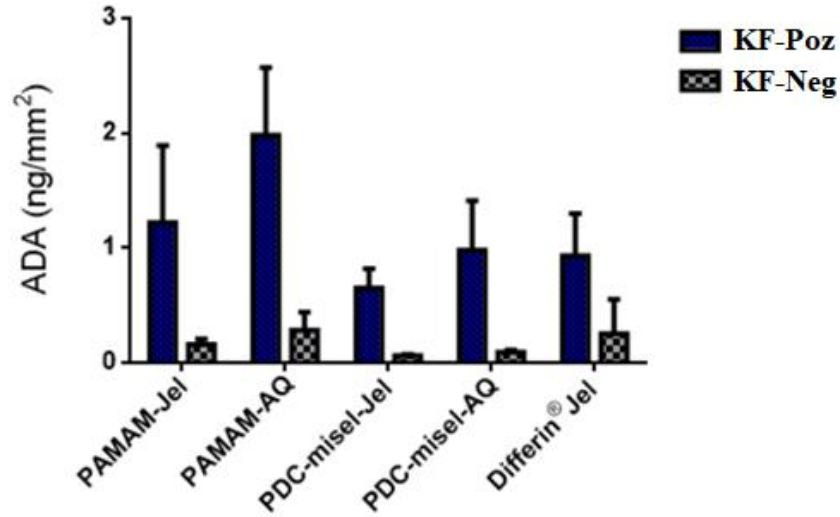
Formülasyonlar	% ADA	Uygulanan formülasyon miktarı (cm ²)	Uygulanan ADA miktarı (µg/cm ²)
PAMAM-Jel	0,03	3,6±0,38 mg	1,1±0,11
PAMAM-AQ	0,03	11,5 µl	3,4
PDC-Misel-Jel	0,04	3,5±0,09 mg	1,4±0,04
PDC-Misel-AQ	0,04	8 µl	3,4
Differin Jel	0,1	3,4±0,14 mg	3,4±0,14

Şekil 4-37: PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları ile ticari preparattan adapalenin deriye penetrasyon etkinlikleri gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5)

Dunnett's multiple comparisons test (One Way ANOVA): Differin®Jel vs. PAMAM Jel***p<0,001 ve Differin®Jel vs. PAMAM-AQ ** p<0,01

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları (PAMAM-AQ, PAMAM-Jel) ve dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları (PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel) ile ticari preparatından kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg)

biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.38’de gösterilmektedir.

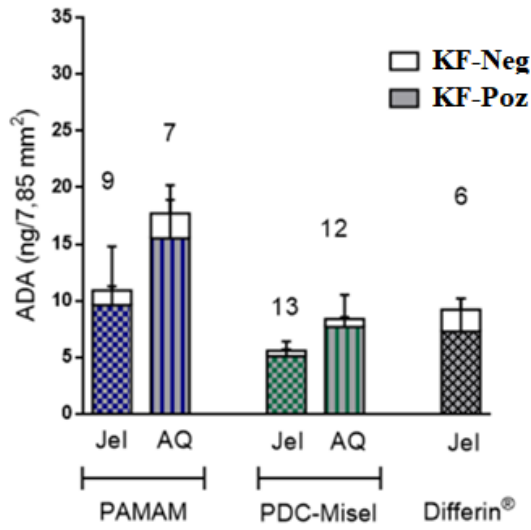


Şekil 4-38: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ formülasyonları ile PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarlarını gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5)

Holm-Sidak metodu ile multiple t test (KF-Poz ve KF-Neg bulgularının karşılaştırılması): PDC-misel-Jel * $p < 0,0001$; PAMAM-Jel * $p = 0,0078$; PAMAM-AQ * $p = 0,0002$; PDC-misel-AQ * $p = 0,0061$; Differin® Jel * $p = 0,0128$

Tukey's multiple comparisons test (One Way ANOVA) (KF-Poz bulgularının karşılaştırılması): PAMAM-AQ vs. PDC-misel-AQ * $p < 0,05$; PAMAM-AQ vs. Differin® Jel * $p < 0,05$

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcı formülasyonları (PAMAM-AQ, PAMAM-Jel) ile dendron temelli misel nanotaşıyıcı formülasyonları (PDC-misel-AQ, PDC-misel-Jel) ve ticari preparat ile yapılan çalışmalarda kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları ile birlikte hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg oranları) değerlerini gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.39’da gösterilmektedir.



Şekil 4-39: PAMAM-Jel, PAMAM-AQ ile PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonları ve ticari preparattan KF-Poz ve KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları ile birlikte hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg oranları) değerlerini gösteren karşılaştırmalı grafik (n=5)

Sütunların üzerindeki sayılar, FHF (KF-Poz/KF-Neg oranları) değerlerini ifade etmektedir.

Adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcılar ve Differin® Jel ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında; 24 saat sonunda reseptör fazdan alınan örneklerde yöntem 3.2.13.6'da anlatılan işlemlerin ardından gerçekleştiren HPLC analizlerinde adapalen konsantrasyonunun TL değerinin altında kaldığı saptandı. Bu bulgu ile, etken maddenin deri tabakalarında lokalize olduğu ve etken maddenin sistemik dolaşıma geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirlendi.

4.11.2. Adapalenin *Stratum Corneum*'daki birikiminin *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları Sonrasında Bantla Soyma (*Tape Stripping*) Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıyı içeren PAMAM-Jel ve pazarda bulunan ticari preparatı ile 24 saat süre ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarında deriye uygulanan formülasyon ve etken madde miktarları Tablo 4.63'te gösterilmektedir. Bu çalışma sonrasında, bantla soyma işlemi yapılarak adapalenin *stratum corneum*'daki birikimi değerlendirildi.

Tablo 4-63: Adapalen yüklü PAMAM-Jel ve ticari preparat ile bantla soyma işlemi yapmak üzere 24 saat süre ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarında deriye uygulanan formülasyon ve etken madde miktarları

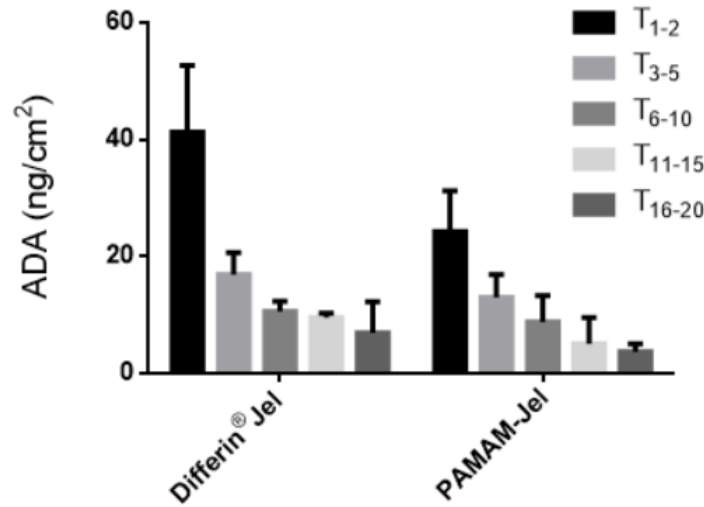
Formülasyon	Uygulanan formülasyon miktarı (mg/cm ²)	Uygulanan ADA miktarı (µg/cm ²)
PAMAM-Jel	3,60±0,11	1,05±0,03
Differin® Jel	3,42±0,07	3,42±0,07

Karakterizyon çalışmaları tamamlanmış, adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıyı içeren PAMAM-Jel ve Differin® Jel ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları sonrasında bantla soyma yöntemi ile *stratum corenum* tabakalarında saptanan adapalen miktarları Tablo 4.64'te verilmiştir.

Tablo 4-64: PAMAM-Jel'den ve ticari preparattan adapalenin *stratum corenum*'daki birikiminin bantla soyma yöntemi ile incelenmesine ait bulgular (n=4)

Bant sayısı	T ₁₋₂	T ₃₋₅	T ₆₋₁₀	T ₁₁₋₁₅	T ₁₆₋₂₀
PAMAM-Jel (ng/cm ²)	24,2±7,0	13,0±3,9	8,8±4,5	5,1±4,4	3,7±1,4
Differin® Jel (ng/cm ²)	48,3±11,4	16,9±3,8	10,6±1,7	9,5±0,8	6,9±5,3

PAMAM-Jel ile kontrol olarak ticari preparattan (Differin® Jel) deriye penetre olan adapalenin *stratum corneum*'un tabakalarındaki birikim ve lokalizasyonunu gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.40'ta verilmektedir.



Şekil 4-40: Adapalen yüklü PAMAM Jel ve ticari preparat ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarında bantla soyma işlemi yapılarak belirlenen *stratum corneum* tabakasındaki adapalen miktarları (n=4)

4.11.3. Adapalenin Deri ve Bantlardan Ekstraksiyon İşlemi ile Geri Kazanımı

Yöntem 3.2.13.5'te anlatıldığı gibi çalışılarak, deri ve bantlardaki geri kazanılan adapalen miktarları ve geri kazanım oranları Tablo 4.65'te verilmiştir.

Tablo 4-65: Adapalenin deri ve bant örneklerinden geri kazanım bulguları (n=3)

	Uygulanan ADA miktarı (ng/cm ²)	Geri kazanılan ADA miktarı (ng/cm ²)	Geri kazanım (%)
Deri örnekleri	62,2	59,2±3,8	95,0±6,1
Bant örnekleri		57,2±5,5	91,8±8,8

4.11.4. Reseptör Fazda BSA'nın Çöktürülmesinin Ardından Adapalenin Geri Kazanım Çalışmasına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.6'da anlatıldığı gibi çalışılarak reseptör fazda BSA'nın çöktürülmesi işlemi ile adapalenin ekstraksiyon ortamında geri kazanım oranları Tablo 4.66'da verilmiştir.

Tablo 4-66: Reseptör fazda adapalenin, BSA'nın çöktürülmesi işlemi sonrasında ekstraksiyon ortamında geri kazanım bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/ml)	Bulunan ortalama değer (ng/ml)	Hesaplanan ortalama değer* (ng/ml)	Geri kazanım (%)		
			ortalama	SD (±)	RSD (%)
20	5,8	23,3	116,3	15,8	13,6
100	25,8	103,2	103,2	7,2	7,0
400	96,3	385,2	96,3	3,6	3,7

*Bulunan konsantrasyon değerlerinin 4 katı alınarak hesaplanmıştır.

4.11.5. Adapalenin Reseptör Fazdaki Stabilitesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.7'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar kapsamında reseptör fazda pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) adapalenin stabilite bulguları Tablo 4.67'de verilmiştir.

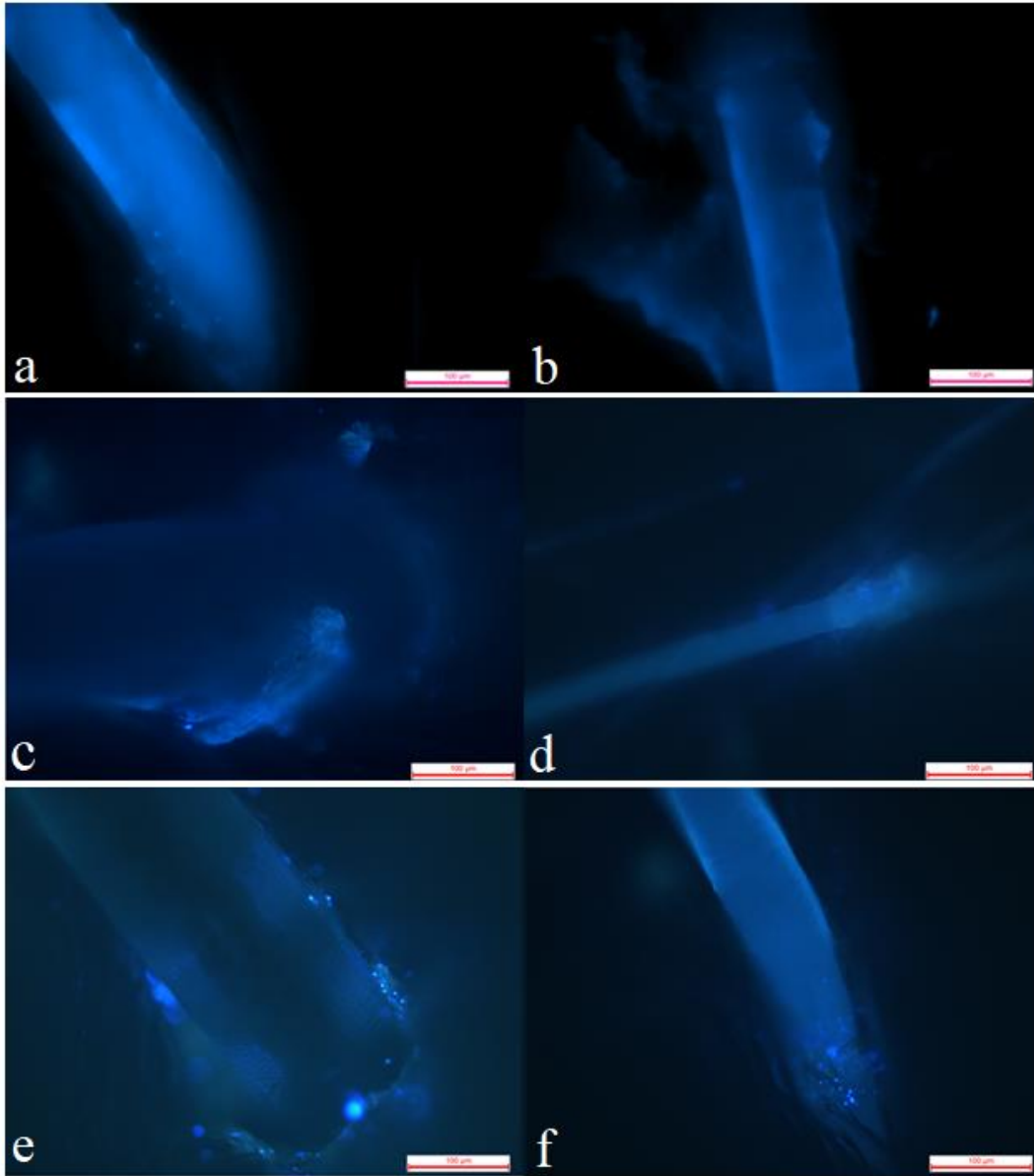
Tablo 4-67: Adapalenin pH 7,4 PBS (%4 BSA, a/h) ortamındaki stabilite bulguları

Zaman (saat)	Konsantrasyon (ng/ml)	Alan	Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
0.		6129,0			
8.	25*	6060,3	6311,3	376,84	5,97
24.		6744,7			

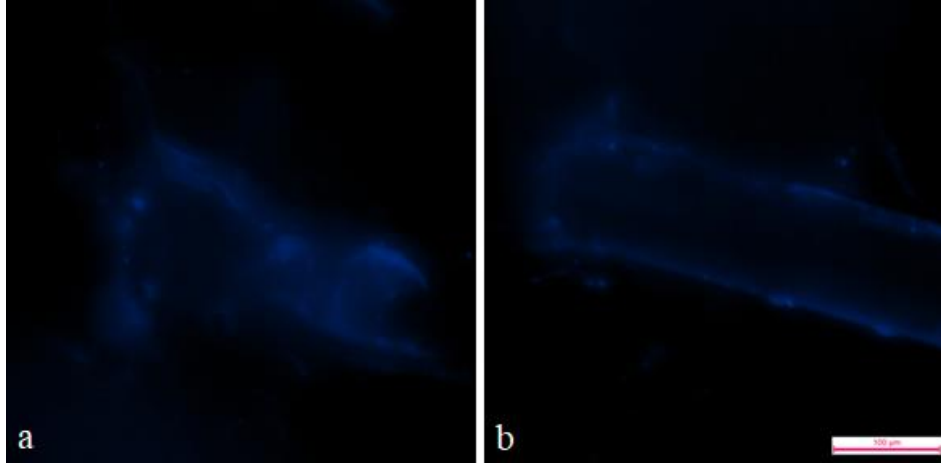
* BSA'nın çöktürülmesi sırasında ACN/DMF (60:40) ile yapılan 4 kat seyreltme hesaba katıldı.

4.11.6. Adapalenin Foliküler Birikiminin Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesine ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.8'de anlatıldığı şekilde çalışılarak floresan mikroskopla yapılan görüntüleme çalışmaları sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de gösterilmektedir.



Şekil 4-41: Dendritik nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonları ile Differin® Jel'in 24 saat süre ile deriye uygulanmasını takiben floresan mikroskop ile deri yüzeyinde elde edilen görüntüler; karşılaştırmalı olarak a, b) PAMAM-Jel c, d) PDC-misel-Jel e, f) Differin® Jel



Şekil 4-42: Sulu koloidal nanotaşıyıcı sistemlerin 24 saat süre ile deriye uygulanmasını takiben floresan mikroskop ile deri yüzeyinde elde edilen görüntüler a) PAMAM-AQ ve b) PDC-misel-AQ

4.12. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deriye uygulanan formülasyonlardan adapalenin foliküler birikimini incelemek için adapalen molekülünün kendisinin gösterdiği floresan özellikten yararlanılarak doğrudan Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile görüntüleme çalışması yapıldı.

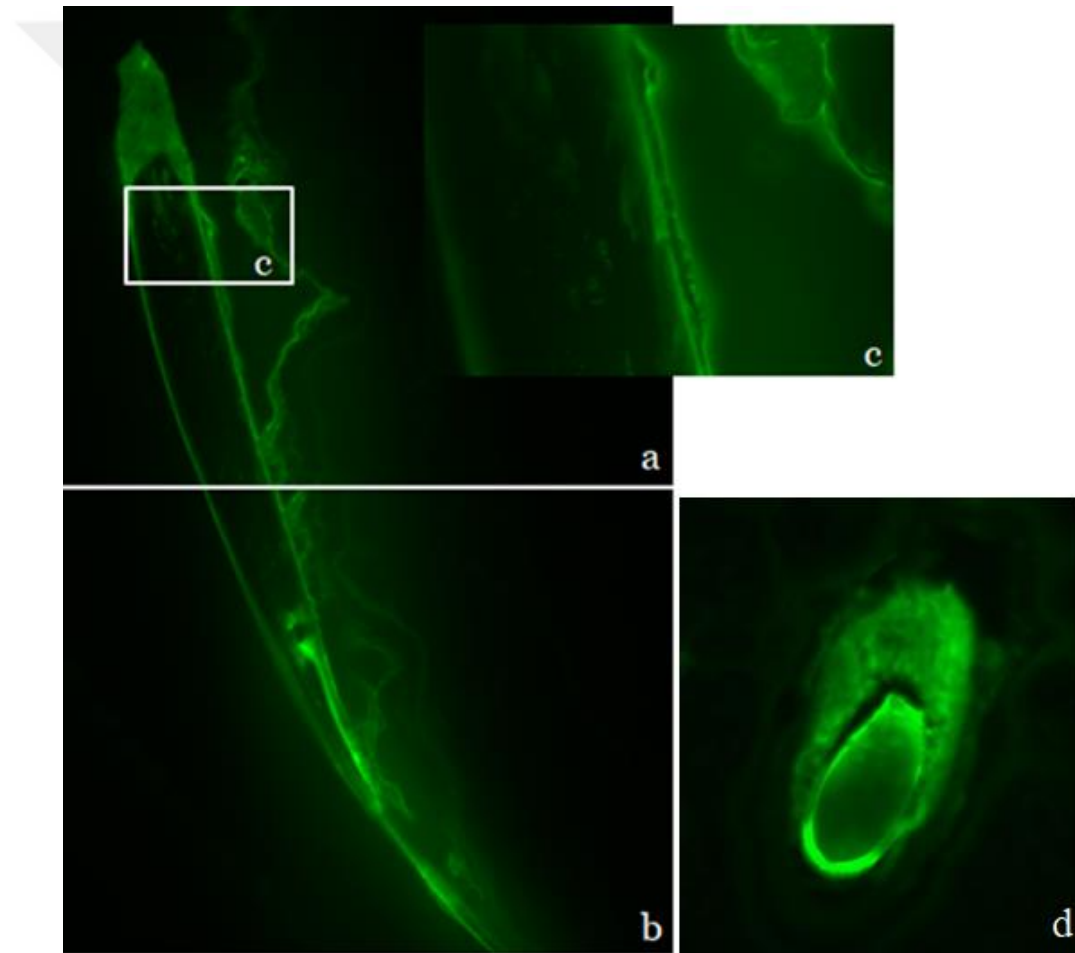
Fakat ön çalışmalar sırasında, herhangi bir adapalen formülasyonu uygulanmamış olan kontrol olarak kullanılan derinin kendisinin otofloresansa sebep olduğu görüldü. Başka bir deyişle, deri örneklerinde görüntüleyip lokalizasyonunu belirlemek istediğimiz floresan sinyali veren adapalen molekülü ile arka planda floresansa sebep olan deri bileşenleri birbirine çok yakın eksitasyon ve emisyon dalga boyu aralıklarına sahip olduğu için elde edilen görüntülerde adapalenden gelen floresans sinyal ile derinin kendisinden; özellikle de kıl folikülllerinden gelen sinyaller birbirinden ayırt edilemedi. Mikroskop donanımında mevcut lazerler, deri bileşenlerinin uyarılmasını önleyerek otofloresansı azaltacak şekilde, adapaleni 405 nm dalga boyundan daha düşük bir dalga boyunda uyarmaya olanak vermedi. Otofloresans kabul edilebilir derecede önlenemediği için CLSM analizleri ile güvenilir sonuçlar elde edilemedi.

Model floresan boya yüklü dendritik nanotaşıyıcılar ile deriye penetrasyonun ve kıl foliküllerinde birikimin değerlendirilmesi için Floresein İzotiyosiyanat (FITC) ile

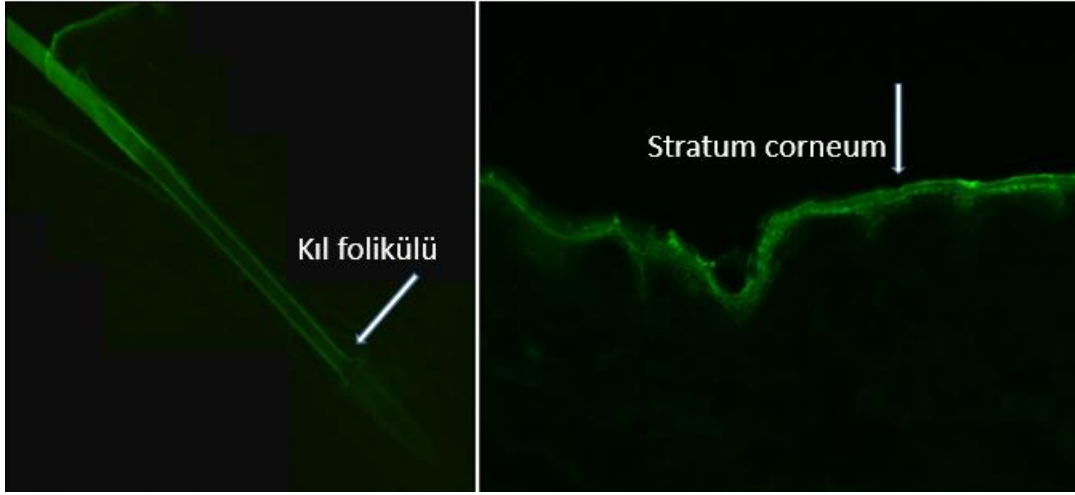
işaretlenen PAMAM dendrimerler ve NK yüklenen dendron temelli miseller ile CLSM analizleri yapılarak görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi.

4.12.1. PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılar ile Yapılan CLSM Analizi Bulguları

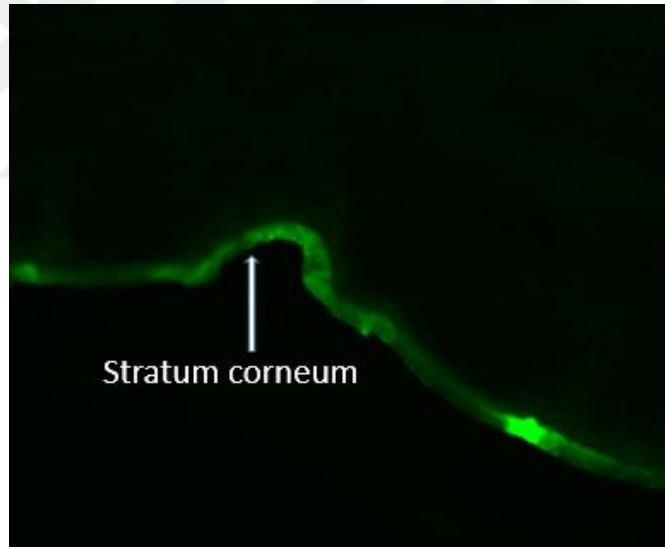
Yöntem 3.2.14.1’de anlatıldığı gibi çalışılarak fluoresans veren FITC bağlı PAMAM dendrimer formülasyonun ve FITC’ın pH 7,4 PBS’deki kontrol çözeltisinin 8 saat deriye uygulanmasını takiben, FITC bağlı PAMAM dendrimer yapısının deri tabakalarındaki lokalizasyonu ve foliküler birikimine ait deriden alınan dikey kesitler ile elde edilen CLMS görüntüleri aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.43-4.45).



Şekil 4-43: PAMAM-NH₂-FITC nanotaşıyıcısının deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntülerinde tespit edilen kıl folikülünün a) üst parçası (10X) b) alt parçası (10X) c) immersiyon objektifi ile 40X büyütülmüş hali d) foliküler açıklık



Şekil 4-44: PAMAM-NH₂-FITC nanotaşıyıcısının deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X)

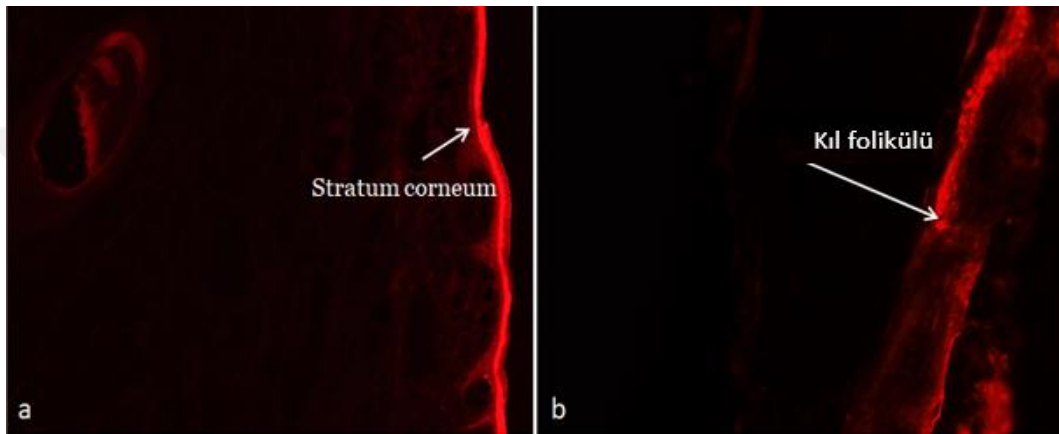


Şekil 4-45: FITC in PBS (pH 7,4) içindeki kontrol çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüsü (10X)

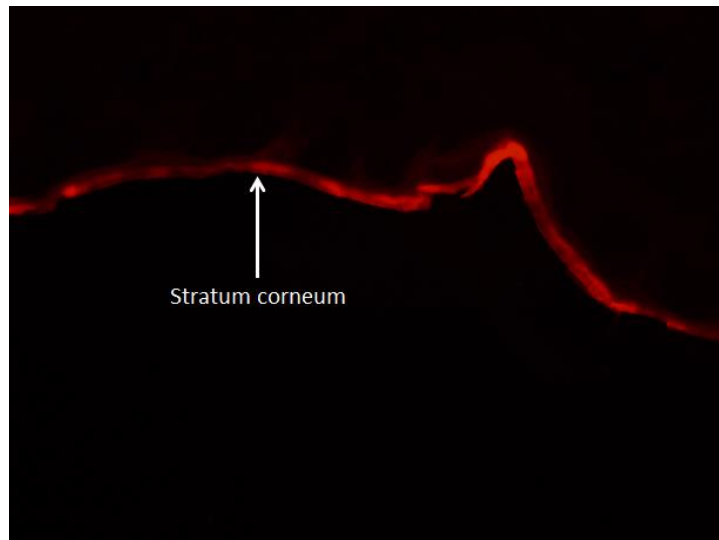
Elde edilen görüntülerde FITC konjuge edilmiş PAMAM dendrimerlerin derideki kıl foliküllerinde biriktiği gözlemlendi.

4.12.2. Adapalenin Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılar ile Yapılan CLSM Analizi Bulguları

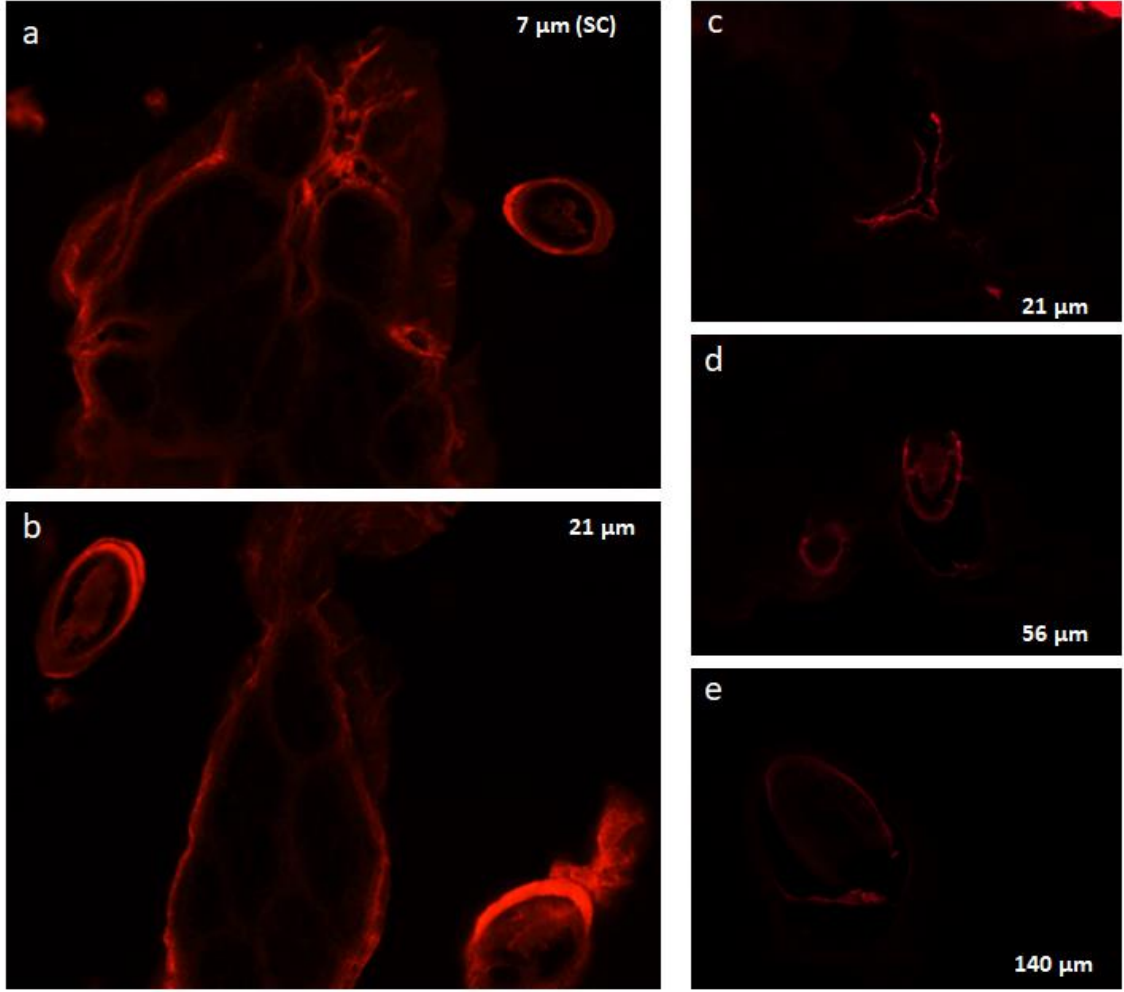
Yöntem 3.2.14.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak model boya olarak floresan bir boya olan Nil Kırmızısı (NK) yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıları ve NK’nin pH 7,4 PBS ile hazırlanan kontrol dispersiyonunun 8 saat deriye uygulanmasını takiben, NK’nin derinin tabakalarındaki lokalizasyonuna ait deriden alınan dikey ve yatay kesitler ile elde edilen CLMS görüntüleri aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.46-4.49).



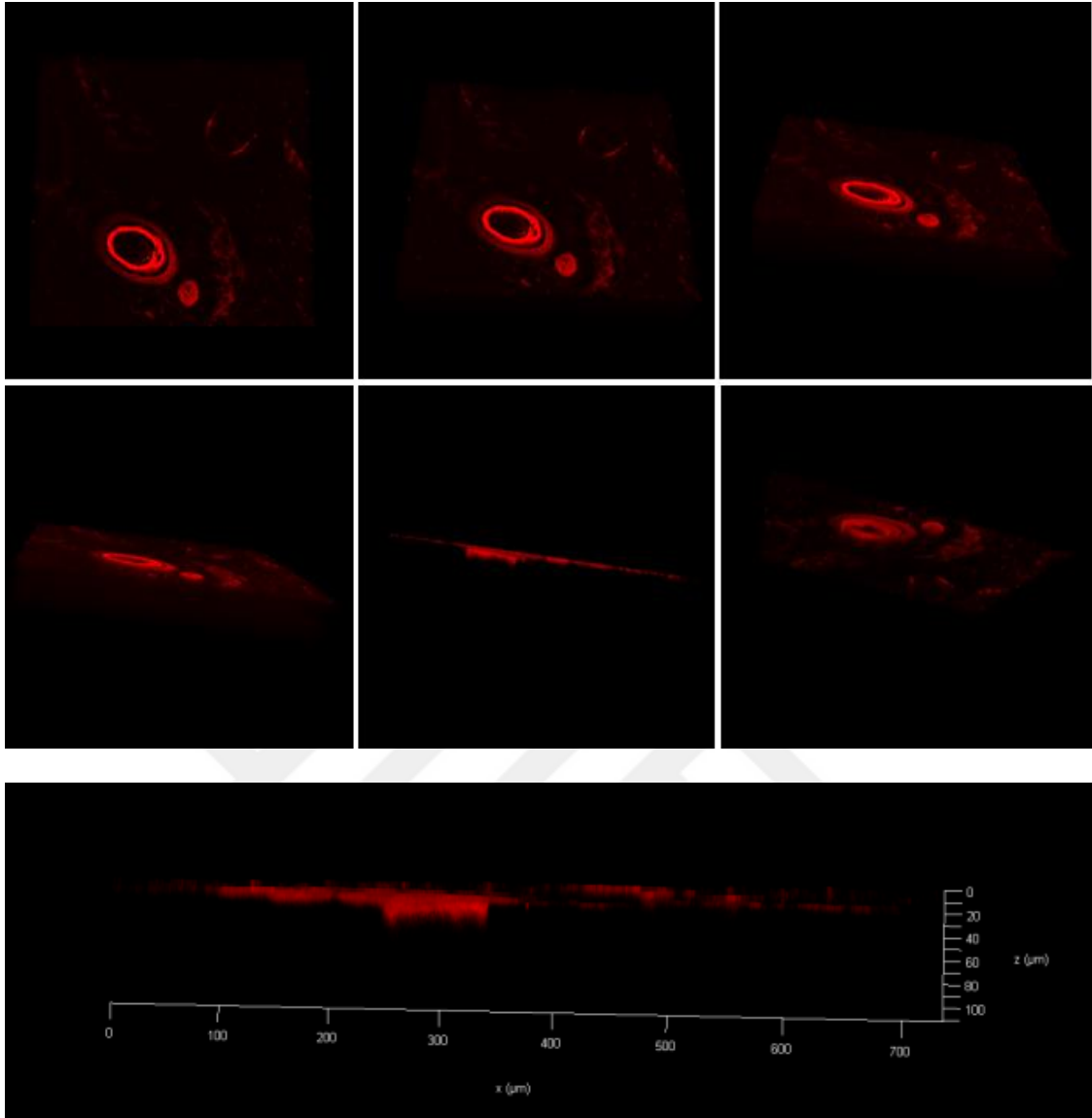
Şekil 4-46: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 20 μm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X) a) *Stratum corneum* b) Kıl folikülü



Şekil 4-47: Nil Kırmızısı’nın PBS (pH 7,4)’teki kontrol dispersiyonunun deriye uygulanmasını takiben 20 μm kalınlıkta alınan dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüsü (10X)



Şekil 4-48: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 7'şer µm kalınlıkta alınan yatay kesitler ile elde edilen CLMS görüntüleri (10X)



Şekil 4-49: Nil Kırmızısı yüklü dendron temelli misellerin deriye uygulanmasını takiben 7 μm kalınlıkta alınan yatay kesitte elde edilen üç boyutlu CLMS görüntüleri (10X)

Yatay kesit örneğinde *stratum corneum*'dan dermise doğru 224-231 μm derinlikte tespit edilen foliküler kanal farklı açılardan, sırasıyla üstten yandan ve alttan, görüntülenmiştir. En altta 7 μm kalınlıktaki yatay kesitin üç boyutlu elde edilen xz-düzlemsel görüntüsü yer almaktadır.

Lipofilik yapıda floresan model boya (NK) enkapsüle edilen dendron temelli nanotaşıyıcılarının *in vitro* koşullarda domuz derisine uygulanması sonrasında yapılan CLSM analizleri ile NK'nin deride kıl foliküllerinde lokalize olduğu görüntülendi.

4.13. Adapalenin Dendron Temelli Nanotaşıyıcılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Misel Nanotaşıyıcılarının Hazırlanmasına ait Bulgular

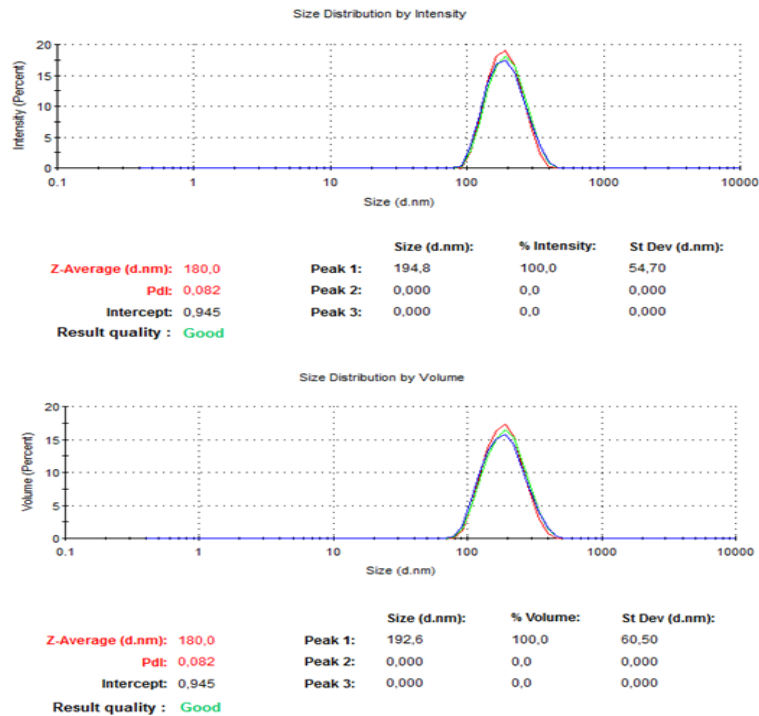
4.14. Adapalen Bağlı Polyester Dendron Polimer Konjugat (PDC-ADA) Yapısının Hazırlanmasına Ait Bulgular

Sentez ve karakterizasyon çalışmaları Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirilen PDC-ADA yapısında yüklenen adapalen miktarının molar oranı 1:5,3 olarak tespit edilmiştir. PDC-ADA yapısının hidrolizi ile açığa çıkacak adapalen oranı ağırlıkça % 15,64'tür.

4.15. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının Partikül Boyutu ve Dağılımı (Polidispersite İndeksi) ile Zeta Potansiyel Bulguları

Yöntem 3.2.15.2'de anlatıldığı gibi PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarında Yöntem 3.2.5'te anlatıldığı şekilde yapılan boyut ölçümlerinde saptanan ortalama partikül boyutu 180 ± 22 nm (PDI: $0,08 \pm 0,01$); Yöntem 3.2.7.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak ölçülen zeta potansiyel değeri $-1,4 \pm 0,9$ olarak belirlenmiştir.

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarına ait örnek partikül boyutu dağılımı grafiği Şekil 4.50'de gösterilmektedir.



Şekil 4-50: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarına ait örnek partikül boyutu dağılımı grafiği

4.16. PDC-ADA'nın Miktar Tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analiz Yöntemi ve Validasyonu

4.16.1. Seçicilik

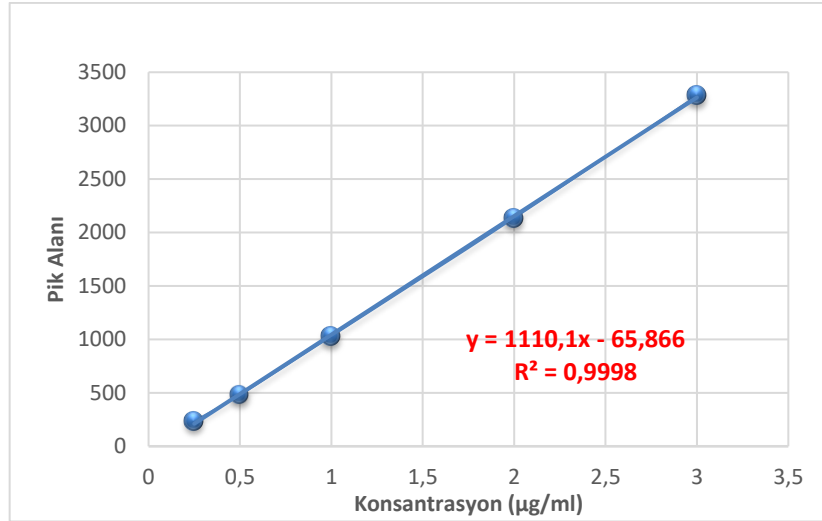
Yöntem 3.2.17.4'te belirtildiği gibi, HPLC analizlerinde PDC-ADA yapısının sentezlenmesinde kullanılan bileşenlerin, domuz derisinin ve bantla soyma işleminde kullanılan bantın ekstraksiyon ortamında hazırlanan örneklerinden kaynaklı, PDC-ADA'nın alıkonma zamanında gelen ve çakışmaya sebep olan herhangi bir pik olmadığı saptandı.

4.16.2. Doğrusallık

Hazırlanan standartlarla konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan (AUC) değerlerinin ortalamaları, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri Tablo 4.68'de gösterilmektedir. Regresyon doğrusuna ait denklem ve hesaplanan determinasyon katsayısı (r^2) Şekil: 4.51'de verilmiştir.

Tablo 4-68: PDC-ADA'nın HPLC ile analiz yöntemine ait doğrusallık bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
0,25	236,7	10,07	4,25
0,5	481	5,57	1,16
1	1029,7	21,73	2,11
2	2135	17,35	0,81
3	3281,3	42,59	1,30



Şekil 4-51: PDC-ADA'nın kalibrasyon doğrusuna ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı

4.16.3. Kesinlik

Yöntem 3.2.17.4'te anlatıldığı gibi kesinlik çalışmalarında hazırlanan standart çözeltiler için elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4.69 ve Tablo 4.70'te verilmiştir.

Tablo 4-69: PDC-ADA'nın HPLC ile analizi yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
0,5	496	24,6	4,96
1	1030,3	20,8	2,02
2	2142,3	23,5	1,09

Tablo 4-70: PDC-ADA'nın HPLC ile analiz yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama alan			Ortalama alan	SD (±)	RSD (%)
	1. gün	2. gün	3. gün			
0,5	496	530,6	477,2	501,3	27,1	5,4
1	1030,3	1058,7	1021,9	1037	19,3	1,9
2	2142,3	2175,6	2103,4	2140,4	36,1	1,7

4.16.4. Teşhis Limiti (TL)

Yöntem 3.2.17.4'te anlatıldığı gibi cevabın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile ilgili 3-1 nolu formül kullanılarak, TL 0,069 µg/ml olarak hesaplandı.

4.16.5. Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.17.4'te anlatıldığı gibi cevabın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi yardımı ile ilgili 3-2 nolu formül kullanılarak, MTL 0,229 9 µg/ml olarak hesaplandı.

4.16.6. Örneklerin Stabilitesi

PDC-ADA'nın ekstraksiyon işlemi ve analiz süresince stabil kaldığını doğrulamak için yapılan çalışmalarda (ACN/THF) (60:40) ortamında hazırlanan örneklerin stabil olduğu doğrulandı. Ekstraksiyon ortamında hazırlanan örnek çözeltisinin HPLC analizlerinde 3 günün sonunda açığa çıkan serbest adapalen pikinin olmadığı saptandı.

PDC-ADA ile hazırlanan örnek çözeltiilerde ise 0., 24. ve 72. saatte yapılan HPLC analizleri ile elde edilen stabilite bulguları Tablo 4.71'de verilmiştir.

Tablo 4-71: PDC-ADA'nın ekstraksiyon ortamında hazırlanan örnek çözeltilerine ait stabilite bulguları (n=3)

Zaman (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Alan	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
0.		1053			
24.	1	1021	1049,7	27,2	2,3
72.		1075			

4.17. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından *In Vitro* Salımı Çalışmalarına Ait Bulgular

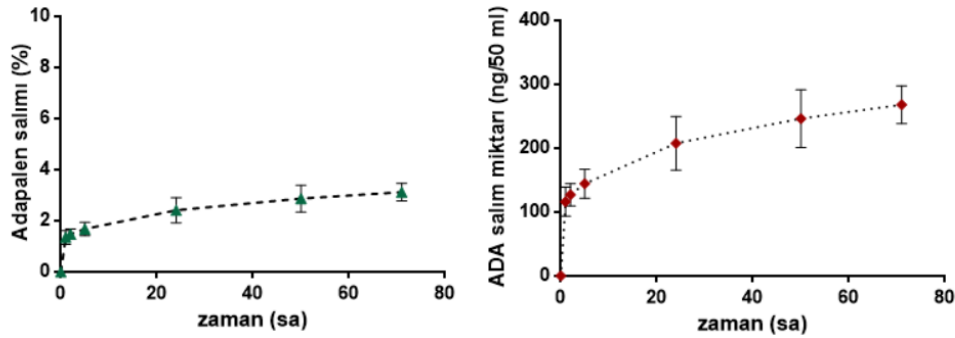
4.17.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan *In Vitro* Salım Çalışmaları

Çözünürlük çalışması sonuçları göz önünde bulundurularak, *in vitro* salım çalışmalarında reseptör fazda adapalenin yeterince çözünmesi ve sink koşulun sağlanması için salım ortamı olarak pH 5,5 PBS (%1,75 a/h Tween 80) kullanılması uygun bulundu. pH 5,5 PBS'te yapılan *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan HPLC miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarına ait sonuçlar Bulgular 4.2'de verilmiştir.

Kontrol olarak, serbest adapalen içeren örneklerde diyaliz membran ile yapılan *in vitro* salım çalışmasında 71. saatte %76,4±1,8 oranında adapalenin reseptör ortama geçtiği saptandı. Yöntem 3.2.18.1'de belirtildiği gibi yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait bulgular Tablo 4.72'de ve salım profilini gösteren ilgili grafik Şekil 4.52'de verilmiştir.

Tablo 4-72: PDC-ADA yapısından % salınan kümülatif adapalen miktarları ile 50 ml reseptör ortamında saptanan salınmış adapalen miktarları bulguları (n=3)

Zaman (saat)	Kümülatif adapalen konsantrasyonu (%)	SD ($\pm$)	Kümülatif adapalen miktarı (ng/50 ml)	SD ($\pm$)
1	1,35	0,27	116,3	22,9
2	1,48	0,20	127,1	17,5
5	1,68	0,26	144,5	22,6
24	2,41	0,49	207,7	42,0
50	2,87	0,53	246,4	45,2
71	3,12	0,34	268,1	29,6

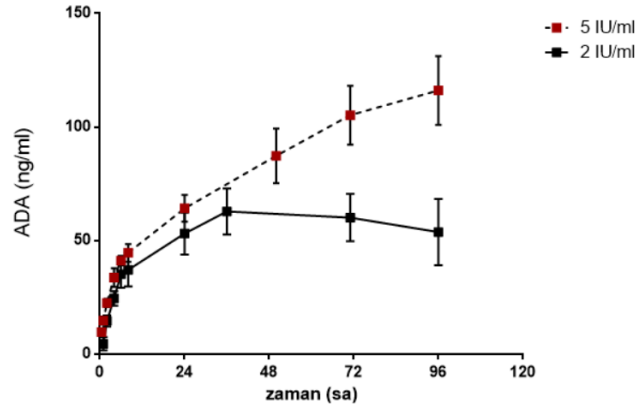


Şekil 4-52: PDC-ADA yapısından adapalenin pH 5,5 PBS ortamında (%1,75 Tween 80) *in vitro* salım profili

4.17.2. Esteraz içeren Ortamda In Vitro Salımı Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.18.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen çalışmalarda soğuk ACN/DMF (60:40) (h/h) organik çözücü karışımının salım ortamından alınan örneklerin üzerine ilavesi ile enzim aktivitesinin sonlandırılması işleminin etkinliği değerlendirildi. Enzim aktivitesi sonlandırılmış örnekte derhal ve 1 saat sonra tekrar yapılan HPLC analizleri ile elde edilen alan değerleri karşılaştırıldığında bir değişiklik olmadığı görüldü; böylece enzim aktivitesini sonlandırmak için ilave edilen organik çözücü miktarının yeterli olduğu doğrulandı. Enzim ortamında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından enzimatik hidroliz mekanizması ile

adapalenin serbestleşmesi incelendi. Sentezlenen ADA-PDC konjugatından *in vitro* koşullarda PLE içeren salım ortamında adapalenin serbestleşmesini gösteren grafik Şekil 4.53'te verilmiştir.



Şekil 4-53: 2 ve 5 IU/ml PLE ortamında PDC-ADA yapısından enzimatik hidroliz ile adapalenin serbestleşmesi

4.18. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

In vitro deriden penetrasyon çalışmaları sonunda 24 saatlik maruziyet süresi sonunda donörde emilmeden kalan PDC-ADA yapısını tespit etmek için deri yüzeyi 1 ml PBS ile yıkanarak bu örneklerde ayrıca HPLC analizi yapıldı. Deri yüzeyinde 24 saat temas süresi içerisinde konjugat yapısının bozulmadığı, donörde adapalen pikine rastlanmadığı tespit edildi.

4.18.1. Adapalenin *In Vitro* Deriden Penetrasyonunun *Punch* Biyopsi Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında; 24 saat sonunda reseptör fazdan alınan örneklerde yöntem 3.2.13.6'da anlatıldığı gibi yapılan işlemlerin ardından gerçekleştiren HPLC analizlerinde adapalen konsantrasyonunun TL değerinin altında kaldığı saptandı. Bu bulgu ile, etken maddenin deri tabakalarında lokalize ve sistemik dolaşıma geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirlendi.

Karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış PDC-ADA misel nanotaşıyıcıları ve pazarda bulunan ticari preparat ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları sonrasında *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.73'te verilmiştir.

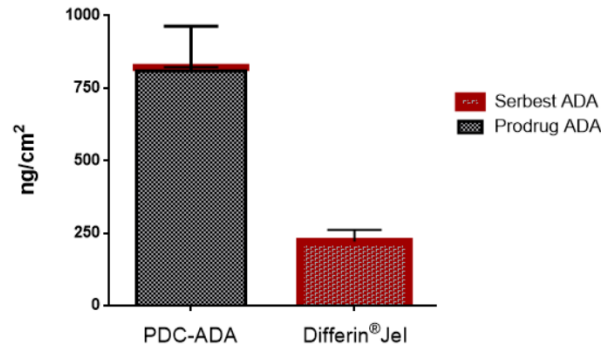
Tablo 4-73: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ve ticari preparattan adapalenin *in vitro* deriden penetrasyonunun incelenmesinde *punch* biyopsi çalışmaları ile elde edilen bulgular (n=4)

Formülasyon kodu	KF-Poz (PSU+) (ng/7,85 mm ^{2#})	KF-Neg (PSU-) (ng/7,85 mm ^{2#})	Kalan deri (ng/cm ²)	Deriye geçen miktar (ng/cm ²)	FHF*
PDC-ADA (serbest ada)	-	-	11,3±1,7	11,3±1,7	-
PDC-ADA (bağlı ada)	63,1±8,1	24,9±5,5	721,5±123,7	809,5±154,4	2,6±0,24
PDC-ADA (toplam ada)	63,1±8,1	24,9±5,5	732,8±144,4	820,3±155,3	2,6±0,24
Differin®Jel	11,4±2,9	5,3±1,5	207,2±37,5	220,4±41,2	2,2±0,1

#7,85 mm²=10*biyopsi alanı

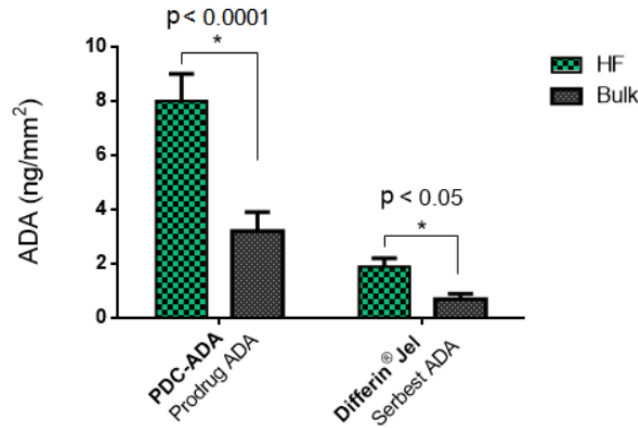
*FHF: Foliküler Hedefleme Faktörü (KF-Poz/KF-Neg)

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından ve pazarda bulunan ticari preparatından deriye geçen serbest ve PDC-ADA yapısında bağlı halde (prodrug) bulunan adapalen miktarları ile kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen (prodrug/ön ilaç) miktarlarını gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.54 ve Şekil 4.55'te gösterilmektedir.



Şekil 4-54: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından ve ticari preparattan deriye geçen serbest ve PDC-ADA yapısında bağlı halde (prodrug) bulunan adapalen miktarları (n=4)

Unpaired t test (deride tespit edilen, serbest+bağlı, toplam adapalen miktarlarının karşılaştırılması): Differin®Jel vs. PDC-ADA * $p < 0,05$



Şekil 4-55: PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından ve ticari preparattan kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları (n=4)

Holm-Sidak metodu ile multiple t test (KF-Poz ve KF-Neg bulgularının karşılaştırılması): PDC-ADA * $p < 0,0001$; Differin®Jel * $p < 0,05$

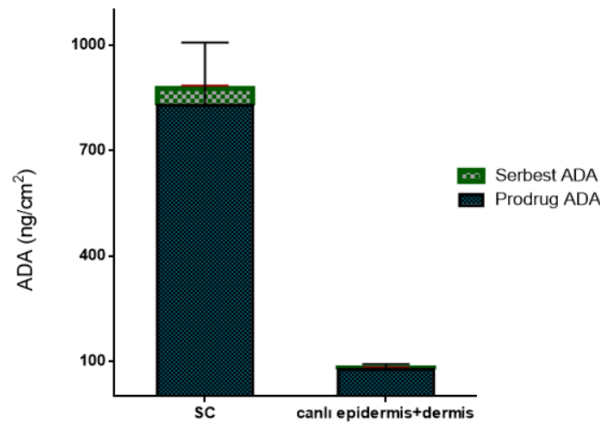
4.18.2. Adapalenin *In Vitro* Deriden Penetrasyonunun Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.19.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak deriye geçen PDC-ADA ile birlikte deride serbestleşen adapalenin deriye penetrasyonunun ve *stratum corneum*’daki birikiminin bantla soyma yöntemi ile değerlendirilmesine ait sonuçlar Tablo 4.74’te verilmiştir.

Stratum corneum (SC) ve canlı *epidermis/dermis* tabakalarında serbest ve bağlı (prodrug) halde bulunan adapalen miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.56'da gösterilmektedir.

Tablo 4-74: Bantla soyma yöntemi kullanılarak deri tabakalarında bulunan serbest ve PDC-ADA yapısında bağlı halde bulunan adapalen miktarları (n=4) (Sonsuz/infinite doz)

	Serbest ADA miktarı (ng/cm ²)	PDC-ADA yapısında bağlı ADA miktarı (ng/cm ²)
SC	47,7±8,1	829,2±178,3
Canlı epidermis/ dermis	3,9±1,5	77,1±15,4
Toplam deri	52,4±8,1	939,5±71,5



Şekil 4-56: SC ve canlı *epidermis/dermis* tabakalarında serbest ve bağlı (prodrug) halde bulunan adapalen miktarları (n=4)

5. TARTIŞMA

5.1. Giriş

Dermatolojik hastalıkların topikal tedavisinde ilaç moleküllerinin doğrudan hastalığın geliştiği hedef bölgeye uygulanma avantajı yanında, ilacın sistemik yan etki ve komplikasyonlarından da kaçınılmaktadır¹. Topikal tedavide ilaçların oldukça kompleks bir membran olan derinin hedef tabakalarına ulaştırılması tedavi etkinliğinin iyileştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak, derinin en dış tabakası olan *stratum corneum*, mükemmel bir bariyer özelliğine sahip bir yapıda olduğu için organizmaya yabancı maddelerin girişini engellediği gibi, topikal uygulanan ilaç moleküllerinin de derinin daha derin hedef tabakalarına ulaştırılmasında hız kısıtlayıcı özellik gösterebilmektedir. Dolayısı ile, dermatolojik hastalıkların topikal tedavi etkinliğinin kısıtlanmasına da yol açabilmektedir². Bu durum, ilaçların deriden penetrasyonunun artırılması ve derideki hedef tabakalarında lokalizasyonun sağlanmasına yönelik yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Son yıllarda, araştırmacıların oldukça fazla ilgisini çeken nanoteknoloji alanındaki gelişmelere bağlı olarak geliştirilen yenilikçi nanotaşıyıcı sistemler ile ilaçların derinin belirli tabakalarına hedeflendirilmesi de bu stratejilerin arasında yer almaktadır^{3,4}.

Akne, lezyonları kıl folikülleri ve foliküle açılan yağ bezlerinden oluşan *pilosebace* üniteye oluşan ve sık karşılaşılan dermatolojik hastalıklardandır. Aknenin patofizyolojisinin kompleks olduğu ve aslında tam olarak anlaşılamadığı vurgulanmakla birlikte, aknenin oluşumunda kıl folikülündeki patofizyolojik olayların rol aldığı görülmektedir⁸. Bu nedenle, akne tedavisinde önemli bir yer tutan topikal uygulamada ilaçların *pilosebace* üniteye lokalizasyonu ve kıl foliküllerindeki birikimi önem taşımaktadır¹⁸.

Aknenin topikal tedavisinde benzoil peroksit, retinoitler ve antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır²⁴¹. Özellikle, bu ilaçların çoğu ile uzun süreli topikal tedavide sıklıkla görülen yanma, soyulma, eritem, kuruluk, ışığa duyarlılık gibi kütanöz yan etkiler hasta uyuncunu olumsuz etkilemektedir^{238,245}.

Adapalen, üçüncü kuşak bir retinoit türevidir ve akne tedavisinde topikal kullanılan retinolün (vitamin A) sentetik bir analogudur²⁵⁹. Adapalenin, nükleer transkripsiyon faktörü olarak görev yapan retinoik asit reseptörlerine (RAR β ve RAR γ) seçici bağlanarak insan keratinositlerinde gen transaktivasyonu ile gen ekspresyonunun

düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Böylece, foliküler keratinizasyonu değiştiren genlerin ekspresyonunu etkileyerek akne lezyonlarının oluşumuna giden süreçte mikrokomedon gelişiminden sorumlu keratinosit hiperproliferasyonunu önleyerek, bu hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını kontrol ettiği düşünülmektedir. Adapalenin komedolitik etkisi, keratinosit hiperproliferasyonunu ve farklılaşmasını normalleştirme yeteneğine bağlanmaktadır^{32,20}. Ayrıca anti-enflamatuar etkisinin bulunduğu da gösterilmiştir³⁴.

Adapalenin orijinal topikal ürünü Differin®Jel (%0,1) (*Galderma Labs L.P.*) isimli orijinal farmasötik ürün, 12 ve üstü yaş hastalarda akne vulgarisin tedavisi için reçeteli bir ürün olarak akne tedavisinde kullanılmak üzere ilk kez 1996 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (*U.S. Food and Drug Administration: FDA*) tarafından onaylanmıştır²⁶⁰. Adapalenin Differin® ismiyle ayrıca; %0,1'lik solüsyon²⁶¹, %0,1'lik krem²⁶² ve %0,3'lük²⁶³ jel formları da aynı şekilde FDA tarafından farklı yıllarda onay almıştır. Avrupa'da orijinal ürün olarak %0,1 adapalen içeren krem ve jel formu kullanıma sunulmaktadır. Dünya ilaç pazarında halihazırda farklı firmaların ürettiği krem, jel, losyon ve solüsyon dozaj şekilleri mevcuttur³⁵.

Topikal adapalen tedavisinde, “retinoit reaksiyonu” olarak bilinen ve doza bağlı olarak uygulama bölgesinde gözlenen eritem, kuruluk, kaşıntı, yanma hissi ve soyulma ile karakterize olan advers etkilerle karşılaşmaktadır. Bu reaksiyon adapalen molekülünün kimyasal yapısında polar kısmı oluşturan karboksilik asit grubunun varlığına bağlanmaktadır³⁶. Fizikokimyasal özellikleri (412,52 g/mol; pKa:4,23; logP:8,04) nedeni ile suda çözünürlüğü çok düşük ve son derece lipofilik bir molekül³⁷ olan adapalenin perkütan penetrasyon kabiliyetinin zayıf olduğu literatürde vurgulanmaktadır. Aşırı lipofilik karakteri, topikal uygulanmasının ardından *stratum corneum*'un üst kısımlarında birikmesine ve daha alt tabakalara geçişinin sınırlandırılmasına neden olmaktadır³⁷⁻³⁹. Bu şekilde lipofilik özelliği yüksek ilaçların *stratum corneum*'da lokalize olmakta ve *stratum corneum* bariyerini aşarak canlı *epidermis* ve *dermis* tabakalarına geçmeleri çok uzun sürebilmektedir³⁶⁸⁻³⁷¹.

Adapalenin suda çözünürlüğünün çok düşük olması topikal formülasyonlarının geliştirilmesini de zorlaştırmaktadır. Konvansiyonel preparatlarının deriye uygulanması ile ortaya çıkan yan etkileri adapalenin topikal uygulanmasını kısıtlayabilmektedir. Ticari preparatların formülasyonlarında, adapaleninin sudaki güç çözünürlüğünün üstesinden

gelmek üzere, propilen glikol, fenoksietanol gibi bazı alkollere ve sürfaktanlara yer verilmektedir. Bu ekşiipyanların *stratum corneum* ile etkileşime girerek deride iritasyona sebep olabildiği ileri sürülmektedir^{16,40}. Uzun süreli ve sabır isteyen bir süreci gerekli kılan akne tedavisinde; topikal uygulanan etken maddenin haftalar sürececek sürekli kullanımı söz konusu olduğundan bu süreçte ortaya çıkacak iritasyon hasta uyuncunu önemli ölçüde azaltmaktadır^{41,42}.

Adapalenin topikal tedavisinin etkinliğinin arttırılması için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; özellikle ilacın derideki hedef bölgelere ulaşmasını sağlanması ve yan etkilerin en aza indirilmesi açısından önem taşımaktadır. Adapalenin sulu bir dispersiyon ortamında dağıtılmak üzere koloidal taşıyıcı sisteme yüklenmesi ile; çözünürlük arttırıcı olarak formülasyona dahil edilen alkollerin ve sürfaktanların kullanımının ortadan kaldırılabilceği ya da en aza indirilebileceği, böylece taşıyıcıya bağlı deri iritasyonunun azaltılabileceği önerilmektedir^{16,19}.

Topikal tedavi için sıklıkla araştırılan ilaç taşıyıcı sistemlerden olan mikropartiküller stabil oldukları ve etken maddeleri kontrollü şekilde saldıkları için tercih edilmektedirler⁸. Literatürde, ilaç konsantrasyonuna ve taşıyıcıya bağlı iritasyona çözüm olarak adapalenin mikropartiküler sistemlere yüklenmesi düşünülmüştür. Böylece yüksek dozda etken maddenin uygulama bölgesinde hızla salımını önlemek, kontrollü veya uzatılmış salım sağlayarak yan etkilerin azaltılması hedeflenmiştir^{37,258,273}. Adapalenin iritasyon yan etkisine çözüm olarak nanopartiküllerin kullanılması da alternatif bir yaklaşım olarak ele alınmaktadır^{16,17,372}.

Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin ilaç moleküllerinin farmakokinetik özelliklerinin iyileştirilmesi, fiziksel, kimyasal veya biyolojik bozunmadan korunması, dokulara hedeflendirilmesi ve kontrollü salımı, özellikle hidrofobik moleküllerin çözündürülmesi ve biyoyararlanımlarının arttırılması gibi pekçok avantajı bilinmektedir³⁷³. Nanotaşıyıcıların deriye topikal uygulanmasının da benzer şekilde avantajları yanında, ilaç moleküllerinin derinin belirli tabakalarına hedeflendirilmesi ve hedef bölgede uzun süreli/kontrollü ilaç salımı sağlaması açısından da üstünlüğü vurgulanmaktadır^{374,375}. Ayrıca, nanopartiküler sistemlerin deriden sistemik dolaşıma ilaç geçişini arttırmadan deride kalış süresini uzattığı da kanıtlanmıştır^{5,6}.

Nanopartiküllerin kıl foliküllerine hedeflendirilebileceği de gösterilmiştir⁹⁻¹⁷. Dermatolojik tedavi için foliküler yolağın olağanüstü bir fırsat sağlayacağı

düşünülmektedir⁸. Kıl folikülleri, topikal olarak uygulanan ilaçlar için rezervuar görevi görmesi sebebiyle umut vaatetmektedir⁷. Özellikle, akne gibi foliküler bölge ile ilişkili dermatolojik hastalıkların tedavisinde nanopartiküler sistemler ile uygulanan ilaçların hedef bölge olarak kabul edilen kıl foliküllerinde³⁷ lokalizasyonu ile tedavinin iyileştirilmesi, daha düşük doz ile hedef konsantrasyonun sağlanması ve kontrollü/uzatılmış salım ile ilaca bağlı yan etkilerin azaltılmasına bağlı olarak hasta uyuncunun arttırılmasının mümkün olabileceği vurgulanmaktadır.

İlaç moleküllerinin özellikle kıl foliküllerine hedeflendirilme açısından potansiyel topikal taşıyıcı olarak mikropartiküllere göre nanopartiküler daha üstün olabileceği öngörülmektedir. Zira, yapılan son çalışmalarda, kütanöz uzantılar (kıl folikülleri, ter kanalları) yoluyla mikropartiküllerin deriden penetrasyonunun, boyutları ile orantılı olarak sınırlanabileceği gösterilmiştir. Bu kapsamda 10 µm'den büyük partiküllerin foliküler açıklıktan penetre olamadığı, 9-10 µm arasındaki boyutta partiküllerin penetrasyon olmaksızın folikül açıklığı etrafında konsantre oldukları, 7 µm boyutunda partiküllere foliküler hatta biraz daha derin bölgelerde rastlandığı, 3-5 µm boyutunda partiküllerin foliküler hatta daha yüksek konsantrasyona ulaştığı gösterilmiştir^{39,376}.

Aknenin topikal tedavisine yönelik nanotaşıyıcı sistemler üzerine son yıllarda pek çok araştırma yapılmaktadır. Akne tedavisinde kullanılan ilaçların penetrasyonunun iyileştirilerek yüksek topikal biyoyararlanım sağlanması ile tedavi etkinliğinin arttırılması, derideki hedef bölgede lokalizasyonlarının sağlanması, yan etkilerinin azaltılması, stabilitelerinin arttırılması ve kontrollü salımı amaçlanmaktadır²⁰⁻³⁰. Nanotaşıyıcı sistemler ile akne tedavisinde kullanılan topikal retinoidlerin güneş ışığına duyarlılık, iritasyon, eritem gibi advers etkilerinin azaltılması, hasta uyuncunun arttırılması da söz konusudur^{34,42}.

Adapalenin literatürdeki yenilikçi topikal formülasyon yaklaşımları arasında mikroemülsiyonlar⁴³ ve katı lipid nanopartiküller^{44,67}, nanokapsüller⁴⁵, aside duyarlı polimerik nanotaşıyıcılar¹⁶, polimerik misel nanotaşıyıcıları¹⁷, lipozomlar⁴⁶ bulunmaktadır. Adapalenin PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanması ve formülasyon optimizasyonuna yönelik bildiğimiz kadarıyla literatürde kayıtlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Dendritik polimerler, özgün şekilde tasarlanabilen çok fonksiyonlu nano boyutlu taşıyıcı sistemler olarak biyomedikal uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir⁴⁷.

Dendritik, yani ağaç benzeri⁴⁸ çok dallı, polimerler grubunda yer alan dendrimerler, lineer polimerlere göre daha yeni, çok sayıda dala ve belli moleküler ağırlığa sahip monodispers yapıda polimerik nanopartiküllerdir.

Dendrimerler, merkezde bir çekirdek kısmı ile fonksiyonel yüzey grupları bulunan üç boyutlu dallanmış dendritik yapılardır. Başlıca avantajları arasında; yüzeylerinde bulunan çok sayıda fonksiyonel grupların kontrol edilebilir olması, yüzey gruplarının yapısına bağlı olarak membran lipitleri ile etkileşme ve permeasyon artırıcı özellik gösterme potansiyellerinin bulunması sıralanabilir⁴⁹⁻⁵². Yüzeyinde polar gruplar taşıyan dendrimerlerin, özellikle hidrofobik ilaçların sudaki çözünürlüklerini arttırdıkları, ayrıca dayanıklı olmayan ilaç moleküllerinin kimyasal stabilitesini de iyileştirdikleri gösterilmektedir. Aynı zamanda, hidrofilik dış kabuk ve hidrofobik bir iç boşluğa sahip bu yapıların penetrasyon artırıcı özelliğinin de bulunduğu vurgulanmaktadır⁵³⁻⁶⁰. Amin yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimerlerin sahip oldukları pozitif yüklü terminal grupları ve negatif yüklü hücre membranları arasındaki etkileşim ile hem epidermal hem de dermal tabakalarda etkin şekilde biriktiği gösterilmiştir ve topikal tedavide potansiyel nanotaşıyıcılar olabilecekleri belirtilmektedir^{55,61}.

Dendronlar ise, dendrimerlerin yapısal bileşeni olarak tanımlanmaktadır. Dendron yapıları kullanılarak, dendrimerlerde bulunan çok sayıda yüzey fonksiyonel grubuna sahip olma özelliklerini^{47,313} barındıran çok çeşitli ve özgün polimerik taşıyıcı sistemler hazırlanabilir. Özellikle, amfifilik özellikte dendron temelli blok kopolimerlerin tasarımı ile kendiliğinden oluşan misel sistemlerinin hazırlanabilen nanotaşıyıcılardandır^{47,62-65}. Örneğin, dendritik yapıların lineer blok kopolimerlerle hibridizasyonu sonucu, amfifilik PEG'lenmiş dendron temelli kopolimerlerin (PDC) hazırlanması ile sulu ortamda oluşan misellerin çekirdek kısmında hidrofobik moleküllerin etkin bir şekilde enkapsülasyonu sağlanabilir. Dendron temelli misellerin düşük kritik misel konsantrasyonları^{313,314} hidrofobik ilaçlarla termodinamik açıdan kararlı taşıyıcı sistemler hazırlanmasını mümkün kılmaktadır⁶². Özellikle, polyester yapısında biyoparçalanabilir dendritik sistemlerle hazırlanan polimer-dendron konjugatları, sahip oldukları hidrolizle parçalanabilen ester yapısı nedeniyle biyouyumlu ve biyoparçalanabilir taşıyıcı sistemler olarak birçok biyomedikal uygulama alanında kullanılabilir³¹⁵⁻³¹⁷.

Aknenin topikal tedavisinde etken maddenin uygulandığı dozaj formu (krem, jel, losyon veya çözelti) da önemlidir. Krem formundaki preparatlar, kurutmayan ve tahriş

etmeyen bir formülasyona ihtiyaç duyan hassas veya kuru ciltler için uygun kabul edilirken³⁷⁷, akneye meyilli ve yağlı ciltler için ise topikal uygulamada su bazlı ürünler önerilir³⁷⁸. Örneğin su bazlı jeller daha az iritan olduğu için tahrişe ve yanmaya neden olabilen hidroalkolik preparatlara göre daha fazla tercih edilmektedir^{379,380}. Pazarda onaylı akne prepratlarının da su bazlı jel taşıyıcı sistemleri ile hazırlandığı görülmektedir. Su bazlı jeller özellikle lipofilik etken maddelerin deriden penetrasyonunu artırma, yüksek oranda su içeriği, kozmetik kabul edilebilirlik, uygulama kolaylığı gibi avantajlar sunar³⁸¹.

Bu doktora tez çalışması kapsamında; akne tedavisine yönelik adapalen etken maddesi yüklü yenilikçi dendritik nanotaşıyıcı sistemlerin optimizasyonu ve karakterizasyonu ile bu nanotaşıyıcıları içeren topikal jel formülasyonlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu çalışmaları yürütüldü.

Adapalenin enkapsülasyon tekniği ile yüklendiği PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcıların optimizasyon çalışmalarında; partikül boyutu ve dağılımı analizleri ile seçilen nanotaşıyıcıların; fiziksel stabilitesi, zeta potansiyel analizi, ilaç yükleme oranı ve yükleme etkinliği ve TEM analizleri yapılarak optimize edilen dendritik nanotaşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu gerçekleştirildi. PAMAM (G2) dendrimerler ile hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlerde kompleks oluşumunu değerlendirmek için ayrıca FTIR analizleri yapıldı.

In vitro koşullarda topikal uygulama sonrasında dendritik nanotaşıyıcı sistemlerden adapalenin derideki lokalizasyonu, penetrasyon derinliği ve kıl folikülerindeki birikimin değerlendirilmesi için FITC ile işaretlenen PAMAM dendrimerler ve NK yüklenen dendron temelli miseller ile CLSM tekniği kullanılarak görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi.

Hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlerin topikal uygulamaya yönelik konvansiyonel bir formülasyon ile kombine edilmesi düşünüldüğü için, karakterizasyon bulgularına göre seçilen adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcı sistemleri (adapalen yüklü PAMAM dendrimerler ve adapalen yüklü dendron temelli miseller) içeren jel formülasyonları hazırlandı. Hazırlanan topikal formülasyonların reolojik özellikleri incelenerek viskozite, yayılabilirlik özellikleri ile pH değerleri belirlendi.

Adapalenin deriye penetrasyonun ve kıl folikülerinde birikiminin değerlendirilmesi için; adapalen yüklü PAMAM dendrimer ve dendron temelli miseller

(sulu koloidal dispersiyon halinde) ve ayrıca bunların jel formülasyonları ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarında geliştirilen formülasyonların performansı pazarda bulunan ticari orijinal ürün ile (Differin®Jel) karşılaştırıldı. Bu amaçla *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben deri örneklerindeki adapalenin kantitatif olarak foliküler birikimini değerlendirmek üzere *punch* biyopsi veya *stratum corneum*'daki konsantrasyon profilini belirlemek üzere bantla soyma işlemi yapıldı.

Tez çalışması kapsamında ayrıca; adapalenin dendron temelli yapılara kovalan konjugasyon yolu ile bağlandığı dendritik konjugat yapılarının sentezlenmesi düşünüldü. Sentez ve karakterizasyon çalışmaları Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirilen PDC-ADA konjugatları ile hazırlanan misel formülasyonlarının partikül boyutu ve polidispersite indeksi ile zeta potansiyel değerleri belirlendi. Hazırlanan PDC-ADA yapısından adapalen salımını değerlendirmek üzere, diyaliz membran kullanılarak, pH 5,5 PBS ortamında ve ayrıca derideki enzimatik aktiviteyi taklit etmek için PLE ilave edilen pH 7,4 PBS ortamında *in vitro* salım çalışmaları yapıldı. PDC-ADA yapısı ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarının derideki lokalizasyonu değerlendirilmesine yönelik *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı, deriye geçen PDC-ADA ve PDC-ADA yapısından serbestleşen adapalen miktarları kantitatif olarak tayin edildi. Foliküler birikimin saptanması için *punch* biyopsi tekniği kullanıldı. Kıl foliküllerinde birikimini kontrol olarak pazarda bulunan ticari orijinal ürün ile (Differin®Jel) karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. PDC-ADA ve PDC-ADA yapısından serbestleşen etken maddenin *stratum corneum* ve canlı *epidermis/dermis*'teki konsantrasyonunu bantla soyma tekniği ile incelendi.

5.2. Adapalenin Miktar Tayini Yöntemi Validasyonunun Değerlendirilmesi

Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan örneklerdeki adapalen (ADA) içeriğinin kantitatif analizinde kullanılmak üzere, literatürde kayıtlı³⁷ yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yönteminin üzerinde geliştirme ve optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Adapalenin farklı ortamlardaki çözünürlüğünün belirlenmesinde, PAMAM dendrimer ve polyester dendron-polimer konjugatları (PDC) ile hazırlanan adapalen yüklü nanotaşıyıcı sistemlerde bulunan etken madde miktarı ile yükleme etkinliği ve yükleme oranlarının saptanmasında, etken maddenin derideki birikiminin değerlendirilmesine yönelik yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında

örneklerde bulunan adapalenin miktar tayini için, literatürde kayıtlı³⁷ HPLC yöntemi üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Optimize edilen yöntemin validasyon çalışmaları kapsamında ICH kılavuzları doğrultusunda, seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, teşhis limiti ve miktar tayini limiti tespiti için gereken analizler yapıldı³⁴².

Optimize edilen HPLC yöntemi ayrıca; dendron temelli nanotaşıyıcılarda kovalan bağlı bulunan adapalenin (PDC-ADA) *in vitro* koşullarda salımının değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* salım çalışmalarda adapalenin miktar tayini için kullanıldı. *In vitro* salım çalışmaları sırasında sink koşulu sağlayacak şekilde seçilen reseptör ortamında, pH:5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi, hazırlanan standartlarla validasyon çalışmaları tekrarlandı³⁴².

Adapalenin ekstraksiyonu için kullanılan ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücüsü ile hazırlanan standartların kullanıldığı seçicilik çalışmalarında; *in vitro* deriden penetrasyon deneyleri sırasında kullanılan domuz derisi ve bantların; ayrıca formülasyon bileşenleri, mobil faz ve çözünme ortamının adapalenin alıkonma zamanında girişim yapmadığı doğrulandı. Doğrusallık çalışmalarında elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 4.4) ait doğru denkleminin ($r^2 = 0,9999$) miktar tayininde kullanılabileceği saptandı. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları ile yöntemin kesinliği gösterildi (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Doğruluk çalışmasında formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeleri, PAMAM dendrimer ya da PDC, içeren örneklerde adapalenin %99-105 oranında geri kazanıldığı tespit edildi (Tablo 4.7). ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücüsü ile hazırlanan standart çözeltiler için adapalenin teşhis limiti 0,4 ng/ml; miktar tayini limiti 1,2 ng/ml olarak belirlendi. Adapalenin ACN/DMF (60:40) (h/h) çözücü karışımında hazırlanan standart çözeltilerinde karanlıkta, oda koşullarında ya da pencere önünde gün ışığına maruz bırakılacak şekilde üç farklı ortamda 5 gün stabilitesini koruduğu saptandı (Tablo 4.8).

In vitro salım çalışmalarında kullanılan reseptör ortamı olan pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi ile hazırlanan standartların kullanıldığı seçicilik çalışmalarında; adapalen piki ile girişim yapan ya da adapalenin alıkonma zamanında gelen çözücü sistemden kaynaklı herhangi bir pik olmadığı doğrulandı. Doğrusallık çalışmalarında elde edilen kalibrasyon eğrisine (Şekil 4.5) ait doğru denkleminin ($r^2 = 0,9999$) miktar tayininde kullanılabileceği saptandı. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları ile i ile yöntemin kesinliği gösterildi (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Adapalenin teşhis limiti 2,4 ng/ml; miktar tayini limiti 7,3 ng/ml olarak belirlendi. Adapalenin reseptör ortamında (pH:5,5

PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi) hazırlanan standart çözeltilerinde 72 saat süre stabilitesini koruduğu saptandı (Tablo 4.9).

Bu bulgular ile, optimize edilen analitik yöntemlerin ilgili ICH kılavuzunda³⁴² belirtilen validasyon kriterlerini karşıladığı gösterilerek, çalışmamızda hazırlanan örneklerdeki adapalen analizi için kullanılabileceğine karar verildi.

5.3. Adapalenin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Değerlendirilmesi

In vitro salım çalışmalarında kullanılacak reseptör fazın belirlenmesi için, *sink* koşulun (sonsuz seyrelme) sağlandığı uygun çözünme ortamını seçmek üzere adapalenin farklı ortamlarındaki çözünürlüğü saptandı (Tablo 4.10). Elde edilen bulgulara göre, denenen çözücüler arasında en yüksek çözünürlüğü; pH 5,5 PBS-Etanol (50:50) (h/h) karışımı sağladı. Ancak, dendron temelli nanotaşıyıcılarda kovalan bağlı adapalenin (PDC-ADA) *in vitro* koşullarda salım ortamında transesterifikasyon sonucu serbestleşmesini, bir başka deyişle PDC-ADA yapısındaki ester bağının salım ortamındaki etanole bağlı olarak kopmasını (transesterifikasyon³⁸²⁻³⁸⁴) önlenmesi gerektiğine karar verildi. Bu nedenle, PDC-ADA yapısından adapalenin pH'ya bağlı salımının değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda reseptör faz olarak kullanmak üzere *sink* koşulu da sağlayan (Tablo 4.10) pH 5,5 PBS (%1,75 Tween 80, a/h) çözeltisi kullanıldı.

5.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcılarının Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının optimizasyon çalışmaları kapsamında; öncelikle etken madde yüklenmeyen dendrimerlerin partikül boyutu karakterizasyonunu yapıldı. Kendi dispersiyon ortamı olarak metanol (MetOH) içinde temin edilen G2-PAMAM-NH₂ dendrimerlerin herhangi bir filtrasyon işlemi uygulanmadan partikül boyutu ölçümleri gerçekleştirildiğinde, dendrimerlerin agregat oluşturma eğiliminde olduğu görüldü (2000-3000 nm; PDI:1). Örneklerin membran filtreden süzülmesi ile G2-PAMAM-NH₂ partikül boyutu ve dağılımının uygun olduğu (12,3±4,0 nm; PDI: 0,31±0,05) saptandı (Tablo 4.11). Etken madde yüklenmeden PAMAM-G2-NH₂ dendrimerlerin saf sudaki (%0,1) boyutları DLS tekniği kullanılarak ölçüldüğünde; birkaç yüz nanometre boyutunda agregatlar oluşturduğu görüldü (Tablo 4.12). Düşük ışık şiddeti yoğunluğunda sinyal veren tek başına (agregat oluşturmayan) yaklaşık 2,6 nm boyutunda dendrimer molekülleri ile birlikte, dendrimerlerin bir araya gelerek oluşturduğu agregatların (379,7±92,2 nm; PDI: 0,51±0,1) olduğunu gösteren pikler elde edildi. Benzer şekilde

literatürde; pH 6,5'de saf tamponlanmamış suda PAMAM-NH₂ dendrimerlerin (20 µM) partikül boyutu ölçümlerinde, agregatların varlığına işaret eden yaklaşık 200 nm'lik boyutları (212 ± 37 nm) gösteren tek bir pik ile beraber yüzde değeri düşük bir ışık şiddeti sinyali veren yaklaşık 2,9 nm boyutundaki moleküllere ait piklerin gözlemlendiği, bu sinyallerin örneklerde bulunan birbirinden ayrı (agregat oluşturmayan) dendrimer moleküllerine ait olduğu bildirilmiştir³⁸⁵. Bir başka çalışmada da; G3 PAMAM-NH₂ dendrimerlerin (10 µM) birkaç yüz nanometre (486 ± 68 nm) boyutunda agregatlar oluşturduğu gözlemlenmiştir³⁸⁶. PAMAM-OH (3., 4. ve 5. jenerasyon) dendrimerlerin (14,4-144 µM) partikül boyutu ölçümlerinde yüksek polidispersite gözlemlendiği ve örnek konsantrasyonundan bağımsız olarak, 20 ile 500 nm arasında çapa sahip agregatların bulunduğu ifade edilmiştir³⁸⁷. Elde edilen sonuçların literatürde bildirilen bulgular ile uyumlu olduğu saptandı.

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik çalışmalarda; adapalene ait karboksilli asit grubu (-COOH) ve PAMAM dendrimerlere (G2-PAMAM-NH₂) ait amin gruplarından kaynaklı kimyasal etkileşim öngörülerek PAMAM-ADA komplekslerinin oluşturulması amacıyla çalışmalar yürütüldü. Literatürde bu şekilde elektrostatik etkileşim mekanizmasına bağlı PAMAM dendrimerlerle asidik (-COOH taşıyan) ilaç molekülleri ya da negatif yüklü iyonlarla kompleks oluşturulması kayıtlıdır^{346-348,351,388}. Uygun pH koşullarında pozitif yüklü amin grupları ile negatif yüklü karboksilat iyonları arasında kurulan kovalan olmayan bağlarla ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır³⁴⁷.

PAMAM dendrimerlerin anyon tutma kabiliyetinin pH düştükçe arttığı, yüksek pH'larda ise azaldığı bilinmektedir³⁰⁰. 16 adet yüzey grubu yanı sıra internal tersiyer amin ve internal amit gruplarına sahip olan PAMAM dendrimerlerin pH 10,5'te yapısındaki bütün amin gruplarının iyonize olmayan halde; pH 7,7'de yüzeydeki bütün primer amin gruplarının iyonize, içteki tersiyer amin gruplarının iyonize olmayan halde halde, dolayısıyla nominal yükün 16 olduğu; pH 5,5'te tersiyer amin gruplarının %55'inin iyonize, sonuçta nominal yükün 24 olduğu; pH 3'te ise bütün amin gruplarının iyonize olduğu ifade edilmektedir³⁸⁹. Benzer şekilde PAMAM (G3-G7) dendrimer yüzeyindeki primer amin gruplarının protonlanmasının pH ~7 civarında tamamlandığı, pH ~3 civarında ise çekirdeği oluşturan etilendiamin grubu dışında tüm tersiyer amin gruplarının iyonize hale geçtiği gösterilmiştir³⁹⁰.

“Henderson-Hasselbach” denkleminin^{122,123} göre; adapalenin pKa değeri 4,2³⁷ olduğu için pH’sı en az 6 olan formülasyonlarda %90’ın üzerinde iyonize olacaktır. PAMAM dendrimerlerin nötral ve zayıf asidik koşullarda yüzey amin gruplarının da iyonize halde olması dikkate alınarak, pH 6-7 olduğunda dendrimere ait pozitif yüklü amin grupları ile adapalene ait karboksilat anyonu ($R-COO^-$) arasında elektrostatik etkileşimin olması beklenmektedir.

5.4.1. Adapalenin Dendrimerin Sudaki Çözeltisine Katı Halde İlavesi ile Hazırlanan Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi

Adapalenin PAMAM dendrimere yüklenmesi için yürütülen formülasyon çalışmaları kapsamında, ilk olarak adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine katı halde ilavesi yöntemi ile yükleme çalışmaları yapıldı. Adapalenin doğrudan dendrimer içeren ortamda çözündürüldü. Yapılan ilk çalışmalarda ilacın yüklenme etkinliğini arttırmak için yüksek konsantrasyonlarda PAMAM ile hazırlanan dendrimerin sudaki çözeltilerinde, konsantrasyondan dolayı artan pH’yı (örneğin, PAMAM oranı %0,3’e çıkarıldığında çözelti pH’sının ~ 9 olduğu saptandı) uygun değerlere çekmek için yükleme öncesinde 1 N HCl ile pH (pH 6 ve 7,5) ayarlandı. Ancak, bu koşulda yükleme çalışmalarında adapalenin ortamda çöktüğü gözlemlendi. Adapalenin çökmesinin, pH ayarı için kullanılan HCl’den gelen Cl^- iyonlarının PAMAM dendrimerler tarafından yarışmalı olarak tutulmasına ve adapalen ile etkileşebilecek grupların kapanmasına bağlandı. Amin yüzey grupları olan PAMAM dendrimerlerin sahip olduğu net pozitif yük ile sudaki iyonları bağlamada elektrostatik etkileşim imkanı sunduğu literatürde açıklanmıştır^{300,301}.

Ayrıca, ikinci yöntem olarak adapalenin THF’de çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilavesi ile PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıların hazırlanması için; hidrasyon aşamasında dispersiyon ortamı olarak PBS çözeltisi (pH 7,4) kullanıldığında da aynı şekilde adapalenin çöktüğü gözlemlendi. Adapalenin bu şekilde PBS (pH 7,4) ile hazırlanan formülasyonlarda çökmesi; benzer olarak PBS (pH 7,4)’den gelen farklı iyonların PAMAM dendrimerler tarafından tutulmasına ve adapalen ile etkileşebilecek grupların kapanmasına bağlandı. Çeşitli iyonların PAMAM dendrimerler tarafından tutulması ile iyon çiftlerinin oluşturulabileceği literatürde farklı çalışmalarda gösterilmiştir^{346,391}. Bu sonuçlara göre, adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıların hazırlanmasında ultra saf su (18.2Ω) kullanılmasına karar verildi.

Adapalenin dendrimerin sudaki çözeltisine katı halde ilavesi yöntemi ile yapılan yükleme çalışmalarında da pH ayarı yapılmaksızın ultra saf su kullanılmasına karar verildi. Bu kapsamda; farklı konsantrasyonlarda (%0-0,1) PAMAM dendrimerlerin saf suda hazırlanan çözeltilerine ve ayrıca kontrol olarak yalnızca saf suya aşırı miktarda adapalen ilave edildi (Tablo 3.2). Kontrol olarak, adapalenin PAMAM dendrimer içermeyen saf sudaki çözünürlüğü $0,28 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$ olarak saptandı. Saf su ortamına %0-0,1 konsantrasyon aralığında artan oranda PAMAM ilavesi ile son derece lipofilik³⁵⁰ ve sudaki çözünürlüğü çok düşük olan adapalenin çözünürlüğünde artış olduğu belirlendi. Ancak, bu yöntem ile sisteme yüklenen adapalen miktarının beklenenden daha düşük bulundu (%0,1 (a/h), PAMAM içeren saf suda geri kazanılan adapalen: $7,06 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$) (Tablo 4.13).

5.4.2. Adapalenin Tetrahidrofuranda Çözündürülerek Dendrimerin Metanoldeki Çözeltisine İlavesi ile Hazırlanan Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi

Adapalenin PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına yüklenmesine yönelik ikinci bir yöntem olarak; adapalenin rahat çözünebildiği uçucu bir organik çözücünde, tetrahidrofuranda (THF) çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilave edilmesine karar verildi. Bu yöntemle hazırlanan formülasyonlarda yüklenen adapalen miktarının önceki yöntem ile elde edilenin yaklaşık dört katına çıktığı (%0,1 (a/h) PAMAM içeren PMM 0.1 C kodlu formülasyonda yüklenen adapalen: $28,4 \pm 4,1 \mu\text{g/ml}$) saptandı (Tablo 4.14). İlk yöntemle göre daha başarılı sonuçlar alınsa da ilacın yüklenme oranı beklenen miktarda olmadığına karar verildi.

Adapalenin PAMAM dendrimerlere yükleme çalışmaları sırasında hazırlanan formülasyonların santrifüj edilmeden sonikasyonu yapıldığında; ortalama partikül boyutu ve PDI değerlerinde düzelme olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, tercih edilen partikül boyutu ve dağılımı değerlerine sahip nanotaşıyıcılar elde edilmesi ve aynı zamanda yükleme etkinliğinin de artırılması için sonraki çalışmalarda adapalenin THF’de çözündürülerek dendrimerin metanoldeki çözeltisine ilave edilmesine karar verildi. Bu şekilde hazırlanan ADA-PAMAM dendrimer kompleksini içeren formülasyonlara en son aşamada ultrasonik prob (Branson Sonifier® 250, 3 mm çap) kullanılarak sonikasyon işlemi uygulandı.

5.4.3. Adapalenin PAMAM Dendrimerlere Probu Sonikasyon Yöntemi ile Yüklendiği Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi

Adapalenin PAMAM dendrimerlere probu sonikasyon yöntemi ile yüklenmesi yönteminde; formülasyonda kullanılan PAMAM ve diğer bileşenlerin oranının; hazırlama sırasında uygulanan sonikasyon işleminin prosedürün; başlangıçta ilave edilen adapalen miktarı ile kullanılan çözücü hacimlerinin optimizasyonuna yönelik bir seri çalışma gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan nanotaşıyıcılar partikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel kararlılıkları açısından değerlendirildi.

Diğer yöntemler ile daha önce hazırlanan formülasyonlardaki PAMAM konsantrasyonları dikkate alınarak; üç farklı konsantrasyonda (%0,05-0,2) PAMAM içerecek şekilde PAMAM-ADA kompleksleri hazırlandı ve düşük güçte (OP 1: 10 Watt) kısa süreli sonikasyon uygulandı. Elde edilen komplekslerin partikül boyutunun PAMAM konsantrasyonuna bağlı olarak giderek arttığı görüldü (Tablo 4.15). Bunun üzerine seçilen konsantrasyonda (%0,1) PAMAM içeren formülasyonlara uygulanan sonikasyon gücü sabit tutularak sonikasyon süresi arttırıldı. Sonikasyon uygulama süresindeki artış ile partikül boyutu ve PDI değerlerinde küçülme olduğu saptandı. Toplam 6 dakika OP=1 de uygulanan sonikasyon işlemi ile ortalama 391 ± 26 nm boyutunda (PDI: $0,27 \pm 0,05$) nanotaşıyıcılar elde edildi (Tablo 4.16). Sonikasyon süresi sabit tutularak, güç arttırıldığında (OP 1: 10 Watt'tan OP 2: 25 Watt'a); göreceli olarak daha iyi partikül boyutu ve PDI değerleri elde edilince (Tablo 4.17) sonikasyon yönteminin optimizasyonunun OP=2'de uygulanacak süreyi belirlemek üzere yapılmasına karar verildi. Sonikasyon gücü daha arttırıldığında (OP 3: 40 Watt); formülasyonlarda köpürme tespit edildi ve uygulanan gücün 25 Watt'ı geçmemesi gerektiği sonucuna varıldı. OP=2 için sonikasyon süresi tekrar optimize edildi.

Optimize edilen sonikasyon prosedürü ile hazırlanan PMM 0.1-S kodlu formülasyonda (368 ± 8 nm; PDI: $0,27 \pm 0,01$) yüklenen adapalen miktarı $48,4 \pm 2,6$ µg/ml olarak saptandı (Tablo 4.18). İlerleyen çalışmalarda dispersiyon ortamına farklı yardımcı bileşenler (%1, a/h) kullanılarak hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı incelendiğinde; dispersiyon ortamına PEG 400 ilave edilen PMM 0.1-S-1PEG kodlu formülasyonda partikül boyutu ve PDI değerinin düştüğü görüldü (Tablo 4.19).

Sonikasyon prosedürünün optimizasyonu sağlandıktan sonra, PAMAM dendrimer formülasyonlarında kullanılacak PAMAM konsantrasyonunu tekrar optimize

etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (%0,002-0,1) PAMAM içeren, optimize edilmiş sonikasyon prosedürü ile hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı değerlendirildi. 0,1 mg adapalen yüklenerek hazırlanan formülasyonlarda PAMAM konsantrasyonunun %0,004'e kadar düşürülebileceği görüldü. PMM 0.004-S kodlu formülasyona ait partikül boyutu ve PDI değeri sırasıyla 223 ± 10 nm ve $0,26 \pm 0,02$ olarak saptandı. %0,002 oranında PAMAM ile hazırlanan PMM 0.002-S kodlu formülasyonun partikül boyutu ile beraber özellikle PDI değerindeki artış dikkat çekti (Tablo 4.20). Bu konsantrasyonun ortamdaki adapalen moleküllerinin tamamının enkapsüle edilmesi için yeterli olmadığı saptandı. ADA/PAMAM mol oranı hesaba katıldığında; bu durumun 16 adet yüzey amin grubuna sahip her bir PAMAM dendrimerin bağlayabileceğinden ortamda daha fazla adapalen molekülü olmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı.

Çalışmaların devamında formülasyonlarda kullanılan PAMAM konsantrasyon aralığı daraltıldı. Daha önce elde edilen partikül boyutu ve PDI değerleri ve formülasyonlarda kullanılan ADA/PAMAM mol oranları dikkate alınarak ve adapalen miktarının arttırılacağı göz önünde bulundurularak; öncelikle 3,3 mol oranı ile hazırlanan PMM 0.02-S kodlu formülasyon temel alındı ve kullanılan PAMAM konsantrasyonu (%0,02) sabit tutularak formülasyona ilave edilen adapalen miktarı kademeli olarak arttırıldı. Partikül boyutu ve dağılımı değerleri incelendiğinde; sırasıyla 3,3 ve 16,4 ADA/PMM mol oranları ile PMM 0.02-S ve PMM 0.02-S-A5 kodlu formülasyonların uygun olduğu sonucuna varıldı. PMM 0.02-S-A10 kodlu formülasyonda PDI değeri 0,3'ün üzerine çıkması ortama ilave edilen ADA/PMM mol oranının 32,9 olduğu dikkate alındığında; 16 adet yüzey amin grubuna sahip her bir PAMAM dendrimerin bağlayabileceğinden ortamda daha fazla adapalen molekülü olmasına bağlanarak olağan karşılandı (Tablo 4.21).

Adapalen miktarındaki artışa bağlı olarak artan mol oranları ile birlikte formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri artış gösterince (Tablo 4.21), çalışmaların devamında PMM 0.02-S-A5 kodlu formülasyon baz alınarak ADA/PAMAM mol oranını düşürmek üzere, formülasyon hazırlama sırasında ortama ilave edilen adapalen miktarı (0,5 mg) sabit tutuldu, böylece PAMAM oranının arttırılmasına karar verildi. ADA/PMM mol oranları sırasıyla 16,4 ve 6,6 olan PMM 0.02-S-A5 ve PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyonlar incelendiğinde; 0,5 mg adapalen ilave edilen ortamda PAMAM konsantrasyonunun arttırılması ile ortalama partikül

boyutunda düşüş olduğu gözlemlendi (Tablo 4.22). Bu durumun ADA/PMM mol oranındaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir.

Stabilizan olarak PEG 400 ün formülasyonlar üzerindeki etkisinin daha kapsamlı incelenmesi amacı ile çalışmalar yürütüldü. Seçilen konsantrasyonda PAMAM (%0,05) ile aynı miktarda adapalen (0,5 mg) ve dispersiyon ortamında farklı konsantrasyonlarda PEG 400 kullanılan formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri incelendiğinde; dispersiyon ortamına PEG 400 (%1; a/h) ilave edilen formülasyonların PEG 400 ilave edilmeyenlere göre partikül boyutunun ve özellikle PDI değerinin küçüldüğü dikkat çekmektedir. PEG 400 %1'in üzerine çıkartıldığında ise, formülasyonların partikül boyutunun arttığı görülmüştür (Tablo 4.23). Bunun muhtemel bir sebebinin polar³⁹² ve son derece hidrofilik³⁹³ bir molekül olan PEG 400 zincirlerinin, polar amin yüzey gruplarına sahip PAMAM dendrimer ile etkileşmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Zira, pozitif yüklü amino asitlerin PEG ile etkileşimi bir çalışmada bildirilmiştir³⁹⁴. Başka bir çalışmada özellikle PEG 400'ün sahip olduğu eter oksijen atomları ile amin grubunun etkileşebileceği belirtilmiştir³⁹⁵.

Tablo 4.23'te elde edilen PDI değerleri incelendiğinde; PEG 400'ün seyreltik çözeltilerinde, PEG zincirlerinin PAMAM agregatlarının etrafını sarak formülasyonlarda daha homojen bir boyut dağılımı sağlayabileceği düşünülmektedir. Dispersiyon ortamında PEG 400 konsantrasyonunun arttırılmasının ise PEG zincirlerinin oluşan adapalen yüklü PAMAM dendrimer partikülleri arasında köprüler kurarak, daha büyük agregatların oluşmasına yol açmış olabileceği sonucuna varıldı. Nitekim, Pluronic F127 ile hazırlanan misel formülasyonlarında daha uzun zincirli PEG'ler kullanılarak, misellerin hidrodinamik çapı üzerine PEG'lerin etkisi incelendiğinde; polietilen glikollerin misel koronası ile uyumlu olduğu öne sürülmüş ve seyreltik PEG çözeltilerinde misel koronalarının PEG zincirleri tarafından bir ortam olarak tercih edildiği bildirilmiştir. PEG konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak partikül boyutlarının arttığı bildirilmiş ve konsantre PEG çözeltilerinde misel koronasına olan ilginin PEG zincirleri arasında kurulan köprülerle misellerin kümeleşmesine neden olabileceği yorumu yapılmıştır³⁹⁶. Sonuç olarak, daha homojen bir boyut dağılımına sahip olduğundan bundan sonraki formülasyonlar dispersiyon ortamına PEG 400 (%1) ilave edilerek hazırlandı.

Belirlenen PAMAM konsantrasyonu oranı (%0,05 ve %0,07) sabit tutularak formülasyona ilave edilen adapalen miktarı kademeli olarak arttırıldığında (0,1'den 1 mg'a) elde edilen tüm formülasyonların ortalama partikül boyutu (<300 nm) ve dağılımının ($PDI < 0,3$) kabul edilebilir değerlerde olduğu görüldü (Tablo 4.24 ve Tablo 4.25). PMM 0.05-S-A5, PMM 0.05-S-A7.5 ve PMM 0.05-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 6,6; 9,9 ve 13,2 olan ADA/PMM mol oranları (Tablo 4.24) ve PMM 0.07-S-A5, PMM 0.07-S-A7.5 ve PMM 0.07-S-A10 kodlu formülasyonlar için sırasıyla 4,7; 7 ve 9,4 olan ADA/PMM mol oranları (Tablo 4.25) dikkate alındığında; bu formülasyonlardan beklenildiği gibi başarılı sonuçlar alındı.

Optimizasyon çalışmaları sırasında hazırlama aşamasında kullanılan MetOH/THF oranının elde edilen formülasyonların partikül boyutu ve dağılımını etkilediği farkedildiği için, seçilen formülasyonların oluşturulması için farklı MetOH/THF oranlarının etkisi de incelendi. MetOH/THF oranı 4 olan PMM 0.05-S-A7.5-1PEG kodlu formülasyon (277 ± 17 nm; $PDI: 0,21 \pm 0,02$) ile MetOH/THF oranı 1 olan PMM 0.05-S-A7.5-1:1-1PEG kodlu formülasyonun (325 ± 69 nm; $0,33 \pm 0,09$) partikül boyutu ve dağılımı karşılaştırıldığında; MetOH/THF oranının 4'ten 1'e düşürülmesinin partikül boyutu ve PDI değerlerini olumsuz etkilediği tespit edildi (Tablo 4.26). Bu nedenle, sonraki çalışmalarda, adapalenin metanolde pratikte çözünmediği, metanol/THF karışımında ortamda PAMAM bulunsun bile THF oranı düşürüldüğünde adapalenin çöktüğü göz önünde bulundurularak, en düşük hacimde THF'de çözündürülen adapalenin metanoldeki PAMAM çözeltisine ilave edilirken MetOH/THF oranı mümkün olduğunca yüksek tutulmaya çalışıldı. Seçilen PMM 0.05-S-A10-1PEG kodlu formülasyonda MetOH/THF oranı 1,5 (600/400) kullanıldığından sisteme ilave edilen adapalen miktarının arttırılabildiği ve adapalenin THF'te çözünürlüğü dikkate alınarak, PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyonda MetOH/THF oranı 3'e çıkarıldı. Sonuçta partikül boyutu ve PDI değerlerinde küçülme olduğu tespit edildi (Tablo 4.27). PMM 0.07-S-A10-1PEG ve PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyonlarda da benzer şekilde MetOH/THF oranının 3'e çıkarılması ile partikül boyutu ve PDI değerlerinde küçülme tespit edildi (Tablo 4.28).

5.5. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Stabilité Bulgularının Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilitesini değerlendirmek için, seçilen nanotaşıyıcılar $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı ve belirli zaman aralıklarında örnekler, görsel olarak ve partikül boyutu ve dağılımı açısından incelendi. Altı hafta süre ile izlenen partikül boyutu ve dağılımı bulguları Tablo 4.29-Tablo 4.32'de verilmiştir.

PMM 0.02-S (ADA/PMM=3,3) kodlu formülasyonun partikül boyutu ve dağılımında altıncı hafta sonunda belirgin bir değişme gözlenmezken; PMM 0.02-S-A5 (ADA/PMM=16,4) kodlu formülasyonda dördüncü haftada partikül boyutunda (444 ± 134 nm; PDI: $0,27\pm 0,08$) belirgin bir artış görülmüştür. PMM 0.02-S-A10 (ADA/PMM=32,9) kodlu formülasyonun ise ikinci haftada partikül boyutu belirgin derecede artmıştır (746 ± 109 nm; PDI: $0,31\pm 0,10$) (Tablo 4.29). PMM 0.05-S-A5 (ADA/PMM=6,6) kodlu formülasyonla beraber, aynı formülasyonun %1 ve %3 oranında PEG 400 dispersiyon ortamı ile hazırlananların da (PMM 0.05-S-A5-1PEG ve PMM 0.05-S-A5-3PEG) partikül boyutu ve dağılımı açısından altıncı hafta sonunda stabilitesini koruduğu saptanmıştır. %5 PEG 400 içeren PMM 0.05-S-A5-5PEG kodlu formülasyonun ise ilk dört hafta boyutunun çok fazla değişmediği; fakat altıncı haftada partikül boyutu ve dağılımında artış olduğu görüldü (Tablo 4.30). İlave edilen adapalen miktarının arttırıldığı; dolayısıyla daha yüksek ADA/PMM mol oranına sahip PEG 400 (%1) içeren formülasyonların da (PMM 0.05-S-A7.5-1PEG (ADA/PMM=9,9); PMM 0.05-S-A10-1PEG (ADA/PMM=13,2) ve PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG (ADA/PMM=13,2)) partikül boyutu ve dağılımı açısından altıncı haftada kararlılığını koruduğu görülmüştür. MetOH/THF=1 oranı ile hazırlanan PMM 0.05-S-A7.5-1:1-1PEG kodlu formülasyonun daha ikinci haftada PDI değerinin hızlı artışı ($0,49\pm 0,28$) kararlı kalmadığını göstermektedir. PMM 0.05-S-A10-1PEG formülasyonuna kıyasla; bu formülasyonun %5 ve %10 PEG 400 ile hazırlananlarında, PMM 0.05-S-A10-5PEG ve PMM 0.05-S-A10-10PEG, daha ikinci haftada partikül boyutu ve PDI değerlerinde ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.31). Adapalen miktarının kademeli arttırıldığı, %1 PEG 400 içeren diğer formülasyonların ((%0,07 PAMAM), PMM 0.07-S-A5-1PEG (ADA/PMM=4,7); PMM 0.07-S-A7.5-1PEG (ADA/PMM=7); PMM 0.07-S-A10-1PEG (ADA/PMM=9,4); PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG (ADA/PMM=9,4)) partikül boyutu ve dağılımında da

altıncı haftada belirgin bir değişme olmadığı ve kararlı kaldığı görülmektedir (Tablo 4.32).

5.6. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Optimizasyon çalışmaları ile hazırlanan PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının arasından, partikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilite bulguları dikkate alınarak en iyi sonuçları veren formülasyonlar seçildi. Seçilen PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarına yüklenen etken madde miktarları belirlendi. Ayrıca bu formülasyonlarda stabilite çalışmaları kapsamında sıfırıncı ve altıncı haftada adapalenin geri kazanım çalışması yapıldı. Seçilen konsantrasyonlarda PAMAM (%0,05 ve %0,07) içeren formülasyonlara ilave edilen adapalen miktarının artışı ile orantılı olarak geri kazanılan etken madde miktarının arttığı ve altıncı haftada yapılan geri kazanım çalışmaları ile bu formülasyonlarda adapalenin kararlı kaldığı saptanmıştır. İki farklı oranda PAMAM ile hazırlanan formülasyonlarda geri kazanılan adapalen miktarları yakın bulunmuştur (Tablo 4.33 ve Tablo 4.34). Formülasyona yüklenen en yüksek adapalen miktarı PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyon için $283,3 \pm 29,9$ µg/ml ve PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyon için $278,5 \pm 17,1$ µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Bu bulgulara göre, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları için altı hafta sonunda kararlılığını koruyan ve partikül boyutu dağılımı homojen ($PDI < 0,2$) olan ve en yüksek oranda adapalen yüklenen PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG ve PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG kodlu nanotaşıyıcıların seçilmesine karar verildi.

5.6.1. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların FTIR Spektroskopisi Bulgularının Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıların karakterizasyon çalışmaları kapsamında, G2-PAMAM-NH₂ ve adapalen arasında sahip oldukları fonksiyonel gruplar arasında beklenen elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşumunu incelendi. Bu amaçla, optimizasyonu tamamlanan ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları için karar verilen %0,05 konsantrasyonda PAMAM içeren formülasyonlar iki farklı yükleme (100 ve 500 µg) adapalen ilavesi ile hazırlandı ve oluşan PAMAM dendrimer komplekslerinin (PMM 0.05-S ve PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyonlar) FTIR analizi yapıldı.

IR spektroskopisi, kimyasal yapıların hassas ve seçici şekilde tespiti ve tanınmasında kullanılan ve iyi bilinen bir analiz yöntemidir. Elektromanyetik spektrumun uzun dalga boylu düşük frekanslı infrared alanındaki ışınların organik bir molekül tarafından absorplanmasıyla molekülün vibrasyonel (titreşimsel) enerjileri etkilenir. IR spektroskopisi ile “parmak izi” bölgesinde maddeye özgü moleküler yapıdan kaynaklanan titreşim frekanslarına bağlı karakteristik absorpsiyon bantlarının tanınması çeşitli kimyasal yapıların ve hatta yapısal izomerlerin doğrudan kesin ayırımını sağlamaktadır. Titreşim frekansları moleküllerde atomların geometrik düzenindeki ve bağlarındaki çok küçük değişikliklere karşı son derece duyarlıdır. IR spektroskopisi moleküler yapı ile moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir³⁹⁷.

Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ise, sistemdeki H-bağı etkileşimlerini de aydınlatma imkanı sunar. Sıcaklık değişimleri sırasında gerçek zamanlı konformasyonel ve yapısal değişiklikleri tespit etmek mümkündür. Örneğe zarar vermeden ve az miktarda örnekle kısa sürede sonuç alınabildiği için kullanımı yaygınlaşmıştır, kimyasalların rutin analizinde kullanılmaktadır³⁹⁸.

FTIR spektroskopisi, ilaç molekülü-dendrimer etkileşiminin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Esas olarak dendrimerlerin yüzeyinde meydana gelen kimyasal dönüşümlerin tespiti için yapılan FTIR analizlerinde, karakteristik bantların ortaya çıkması ya da kaybolması özellikle yüzey gruplarının modifikasyonunun kanıtlanması için amaçlanmaktadır. Bununla birlikte, literatürde ilaç-dendrimer komplekslerinin karakterizasyonu için de kullanıldığı görülmektedir^{388,399,400}. Dendrimerlerin ilaçlarla kompleks oluşturma yeteneği dendrimer yüzey gruplarının doğasına ve dendrimer ile ilaç arasındaki elektrostatik etkileşimlere bağlıdır. İlaç-dendrimer arasındaki etkileşime bağlı titreşim frekanslarının belirlenmesi, ancak etkileşim halinde olan sistem ile dendrimere ve ilaca ait spektrumların karşılaştırılması ile mümkün olmaktadır⁴⁰¹.

PAMAM dendrimer ve adapalen arasındaki etkileşimi göstermek amacı ile; gerçekleştirilen FTIR analizleri ile ayrı ayrı spektral analizi yapılan adapalen, PAMAM dendrimer ve ADA-PAMAM kompleksinin spektrumları karşılaştırıldı. Yapılan çalışmalarda öncelikle etken maddenin toz halinde IR spektrumu alındı. Şekil 4.8’de sunulan IR spektrumunda elde edilen piklerin literatürde adapalen için kayıtlı veriler ile uyumlu olduğu görüldü¹⁶. Adapalenin IR spektrumunda, 1686 cm^{-1} ’de karboksilik asit (-COOH) fonksiyonel grubundan kaynaklanan güçlü bir karbonil bandı ile 2899 ve 2848

cm^{-1} 'de adamantan grubundan kaynaklı güçlü pikler görülmektedir (Şekil 4.8). Literatürde, 4-(1-adamantil) fenol yapısındaki adamantan grubundan kaynaklanan bantların 2900 ve 2846 cm^{-1} 'de pik verdiği kayıtlıdır^{402,403}. Başka bir çalışmada da benzer şekilde, 2905 and 2849 cm^{-1} 'de ortaya çıkan iki keskin pikin adamantil grubundaki C-H simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerinden (*stretching vibrations*) kaynaklandığı ifade edilmektedir⁴⁰⁴.

PAMAM-NH₂ dendirimere ait IR spektrumunda, 1638 cm^{-1} 'de dendrimer yapısındaki amit gruplarından kaynaklanan karbonil (C=O) gerilme titreşimleri (amit I bandı), 1554 cm^{-1} 'de N-C gerilme ve N-H eğilme (*bending*) titreşimlerinden (amit II bandı) kaynaklanan karakteristik bantlar ile birlikte 2901, 2971, 3074, 3280 bantları da görülmektedir (Şekil 4.9). Elde edilen spektrum literatür bilgisi ile uyumludur. Benzer bölgelerde (1636, 1537, 3051, 3255 cm^{-1} 'de) karakteristik bantlar elde edildiği kayıtlıdır⁴⁰⁵. G4 PAMAM-NH₂ dendrimerlerle yapılan başka bir çalışmada da 1644 cm^{-1} 'te görülen bantın amit grubundaki karbonil (C=O) gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir³⁹⁹.

Sahip oldukları fonksiyonel gruplar göz önüne alınarak, amin yüzey grupları bulunan PAMAM-NH₂ dendrimerler ile karboksilik asit grubu bulunan adapalen molekülleri arasındaki etkileşim sonucu adapalenin PAMAM dendrimerlere yüklendiğini göstermek üzere, optimizasyonu tamamlanan formülasyon için farklı miktarda adapalen yüklenerek hazırlanan PAMAM dendrimer komplekslerinin IR spektrumları değerlendirildi. 100 μg adapalen ile hazırlanan PMM 0.05-S kodlu ve 500 μg adapalen ile hazırlanan PMM 0.05-S-A5 kodlu formülasyonlarda parmak izi bölgesinde, 1235 cm^{-1} 'de ve 882 cm^{-1} 'deki, bantların yükleme oranı ile orantılı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 4.10-Şekil 4.12). PMM 0.05-S-A5 kodlu dendrimer kompleksi ile adapalen ve PAMAM dendrimere ait IR spektrumu karşılaştırıldığında; PMM 0.05-S-A5 kodlu dendrimer kompleksine ait spektrumda adapalene ait karakteristik karbonil bandının (1686 cm^{-1}) kaybolduğu, karbonil (C=O) gerilme titreşimlerinden (amit I bandı) kaynaklanan pikin 1640'ta ortaya çıktığı saptandı. Elde edilen sonuçlar ortamda serbest adapalen kristallerinin bulunmadığını gösterdi (Şekil 4.13). Bu şekilde hazırlanan ilaç-PAMAM dendrimer komplekslerinde adapalene ait karakteristik piklerin kayboluşu ve yeni bir noktada pikin oluşması kompleks oluşumunun kanıtı şeklinde yorumlanmıştır³⁸⁸.

5.6.2. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Zeta Potansiyel Bulgularının Değerlendirilmesi

Formülasyon optimizasyon çalışmalarında; partikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilitesi açısından seçilen ve farklı miktarlarda adapalen yüklenen nanotaşıyıcıların zeta (ζ) potansiyel ölçümleri değerlendirildiğinde; %0,05 PAMAM ve değişen miktarlarda adapalen yüklenen formülasyonların ζ -potansiyel değerleri (+) 18,4 ile (+) 24,4 olarak ölçüldü. Aynı konsantrasyonda adapalen içermeyen PAMAM-NH₂ dendrimerlerin (C-PMM (0.05) kodlu formülasyon) saf sudaki ζ -potansiyel değeri (+) 25,4 $\pm$ 2,0 olarak ölçüldü. %0,07 PAMAM içeren ve en yüksek miktarda adapalen yüklenen PMM 0.07-S-A10-3:1 ve PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyonların ζ -potansiyel değerleri ise sırasıyla (+) 29,7 $\pm$ 2,5 ve (+) 27,6 $\pm$ 2,3 olarak saptandı (Tablo 4.36).

Elde edilen bulgulara göre, PAMAM dendrimerlere adapalen yüklenmesiyle zeta potansiyel değerlerinde hafif bir düşüş görülsede anlamlı bir değişiklik olmadığı, aynı şekilde iyonize olmayan PEG 400 ün de beklendiği şekilde formülasyonlarda zeta potansiyel üzerinde etkisi olmadığı saptandı (Tablo 4.36). Ortamdaki PAMAM oranının artışına (%0,05'ten %0,07'e çıkması) bağlı olarak, adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıların zeta potansiyel değerinin artmasının, konsantrasyonun yükselmesiyle dendrimer yapısından kaynaklanan yüzey amin grupları ile beraber tersiyer amin gruplarının yoğunluğunun artmasına bağlı olağan olduğu sonucuna varıldı (Tablo 4.35). PAMAM dendrimerlerin zeta potansiyel değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı literatürde de kayıtlıdır⁴⁰⁶.

Nanopartiküler sistemlerin kararlılığı (stabilitesi), zeta potansiyel değerleri ile doğrudan ilişkilendirilmekte, zeta potansiyelinin belli bir eşik değerin üzerinde olması stabilite göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Zeta potansiyel değerinin -20 mV'tan küçük veya +20 mV'tan büyük olduğu sistemlerde yüklü partiküller arasında güçlü bir elektriksel itme kuvveti etkili olduğu için agregasyon eğiliminin daha düşük bir ihtimal olacağı düşünülmektedir⁴⁰⁶. Ayrıca, pozitif yüklü sistemlerin genellikle negatif yük taşıyan çoğu hücresel membranlardan geçiş üzerindeki belirgin etkisi de vurgulanmaktadır. Ancak, aşırı pozitif yüke sahip sistemlerin muhtemel membran bütünlüğünün bozulmasıyla önemli hücre içi bileşenlerin kaybı sonucu hücre toksisitesini indükleyebileceğinin de dikkate alınması gerekmektedir⁴⁰⁷.

Amin ve hidroksil yüzey gruplu 2., 3. ve 4. jenerasyon PAMAM dendrimerlerin araştırıldığı literatürde kayıtlı başka bir çalışmada, saf suda (pH 6,5) hazırlanan tüm dendrimerlerin (5-20 μM) yükü pozitif bulunmuştur. G2-PAMAM-NH₂ (20 μM) ve G2-PAMAM-OH (20 μM) dendrimerlere ait zeta potansiyel değerleri sırasıyla (+) $7,18 \pm 0,58$ ve (+) $8,99 \pm 0,75$ olarak saptanmıştır. Elde edilen net pozitif yükün dendrimer yapısını oluşturan tersiyer amin gruplarına atfedilebileceği vurgulanmıştır³⁸⁵. Berberin konjuge edilen ve berberin enkapsüle edilen G4 PAMAM dendrimerler ile yapılan başka bir çalışmada da ilaç yüklü G4 PAMAM dendrimerlerin ζ -potansiyel değerleri sırasıyla $30,3 \pm 0,69$ mV ve $30,6 \pm 1,38$ mV; tek başına G4 PAMAM dendrimerlerin ζ -potansiyel değeri ise $30,4 \pm 0,8$ mV olarak saptanmıştır⁴⁰⁰. Yani PAMAM dendrimerlere enkapsülasyon ya da konjugasyon ile ilaç yüklenmesi PAMAM dendrimerlerin zeta potansiyelinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgular da dendrimer yapısını oluşturan tersiyer amin gruplarının elde edilen zeta potansiyel değerlerine katkısını düşündürmektedir.

5.6.3. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların Yükleme Oranı ve Yükleme Etkinliği Bulgularının Değerlendirilmesi

PAMAM dendrimerler ile hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlerdeki adapalen yükleme oranı ve yükleme etkinliğini belirlemek için örnekler santrifüj edildikten sonra HPLC ile analiz edildi. Böylece formülasyona başlangıçta ilave edilen etken madde miktarına kıyasla “geri kazanılan” etken madde miktarı belirlendi. Dendrimerler tarafından tutulmayan serbest adapalen moleküllerinin filtrelenerek, sadece nanotaşıyıcı sistem içerisinde enkapsüle olan adapalen miktarını saptamak için ultrafiltrasyon yöntemi kullanıldı ve filtrattan alınan örnekler de HPLC ile analiz edildi. Bu şekilde dendrimerlere yüklenmeyen serbest adapalen miktarının belirlenmesi ve nanotaşıyıcı sistemlerde bulunan “geri kazanılan” adapalen miktarından çıkarılarak nanotaşıyıcı sistem tarafından enkapsüle olan adapalen miktarının dolaylı yoldan saptanması amaçlandı. Ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta ihmal edilecek derecede düşük (miktar tayini limiti altında) bulunan adapalen miktarları ile yüklemenin %99,99 oranında gerçekleştiği sonucuna varıldı.

Adapalen yüklü PAMAM dendrimer formülasyonlarının yükleme oranı (YK) ve yükleme etkinliği (YE) doğrudan nanotaşıyıcıda bulunan geri kazanılan adapalen miktarı üzerinden hesaplandı (Denklem 3.3 ve 3.4). Tablo 4.36'daki bulgular incelendiğinde, YK

(%) tüm formülasyonlarda birbirine yakın olduğu (~%25-30) bulunmuştur. Adapalen ile PAMAM dendrimerlerin etkileşimi büyük ölçüde dendrimere ait yüzey gruplarından kaynaklandığı için 16 adet yüzey amin grubuna sahip her bir PAMAM dendrimere belli oranda adapalen molekülü bağlanacağı için bu durum zaten beklenmektedir⁴⁰⁸. Yani, PAMAM dendrimerlere yüklenebilecek en yüksek etken madde miktarı doğrudan dendrimerin yüzey gruplarının sayısına bağlı olacaktır. Zaten adapalenin PAMAM dendrimer formülasyonlarının hazırlanması ve optimizasyonu çalışmaları sırasında partikül boyutu ve dağılımı açısından başarılı sonuçlar alınmasında da kullanılan ADA/PAMAM mol oranının etkili olduğu görülmüştür. YE (%) sonuçlarına bakıldığında; formülasyonda kullanılan PAMAM konsantrasyonu sabit tutularak başlangıçta ilave edilen adapalen miktarı arttıkça dendrimere yüklenen etken madde oranının doygunluğa ulaşmasına bağlı olarak YE (%) değerlerinin giderek düştüğü görülmektedir (Tablo 4.36). Bu da, aynı şekilde yüklenen adapalen miktarında dendrimerin yüzey gruplarının sayısının büyük ölçüde belirleyici olmasına bağlanmaktadır.

%0,05 oranında PAMAM içeren ve sırasıyla 500, 750 ve 1000 µg adapalen ile, MetOH/THF oranı mümkün olduğunca yüksek tutularak hazırlanan PMM 0.05-S-A5-1PEG (MetOH/THF:4); PMM 0.05-S-A7.5-1PEG (MetOH/THF:4); PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG (MetOH/THF:3) kodlu formülasyonlarda YE (%) değerleri sırasıyla %42,7±3,5; %34,5±4,9 ve %33,7±1,6 olarak hesaplanmıştır. %0,07 oranında PAMAM içeren ve sırasıyla 500, 750 ve 1000 µg adapalen ile, MetOH/THF oranı mümkün olduğunca yüksek tutularak hazırlanan PMM 0.07-S-A5-1PEG (MetOH/THF:4); PMM 0.07-S-A7.5-1PEG (MetOH/THF:4); PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG (MetOH/THF:3) kodlu formülasyonlarda YE (%) değerleri sırasıyla %50,4±5,6; %34,8±5,3 ve %33,4±0,9 olarak hesaplanmıştır. MetOH/THF oranının 1,5 olduğu PMM 0.07-S-A10-1PEG kodlu formülasyonun PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG (MetOH/THF:3) kodlu formülasyona kıyasla belirgin dercede düşük YE (%) değeri (%19,6±0,8) dikkat çekmektedir. Bu durum PAMAM dendrimerlerin metanolde THF'a göre daha iyi çözünmesine bağlandı.

5.6.4. Adapalen Yüklü PAMAM Dendrimer Nanotaşıyıcıların TEM Bulgularının Değerlendirilmesi

Kararlı olduğu saptanan, partikül boyutu dağılımı homojen (PDI<0,2) olan ve en yüksek oranda etken madde yüklenen PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG ve PMM 0.07-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyonlar arasından daha düşük konsantrasyonda PAMAM

(%0.05) ile hazırlanan, partikül boyutu ve dağılımı, stabilite ile yüklenen adapalen oranı açısından daha yüksek konsantrasyonda PAMAM (%0.07) içeren formülasyona göre anlamlı farkı bulunmayan PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyon, zeta potansiyeli daha düşük olduğu için deriye uygulama açısından daha güvenli olduğu düşünülerek *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi.

Seçilen PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG kodlu formülasyonun TEM analizleri yapılarak, adapalen yüklü PAMAM dendrimerlere ait şekil ve yüzey morfolojisi incelendi. Adapalen yüklü PAMAM dendrimerlerin nano boyutta ve küresel bir morfoloji göstermiştir (Şekil 4.14), bu görüntüler literatür ile uyumludur⁴⁰⁹⁻⁴¹².

TEM ile ölçülen boyutların, DLS ölçümlerinde elde edilen boyutlara göre daha küçük olmasının sebebi, DLS tekniği ile ölçülen boyutun partiküllerin hidrodinamik boyutu; yani bir sıvı içerisinde hareket halinde olan partiküllerin ölçülen çapı olmasına bağlanmaktadır. Ayrıca DLS tekniğinin büyük partiküllerin girişimlerine daha duyarlı olduğu vurgulanmaktadır⁴¹³. Literatürde ayrıca; TEM analizlerinde DLS ölçümlerine göre küçük boyutların olması, TEM numunelerinin hazırlanma prosesi sırasında nanopartiküllerin dehidrasyonuna ya da negatif boyama ile boyutların değişmesine bağlı olabileceği de vurgulanmaktadır^{414,415}.

5.7. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılarının Formülasyon Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıların hazırlanması ve optimizasyonu çalışmaları kapsamında; etken maddenin enkapsülasyon yöntemi ile PDC'lerle hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlere yüklenmesi için ultrasonik banyoda sonikasyon, film oluşturma ve kosolvan evaporasyon teknikleri denendi. Hazırlanan dendron misellerin partikül boyutu ve dağılımı ölçümleri gerçekleştirildi, seçilen formülasyonlarda adapalen geri kazanma çalışmaları yapılarak yüklenen adapalen miktarları saptandı.

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının hazırlanmasında; ultrasonik banyoda sonikasyon uygulanması yöntemi ile hazırlanan nanotaşıyıcıların elde edilen partikül boyutu ($692,4 \pm 229,3$ nm) ve PDI ($0,72 \pm 0,14$) değerleri çok yüksek bulundu. Adapalenin dendron temelli misellere yüklenmesi için yürütülen formülasyon çalışmaları kapsamında ikinci bir yöntem olarak ince film hidrasyon tekniği kullanıldı. DMc 0.7 A3.5 FH.C kodlu formülasyonun partikül boyutu analizinde $0,29 \pm 0,04$ PDI

değeri ile partikül boyutu ($97,12 \pm 12,7$) küçük miseller elde edildiği görüldü (Tablo 4.38).

Adapalen yükleme çalışmalarında üçüncü bir yöntem olarak ise, ko-solvan evaporasyon tekniği kullanıldı. Bu yöntem ile hazırlanan DMc 0.7 A3.5 C kodlu formülasyonun boyut analizinde dendron temelli misellerin partikül boyutu ve dağılımı $192,8 \pm 11,3$ nm ve PDI: $0,19 \pm 0,02$ olarak saptandı (Tablo 4.38). İnce film hidrasyon tekniği ile elde edilenlere göre daha büyük boyuta sahip, fakat daha homojen bir dağılım gösteren miseller elde edildiği saptandı.

İnce film hidrasyon ve ko-solvan evaporasyon, ile elde edilen misellerde yapılan etken madde geri kazanım çalışmalarında sırasıyla DMc 0.7 A35 FH.C ve DMc 0.7 A35 C kodlu formülasyonlarda misellere yüklenen adapalen $0,9 \pm 0,3$ ve $7,3 \pm 3,2$ $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı (Tablo 4.37). Sonuç olarak, DMc 0.7 A35 FH.C kodlu formülasyonun PDI değeri, DMc 0.7 A3.5 C kodlu formülasyona kıyasla göreceli yüksek, geri kazanılan adapalen miktarı ise düşük bulundu. Partikül boyutu açısından daha homojen bir dağılım gösterdiği ve yükleme oranı daha fazla (~ 7 kat) olduğu için adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının optimizasyon çalışmaları için ko-solvan evaporasyon yönteminin kullanılmasına karar verildi.

5.7.1. Ko-solvan Evaporasyon Yöntemi ile Hazırlanan Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcılara ait Çalışmaların Değerlendirilmesi

Ko-solvan evaporasyon yöntemi hidrofobik bir ilaç molekülü ile birlikte suda çözünebilen amfifilik özellikte polimerin bir araya getirilmesinde avantaj sağlar, bu yöntem ile hidrofilik polimerlerin enkapsülasyon etkinliğinin arttığı ileri sürülmüştür. Yöntem, ilaç ve polimerin uçucu ve suyla karışabilen organik bir çözücüde (yardımcı çözücü/ko-solvan) birlikte çözündürülmesi prensibine dayanır. Organik fazın, misel çekirdeğini oluşturan bloğun çözünmediği sulu faza ilavesi ya da tam tersi şekilde (sulu fazın organik faza ilavesi), ardından organik çözücünün buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılması sonucu ilacın enkapsüle olduğu misel yapısı kendiliğinden oluşur. Paklitaksel, doksorubisin, adriyamisin, fenofibrat, siklosporin A gibi önemli terapötik ajanların ko-solvan evaporasyon yöntemi kullanılarak polimerik misellere enkapsülasyon çalışmaları yapılmıştır⁴¹⁶⁻⁴²¹.

Ko-solvan evaporasyon yöntemi ile hazırlanan adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıların optimizasyonunda; kullanılan PDC ve adapalen miktarı, dispersiyon ortamı ve hazırlama yöntemi parametrelerinin dendron temelli misellerin

partikül boyutu ve enkapsülasyon verimi üzerindeki etkileri değerlendirildi. Uygun olan formülasyonlar çalışmanın ilerleyen döneminde karakterizasyon çalışmaları yapılmak üzere seçildi. Adapalen yüklü polyester dendron temelli misel nanotaşıyıcı sistemlerinde kullanılan formülasyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3.19’da verilmiştir.

Bu kapsamda, ilk olarak kullanılan PDC miktarını optimize etmeye yönelik çalışmalar yapıldı. Daha önce denenilen diğer yöntemlere kıyasla, ko-solvan evaporasyon yöntemi ile dendron temelli misellere yüklenen adapalen oranı göreceli olarak daha yüksek ($7,3 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$) bulunduğu için, seçilen DMc 0.7 A35 C kodlu formülasyon ($\sim 43 \mu\text{M}$ PDC; $192,8 \pm 11,3 \text{ nm}$; PDI: $0,19 \pm 0,02$) optimizasyon için temel olarak alındı. Adapalen miktarı sabit tutularak, PDC miktarının düşürülmesiyle ($\sim 31 \mu\text{M}$) hazırlanan DMc 0.5 A35 C kodlu formülasyon için birim hacimde yüklenen adapalen miktarının düştüğü ($2,9 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$) görüldü. Bu formülasyona ait ortalama partikül boyutu ($168,1 \pm 15,7 \text{ nm}$) ve PDI ($0,28 \pm 0,05$) değerleri incelendiğinde; boyutta çok az bir küçülme ile birlikte dağılımın önceki kadar homojen olmadığı saptandı (Tablo 4.38). DMc 0.7 A35 C kodlu formülasyon baz alınarak bu defa ilave edilen adapalen miktarı artırıldığında; DMc 0.7 A80 C kodlu formülasyonda birim hacimde yüklenen adapalen miktarında artış ($11,0 \pm 4,9 \mu\text{g/ml}$) tespit edildi (Tablo 4.39).

Bir sonraki aşamada; 1,2 ml sulu formülasyonda PDC konsantrasyonunu miktarının ne kadar arttırılabileceğini saptamak üzere, ilave edilen etken madde miktarı sabit tutularak farklı miktarlarda, 0,7; 1; 1,5 ve 3 mg (~ 43 ; ~ 62 ; ~ 93 ; $\sim 180 \mu\text{M}$), PDC ile misel formülasyonları hazırlandı. PDC miktarının teorikte $180 \mu\text{M}$ ’a ulaştığı DMc 3 A80 C kodlu formülasyonda hazırlama esnasında daha santrifüj edilmeden sulu fazda çökme gözlemlendi. Bu durum kullanılan miktar ile PDC’nin sudaki doygunluk konsantrasyonunun aşılmasına bağlandı. Tablo 4.40’te formülasyonda birim hacimde tespit edilen adapalen miktarlarına bakıldığında; ortamda çözünebileceğinden daha fazla miktarda bulunan PDC ile beraber, bir miktar etken maddenin muhtemelen çökmesiyle, geri kazanılan adapalen miktarının, PDC oranının daha az olduğu formülasyonlarda geri kazanılan adapalen miktarına kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. DMc 0.7 A80 C, DMc 1 A80 C ve DMc 1.5 A80 C kodlu misel formülasyonlarında, sırasıyla $11,0 \pm 4,9$; $23,2 \pm 5,8$ ve $26,8 \pm 8,6 \mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilen adapalen konsantrasyonları; PDC miktarı arttıkça dendron misellere yüklenen adapalen miktarının da arttığını göstermektedir. DMc 0.7 A80 C ($218,4 \pm 14,2 \text{ nm}$; PDI: $0,26 \pm 0,01$) ve DMc 1 A80 C ($231,5 \pm 14,2 \text{ nm}$; PDI:

0,34±0,01) kodlu formülasyonlar karşılaştırıldığında; 1,2 ml hacimde PDC miktarı 0,7 mg'dan 1 mg'a çıkarıldığında (~43 µM'dan ~62 µM'a) ortalama partikül boyutu ve PDI değerlerinin bir miktar büyüdüğü görülmektedir. Bu durum, PDC konsantrasyonunun artmasıyla ortamdaki misel agregatlarındaki monomer sayısındaki artışa³¹² bağlanmaktadır. Nitekim, literatürde agregasyon sayısı ile partikül boyutunun ilişkili olduğu kayıtlıdır⁴²². Bununla birlikte, 1,2 ml formülasyonda 1 mg'ın üzerinde PDC bulunan DMc 1.5 A80 C ve DMc 3 A80 C kodlu formülasyonlarda elde edilen ortalama partikül boyutu değerleri DMc 0.7 A80 C, DMc 1 A80 C kodlu formülasyonlarda elde edilenlere göre daha küçük bulunmuştur (Tablo 4.40). Bu durumun konsantrasyon artışıyla birlikte dendron misel yapısında belli bir değere ulaşan PDC monomeri sayısındaki artışına bağlı olarak monomerlerin birbiriyle etkileşimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde benzer şekilde; amfifilik blok ko-polimer konsantrasyonunun artmasıyla, miseller agregasyon sayısının arttığı⁴²³; başka bir ifadeyle ortamdaki partiküllerin sayısının artmasıyla, yoğunluğun arttığı ve partikül boyutunun küçüldüğünü gösteren çalışmalar mevcuttur⁴²⁴⁻⁴²⁶. Fakat bunun tam tersi bir durum olarak, giderek artan PDC konsantrasyonu ile misel agregasyon sayısındaki artışa bağlı olarak daha büyük boyutlu elde edilen partiküllerin bir kısmının (büyük misel agregatlarını) santrifüj işlemi sırasında çökmesi sonucu daha düşük partikül boyut değerleri elde edilmiş olabileceği de düşünülmektedir. Bu çalışmaların sonucunda, çökme gözlenen DMc 3 A80 C kodlu formülasyon elendi. Ayrıca, DMc 1.5 A80 C kodlu formülasyon da PDI değeri (0,43±0,05) yüksek bulunduğu için bu formülasyonda kullanılan PDC miktarının yüksek olduğu sonucuna varılarak elendi.

Diğer formülasyonlarda (DMc 0.7 A80 C ve DMc 1 A80 C) stabilizan olarak PEG 400 kullanılmasının etkisi incelendi. Adapalen miktarı sabit tutularak, seçilen iki farklı PDC miktarı ile, dispersiyon ortamına %1 (a/h) oranında PEG 400 ün ilave edildiği dendron temelli misel nanotaşıyıcıları hazırlandı. PEG 400 içeren ve içermeyen formülasyonlar ortalama partikül boyutu ile PDI değerleri açısından değerlendirildi. Dispersiyon ortamına PEG 400 ilave edilen misel formülasyonların (DMc 0.7 A80 1PEG C ve DMc 1 A80 1PEG C) partikül boyutu ve PDI değerlerinin PEG 400 ilave edilmeyenlere göre (DMc 0.7 A80 C ve DMc 1 A80 C) küçüldüğü görüldü (Tablo 4.41).

İlerleyen çalışmalarda, uygun stabilite bulguları gösteren kabul edilebilir boyut ve PDI değerlerine sahip dendron misel nanotaşıyıcıları hazırlayabilmek için daha başarılı

sonuçlar verecek ve aynı zamanda yükleme etkinliğini arttıracak bir yöntem arayışı sırasında ultrasonik prob ile sonikasyon denenmesine karar verildi. Bu yüzden optimizasyon çalışmaları kapsamında sonikasyon işleminin etkisini de ortaya çıkarmak için seçilen iki farklı miktarda (0,7 mg ya da 1 mg) PDC ile hazırlanan dendron temelli misel formülasyonların dispersiyon ortamında stabilizan olarak PEG 400 kullanılmasının partikül boyutu ve dağılımı üzerindeki etkisi santrifüj uygulanmadan değerlendirildi.

Tablo 4.42 incelendiğinde DMc 0.7 A80 ve DMc 1 A80 kodlu formülasyonlar esas alınarak, dispersiyon ortamına PEG 400 ilavesi yapılan DMc 0.7 A80 1PEG; DMc 1 A80 1PEG ve DMc 1 A80 5PEG kodlu formülasyonlarda göreceli olarak daha küçük boyutta dendron miseller elde edildiği ve daha homojen bir partikül boyutu dağılımı sağlandığı saptandı. Bunun muhtemel bir sebebi; polar³⁹² ve hidrofilik³⁹³ bir molekül olan PEG 400 zincirlerinin, iki bloktan oluşan PDC'lerin hidrofilik kuyruk kısmını, yani oluşan misel agregatlarının sulu ortamla etkileşim halinde olan kabuk bölgesini meydana getiren poli(metil metakrilat) yapısında uzun lineer bir polimer zincirinden ibaret bloğu ile etkileşmesi söz konusu olabilir. Dispersiyon ortamında bulunan PEG 400 zincirlerinin kendisi gibi son derece hidrofilik özellikte olan PDC yapısındaki polimere ilgisinden dolayı misel agregatlarının etrafını sarak formülasyonlarda daha homojen boyut dağılımı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, ortamda PEG 400 konsantrasyonunun %5'e çıkarılmasının, dendron temelli misellerde daha büyük agregatların oluşmasına yol açmadığı gözlemlendi. Daha önce de açıklandığı gibi; Pluronic F127 ile hazırlanan misel formülasyonlarında ortama ilave edilen PEG'in elde edilen misellerin hidrodinamik çapı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, polietilen glikollerin misel koronası ile uyumlu olduğu için seyreltik PEG çözeltilerinde misel koronalarının PEG zincirleri tarafından bir ortam olarak tercih edilmesine sebep olduğu öne sürülmüştür. Bahsedilen çalışmada, konsantre PEG çözeltilerinde Pluronic F127 ile hazırlanan misellerin partikül boyutlarında büyüme gözlenmiş, bu durumun PEG zincirleri arasında kurulan köprülerin misellerin kümeleşmesine neden olabileceği yorumu yapılmıştır. Yalnız bu çalışmada çok daha uzun zincirli olan PEG6000 ve PEG35000 kullanılmıştır³⁹⁶. Bu durum göz önüne alındığında; çalışmamızda dendron temelli misellerde dispersiyon ortamında %5 oranında düşük zincirli PEG 400 kullanılmasının agregat kümeleşmesine yol açmamış olması makuldür. Sonuç olarak, PEG 400 ün eklenmesiyle daha homojen bir partikül

boyutu dağılımı ile daha küçük boyutlu miseller elde edildiği için, sonraki çalışmalarda formülasyonların dispersiyon ortamına PEG 400 ilave edilerek hazırlanmasına karar verildi.

Adapalenin dendron temelli misellere yüklenmesi için hazırlama yönteminin optimizasyonu kapsamında; ultrasonik prob ile sonikasyon uygulamaları sırasında misel formülasyonları hazırlandığında, organik çözücü ortamdan uzaklaştırılmadan yapılan sonikasyon uygulaması ile etkili sonuç alınamadı. Bunun yerine, kosolvan evaporasyon yöntemine göre hazırlanan formülasyonlarda organik faz tamamen uçurulduktan sonra en son aşamada ultrasonik proba sonikasyon uygulandı. Literatürde de sulu fazda misel formülasyonlarının çok modlu boyut dağılımını önlemek için sonikasyon ya da yüksek basınçlı bir ekstruderden geçirme işleminin yapıldığı görülmektedir⁴²⁷.

Uygulanan sonikasyon işleminin dendron temelli misellerin boyutu açısından etkisi Tablo 4.43'te açıkça görülmektedir. Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının tamamında PDI değerlerinin belirgin derecede düzeldiği ($PDI < 0,3$) saptanmıştır. Aynı zamanda partikül boyutunun da belirgin derecede küçüldüğü (30 ila 60 nm daha küçük) gözlenmiştir. Aynı koşullarda aynı miktarda PDC ile hazırlanan boş misellerde ise sonikasyon uygulamasının misel agregatlarında büyümeye ve boyut dağılımında heterojeniteye yol açtığı görülmektedir (Tablo 4.43).

Sonikasyonun hazırlama prosedürüne dahil edilmesiyle birlikte optimizasyon çalışmalarında son aşamada; iki farklı PDC miktarı ile hazırlanan DMc 0.7 A80 1PEG S ve DMc 1 A80 1PEG S kodlu misellere yüklenen etken madde miktarları incelendiğinde; saptanan adapalen konsantrasyonları sırasıyla $53,4 \pm 3,1$ ve $62,3 \pm 2,3$ $\mu\text{g/ml}$ 'dir (Tablo 4.44). Artan PDC konsantrasyonuna bağlı olarak yüklenen adapalen miktarının arttığı görülmektedir. Bu durum literatür bulguları ile uyumludur³¹¹. Ayrıca DMc 1 A80 1PEG S kodlu formülasyonda kullanılan PEG 400 oranının %5'e çıkarılması ile iki farklı oranda (%1 ve %5) PEG 400 içeren formülasyonlar arasında saptanan adapalen konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. DMc 1 A80 1PEG S ve DMc 1 A80 5PEG S kodlu formülasyonlar için birim hacimde misellere yüklenen adapalen miktarları sırasıyla $62,3 \pm 2,3$ ve $65,5 \pm 3,2$ $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.45).

Elde edilen bu bulgular sonucunda DMc 1 A80 1PEG S kodlu formülasyon seçilerek dendron temelli misel formülasyonlara ilave edilen adapalen miktarı kademeli

olarak arttırıldı. Seçilen miktarda PDC içeren ve farklı miktarlarda adapalen yüklenen misel formülasyonların partikül boyutlarının birbirine çok yakın olduğu (294,4 ile 306,2 nm arasında), aynı şekilde PDI değerlerinin de oldukça homojen olduğu (0,19-0,22) ve yüklenen adapalen miktarının da giderek arttığı tespit edildi (Tablo 4.46). Aynı oranda PDC ile hazırlanan BoşMisel-1PEG koldu etken madde yüklenmeyen misel formülasyonu (160,4±4,6 nm; PDI: 0,23±0,01) ile karşılaştırıldığında; adapalen yüklü misellerin hidrodinamik çapındaki artış, misel agregatlarının çekirdek bölgesinin etken madde moleküllerine yer açmak üzere genişlemesine bağlandı (Tablo 4.43). Bu durum literatür bulguları ile uyumludur^{311,428,429}. Karakterizasyon çalışmalarında da seçilen formülasyonlarda hesaplanan yükleme oranları ile yükleme etkinliklerinin (Tablo 4.51) yüksek bulunması bu durumu desteklemektedir.

5.8. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Stabilité Bulgularının Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının fiziksel stabilitesini değerlendirmek amacıyla, partikül boyutu ve dağılımı bulgularına göre seçilen formülasyonların fiziksel stabilitesi buzdolabı koşullarında (5°C±3°C) saklanarak izlendi. Hazırlandıktan sonra sonikasyon uygulanmayan DMc 0.7 A8 C, DMc 0.7 A8 1PEG C, DMc 1 A8 C ve DMc 1 A8 1PEG C kodlu formülasyonların fiziksel kararlılıklarını değerlendirmek üzere 2. hafta sonunda partikül boyutu ve dağılımları ölçüldüğünde misellerin stabil kalmadığı gözlemlendi (Tablo 4.47).

Ultrasonik proba sonikasyon uygulanarak hazırlanan DMc 1 A80 1PEG S, DMc 1 A200 1PEG S, DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonların ise 1. ay sonunda yapılan boyut ölçümlerinde boyutlarda gözlenen hafif artışla birlikte partikül boyutu ve dağılımı açısından stabilitelerini büyük ölçüde korudukları ($r_h < 340$ nm ve $PDI \leq 0,23$) tespit edildi (Tablo 4.48). DMc 1 A1000 1PEG S kodlu formülasyonun 1. ay sonunda tespit edilen partikül boyutunun ilk hazırlandığı zaman ölçülen boyut değerlerine ve diğer formülasyonlara göre daha belirgin şekilde büyüdüğü, PDI değerinin 0,3'ün üzerine çıktığı, dolayısıyla boyut dağılımında bozulma olduğu gözlemlendi. Ayrıca adapalen yüklenmeden hazırlanan boş misel nanotaşıyıcılarının (BoşMisel-1PEG) da stabilitesini 1 ay boyunca koruduğu; tazeyken 0. ayda elde edilen partikül boyutu ve PDI (160,4±4,6 nm ve 0,21±0,01) değerlerinin 1. ayda yapılan ölçümlerde (178,0±13,4 nm ve 0,18±0,03) çok fazla değişmediği tespit edildi (Tablo 4.49).

Boş misel nanotaşıyıcılarında (BoşMisel-1PEG) 4. ayda partikül boyutu ve dağılımında belirgin derecede bozulma gözlemlendi ($712,9 \pm 136,0$ nm; PDI: $0,62 \pm 0,18$) (Tablo 4.49) ve etken madde yüklenmeyen PDC ile hazırlanan dendron temelli misellerin bu koşullarda uzun bir süre (4 ay) stabilitelerini koruyamadıkları sonucuna varıldı. Fakat adapalen yüklü DMc 1 A80 1PEG S, DMc 1 A200 1PEG S, DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonlarda misellerin 4. ay sonunda boyutlarında ve PDI değerlerinde gözlenen bir miktar artışla birlikte partikül boyutu ve dağılımı açısından etken madde içermeyen boş misellere kıyasla stabilitelerini büyük ölçüde korudukları ($r_h < 397$ nm ve $PDI \leq 0,26$) dikkat çekmektedir (Tablo 4.48). Bu sonuçlar literatür bulguları ile de uyumludur. Polimerler ve ilaçlar arasındaki etkileşimin polimerik misellerin yapısal olarak kararlılığını arttırmanın dışında aynı zamanda misellerden ilacın sızmasını da önlediği vurgulanmaktadır. Hidrofobik ilaçların miseller tarafından enkapsülasyonunun amfifilik polimerler için misel oluşumu sırasında hidrofobik kuvveti arttıracağı, böylece polimerik misellerin kinetik stabilitesini iyileştirdiği bildirilmiştir^{184,430,431}. Örneğin, amfifilik bir polimer olan α -hidroksi PEO-PBLA (poli (α -hidroksi etilen oksit-ko-p-benzi-aspartat)) ile hazırlanan doksorubisin yüklü misellerin boş α -hidroksi PEO-PBLA miselleri ile karşılaştırıldığında *in vitro* koşullarda daha kararlı olduğu gösterilmiştir⁴³⁰.

5.9. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının optimizasyon çalışmalarında görsel olarak, partikül boyutu dağılımı ve yüklenen adapalen miktarı incelenerek değerlendirilen formülasyonlar arasından uygun olan formülasyonlar seçildi. Seçilen formülasyonların zeta potansiyel, adapalenin nanotaşıyıcı sisteme yüklenme oranı, yükleme etkinliği, morfolojik özellikleri karakterize edildi.

5.9.1. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Zeta Potansiyel Bulgularının Değerlendirilmesi

Optimizasyon çalışmaları ile partikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilitelerine göre seçilen; farklı oranda adapalen yüklü nanotaşıyıcıların (DMc 1 A20 1PEG S ve DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonlar) zeta (ζ) potansiyel ölçümleri değerlendirildi. Adapalen yüklü miseller ile etken madde yüklenmeyen misellerin (BoşMisel-1PEG) ortalama ζ -potansiyel değerleri sırasıyla, (-) $0,3 \pm 0,04$; (-) $1,2 \pm 0,7$ ve (-) $1,9 \pm 0,2$ olduğu saptandı (Tablo 4.50). Misellerin hazırlanmasında kullanılan PDC yapısının non-iyonize karakteri göz önüne alındığında 0 değerine yakın bir yüzey yükü bulunması beklenen bir

durumdur. Bu sonuçlar literatür bulguları ile uyumludur³⁶³. Çok az da olsa elde edilen negatif yük değerleri literatürde açıklandığı gibi; ara yüzeyde adsorbe edilen su moleküllerine ait hidrojen atomlarının suyun kendi kendine iyonlaşmasından gelen anyonik hidroksil iyonlarının partiküllere adsorpsiyonunu kolaylaştırarak hidrofobik polimerik partiküllerin yüzeyinin negatif yük kazanmasına bağlandı^{432,433}.

Neredeyse nötral sayılabilecek yüke sahip misellerin gösterdiği kararlılık (Tablo 4.48) stabilitenin sadece zeta potansiyele bağlı olmadığını göstermektedir. Bu durumun sistemde sterik stabilizasyonun sağlanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Zira, non-iyonize Tween 80 kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil bir koloidal sistem elde etmek için ideal kabul edilen $\pm 20/30$ mV zeta potansiyel değerinden daha düşük zeta potansiyel değerine sahip olmasına rağmen, Tween 80'in nanotaşıyıcılara sterik stabilizasyon sağladığı gösterilmiştir^{434,435}. DMc 1 A1000 1PEG S kodlu formülasyonda ise misellerin yükü (-) $17,7 \pm 1,2$ olarak bulundu (Tablo 4. 50). Daha düşük miktarda etken madde yüklenen misellere göre elde edilen bu yoğun negatif yükün misel yüzeyinde enkapsüle olmamış, asidik ($pK_a:4,2$) yapıda olduğu için suda ($pH: \sim 6,4$) negatif yük kazanan adapalen (anyon) moleküllerinin bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.9.2. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların Yükleme Oranı ve Yükleme Etkinliği Bulgularının Değerlendirilmesi

Dendron temelli misellerde adapalen yükleme oranı ve yükleme etkinliğini belirlemek için formülasyonlarda öncelikle HPLC analizleri ile geri kazanılan etken madde miktarı belirlendi. Ultrafiltrasyon yöntemi ile dendron temelli misel nanotaşıyıcılarına yüklenmeyen serbest adapalen miktarının belirlenmesi için yapılan ultrafiltrasyon işlemi ile filtratta ihmal edilecek derecede düşük (miktar tayini limiti altında) miktarda adapalen bulundu; yükleme oranında gerçekleştiği sonucuna varıldı. Adapalen yüklü dendron temelli misel formülasyonlarının yükleme oranı (YO) ve yükleme etkinliği (YE) doğrudan nanotaşıyıcı sistemlerde bulunan geri kazanılan adapalen miktarı üzerinden hesaplandı (Denklem 3.5 ve 3.6).

Tablo 4.51'deki bulgular incelendiğinde; farklı oranlarda PDC kullanılarak sabit miktarda adapalen ile hazırlanan DMc 0.7 A80 1PEG S ve DMc 1 A80 1PEG S kodlu formülasyonlarda, PDC miktarının artışına bağlı olarak, YO'nun $\%8,4 (\pm 0,5)$ 'ten $\%7,0 (\pm 0,2)$ 'ye düştüğü; fakat YE'nin $80,2 (\pm 4,7)$ 'den $\%93,5 (\pm 3,5)$ 'e çıktığı gözlemlendi. PDC

miktarı sabit tutularak farklı miktarlarda adapalen ile hazırlanan DMc 1 A80 1PEG S; DMc 1 A200 1PEG S ve DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonlarda, hazırlama sırasında ilave edilen etken madde miktarındaki artışla beraber, YO'nun %7,0 ($\pm 0,2$)'den, %15,8 ($\pm 0,9$)'e ve % 32,1 ($\pm 0,4$)'e çıktığı gözlemlendi. YE ise bu formülasyonlar için sırasıyla, %93,5 $\pm$ 3,5; %93,9 $\pm$ 6,7 ve %94,2 $\pm$ 1,7 olarak hesaplandı.

YO değerlerinin, aynı miktarı PDC içeren formülasyonlarda ilave edilen adapalen miktarı ile orantılı şekilde artması, misellere yüklenen etken madde oranının doyumuna ulaşmamasına bağlandı. Literatürde benzer şekilde, kendiliğinden oluşan polimerik misellerin araştırıldığı bir çalışmada, yüklenen ilaç oranı ~%20 ve yükleme etkinliği %90< üzerinde bulunmuştur⁴²⁸. Başka bir çalışmada ise; misellerin hidrofobik çekirdeğini oluşturacak lineer blok poli- ϵ -kaprolakton (PCL) polimeri ile hidrofilik kabuğunu oluşturacak poli (etilen glikol) (PEG) zincirlerini taşıyan üçüncü jenerasyon (G3) polyester dendronun hibridizasyonu sonucu elde edilen amfifilik PEG'lenmiş dendron temelli kopolimerler (PDC'ler) kullanılarak endoksifen yüklü misel nanotaşıyıcıları hazırlanmış; yüklenen etken madde oranı %0,3-3 arasında, yükleme etkinliği ise %2-20 arasında bulunmuştur. Bu çalışmayla kıyaslandığında, bizim çalışmamızdaki yükleme oranı ve yükleme etkinliği değerleri çok daha yüksektir. Bu durum bahsedilen çalışmada hazırlanan misellerin çekirdeğini meydana getiren PDC'lerin hidrofobik kısmını oluşturan lineer PCL bloğun, bizim çalışmamızda hazırlanan misellerin çekirdeğini meydana getiren PDC'lerin hidrofobik kısmını oluşturan G3 polyester dendron yapısına göre daha küçük bir alan işgal etmesinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Zira, elde ettikleri misel boyutları (~40-50 nm) da hidrofobik ilacın yerleşeceği çekirdek bölgesinin daha küçük olduğunu göstermektedir⁶².

5.9.3. Adapalen Yüklü Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıların TEM Bulgularının Değerlendirilmesi

DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonun fiziksel stabilitesinin uygun olduğu, 4. ayda elde edilen partikül boyutu (298,7 $\pm$ 29,2 nm) ve dağılımı (PDI: 0,25 $\pm$ 0,04) bulguları ile saptandı (Tablo 4.48). Makul partikül boyutu (297,1 $\pm$ 21,3 nm) ve homojen boyut dağılımı gösteren (PDI: 0,19 $\pm$ 0,02), yüksek oranda etken madde yüklenen (394,3 $\pm$ 7,6 μ g/ml) ve 4 aylık izleme süresi içerisinde partikül boyutu ve dağılımı

açısından kararlı olduğu saptanan DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyon, *in vitro* penetrasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi.

Seçilen DMc 1 A500 1PEG S kodlu formülasyonun TEM analizleri yapılarak, adapalen yüklü dendron temelli misellere ait şekil ve yüzey morfolojisi incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.16’da gösterilmektedir. TEM görüntüleri adapalen yüklü misellerin küresel, nano boyutta olduğunu ve homojen dağıldığını gösterdi. TEM analizlerinde görüntülenen misel boyutlarının, DLS tekniği ile elde edilen boyutlara göre daha küçük bulunmaları daha önce de belirtildiği gibi, DLS ile partiküllerin hidrodinamik çaplarının ölçülmesine; sulu dispersiyon ortamı molekülleri ile sarılan partiküllerin ölçülen hidrodinamik çaplarının gerçek geometrik boyutlardan daha büyük bulunmasının olağan olmasına bağlandı⁴¹³. Bu bulgular literatür ile uyumludur^{311,315}. Literatürde ayrıca; TEM analizlerinde DLS ölçümlerine göre küçük boyutların gözlenmesi, TEM numunelerinin hazırlanma prosesi sırasında nanopartiküllerin dehidrasyonuna ya da negatif boyama ile boyutların değişmesine bağlı olabileceği de açıklanmaktadır^{414,415}.

5.10. Adapalen Yüklü Dendritik Nanotaşıyıcıların Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Jellerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Uygulama kolaylığı, doğru dozlama, reolojik özellikler ve deriye daha iyi adezyon sağlaması için adapalen yüklü optimum dendritik nanotaşıyıcıları içeren sistemler jelleştirildi. Seçilen iki farklı dendritik nanotaşıyıcı sistemin; adapalen yüklü PAMAM dendrimerler ve adapalen yüklü dendron temelli misellerin (PDC-misel) jel formülasyonları, jelleştirici ajan olarak hidroksi propil selüloz (HPC) kullanılarak hazırlandı. Böylece, adapalenin derideki birikiminin değerlendirilmesine yönelik *in vitro* penetrasyon çalışmaları ile kıl foliküllerine hedeflenmesi açısından geliştirilen formülasyonların performansının pazarda bulunan ticari orijinal ürün ile (Differin®Jel) karşılaştırılması amaçlandı.

HPC, farmasötik ve kozmetik endüstrisinde viskoziteyi arttırmak veya jel formülasyonları hazırlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelleştirici ajanı olarak sağladığı avantajlar arasında; düşük konsantrasyonlarda yüksek viskozite sağlamak, sıcaklığa karşı dayanıklılık, formülasyonların stabilitesini arttırmak, hoş bir dokuya sahip olmak sayılabilir. Bakteri veya mantar üremesine son derece dayanıklıdır, iritasyona sebep olmaz⁴³⁶. pH 6-8 arasında düşük sıcaklıkta HPC’nin hidrolizi minimal seviyede olduğu belirtilmektedir^{437,438}.

Farklı konsantrasyonlarda HPC (%1-2, a/h) ile hazırlanan adapalen veya nanotaşıyıcı içermeyen jellerde yapılan tek noktalı viskozite ölçümlerinde ($\gamma=5 \text{ s}^{-1}$), dispersiyon ortamında HPC konsantrasyonu arttırıldığında, jelin viskozitesinde de beklendiği gibi artış gözlemlendi. %1 HPC ile hazırlanan jelin viskozitesinin yetersiz; fakat %1,5 ve % 2 HPC ile hazırlanan jellerin viskozitelerinin ise kabul edilebilir olduğu sonucuna varıldı (Tablo 4.52). Jel formunda deriye sürülerek uygulanabilecek; ama aynı zamanda etken madde yüklü nanotaşıyıcıların üç boyutlu jel matriksinden salımını geciktirmeyecek bir taşıyıcı ortamı sağlamak için düşük konsantrasyonda jelleştirici madde kullanılması amaçlandı. En yaygın kullanılan topikal taşıyıcılardan olan krem ve jellerin nanopartiküllerde yüklü bulunan etken maddelerin yeterli düzeyde salımını önleyebileceği, bunun da koloidal yarı katı topikal formülasyonlar kullanılan bazı çalışmalarda elde edilen zayıf penetrasyon etkinliği bulgularının başlıca sebeplerinden biri olduğu literatürde açıklanmıştır^{372,439}. Bu yüzden dendritik nanotaşıyıcılara yüklenen adapalenin deriye uygulandığında etkili şekilde salımını sağlayacak, bir yarı katı taşıyıcı ortamı sağlamak için dendritik nanotaşıyıcıların % 1,5 (a/h) oranında HPC ile jel formülasyonlarının hazırlanmasına karar verildi.

Reolojik özellikler, eczacılıkta bilhassa emülsiyon, süspansiyon ve yarı katı ilaç şekillerinde hazırlanan preparatın kararlılık, kıvam, uygulanabilirlik ve görünüm özelliklerini belirler. Viskozite, bir akışkanın akmaya karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. Viskozite arttıkça akışa gösterilen direnç de artar. Bu durumda viskozite akışkanın akmaya karşı gösterdiği direnç ile doğru, akışkanlık ile ters orantılıdır⁴⁴⁰. Seçilen adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları (PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG/ PAMAM-AQ) içeren PAMAM-Jel, seçilen adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcıları (DMc 1 A50 1PEG S/ Dendron-AQ) içeren PDC-misel-Jel formülasyonları ile bu nanotaşıyıcı sistemlerin bulunduğu dispersiyon ortamında (%1 PEG 400-Su) aynı oranda (%1,5) HPC ile hazırlanan plasebo jel formülasyonu (1.5 HPC-1PEG) ve Differin® Jel üzerinde viskozite ölçümleri yapıldı, reolojik özellikleri incelendi.

%1,5 HPC ile hazırlanan jellere ($\eta_{1.5 \text{ HPC}}=9,19\pm0,09 \text{ Pa s}$) %1 (a/h) oranında PEG 400 ilave edildiğinde ($\eta_{1.5 \text{ HPC-1PEG}}=4,23\pm0,12 \text{ Pa s}$) viskozitenin azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.53). Literatür taramasında benzer şekilde hazırlanan topikal jel formülasyonlarında PEG 400'ün viskoziteyi azalttığı bildirilmiştir⁴⁴¹. Plasebo jel ile PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel'in viskozitesi karşılaştırıldığında, PDC-misel-Jel'in viskozitesinde hafif bir

artış olmakla birlikte aralarında çok fark olmadığı (Tablo 4.53), jel ortamına ilave edilen nanotaşıyıcıların viskoziteyi çok etkilemediği sonucuna varıldı. Hazırlanan dendritik nanotaşıyıcıları içeren jeller ile Differin®Jel'in viskozitesi ($\eta_{\text{Differin}^{\circledR}\text{Jel}} = 24,44 \pm 0,17 \text{ Pa s}$) arasında belirgin bir fark olduğu saptandı. Daha önce açıklanan sebep yüzünden, dendritik nanotaşıyıcıların jelleştirilmesinde, Differin®Jel'in viskozitesine eşdeğer viskozite yakalanması da amaçlanmadı. Aynı formülasyonların reolojik özellikleri incelendiğinde, Casson modeli⁴⁴² kullanılarak hesaplanan plastik viskozite (η_c) ve eşik kayma gerilimi (τ_0) (*yield stress*) değerlerinin PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel'de Differin®Jel'e göre belirgin şekilde daha düşük olduğu görülmektedir (Tablo 4.54). Kayma hızı oranına (γ) karşı viskozitenin (η) değişiminin verildiği karşılaştırmalı reogram formülasyonların psödoplastik (*shear thinning*) davranış sergilediğini göstermektedir (Şekil 4.17).

Psödoplastik akış, *Newtonian* olmayan bir akış tipidir. Kayma geriliminin kayma hızı oranı (kayma deformasyonunun değişme hızı, *shear rate*) ile orantılı olarak arttığı *Newtonian* akış gösteren sıvıların aksine, *Newtonian* olmayan akış, kayma hızı oranı ile kayma geriliminin aynı oranda artmadığı; bu yüzden viskoziteleri kayma hızına bağlı olan sistemlerde gözlenir. *Newtonian* olmayan akış gösteren sistemlere emülsiyonlar, süspansiyonlar, losyonlar ve merhemler örnek gösterilebilir. Psödoplastik akış gösteren sistemlerde kayma hızı arttıkça viskozite azalır. Bunlara kayma ile incelen (*shear thinning*) sistemler tanımlanır^{440,443}. Psödoplastik akış, hazırlanan bir preparatın primer ambalajına kolay doldurulması, kullanım sırasında, tüpten rahat çıkması, şişeden akması, enjektör iğnesinden geçebilmesi veya deri yüzeyinde düzgün şekilde yayılabilmesini sağlar⁴⁴⁰.

Yayılabilirlik bulguları incelendiğinde; adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcıları içeren jellerin, PAMAM-Jel ($5,2 \pm 0,2 \text{ cm}^2$) ve PDC-misel-Jel ($5,4 \pm 0,4 \text{ cm}^2$), Differin®Jel'e ($2,4 \pm 0,3 \text{ cm}^2$) kıyasla aynı sürede daha büyük bir alana yayıldığı gözlemlendi (Tablo 4.55). Bu durum PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel formülasyonlarının viskozitelerinin Differin®Jel'e göre daha düşük olması yönünden beklenen bir durumdur. Elde edilen bu sonuçlarla hazırlanan dendritik nanotaşıyıcıları içeren jellerin uygulandığı bölgede kolayca ve homojen olarak yayılabileceği; bu yüzden topikal uygulama için uygun oldukları sonucuna varıldı¹⁷.

PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel formülasyonları ile Differin®Jel'in pH'ları indikatör kağıtları ile tespit edildi. Dijital pH metre ile 25 °C'de yapılan ölçümlerde plasebo jelin (1.5 HPC-1PEG) pH'sı $6,4\pm0,2$ olarak ölçüldü. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan ultra saf suyun (Milli-Q® water, 18.2 MΩ.cm) normal şartlarda pH'sı 6,998 olarak bilinmektedir. Fakat su arıtma cihazı (Millipore Milli-Q, Merck) ile elde edilen suyun pH değerinin sistemden alındıktan sonra hızla değişebildiği bildirilmektedir⁴⁴⁴. Zaten deneyler sırasında çeşitli zamanlarda arıtma cihazından alınan saf suda yapılan ölçümlerde pH değerinin ~6,5 civarında olduğu saptandı. Bu durum havada doğal olarak bulunan karbon dioksitin suda çözünmesiyle bikarbonat üretimine bağlı olarak saf suyun pH değerini düşürmesine bağlanmaktadır⁴⁴⁵. 1.5 HPC-1PEG kodlu jelin pH'sının da $6,4\pm0,2$ olarak bulunması, PEG 400 ve HPC'nin de non-iyonik^{446,447} karakterde olduğu dikkate alındığında beklenen bir sonuçtur. PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel'e ait pH'ların ise sırasıyla, 7-7,5 ve 6-6,5 arasında (Şekil 4.18a ve 4.18b) olduğu, Differin®Jel'in pH'sının ise ~5 civarında (Şekil 4.19) olduğu tespit edildi. PAMAM-AQ ve Dendron-AQ kodlu sulu koloidal dispersiyonların pH'larının da sırasıyla ~7 ve ~6-6,5 civarında olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ile elde edilen pH'ların uyumlu olduğunu göstermektedir. Differin®Jel'in pH'sının 5 olduğu literatürde de kayıtlıdır⁴⁴⁸. Deriye uygulanacak topikal preparatlar için pH 5-7 aralığı uygun kabul edilmektedir⁴⁴⁹.

Hazırlanan PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel formülasyonlarında, buzdolabı koşullarında ($5^{\circ}\text{C}\pm3^{\circ}\text{C}$) 1 hafta süre ile saklandıktan sonra, adapalen miktarları saptanarak etken maddenin dendritik nanotaşıyıcıları içeren jellerden geri kazanımı belirlendi. Differin®Jel'de bulunan adapalen miktarı ayrıca yapılan geri kazanım çalışmaları ile doğrulandı. Jelleştirme öncesinde sıvı formda bulunan nanotaşıyıcı sistemlerdeki adapalen konsantrasyonu bilindiği için, hazırlanan jel formülasyonlarında bulunan teorik adapalen yüzdeleri (a/a) hesaplandı. Adapalen yüklü nanotaşıyıcıları içeren PAMAM-Jel ve PDC Misel-Jel formülasyonları ile Differin®Jel'de bulunan adapalen konsantrasyonları sırasıyla, %0,03 (a/a), %0,04 (a/a) ve %0,1 (a/a) olarak belirlendi (Tablo 3.26). Jel formülasyonlarında adapalenin geri kazanım bulguları uygun bulundu (PAMAM-Jel için $98,31\pm3,74$, PDC Misel-Jel için $96,49\pm4,47$ ve Differin®Jel için $97,25\pm4,44$) (Tablo 4.56).

Adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarında ve Differin®Jel'de etken maddenin fiziksel durumu, bir floresan mikroskop (Leica Microsystems, 40X) ile görüntülendi. PMM 0.05-S-A10-3:1-1PEG (PAMAM-AQ) ve DMc 1 A500 1PEG S (Dendron-AQ) kodlu formülasyonlar ile bu sistemlerle hazırlanan nanopartiküler jel formülasyonları, PAMAM-Jel ve PDC Misel-Jel, ve ayrıca Differin®Jel'de bulunan adapalenin fiziksel durumu incelendi. Adapalen yüklü PAMAM dendrimerler ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının sulu koloidal dispersiyon ve jel ortamında homojen bir şekilde dağıldığı gözlemlendi (Şekil 4.20-4.24). Formülasyon ana bileşenleri karbomer 940, poloksamer 182, edetat disodyum, propilen glikol, saf su olarak bildirilen⁴⁵⁰ ticari üründe (Differin®Jel) ise adapalenin heterojen bir dağılım gösteren mikro kristaller halinde dağılmış bulunduğu gözlemlendi. Differin®Jel daha önce de adapalen mikro kristallerinin (3-10 µm) bir süspansiyonu olarak tanımlanmıştır³⁸.

5.11. *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Topikal hedeflendirmede son yıllarda çıkan makalelerde *in vitro* perkütan absorpsiyon çalışmalarında daha çok epidermis ve dermisin bir bütün halde bulunduğu tam kalınlıkta deri kullanıldığı dikkat çekmektedir⁴⁵¹⁻⁴⁵³. Bu yüzden *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları sırasında deri tabakalarındaki birikim ön planda olduğu için yerel bir kesim evinden temin edilen domuz derisinin dermatom edilmeden “tam kalınlıkta” (*full-thickness*) kullanılması uygun görüldü.

Finite doz uygulaması yapılacak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında jel formülasyonlarının kullanılacak yöntem ile (PAMAM-Jel, PDC Misel-Jel ve Differin®Jel) Franz difüzyon hücrelerine yerleştirilen deri yüzeyine homojen şekilde yayılmasını sağlanması açısından, uygulanabilirliğini değerlendirildi. Bu amaçla; penetrasyon çalışmaları öncesinde NK içeren %1,5 oranında HPC ile hazırlanan jel örneği Franz hücresine sabitlenen domuz derisine uygulandı ve formülasyonların deriye tatbik yönteminin uygun olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.25).

Finite doz koşullarında, formülasyonda etken madde konsantrasyonu deneyler sırasında etken maddenin deriye penetrasyonu ile veya ek olarak evaporasyon sebebiyle değişir⁴⁵⁴. Genel olarak gerçekçi veriler elde etmek için deneysel koşullarda *in vivo* durumun olabildiğince yakın bir şekilde taklit edilmesi istenir. Deri yüzeyine uygulanacak olan ve penetrasyona uğrayan etken maddeyi içeren formülasyonun miktarı ve konsantrasyonu, uygulama süresi gibi parametreler çalışmanın amacına bağlıdır.

Topikal formülasyonların klinik durumlarda yaygın olarak nispeten küçük miktarlarda (*finite* dozda) uygulandığı dikkate alındığında; *in vivo* koşulların taklidi için *in vitro* deneyler sırasında da küçük miktarlarda formülasyon uygulanması ideal kabul edilir⁴⁵⁴. *Finite* doz uygulamasının doğası gereği, *in vitro* koşullarda küçük miktarlarda dozların deri gibi bir membrana eşit şekilde uygulanması zor olduğu için deneyler arası varyasyona sebep olabilir⁴⁵⁵. *Finite* dozda deriye uygulanan ilaçların topikal biyoyararlanımı birim alan başına uygulanan ilaç miktarına bağlı⁴⁵⁶ olduğu için deney içi ve deneyler arasında varyasyonu en aza indirmek için donörde uygulama alanı üzerinde homojen ilaç dağılımını sağlamak son derece önemlidir. *Finite* dozda yapılan çalışmalarda sınırlı miktarda etken madde uygulandığı için, deneylerin bitiminde uygulanan toplam dozun geri kazanım oranının tespit edilmesi beklenir. OECD rehberlerine göre etken maddenin ve metabolitlerinin ortalama geri kazanım değerlerinin $100 \pm 10\%$ aralığında olması; eğer bu kriter karşılanamıyorsa da sebebinin ortaya konması istenir^{356,454,457}.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deriye uygulanan formülasyonlardan adapalenin foliküler birikimini kantitatif olarak değerlendirmek ve ayrıca deriye geçen etken madde miktarlarını belirlemek üzere *punch* biyopsi çalışmaları yapıldı. Deride kıl foliküllerine hedeflendirmeye yönelik son yıllarda yapılan araştırmalarda yeni bir yöntem olan *punch* biyopsi yönteminin kullanılması dikkat çekmektedir¹⁹⁸. *Punch* biyopsi uygulamalarında, bir kıl folikülü ile birlikte yağ (sebase) bezlerinden oluşan piloseböz ünite (PSU)'yi içeren foliküler birikim bölgeleri ve kontrol grubu olarak da kıl folikülü içermeyen deri bölgelerinden yararlanıldı. Herhangi bir uygulama yapılmamış deri örneklerinden, kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) ve kıl folikülü içeren (KF-Poz) bölgelerden alınan biyopsilerin ışık mikroskobu altında görünümü Şekil 4.26'da, *punch* biyopsi uygulaması sonrasında derinin görünümü ise Şekil 4.27'de gösterilmiştir.

Foliküler hedefleme açısından hem salt dendritik nanotaşıyıcıları içeren su bazlı koloidal dispersiyonlar (PAMAM-AQ ve PDC-misel-AQ) hem de hazırlanan dendritik nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarının (PAMAM-Jel ve PDC-misel-Jel) gösterdikleri performans Differin® Jel ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

PAMAM dendrimerler ile hazırlanan adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcı sistemler ve adapalenin pazarda bulunan ticari preparatı ile 24 saat *in vitro* penetrasyon

çalışmaları gerçekleştirildikten sonra *punch* biyopsi ile derideki adapalen miktarları tespit edildi. Bu amaç ile, deriye uygulanan formülasyon ve etken madde miktarları; PAMAM-Jel (%0,03) için $3,6 \pm 0,38$ mg jel/cm² ile $1,1 \pm 0,11$ µg adapalen/cm²; PAMAM-AQ (%0,03) için $11,5$ µl sulu koloidal dispersiyon/cm² ile $3,4$ µg adapalen/cm²; Differin®Jel (%0,1) için $3,4 \pm 0,14$ mg jel/cm² ile $3,4 \pm 0,14$ µg adapalen/cm² olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.57). Bu şekilde *finite* doz koşulları sağlanmıştır. Çözeltiler için 10 µl/cm²'ye kadar, yarı katı preparatlar için 10 mg/cm²'ye kadar uygulanan dozlar *finite* doz kabul edilmektedir^{458,459}.

Aynı şekilde, dendron temelli miseller ile hazırlanan adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcı sistemler ve adapalenin pazarda bulunan ticari preparatı ile 24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra *punch* biyopsi ile adapalenin deriden penetrasyonu incelendi. Bu amaç ile, deriye uygulanan formülasyon ve etken madde miktarları; PDC-misel-Jel (%0,04) için $3,5 \pm 0,09$ mg jel/cm² ile $1,4 \pm 0,04$ µg adapalen/cm²; PDC-misel-AQ (%0,04) için 8 µl sulu koloidal dispersiyon/cm² ile $3,4$ µg adapalen/cm²; Differin®Jel (%0,1) için $3,4 \pm 0,14$ mg jel/cm² ile $3,4 \pm 0,14$ µg adapalen/cm² olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.60). Bu şekilde *finite* doz koşulları sağlanmıştır.

Adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcılar (PAMAM dendrimer ve dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının sulu dispersiyonları ile bunların jel formülasyonları) ve ticari preparat ile elde edilen punch biyopsi bulguları (Tablo 4.58-4.59 ve Tablo 4.61-4.62) de verilmiştir. Bu tabloda da görüldüğü gibi; KF içeren 10 adet biyopsi örneğinde (KF-Poz) saptanan adapalen miktarları (ng/7,85 mm²); KF içermeyen 10 adet biyopsi örneğinde (KF-Neg) saptanan adapalen miktarları (ng/7,85 mm²); biyopsi örnekleri alındıktan sonra kalan deride saptanan adapalen miktarları (ng/cm² KF içeren biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarının KF içermeyen biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarına oranı olarak ifade edilen foliküler hedefleme faktörü (FHF: KF-Poz/KF-Neg); 24 saat uygulama süresi sonunda deri yüzeyinden silinerek uzaklaştırılan formülasyon fazlasında saptanan penetre olmadan kalan adapalen miktarları (µg/cm²); deriye geçtiği saptanan toplam adapalen miktarları (ng/cm²); uygulanan doza kıyasla saptanan toplam geri kazanılan adapalen oranı (%) ve uygulanan doza kıyasla deriye geçtiği saptanan toplam adapalen miktarını ifade eden deriye penetrasyon etkinliği (%) değerlendirilmiştir.

PAMAM-Jel, PAMAM-AQ ve Differin®Jel'den; KF-Poz biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları sırasıyla; $9,6 \pm 5,2$ ng/7,85 mm², $15,5 \pm 4,7$ ng/7,85 mm² ve

7,3±2,9 ng/7,85 mm²; KF-Neg biyopsi örneklerinde, 1,3±0,4 ng/7,85 mm², 2,2±1,2 ng/7,85 mm² ve 1,9±1,0 ng/7,85 mm²; FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri 8,8±2,6; 7,4±2,1 ve 5,9±2,5 olarak saptanmıştır (Tablo 4.58).

PAMAM-Jel, PAMAM-AQ ve Differin® Jel'den; deri yüzeyinde kalan adapalen miktarları sırasıyla 0,89±0,16 µg/cm², 2,50±0,18 µg/cm² ve 2,85±0,15 µg/cm²; deriye geçen toplam adapalen miktarları 76,7±28,6 ng/cm²; 211,9±51,0 ng/cm² ve 77,0±29,2 ng/cm²; adapalenin geri kazanım oranları %91,8±7,4; %81,7±2,3 ve %86,9±5,7; deriye penetrasyon etkinlikleri %7,3±2,7; %6,4±1,5 ve %2,3±0,8 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.59).

PAMAM-Jel, PAMAM-AQ ve Differin® Jel formülasyonlarından adapalenin kıl foliküllerinde (KF-Poz) birikimi deride kıl folikülü olmayan alanlara (KF-Neg) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PAMAM-Jel, KF-Poz'da KF-Neg alanlara göre en az 7 kat (p=0,0078); PAMAM-AQ, KF-Poz'da KF-Neg alanlara göre en az 7 kat (p=0,0002) ve Differin® Jel, KF-Poz'da KF-Neg alanlara göre en az 4 kat (p=0,0128) fazla birikmiştir. PAMAM-AQ ile, Differin® Jel'e göre kıl foliküllerine ulaşan adapalen miktarı anlamlı olarak (p<0,05) artmıştır (yaklaşık 2 katına) (Şekil 4.28). Kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli açısından karşılaştırma yapmak üzere hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri incelendiğinde; formülasyonlar arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.29).

Formülasyonlardan deriye geçen adapalen miktarları karşılaştırıldığında PAMAM-AQ ile, Differin® Jel (p<0.001) ve PAMAM-Jel'e (p<0.001) göre deride yaklaşık 3 kat fazla adapalen birikmiştir (Şekil 4.30). Uygulanan doza oranla deriye geçen adapalen miktarları açısından değerlendirildiğinde PAMAM-AQ'nun penetrasyon etkinliği Differin® Jel'e göre yaklaşık 2,8 kat (p<0.01); PAMAM-Jel'in penetrasyon etkinliği Differin® Jel'e göre yaklaşık 3,2 kat (p<0.01) fazla bulunmuştur (Şekil 4.31).

Sonuçta, PAMAM-Jel formülasyonu adapaleni kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli, adapalenin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi açısından Differin® Jel ile benzer performans göstermiştir. Diğer taraftan, PAMAM jel formülasyonundaki adapalen içeriği, Differin® Jel'de bulunan miktarın yaklaşık 1/3 ü oranında olmasına rağmen tasarlanan bu yenilikçi jel formülasyonu ile ilacın deriye penetrasyon etkinliği ~3,2 kat artmıştır. 24 saat içinde PAMAM-Jel'den uygulanan dozun %7,3 (±2,7)'ü ve ticari üründen uygulanan dozun %2,3 (±0,8)'ü deriye geçmiştir.

Dolayısı ile, ticari ürüne göre çok daha düşük doz ile benzer performans edildiği gösterilmiştir.

PAMAM-AQ formülasyonu ile Differin®Jel'e göre adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi açısından yaklaşık 2 kat, derinin tamamındaki birikimi açısından yaklaşık 3 kat artış sağlanmıştır. Her iki formülasyonla deriye aynı dozda adapalen uygulanmış, PAMAM-AQ ile ilacın deriye penetrasyon etkinliği (~2,8 kat) artmıştır. 24 saat içinde PAMAM-AQ'den uygulanan dozun %6,4 ($\pm 1,5$)'ü ve ticari üründen uygulanan dozun %2,3 ($\pm 0,8$)'ü deriye geçmiştir. PAMAM dendrimerlerin *finite* doz koşullarında sulu koloidal dispersiyon formu ile jel formu arasında deriye geçen adapalen miktarları açısından aralarında anlamlı fark bulunmuştur. PAMAM-AQ ile PAMAM-Jel'e göre deride yaklaşık (~3 kat) ($p < 0.001$) fazla adapalen birikmiştir.

Uygulamada, yaklaşık %70 daha düşük konsantrasyonda adapalen içermesine rağmen, PAMAM-Jel formülasyonu ile adapalenin deriye penetrasyon etkinliğinin artırılması ve adapalenin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi açısından Differin®Jel'in sergilediğine benzer bir performans elde edilmesi; PAMAM-Jel formülasyonunda adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının boyutları ($r_h = 256 \pm 12$ nm; $PDI = 0,19 \pm 0,01$) ile Differin®Jel'de bulunan adapalen mikro kristallerinin boyutları ($3-10 \mu m$)³⁸ karşılaştırıldığında; adapalen yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının sahip oldukları daha küçük partikül boyutları sayesinde deri yüzeyine uygulanmalarını takiben uygulanan partiküllerin Differin®Jel'deki adapalen kristallerine göre, daha büyük bir kısmının kıl foliküllerine penetre olabilmesi ile açılanabileceği düşünülmektedir.

Deriye aynı dozda adapalenin uygulandığı PAMAM-AQ formülasyonu ile Differin®Jel'e göre adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi açısından yaklaşık 2 kat, derinin tamamındaki birikimi açısından yaklaşık 3 kat artış sağlamanın sebebi de aynı şekilde açıklanabilir. Deri yüzeyine uygulanan farklı boyut ve yapıdaki partiküllerin foliküler açıklıklarda birikerek foliküler yolak boyunca penetre oldukları, penetrasyon derinliklerinin ise büyük ölçüde büyüklüklerine bağlı olduğu literatürde kayıtlıdır²⁰⁸. Örneğin, boyutları 750 nm ve 6 μm arasında değişen partiküllerin kıl foliküllerine penetrasyonları karşılaştırıldığında; 750 nm boyutta olanların kıl foliküllerine daha etkin şekilde penetre oldukları; 750 nm ve 1,5 μm boyutlarda partiküllerin 3-6 μm boyutunda mikropartiküllere göre kıl foliküllerinde penetrasyon derinliklerinin daha fazla olduğu

gösterilmiştir³⁷⁶. Literatürde, kıl foliküllerine penetrasyonun sağlanmasında optimum partikül boyutları, bir çalışmada 320 nm ve 750 nm arasında öngörülmüş¹⁰³, 122-1000 nm arasında değişen boyutlarda, farklı yüzey özelliklerine sahip, farklı tipte materyallerle hazırlanan partiküllerin incelendiği başka bir çalışmada yapılan analizler sonucunda yaklaşık 300-600 nm'lik partiküllerin kıl foliküllerine penetrasyon kabiliyetleri diğerlerine göre daha fazla bulunmuştur. Aynı çalışmada, 230 nm ve 300 nm boyutlarda nanopartiküllerin kıl folikülü kanalında özellikle yağ bezlerin olduğu derinliğe penetre olabildikleri gösterilmiştir²¹³.

PAMAM jel formülasyonu ile adapalenin deriye penetrasyon etkinliğinin artmasında ve adapalenin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi açısından daha düşük dozda adapalen ile; Differin®Jel'in sergilediğine benzer bir performans elde edilmesinde; ikinci bir faktör olarak PAMAM dendrimerlerin sahip olduğu pozitif yükün önemli bir katkısı olmuş olabileceği düşünülmektedir. Bu durum deri ve deri uzantısı olan kıl foliküllerinin negatif yüklü⁴⁶⁰ olması sebebiyle, pozitif yüklü PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının deriye ve kıl foliküllerine afinite göstermesi; bu yüzden penetrasyon kabiliyetinin fazla olması ile açıklanabilir. Deriye aynı dozda adapalenin uygulandığı PAMAM-AQ formülasyonu ile Differin®Jel e göre adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi açısından yaklaşık 2 kat, derinin tamamındaki birikimi açısından yaklaşık 3 kat artış sağlamanın sebebi de aynı şekilde açıklanabilir.

Literatürde de foliküler hedeflendirmede partikül boyutunun yanı sıra yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerin de etkili olabileceği; deri ve kıl foliküllerinin yüzey yükünün negatif olmasının pozitif yüklü partiküllerin bu yapılara bağlanmasını kolaylaştıracağı; bu yüzden katyonik partiküllerin foliküler penetrasyonda yardımcı olacağı belirtilmektedir^{461,462}. PAMAM dendrimerlerin penetrasyon arttırıcı etkilerinin moleküler boyut, yüzey yükü ve konsantrasyona bağlı olduğu ifade edilmektedir. Penetrasyon arttırıcı etkinliğin katyonik yüzey gruplarına sahip dendrimerler için daha yüksek olduğu gösterilmiştir^{305,359}.

Ayrıca, PAMAM-Jel formülasyonu ile adapalenin deriye penetrasyon etkinliğinin arttırılması ve daha az etken madde içerdiği halde kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamında Differin®Jel ile benzer oranda adapalen birikimi sağlamasında, PAMAM dendrimerlerin adapalen ile kompleks oluşturarak etken maddenin sudaki çözünürlüğünü arttırmasının da etkili olduğu düşünülmektedir. Deriye aynı dozda adapalenin

uygulandığı PAMAM-AQ formülasyonu ile Differin®Jel'e göre adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi açısından yaklaşık 2 kat, derinin tamamındaki birikimi açısından yaklaşık 3 kat artış sağlamasının sebebi de aynı şekilde açıklanabilir. Literatürde, G5 PAMAM-NH₂ dendrimerle yapılan bir çalışmada model olarak seçilen NSAİ'larla (ketoprofen ve diflunisal), ilaç-PAMAM dendrimer kompleksleri oluşturulmuş, hazırlanan bu komplekslerle ilaçların deriden geçişinin önemli ölçüde arttırıldığı ileri sürülmüştür. PAMAM dendrimerlerin penetrasyon arttırıcı etkisinin NSAİ-PAMAM dendrimer kompleksleri ile yüklenen ilaçların suda çözünürlüğünün önemli ölçüde arttırılmasından veya PAMAM dendrimerlerin yüzeyinde bulunan çok sayıda katyonik yüklü primer amin gruplarının derinin bariyer fonksiyonunu değiştirmesinden kaynaklanmış olabileceği yorumu yapılmıştır¹⁸⁰.

PAMAM-Jel formülasyonunun, daha düşük adapalen dozu uygulaması ile; etken maddeyi kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli Differin®Jel'inkine benzer olması; PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının foliküler lokalizasyonlarına bağlı olarak sadece kıl foliküllerindeki adapalen birikimini arttırmasından ziyade, hem foliküler lokalizasyonlarına bağlı hem de örneğin pozitif yükleri sayesinde penetrasyon arttırıcı etkinliklerine bağlı olmak üzere genel olarak tüm deride adapalen birikimini arttırdığı için de olabileceği düşünülmektedir. Bu durum adapaleni kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli açısından Differin®Jel ile benzer olan PAMAM-AQ formülasyonu için de geçerlidir. Ayrıca Differin®Jel'de adapalenin mikro kristaller halinde bulunması, tamamen çözündüğü bir ortamda uygulanmasına kıyasla kıl foliküllerinde birikim açısından avantaj sağladığı düşünülmektedir. Differin®Jel için hesaplanan FHF değerinin (KF-Poz/KF-Neg oranı) yüksek çıkması, Differin®Jel'den KF-Poz'da deride kıl folikülü içermeyen diğer alanlara göre daha yüksek miktarda biriktiğini göstermektedir. Adapalenin Differin®Jel'den de KF-Poz'da KF-Neg alanlara daha fazla birikmesi mikro boyutta kristaller halinde bulunmasına ile açıklanabilir. Nitekim, çok yakın zamanda literatüre geçen bir çalışmada da adapalenin Differin®Jel'den, nispeten daha çözünür halde bulunduğu Differin®Krem'e kıyasla seçici olarak kıl foliküllerinde daha çok birikmesi, Differin®Jel'deki mikro kristal yapısına atfedildiği¹⁷.

PAMAM dendrimerlerin *finite* doz uygulama koşullarında sulu koloidal dispersiyon formu ile jel formu arasında deriye geçen adapalen miktarları açısından anlamlı bir fark bulunması; deriye uygulanan adapalen miktarlarının (*finite* koşulların

sağlandığı aralıkta) farklı olmasına (PAMAM-Jel (%0,03) için $3,6 \pm 0,38$ mg jel/cm² ile $1,1 \pm 0,11$ µg adapalen/cm²; PAMAM-AQ (%0,03) için $11,5$ µl sulu koloidal dispersiyon/cm² ile $3,4$ µg adapalen/cm²) bağlandı. PAMAM-AQ ile deri yüzeyine uygulanan adapalen miktarının PAMAM-Jel'e göre daha fazla olması (~3 kat) bağlandı. *Finite* dozlarda deriye uygulanan ilaçların topikal biyoyararlanımının birim alan başına uygulanan ilaç miktarına bağlı olduğu⁴⁵⁶ literatürde de vurgulanmaktadır. Bununla birlikte PAMAM-Jel formülasyonunda PAMAM dendrimer nanotaşıyıcılarının bulunduğu jel ortamı nanotaşıyıcılarla birlikte adapalenin deriye penetrasyonunu geciktirmiş de olabilir. Bu durum jel formülasyonunun doğası gereği çözelti formuna göre daha kıvamlı, viskoz bir yapıda olduğu için formülasyon ortamında dağılmış bileşenlerin termodinamik aktivitesini düşürerek deriye penetrasyonunu kısıtlamış olma ihtimali ile açıklanabilir. Termodinamik aktivite, formülasyondan kaçma eğiliminin göstergesi olarak⁴⁶³, taşıyıcı ortamının viskozitesine bağlı olarak deriden penetrasyon kabiliyetinin azalabileceği literatürde kayıtlıdır⁴⁶⁴.

Elde edilen bu sonuçlar ile adapalen yüklü PAMAM-Jel formülasyonunun topikal akne tedavisi için avantajlı olabileceğini gösterilmektedir. PAMAM dendrimerlerin, hem ilacın çözünürlüğünü artırma hem de hedeflenen etki bölgesinde birikme özellikleri ile adapalenin kıl foliküllerine etkili şekilde ulaştırılmasında potansiyel taşıyıcılar olabilecekleri ortaya konmuştur.

PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ ve Differin®Jel'den; KF-Poz biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları sırasıyla $5,1 \pm 1,3$ ng/7,85 mm², $7,7 \pm 2,8$ ng/7,85 mm² ve $7,3 \pm 2,9$ ng/7,85 mm²; KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan adapalen miktarları sırasıyla $0,5 \pm 0,1$ ng/7,85 mm², $0,7 \pm 0,2$ ng/7,85 mm² ve $1,9 \pm 1,0$ ng/7,85 mm²; hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri sırasıyla $13,3 \pm 4,1$; $11,7 \pm 4,0$ ve $5,9 \pm 2,5$ bulunmuştur. Tablo 4.62'ye göre, PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ ve Differin®Jel'den, deri yüzeyinde kalan adapalen miktarları sırasıyla $1,06 \pm 0,05$ µg/cm², $2,71 \pm 0,11$ µg/cm² ve $2,85 \pm 0,15$ µg/cm²; deriye geçen toplam adapalen miktarları $32,1 \pm 6,2$ ng/cm²; $110,3 \pm 22,7$ ng/cm² ve $77,0 \pm 29,2$ ng/cm²; adapalenin geri kazanım oranları %83,1±5,8; %84,4±5,6 ve %86,9±5,7; deriye penetrasyon etkinlikleri %2,3±0,5; %3,2±0,7 ve %2,3±0,8 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4. 61).

PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ ve Differin®Jel formülasyonlarından adapalenin kıl foliküllerindeki (KF-Poz) birikimi, deride kıl folikülü olmayan alanlara (KF-Neg)

göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PDC-misel-Jel, KF-Poz'da KF-Neg alanlara göre en az 10 kat ($p < 0,0001$); PDC-misel-AQ kıl foliküllerinde KF-'a göre yaklaşık 11 kat ($p=0,0061$) ve Differin®Jel KF-Poz'da KF-Neg alanlara göre en az 4 kat ($p=0,0128$) fazla birikmiştir. Kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli açısından karşılaştırma yapmak üzere hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri incelendiğinde; PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ formülasyonlarından KF-Neg alanlara kıyasla kıl foliküllerine hedeflenen adapalen oranları Differin®Jel'e göre daha yüksek bulunmuştur. PDC-misel-Jel için bu oranın Differin®Jel'e göre önemli derecede, yaklaşık 2,3 kat ($p < 0,05$) arttığı görülmektedir (Şekil 4.33). PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ kıl foliküllerine Differin®Jel ile benzer miktarlarda adapalen ulaştırılmıştır. PDC-misel-Jel'in Differin®Jel'e göre daha düşük dozda adapalen içermesine rağmen kıl foliküllerinde etkin şekilde adapalenin birikimini sağladığı görülmektedir (Şekil 4.32).

Formülasyonlardan deriye geçen adapalen miktarları karşılaştırıldığında; PDC-misel-AQ ile deride, Differin®Jel'e göre ortalama 1,4 kat fazla adapalen biriktiği görülmektedir, fakat istatistiksel analizde bu iki formülasyon arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. PDC-misel-Jel ile ise deride Differin®Jel'e göre ortalama 2,4 ($p < 0,05$) kat daha az adapalen biriktiği görülmektedir. Dendron temelli misellerin *finite* doz koşullarında sulu koloidal dispersiyon formu ile jel formu arasında deriye geçen adapalen miktarları açısından anlamlı bir fark bulunmuştur. PDC-misel-AQ ile deriye geçen adapalen miktarının PDC-misel-Jel formülasyonuna göre yaklaşık 3,4 kat ($p < 0,001$) fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.34). Uygulanan doza oranla deriye geçen adapalen miktarları açısından değerlendirildiğinde; PDC-misel-Jel, PDC-misel-AQ ve Differin®Jel formülasyonlarının penetrasyon etkinlikleri benzer bulunmuştur (Şekil 4.35).

Sonuç olarak; PDC-misel-Jel formülasyonundaki adapalen içeriği Differin®Jel'de bulunan miktarın yaklaşık %40'ı oranında olmasına rağmen bu yenilikçi jel formülasyonu ile kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli Differin®Jel'e göre (~2,3 kat) artmıştır. PDC-misel-Jel ve Differin®Jel arasında adapalenin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi ve penetrasyon etkinliği açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yani PDC-misel-Jel formülasyonu, %60 daha az adapalen içermesine rağmen, kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi ve penetrasyon etkinliği açısından Differin®Jel ile benzer performans göstermiştir. PDC-misel-AQ formülasyonu ise adapaleni kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli, adapalenin kıl folikülleri ile birlikte

derinin tamamındaki birikimi ve penetrasyon etkinliği açısından Differin® Jel ile benzer performans göstermiştir. Her iki formülasyonla deriye aynı dozda adapalen uygulanmış, 24 saat içinde PDC-misel-AQ'den uygulanan dozun %3,2 ($\pm 0,7$)'si ve ticari üründen uygulanan dozun %2,3 ($\pm 0,8$)'ü deriye geçmiştir.

Uygulanan doz açısından, %60 daha az adapalen içermesine rağmen PDC-misel-Jel formülasyonu ile adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi ve deriye penetrasyon etkinliği açısından Differin® Jel'in sergilediğine benzer bir performans elde edilmesinde; PDC-misel-Jel formülasyonunda adapalen yüklü dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının boyutları ($r_h=297,1\pm 21,3$ nm; $PDI=0,19\pm 0,02$) ile Differin® Jel de bulunan adapalen mikro kristallerinin boyutları ($3-10\ \mu\text{m}$)³⁸ karşılaştırıldığında adapalen yüklü dendron temelli misellerin sahip oldukları daha küçük partikül boyutları sayesinde deri yüzeyine uygulanmalarını takiben uygulanan partiküllerin Differin® Jel'deki adapalen kristallerine göre, daha büyük bir kısmının kıl foliküllerine penetre olabilmesi ile açıklanabilir.

Deri yüzeyine uygulanan farklı boyut ve yapıdaki partiküllerin foliküler açıklıklarda birikerek foliküler kanal boyunca penetre oldukları, penetrasyon derinliklerinin ise büyük ölçüde büyüklüklerine bağlı olduğu literatürde kayıtlıdır²⁰⁸. Örneğin saçlı deride kıl foliküllerine penetrasyonları karşılaştırılan ve boyutları 750 nm ve 6 μm arasında değişen partiküllerden 750 nm boyutta olanların kıl foliküllerine daha etkin şekilde penetre oldukları; 750 nm ve 1,5 μm boyutlarda partiküllerin 3-6 μm boyutunda mikropartiküllere göre kıl foliküllerinde penetrasyon derinliklerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir³⁷⁶. Literatürde, kıl foliküllerine penetrasyonun sağlanmasında optimum partikül boyutları, bir çalışmada 320 nm ve 750 nm arasında öngörülmüş¹⁰³, 122-1000 nm arasında değişen boyutlarda, farklı yüzeylere özelliklerine sahip, farklı tipte materyallerle hazırlanan partiküllerin incelendiği başka bir çalışmada yapılan analizler sonucunda yaklaşık 300-600 nm'lik partiküllerin kıl foliküllerine penetrasyon kabiliyetleri diğerlerine göre daha fazla bulunmuştur. Aynı çalışmada 230 nm ve 300 nm boyutlarda nanopartiküllerin kıl folikülü kanalında özellikle sebase bezlerin olduğu derinliğe penetre olabildikleri gösterilmiştir²¹³.

Deriye aynı dozda adapalenin uygulandığı PDC-misel-AQ formülasyonu ve Differin® Jel ile adapalenin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamındaki birikimi ve penetrasyon etkinliği açısından benzer performans elde edilmesinin sebebinin; iki

formülasyonun *in vitro* koşullarda deriye uygulanma yöntemleri arasındaki farktan, masaj etkisinden, kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir; çünkü PDC-misel-Jel formülasyonu ile daha az dozda adapalen uygulanmış olmasına rağmen PDC-misel-AQ ve Differin® Jel ile istatistiksel olarak benzer sonuçlar alınmıştır. *In vitro* koşullarda jel formülasyonları uygulanan adapalen dozunun deri yüzeyinde homojen dağılması için aplikatör yardımıyla deriye sürülerek uygulanmıştır, bu sırada düzgün yayılabilmeleri için masaj yapılmıştır. Halbuki sulu koloidal dispersiyon formunda olan PDC-misel-AQ formülasyonu otomatik mikro pipet yardımıyla deri yüzeyine damlatılarak uygulanmış, jellerde olduğu gibi etkili bir masaj uygulaması yapılmamıştır. Zira, daha önce nanopartiküllerin foliküler penetrasyonunun incelendiği bazı çalışmalarda, nanopartiküllerin kıl foliküllerinden penetrasyon etkinliğinin deriye masaj yapılarak uygulandıklarında önemli derecede arttığı gözlenmiştir^{9,465}.

%60 daha az adapalen içeren PDC-misel-Jel formülasyonu ile deriye geçen adapalen miktarları Differin® Jel ile elde edilen kadar olmamıştır ($p < 0.05$). Bu durum PDC-misel-Jel'deki adapalen dozunun çok daha az olmasına bağlanmaktadır. *Finite* dozlarda deriye uygulanan ilaçların biyoyararlanımının birim alan başına uygulanan ilaç miktarına bağlı olduğu⁴⁵⁶ literatürde de vurgulanmaktadır.

PDC-misel-Jel ile PAMAM-Jel formülasyonlarının penetrasyon etkinliği açısından Differin® Jel'e karşı gösterdikleri performansın farklı olmasından PAMAM-Jel'in penetrasyon etkinliğinin PDC-misel-Jel'e göre daha yüksek olması sonucu çıkarıldı. Bu durum, PAMAM-Jel'in içerdiği partiküllerin nano boyutta olması dışında, PDC-misel-Jel'de bulunan dendron temelli misellerin nötral yüzey yükü de dikkate alındığında, daha önce bahsedildiği gibi ikinci bir faktör olarak PAMAM dendrimerlerin sahip olduğu pozitif yüzey yükünün negatif yüklü⁴⁶⁰ olan deri ve kıl folikülleri ile etkileşime bağlı olarak nanopartiküllerin penetrasyon kabiliyeti üzerinde önemli bir katkısı olması ile açıklanabilir.

PDC-misel-Jel formülasyonunun, FHF (KF-Poz/KF-Neg) değeri ile ifade edilen, adapaleni kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyelinin Differin® Jel ile kıyaslandığında en az 2 kat yüksek yüksek olması, PDC-misel-Jel'de bulunan dendron temelli misel nanotaşıyıcılarının, Differin® Jel'e kıyasla daha seçici şekilde foliküler lokalizasyonlarına bağlı olarak kıl foliküllerindeki adapalen birikimini arttırması ile açıklanabilir. Bu noktada tektar vurgulamak gerekirse, hem nanopartiküler taşıyıcı sistemlerden ve

Differin®Jel'den adapalenin kıl foliküllerindeki birikimi deride kıl folikülü olmayan KF-Neg alanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Daha önce de açıklandığı gibi, Differin®Jel'de adapalenin mikro kristaller halinde bulunmasının, tamamen çözündüğü bir ortamda uygulanmasına kıyasla kıl foliküllerinde birikim açısından avantaj sağladığı düşünülmektedir¹⁷.

Bu bulgular değerlendirildiğinde, PDC-misel-Jel formülasyonunun, seçici olarak KF-Neg alanlara göre kıl foliküllerini tercih ettiği açıktır. Sahip oldukları daha küçük partikül boyutları sayesinde deri yüzeyine uygulanmalarını takiben uygulanan dendron temelli misellerin Differin®Jel'deki adapalen kristallerine göre, daha büyük bir kısmının kıl foliküllerine penetre olması ile bu durum açıklanabilir. PDC-misel-Jel formülasyonundan deriye geçen görece düşük ama kıl foliküllerinde tespit edilen Differin®Jel ile eşdeğer adapalen miktarları göz önünde bulundurulduğunda, nötral yüklü hidrofilik karakterde kabuğa sahip bir nanotaşıyıcı sistem olarak dendron temelli misellerin daha çok kıl folikülleri yolu ile deriye iyi penetrasyon sağlamış olduğu düşünülmektedir. Dendron temelli miseller ile, adapalenin seçici olarak kıl foliküllerinde biriktiğinin gözlenmesi, bu nanotaşıyıcıların adapaleni enkapsüle ederek içine hapsediği son derece hidrofilik kabuk yapısı ile deri bariyeri tarafından hidrofilik bir makromolekül gibi karşılanmasına sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Genel olarak, nanopartiküllerin deriye, keratinositlerin arasındaki boşlukları dolduran lipid matriksi izleyen hücreler arası (interselüler) yol, keratinositlerden geçen hücre içi (transselüler) yol ile kıl folikülleri, sebase bezleri ve ter bezlerinin oluşturduğu *shunt (transappendageal)* yol olmak üzere başlıca üç şekilde penetre olabileceği ileri sürülmektedir^{189,190}. Hücreler arası yol hücre içi yola göre daha üstündür^{89,102}. Hidrofobik moleküllerin deriye hücreler arası yolu kullanarak penetre olduğu, hidrofilik moleküllerin ise *stratum corneum*'u geçmek için tercihen korneositlerden geçen hücre içi yolu seçtiği belirtilmektedir. Ancak, hidrofilik maddelerin *stratum corneum*'un hidrofobik karakteri yüzünden deriden kolaylıkla penetre olamadığı da bilinmektedir¹⁰². *Stratum corneum* tabakasının devamlılığının bozulmasına yol açan kıl folikülü ve ter bezlerinin oluşturduğu foliküler yolak ise, nanopartiküllerin deriye penetrasyonunda alternatif bir giriş yolu olarak önem kazanmaktadır¹⁹¹. Yapılan bir çalışmada, foliküler açıklıkların *in vitro* koşullarda blokajı uygulaması (*hair follicle plugging*) sonrasında, kıl foliküllerinin tıkanmasına bağlı olarak hidrofilik maddelerin (partisyon kat sayısı, $\log P_{\text{yağ/su}} < 0$) deriden

permeasyonunda, lipofilik maddelere göre daha fazla azalma gözlenmiştir⁴⁶⁶. Kıl folikülleri ve ter bezleri gibi deri uzantılarının özellikle hidrofilik bileşikler ve makromoleküller için önemli bir permeasyon/penetrasyon yolu olduğunu gösteren birçok araştırma yayınlanmıştır⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹.

Dendron temelli misellerin *finite* doz koşullarında sulu koloidal dispersiyon formu ile jel formu arasında deriye geçen adapalen miktarları açısından anlamlı bir fark bulunması; deriye uygulanan adapalen miktarlarının (*finite* koşulların sağlandığı aralıkta) farklı olmasına (PDC-misel-Jel (%0,04) için $3,5 \pm 0,09$ mg jel/cm² ile $1,4 \pm 0,04$ µg adapalen/cm²; PDC-misel-AQ (%0,04) için 8 µl sulu koloidal dispersiyon/cm² ile $3,4$ µg adapalen/cm²) bağlandı. Zira, PDC-misel-AQ ile deri yüzeyine uygulanan adapalen miktarı PDC-misel-Jel'e göre (~2,4 kat) daha fazladır. *Finite* dozlarda deriye uygulanan ilaçların biyoyararlanımının birim alan başına uygulanan ilaç miktarına bağlı olduğu⁴⁵⁶ literatürde de vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, PDC-misel-Jel formülasyonunda dendron temelli misellerin bulunduğu jel ortamı, nanotaşıyıcılarla birlikte adapalenin deriye penetrasyonunu geciktirmiş olabilir. Bu durum daha önce de belirtildiği gibi; jel formülasyonunun daha kıvamlı, viskoz bir yapıda olması nedeniyle bileşenlerin termodinamik aktivitesini⁴⁶³ düşürmesi ve taşıyıcı ortamının viskozitesine bağlı olarak deriden penetrasyon kabiliyetini azaltması ile açıklanabilir⁴⁶⁴.

Elde edilen sonuçlar; adapalen yüklü PDC-misel-Jel formülasyonunun topikal akne tedavisi için avantaj sağlayabileceğini göstermektedir. Dendron temelli miselleri içeren jel formülasyonunun da, hem ilacın çözünürlüğünün artırılması hem de hedeflenen etki bölgesinde seçici birikme özellikleri ile adapalenin kıl foliküllerine hedeflendirilmesinde potansiyel taşıyıcılar olabilecekleri ortaya konmuştur.

Reseptör fazda etken maddenin çözünürlüğünü arttırmak için alkol ya da sürfaktan kullanımı durumunda deri ile olası etkileşimi önlemek için, *in vitro* penetrasyon çalışmalarında reseptör ortama BSA ilave edilmesi uygun görüldü. Literatürde bu amaçla reseptör fazda BSA kullanımı mevcuttur³⁴⁵. Yapılan çözünürlük çalışmalarında %4 BSA içeren pH 7,4 PBS (a/h) ortamında adapalenin sink koşulun sağlanması için yeterli miktarda çözündüğüne ($8,96 \pm 0,83$ µg/ml) karar verildi (Tablo 4.10). *In vitro* penetrasyon çalışmaları sonunda, adapalenin deriden geçip geçmediğini değerlendirmek için; PAMAM-AQ, Dendron-AQ, PAMAM-Jel, PDC Misel-Jel ve Differin®Jel'in deriye uygulanmasını takiben 24 saat sonunda reseptör fazdan (%4 BSA içeren pH 7,4 PBS) da

alınan örneklerde, BSA'nın çöktürülmesinden sonra yapılan HPLC analizlerinde adapalen tespit edilmedi. Bu elde edilen sonuçlar ile oldukça düşük TL değerine sahip analiz yöntemine rağmen reseptör faza geçen etken madde miktarının TL altında kaldığı saptandı. Adapalen yüklü dendritik nanotaşıyıcıların *in vitro* deriden 24 saat süre ile penetrasyon çalışmalarında sonunda adapalenin derinin tabakalarında lokalize olduğu ve etken maddenin sistemik dolaşıma geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olacağı şeklinde yorumlanmıştır.

Adapalenin PAMAM-Jel ve Differin®Jel ile *stratum corneum*'un farklı derinlikteki katmanlarında birikim ve dağılımının değerlendirilmesi için *Tape Stripping* olarak bilinen bant ile soyma yöntemi kullanıldı. Bant soyma, topikal formülasyonların kalite ve etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir. Formülasyonların topikal uygulanmasını takiben *stratum corneum* tabakasının yapışkan bantlar yardımıyla soyulması ve derinin daha alttaki tabakalarından ayrılması işlemidir. Girişimsel olmayan bu teknikle *stratum corneum*'daki hücre katmanları art arda uzaklaştırılır. Korneositleri ve formülasyondan penetre olan maddeleri içeren yapışkan bantların çeşitli çözücülerle ekstraksiyona tabi tutulmasıyla penetre olan maddeler klasik analitik yöntemler kullanılarak kantitatif olarak tayin edilebilir. Bu yöntem ile farklı formülasyonlardan penetre olan etken maddelerin derinin en üst tabakası olan *stratum corneum*'daki lokalizasyonu, *stratum corneum*'un hücre katmanlarındaki dağılımı hakkında bilgi edinilebilir, karşılaştırma yapılabilir⁴⁷⁰.

PAMAM dendrimer nanotaşıyıcıları ile hazırlanan PAMAM-Jel ve pazarda bulunan ticari preparatından deriye penetre olan adapalenin *stratum corneum*'daki lokalizasyonunu karşılaştırmalı olarak incelendi. 24 saat süre ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmaları sonrasında, deri örneklerine bant ile bantla soyma işlemi uygulandı. Bu amaçla; deriye uygulanan formülasyon ve adapalen miktarları, PAMAM-Jel (%0,03) için $3,60 \pm 0,11$ mg jel/cm² ile $1,05 \pm 0,03$ µg adapalen/cm²; Differin®Jel (%0,1) için $3,42 \pm 0,07$ mg jel/cm² ile $3,42 \pm 0,07$ µg adapalen/cm² olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.63).

24 saat sürdürülen *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben uygulama yapılan deri yüzeyindeki formülasyon fazlası dikkatli bir şekilde silinerek uzaklaştırıldıktan sonra bantla soyma prosedürü uygulandı. Bantlar gruplar halinde ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu ve yapılan HPLC analizleri ile *stratum corneum*'un farklı derinliklerindeki

penetre olmuş adapalen miktarları saptandı. *Stratum corneum* tabakasının farklı derinliklerinde tespit edilen adapalen miktarları en üst katmandan en alt katmana doğru PAMAM-Jel için sırasıyla, (T₁₋₂) 24,2±7,0 ng/cm²; (T₃₋₅) 13,0±3,9 ng/cm²; (T₆₋₁₀) 8,8±4,5 ng/cm²; (T₁₁₋₁₅) 5,1±4,4 ng/cm²; (T₁₆₋₂₀) 3,7±1,4 ng/cm² ve Differin®Jel için sırasıyla, (T₁₋₂) 48,3±11,4 ng/cm²; (T₃₋₅) 16,9±3,8 ng/cm²; (T₆₋₁₀) 10,6±1,7 ng/cm²; (T₁₁₋₁₅) 9,5±0,8 ng/cm²; (T₁₆₋₂₀) 6,9±5,3 ng/cm² olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.64). PAMAM-Jel ile kontrol olarak ticari preparattan (Differin®Jel) deriye penetre olan adapalenin *stratum corneum*'un katmanlarındaki birikim ve dağılımını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.40'ta verilmiştir.

Uygulanan doz açısından yaklaşık %70 daha az adapalen içermesine rağmen PAMAM-Jel formülasyonu ile Differin®Jel arasında adapalenin *stratum corneum*'un katmanlarındaki birikim ve dağılımı ile *stratum corneum*'a geçtiği tespit edilen miktarları açısından benzer sonuç elde edilmiştir (p>0,05). Bu durum, geliştirilen PAMAM-Jel formülasyonunun, pazardaki ticari jel preparatına göre çok düşük doz ile adapaleni *stratum corneum*'un altındaki tabakalarına ulaştırma potansiyeli ve topikal biyoyararlanım açısından Differin®Jel ile benzer olduğu gösterilmiştir. Bu durum, özellikle uygulanan dozun düşürülmesi ile etken maddenin topikal potansiyel yan etkilerinin azaltılması açısından önem taşımaktadır.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben *punch* biyopsi ve bantla soyma uygulamaları sonrasında deri ve yapışkan bantlardaki adapalen miktarlarını saptamak üzere uygulanan ekstraksiyon yönteminin etkinliğini belirlemek amacıyla geri kazanım çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmalar sonunda deri ve bant örnekleri üzerine ilave edilen adapalen miktarları üzerinden geri kazanım oranları hesaplandı. Buna göre deri ve yapışkan bant örneklerinden % geri kazanım değerleri sırasıyla %95,0±6,1 ve %91,8±8,8 olarak belirlendi. Sonuçta adapalenin uygulanan ekstraksiyon yöntemi ile deri ve bant örneklerinden yüksek oranda (>%90) geri kazanıldığı sonucuna varıldı ve kullanılan ekstraksiyon yönteminin uygun olduğuna karar verildi (Tablo 4.65).

Adapalenin deriden geçip geçmediğini tespit etmek için 24 saat süre ile yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarının sonunda deriden permeasyona uğrayan etken madde miktarını saptamak için, HPLC analizlerinden önce reseptör ortamındaki BSA'nın çöktürülmesi işlemi yapıldığı için BSA'nın çöktürülmesi sonucu elde edilecek adapalen miktarlarının doğruluğundan emin olmak, bu işlem ile adapalenin geri kazanım

etkinliğini belirlemek için geri kazanım çalışmaları yapıldı. Hazırlanan örneklerde HPLC analizleri ile tespit edilen adapalen miktarları ve başlangıçta ilave edilen adapalen miktarları üzerinden % geri kazanım değerleri hesaplandı. Adapalenin 20, 100 ve 400 ng/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltileri için elde edilen geri kazanım oranları belirlendi. (Tablo 4.66). Ayrıca *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları süresince reseptör ortamı olan %4 BSA içeren pH 7,4 PBS'te adapalenin 24 saatlik sürede stabil kaldığı saptandı (Tablo 4.67).

PAMAM-Jel, PDC-misel-Jel, Differin® Jel ve ayrıca PAMAM-AQ, PDC-misel-AQ formülasyonları ile yapılan floresan mikroskop analizleri, Franz difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* deriden geçiş çalışmalarının ardından deri yüzeyi dikkatlice temizlendikten sonra yapıldı. 24 saat süre ile adapalen yüklü formülasyonların uygulandığı deri örneklerinin yüzeyinden alınan floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlarda foliküler açıklıkların etrafında adapalenin lokalize olduğu saptandı. Differin® Jel'in uygulandığı deride folikül etrafında boyut büyüklüğüne bağlı olarak penetre olamadığı için yüzeyde kaldığı düşünülen adapalen mikro kristalleri net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.41-e,f).

5.12. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile tarama yapılan deri örneklerinde floresan özellikte bir maddenin lokalize olduğu bölge görüntülenebilir, böylece maddenin penetrasyon yolağı ve/veya penetrasyon derinliği hakkında bilgi edinilebilir³⁵⁷. Model floresan boya yüklü dendritik nanotaşıyıcılar ile deriye penetrasyonun ve kıl folikülerinde birikimin değerlendirilmesi için, FITC ile işaretlenen PAMAM dendrimerler ve NK yüklenen dendron temelli miseller ile CLSM analizleri yapılarak görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi.

5.12.1. PAMAM Dendrimer Temelli Nanotaşıyıcı Sistemlerle Yapılan CLSM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

PAMAM dendrimerlerin derideki birikiminin ve penetrasyonunun değerlendirilmesi ve penetrasyon derinliğinin aydınlatılması amacı ile PAMAM dendrimerlerin yüzey gruplarına FITC bağlanarak PAMAM(NH₂)-FITC (1:2) konjugatı oluşturuldu. Amin ve izotiyosiyanat grupları arasında oluşan tiyöüre bağı oldukça stabil olduğu için FITC hücrede ve *in vivo* çalışmalarda floresan işaretleme amacı ile sıklıkla

kullanılan bir floresan boyadır^{358,471-473}. FITC ile işaretlenen PAMAM dendrimerler (pH 7,4 PBS'te, 5 µM) ve kontrol grubu olarak serbest FITC'in (pH 7,4 PBS'te, 10 µM) *in vitro* koşullarda uygulandığı domuz derisi örnekleri Franz difüzyon hücrelerinden alındıktan sonra deri yüzeyinde kalan formülasyon temizlenerek uzaklaştırıldı. Deri örneklerinden 20 µm kalınlığında alınan dikey kesitler CLSM tekniği ile incelendi. Elde edilen görüntülerde FITC ile işaretlenmiş PAMAM dendrimerlerin deride kıl foliküllerinde biriktiği, foliküler yolak dışında *stratum corneum* bariyerini aşarak derinin alt tabakalarına derin penetrasyonun gerçekleşmediği gözlemlendi (Şekil 4.43 4.44). Kontrole ait görüntüler incelendiğinde FITC'in deri yüzeyinde kaldığı görülmektedir (Şekil 4.45). Böylelikle PAMAM dendrimerlerin deride kıl folikülü aracılı penetrasyon ve birikim eğilimi, floresan görüntüleme tekniği ile desteklendi.

5.12.2. Dendron Temelli Misel Nanotaşıyıcıları ile Yapılan CLSM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Dendron temelli misellerin deride kıl foliküllerine hedeflendirilme potansiyelinin değerlendirilmesinde; model olarak seçilen lipofilik karakterde floresan bir boya olan NK dendron temelli miseller kosolvan evaporasyon yöntemi ile yüklendi. Deri örneklerinde yapılan görüntüleme çalışmalarında; özellikle lipofilik karakterde etken maddeler için model olarak, deri bileşenlerinin sinyal verdiği dalga boyu aralığından uzak olan 630 nm dalga boyunda floresan sinyali veren NK sıklıkla kullanılır³⁶⁰. NK yüklü (128 µg/ml) dendron temelli miseller ve kontrol grubu olarak NK dispersiyonu (pH 7,4 PBS'te, 128 µg/ml) *in vitro* koşullarda uygulandığı domuz derisi örnekleri Franz difüzyon hücrelerinden alındıktan sonra deri yüzeyinde kalan formülasyon temizlenerek uzaklaştırıldı. Deri örneklerinden 20 µm kalınlığında alınan yatay ve dikey kesitler CLSM tekniği ile incelendi.

Deriden, *stratum corneum* yüzeyinden başlamak sureti ile yatay olarak alınan her bir kesit dikkatli bir şekilde sayıldı; böylece uzaklaştırılan doku ile beraber deride inilen derinlik yaklaşık olarak saptandı. Deriye uygulama sonrasında elde edilen dikey kesit görüntülerinde lipofilik yapıda NK enkapsüle edilen dendron temelli miseller ile NK'nin *stratum corneum* tabakasını aşmadığı; fakat deride kıl foliküllerinde biriktiği gösterilmiştir (Şekil 4.46). Kontrole ait görüntülerde ise NK'nin deri yüzeyinde kaldığı görülmektedir (Şekil 4.47). Yatay kesitlerde elde edilen görüntülerde, incelenen bir örnekte derinin üst tabakalarında (~7-21 µm) hem hücreler arasında hem de foliküler

kanal etrafında (Şekil 4.48-a,b,c); daha derin tabakalarda ise foliküler kanal çeperlerinde ~56 ve ~140 µm derinliğe kadar penetrasyon gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.48-d,e). İncelenen başka bir yatay kesit örneğinde *stratum corneum*'dan dermise doğru 224-231 µm derinlikte tespit edilen foliküler kanal kesiti farklı açılardan üç boyutlu olarak görüntülenmiş, dendron temelli misellerle taşınan NK'nin net bir şekilde foliküler yolağı kullanarak dermis tabakasına kadar penetre olduğu görülmektedir (Şekil 4.49).

5.13. Adapalenin Dendron Temelli Nanotaşıyıcılara Kovalan Bağlanmasıyla Oluşturulan Konjugatlarla Hazırlanan Misellere ait Çalışmaların Değerlendirilmesi

Polyester dendron polimer konjugat (PDC) temelli misel formülasyonları ile adapalenin deriden penetrasyon profilinin araştırılması ve derideki birikiminin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar kapsamında, adapalenin dendron temelli nanotaşıyıcılara alternatif olarak ester bağı ile kimyasal olarak kovalan bağlanması düşünüldü; bu şekilde prodrug yaklaşımı uygulandı. Bu amaçla, öncelikle adapalen molekülünün yapısındaki karboksil grupları ($-COOH$) ile ester bağı oluşturabilecek uç dallarında hidroksil yüzey grupları ($-OH$) bulunan üçüncü jenerasyon polyester dendron yapısı sentezlendi. Ardından bu yapıya poli(metil metakrilat) yapısında lineer bir polimer zinciri konjuge edilerek AB tipi dendritik lineer diblok kopolimer yapısında G3 polyester dendron-polimer konjugat (PDC-OH) yapısı oluşturuldu (Şekil 3.4). Sonraki aşamada ise G3 PDC-OH yapısına adapalen ester bağı ile kovalan bağlanarak PDC-ADA yapısı hazırlandı (Şekil 3.5). Tüm sentez ve karakterizasyon çalışmaları Boğaziçi Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirildi.

Prodrug/Ön ilaç yaklaşımı, ilaç geliştiricilerine moleküler modifikasyon ile ilaç farmakokinetiği, farmakodinamiği ve toksikolojisini değiştirme, ayarlama imkânı sunar⁴⁷⁴. Suda zayıf çözünürlük, kimyasal kararsızlık, yetersiz oral ya da topikal absorpsiyon, hızlı pre-sistemik metabolizma, kısa yarı ömür, toksisite ve lokal iritasyon gibi istenmeyen özellikler, ön ilaç yaklaşımı kullanılarak ortadan kaldırılabilir, ya da değiştirilebilir. İlaç moleküllerinin fizikokimyasal özelliklerinin, kimyasal yapısında yapılacak bazı müdahalelerle modifiye edilmesi amaçlanan ön ilaç tasarımı stratejisinden, özellikle oral ve parenteral kullanımlar için, sıklıkla yararlanılır³⁶⁷.

Deriye uygulanacak ilaçlara yönelik de ön ilaç stratejisinin uygulanması düşünülebilir. Literatürde deriden geçişi arttırmaya yönelik farklı ilaçlarla gerçekleştirilen ön ilaç hazırlama girişimleri mevcuttur⁴⁷⁵⁻⁴⁸⁰. Bu prensiple, ilaç

moleküllerinin polimerik yapıda taşıyıcılara konjugasyonuna dayanan, deriye penetrasyon kabiliyeti yüksek, deride enzimatik ve/veya kimyasal yollardan aktif farmasötik bileşene dönüşebilecek prodrug yapısında ilaç yüklü nanotaşıyıcı sistemler hazırlanabilir. Bir prodrug yapısından ana ilacın salınması, hidroliz mekanizması ile kimyasal veya enzimatik olarak yıkılabilecek bağ içermesine bağlı olarak gerçekleşir⁴⁸¹. Kimyasal bağın yapısı, hazırlanan ön ilaçtan beklenen salım performansı açısından önemlidir. Örneğin, salımın çok gecikmesi istenmeyen durumlarda, fizyolojik koşullarda ilacı kısa sürede salması beklenen ön ilaçlar için kolay kopabilecek bir bağ tercih sebebidir. Aktif farmasötik bileşen ile taşıyıcıyı bağlamak üzere kullanılacak kimyasal bağlar arasında, esterler hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kimyasal hidrolizle kopabilme özellikleri gösterilmiş bağlardır³⁶⁷. Göreceli olarak fizyolojik koşullarda karbonat, karbamat ve amit gibi kimyasal bağlara kıyasla daha kolay hidroliz olmaları nedeniyle polimerik ön ilaçlar geliştirilirken, amaca bağlı olarak, ester bağlı yapıların hazırlanmasının tercih edildiği görülmektedir³⁶⁶. Literatürde ester bağ içeren çeşitli prodrugların tasarlandığı çalışmalar yer almaktadır^{482,483}.

Suda çözünebilen polimerik ön ilaçlar için, ana ilacın serbestleşmesini sağlayacak polimer ile ilaç arasındaki bağın enzimatik hidroliz yolu ile kırılması potansiyeli de söz konusudur³⁶⁶. Deri dokusunda, ilaç metabolizmasından ve eliminasyonundan sorumlu enzimlerin varlığı deriden penetre olan bir prodrug'ın enzimatik yolla biyotransformasyona uğramasını mümkün kılar. Derideki enzimatik aktivite, özellikle transdermal absorpsiyon prosesi sırasında hız kısıtlayıcı faktör⁴⁸⁴ olarak deriye uygulamaya yönelik prodrug tasarımında kullanılacak bağların seçimi açısından göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir. Derideki enzimatik aktivite, büyük ölçüde esterazlardan kaynaklandığı^{485,486} için deriden penetrasyonu arttırmaya yönelik birçok ester prodrug sentezlenmiş ve kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır⁴⁸⁷. Deride enzim aktivitesinin özellikle canlı epidermis ve kıl foliküllerinde yüksek olduğu bildirilmiştir^{488,489}. Bir çalışmada, insan derisindeki benzer olarak domuz kulak derisinde de, esterazların epidermiste, stratum corneum'un hemen altında lokalize olduğu bildirilmektedir⁴⁹⁰.

Tez çalışması kapsamında; adapalenin dendron temelli yapılara kovalan konjugasyon yolu ile bağlandığı PDC-ADA konjugatları ile kosolvan evaporasyon yöntemi kullanılarak misel nanotaşıyıcıları hazırlandı. PDC-ADA konjugatları ile

hazırlanan misellerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında; misellerin ortalama partikül boyutu 180 ± 22 nm (PDI: $0,08 \pm 0,01$) ve zeta potansiyeli $1,4 \pm 0,9$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen PDC-ADA misellerinin partikül boyutu dağılımının son derece homojen olduğu (PDI: $0,08 \pm 0,01$) dikkat çekmektedir.

Adapalenin kovalan olmayan etkileşimlerle fiziksel olarak enkapsülasyonu yaklaşımı ile hazırlanan optimizasyonu tamamlanmış DMc 1 A500 1PEG S kodlu dendron temelli miseller göre ($r_h = 297,1 \pm 21,3$ nm; PDI= $0,19 \pm 0,02$; YO= $\%32,1 \pm 0,4$; molar oran $(PDC/ADA) = 1:13$; ADA konsantrasyonu= $394,3 \pm 7,6$ µg/ml) adapalenin kovalan bağlı bulunduğu PDC-ADA ile hazırlanan misellerin (YO= $\%15,64$; molar oran $(PDC/ADA) = 1:5,3$; ADA konsantrasyonu= 172 µg/ml) boyutlarının küçük ve partikül boyutu dağılımlarının daha dar olması; (1) her iki yaklaşım için kullanılan amfifilik dendritik lineer diblok kopolimer yapılarının hidrofobik segmentini oluşturan ve misellerin çekirdeğini meydana getiren polyester dendron yapılarının farklı olmasına (PDC-ADA yapısındaki PDC’de polyester dendron segmenti, enkapsülasyonda kullanılan PDC’deki polyester dendron segmentinden daha kısa), (2) her iki misel formülasyonunda yüklü bulunan adapalen miktarı dikkate alındığında hesaplanan PDC/ADA molar oranlarının ve yüklenen adapalen içeriğinin farklı olmasına (PDC-ADA misellerinde bir mol PDC’ye karşılık yüklenen ADA miktarı yaklaşık 2 kat daha düşük) bağlandı. Literatürde de benzer olarak amfifilik blok kopolimerlerle hazırlanan polimerik misellerde hidrofilik misel çekirdeğini oluşturan hidrofobik bloğun molar oranı arttırıldıkça hidrofobik segmentin uzamasıyla misel boyutlarının arttığı görülmüştür⁴⁹¹. Blok kopolimerlerden oluşan misellerin boyutunun primer olarak segment zincirlerinin uzunluğuna bağlı olduğu⁴⁹², amfifilik blok kopolimerin moleküler ağırlığı, agregasyon sayısı, hidrofilik ve hidrofobik zincirlerin birbirine oranı ve hazırlama prosesi gibi faktörlerin polimerik misellerin boyutunu belirlediği bilinmektedir⁴⁹³.

5.13.1. PDC-ADA için Analitik Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi

PDC-ADA’nın derideki birikiminin değerlendirilmesi için *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarını takiben hazırlanan *punch* biyopsi örneklerinde ve *stratum corneum*’un soyulması işleminde kullanılan bantlarda bulunan konjugat miktarının tayini için diğer çalışmalarda örneklerde bulunan adapalen içeriğinin kantitatif tayininde kullanılan literatürde kayıtlı³⁷ yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yöntemi kullanıldı. ADA konjugatı ile birlikte deride penetrasyon süresi içinde hidrolizle

açığa çıkan adapalen miktarları optimize edilmiş ve validasyonu yapılmış bu yöntemle ayrıca yapılan analizlerle belirlendi. PDC-ADA'nın kantitatif tayininde konjugat yapısının analiz şartlarında hidrolizini önlemek için hareketli faza trifloroasetik asit ilave edilmedi. Optimizasyonu sağlanan yöntemin PDC-ADA yapısı ile hazırlanan standartlar için ICH Kılavuzları doğrultusunda validasyon çalışmaları yapıldı³⁴².

ACN/THF (60:40) (h/h) ortamında hazırlanan standartlarla yapılan seçicilik çalışmalarında, *in vitro* deriden penetrasyon deneyleri sırasında kullanılan domuz derisi ve bantların; ayrıca PDC-ADA yapısının sentezlenmesi aşamasında kullanılan her bir bileşenin (G3 PDC-OH, G3 polyester dendron, poli(metil metakrilat) temelli lineer polimer, adapalen), ekstraksiyon çözücüsü, reseptör faz ya da mobil fazın adapalenin alıkonma zamanında girişim yapmadığı doğrulandı. Doğrusallık çalışmalarında elde edilen kalibrasyon (Şekil 4.51 doğrunun regresyon analizi ile ($r^2 = 0,9998$) miktar tayininde kullanılabileceği gösterildi. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından yöntemin kesinliği gösterildi (Tablo 4.69 ve 4.70). PDC-ADA'nın analizlerde teşhis limiti 0,069 µg/ml; miktar tayini limiti 0,229 µg/ml olarak belirlendi. Adapalenin ekstraksiyon ortamında hazırlanan standart çözeltilerinde 72 saat stabilitesini koruduğu saptandı (Tablo 4.71).

Bu bulgulara dayanarak, PDC-ADA için kullanılan analitik yöntemin ilgili ICH kılavuzunda³⁴² belirtilen validasyon kriterlerini karşıladığı gösterilerek yapılan çalışmalarda adapalenin miktar tayini için kullanılabileceğine karar verildi.

5.13.2. Adapalenin PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarından *In Vitro* Salımı Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi

Adapalenin PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından etken maddenin salımı için derinin pH sınırı (pH 5,5) ve derideki esterazlara bağlı enzimatik aktiviteyi taklit edecek bir reseptör ortamı (esteraz ilavesi yapılan) seçilerek iki farklı ortamda değerlendirildi.

5.13.2.1. pH 5,5 PBS Ortamında Yapılan *In Vitro* Salım Çalışmaları

Hazırlanan PDC-ADA yapısından *in vitro* koşullarda adapalen salımını değerlendirmek üzere öncelikle pH 5,5 PBS ortamında diyaliz membran kullanılarak salım çalışmaları gerçekleştirildi. Reseptör fazda sink koşulu sağlamak için PBS çözeltilisine %1,75 (a/h) oranında Tween 80 ilave edildi. Tween 80, lipofilik karakterde etken maddelerle *in vitro* koşullarda yapılan salım çalışmalarında çözünürlük artırıcı

olarak sıklıkla kullanılmaktadır^{363,364}. PDC-ADA ile hazırlanan misel formülasyonundan pH 5,5'te gerçekleştirilen *in vitro* salım bulguları Tablo 4.72'de verilmiştir. Diyaliz torbasında prodrug misellerde yüklü bulunan adapalen miktarının (8,6 µg), 24. saat sonunda %2,41±0,49; 71. saat sonunda %3,12±0,34'ünün salındığı saptandı. 50 ml'lik reseptör ortamında pH'ya bağlı hidrolizle açığa çıkan adapalen miktarları 24. saatte, 207,7±42,0 ng ve 71. saat sonunda 268,1±29,6 ng olarak hesaplandı (Şekil 4.52).

Elde edilen sonuçlar, 24 saat sonunda kümülatif adapalen salımı (%2,41±0,49) üzerinden değerlendirildiğinde; pazardaki ticari ürün olan Differin®Jel (%0,1) ile deride 1 cm² alana 10 µg'a kadar adapalen uygulanacağı var sayılırsa (*in vivo* şartların taklidi amacıyla yarı katı preparatlar için 10 mg/cm²'ye kadar kabul edilen *finite* doz^{458,459} koşulları düşünülerek), prodrug miselden (8,6 µg adapalen içeren) etken madde salım miktarının (207,7±42,0 ng) oldukça düşük olduğu görülmektedir. FDA tarafından Differin®Jel ile deriye uygulanması önerilen adapalen dozu⁴⁹⁴ (2 µg ADA/cm²; 2 mg Differin®Jel/cm²) dikkate alındığında, etken madde salım miktarı baz alınarak bu doz üzerinden varsayımsal salım oranı hesaplanırsa bile bulunacak salım miktar ~%10 civarında olacaktır. Buna göre, pH 5,5 koşullarında 24 saatlik sürede PDC-ADA yapısının büyük ölçüde stabil kaldığı söylenebilir. Bu noktada, örneğin normal koşullarda pH'sı ~5,5 olduğu bilinen deri yüzeyinde, PDC-ADA yapısından pH'ya bağlı hidrolizle 24 saatlik sürede tahmini olarak düşük bir miktar adapalenin salınması öngörülebilir.

5.13.2.2. Esteraz İçeren Ortamda *In Vitro* Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hazırlanan PDC-ADA yapısından *in vitro* koşullarda adapalen salımını değerlendirmek üzere; ayrıca derideki enzimatik aktiviteyi taklit etmek için PLE ilave edilen pH 7,4 PBS ortamında *in vitro* salım çalışmaları yapıldı. Literatürde deriye uygulanacak topikal ön ilaçlardan *in vitro* koşullarda enzimatik aktiviteye bağlı salımın değerlendirilmesinde kullanılan esteraz konsantrasyonları belirlendikten sonra, PDC-ADA ile hazırlanan misel formülasyonundan enzimatik hidroliz ile serbestleşen adapalen miktarları ve oranı belirlendi. PDC-ADA'dan 2 IU/ml^{476,477} ya da 5 IU/ml^{495,496} PLE aktivitesinin sağlandığı ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen salım grafiği Şekil 4.53'te gösterilmiştir. Buna göre 2 IU/ml PLE aktivitesinin sağlandığı ortamda, ~36. saatten sonra adapalen salımının durma noktasına geldiği anlaşılmaktadır. Bu durumun, deneylerin yürütüldüğü sıcaklık koşullarında zamana bağlı olarak ortamdaki esteraz aktivitesinin kaybolmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 5 IU/ml

PLE aktivitesinin sağlandığı ortamda adapalen konsantrasyonu 24. saatte $64,2 \pm 5,9$ ng/ml ($\sim 256,8$ ng/4 ml), 72. saatte ise $105,2 \pm 13,0$ ng/ml ($\sim 420,8$ ng/4 ml) olarak saptanmıştır. FDA tarafından Differin®Jel ile deriye uygulanması önerilen adapalen dozu⁴⁹⁴ ($2 \mu\text{g ADA/cm}^2$; $2 \text{ mg Differin}^\circ\text{Jel/cm}^2$) da göz önünde bulundurularak, daha önce deriye $3,4 \pm 0,14 \mu\text{g ADA/cm}^2$ dozda Differin®Jel uygulayarak yaptığımız in vitro geçiş çalışmalarında deriye geçen adapalen miktarları, $77,0 \pm 29,2$ ng/cm² dikkate alındığında, 5 IU/ml PLE aktivitesinin sağlandığı ortamda PDC-ADA yapısından arzu edilecek seviyede adapalen serbestleştiği yorumlanabilir.

5.13.3. PDC-ADA ile Hazırlanan Misel Nanotaşıyıcılarının In Vitro Deriden Penetrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında taze domuz derisi örnekleri üzerine 24 saat süre ile, PDC-ADA içeren sulu misel formülasyonu ($240 \mu\text{l}$; $1,1 \text{ mg/ml}$) ($264 \mu\text{g PDC-ADA konjugat ile uygulanan ADA miktarı} = 23,3 \mu\text{g/cm}^2$) veya $23,3 \pm 0,22 \text{ mg Differin}^\circ\text{Jel}$ ($23,3 \mu\text{g ADA/cm}^2$) uygulandı.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarını takiben deri yüzeyinde kalan formülasyon fazlası dikkatli bir şekilde silinerek uzaklaştırıldıktan sonra, deriye uygulanan formülasyonlardan foliküler birikimin değerlendirilmesi için *punch* biyopsi tekniği kullanıldı. Kontrol olarak, pazarda bulunan ticari orijinal ürün ile (Differin®Jel) karşılaştırma yapıldı. Ayrıca deriye geçen toplam adapalen miktarları belirlendi. PDC-ADA ile hazırlanan misel formülasyonundan deriye geçen PDC-ADA yapısında bağlı halde (prodrug) bulunan adapalen miktarı; serbestleşen adapalen miktarı; pazarda bulunan ticari preparatından deriye geçen serbest adapalen miktarı ile bu formülasyonlara ait kıl folikülü içeren (KF-Poz) ve kıl folikülü içermeyen (KF-Neg) biyopsi örneklerinde saptanan adapalen (prodrug/serbest) miktarları Tablo 4.73'te; ilgili grafikler de Şekil 4.54 ve Şekil 4.55'te verilmiştir.

PDC-ADA misel formülasyonu ve Differin®Jel için, KF-Poz biyopsi örneklerinde saptanan serbest/bağlı toplam adapalen miktarları sırasıyla $63,1 \pm 8,1 \text{ ng/7,85 mm}^2$ ve $11,4 \pm 2,9 \text{ ng/7,85 mm}^2$; KF-Neg biyopsi örneklerinde saptanan serbest/bağlı toplam adapalen miktarları $24,9 \pm 5,5 \text{ ng/7,85 mm}^2$ ve $5,3 \pm 1,5 \text{ ng/7,85 mm}^2$; hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri $2,6 \pm 0,24$ ve $2,2 \pm 0,1$; deriye geçtiği tespit edilen serbest/bağlı toplam adapalen miktarları $820,3 \pm 155,3 \text{ ng/cm}^2$ ve $220,4 \pm 41,2$ olarak bulunmuştur. PDC-ADA misel formülasyonu için deride tespit edilen serbest adapalen miktarı $11,3 \pm 1,7$

ng/cm² ve PDC-ADA yapısında bağılı adapalen miktarı 809,5±154,4 ng/cm²'dir. PDC-ADA misel formülasyonundan biyopsi örneklerinde serbest halde adapalen tespit edilmemiştir (Tablo 4.73).

PDC-ADA misel formülasyonundan deriye geçtiği tespit edilen serbest/bağılı toplam adapalen miktarının ancak ~%1,4'ünün serbest halde bulunduğu, 24 saat içerisinde PDC-ADA yapısından adapalenin yeterli düzeyde salımının gerçekleşmediği gözlenmiştir (Şekil 4.54). PLE ortamında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında saptanan serbestleşen ilaç miktarlarına kıyasla *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında deride tespit edilen bu düşük serbest ilaç miktarı, eksize domuz derisi ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarında derideki enzim aktivitesinin büyük ölçüde kaybolmasına bağlandı. Franz hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* deriden geçiş çalışmalarında ilgili OECD rehberinde³⁵⁶ açıklanan, deri örneklerinin donör ve reseptör kompartmanlar arasına yerleştirildiği, derinin epidermal yüzünün hava ile ve dermisin reseptör faz ile temas ettiği standart yöntem ile, deride saptanan biyotransformasyon ile aktif farmasötik bileşene dönüşme oranının oldukça düşük bulunması literatürde, deriden geçiş çalışmalarının gerçekleştirildiği deney düzeneğinin esterazlara bağılı biyotransformasyon prosesini önemli derecede etkilemesine, Franz hücresine sabitlenen deri örneklerinde zorlayıcı koşullarda stres faktörüne bağılı enzimatik aktivitenin azalmasına bağlanmıştır. Sonuç olarak, düşük enzim aktivitesinin, derilerin Franz hücrelerine sabitlenmesi sırasında doku üzerinde uygulanan germe ve basınca bağılı olarak hücrelerin zarar görmesi sonucu dokunun canlılığını büyük ölçüde yitirmesinden kaynaklanmış olabileceği ortaya konmuştur⁷⁹. PDC-ADA misel formülasyonundan biyopsi örneklerinde serbest halde adapalen tespit edilmemesi, *in vitro* koşullarda zaten PDC-ADA yapısından oldukça düşük oranda gerçekleştiği görülen ilaç salımı dikkate alındığında, biyopsi örneklerinin de derinin kalan kısmına kıyasla çok küçük bir alanı temsil etmesine bağlanmaktadır.

Formülasyonlardan deriye geçen adapalen miktarları karşılaştırıldığında; PDC-ADA misel formülasyonunu ile deride, Differin®Jel'e göre ortalama 3,7 kat fazla adapalen (serbest+bağılı) biriktiği görülmektedir (Şekil 4.54). Bu formülasyonlar ile kıl foliküllerine ulaştırılan adapalen miktarları karşılaştırıldığında da; PDC-ADA misel formülasyonunu ile kıl foliküllerinde tespit edilen adapalen miktarının, Differin®Jel'e göre ortalama 5,5 kat fazla adapalen (serbest+bağılı) biriktiği görülmektedir (Şekil 4.55).

PDC-ADA misel formülasyonunu ile deriye geçen ve kıl foliküllerine ulaştırılan adapalen (serbest+bağlı) miktarlarının Differin®Jel'e göre önemli derecede yüksek bulunmasında; PDC-ADA misel formülasyonunda adapalenin kovalan bağlı bulunduğu nanotaşıyıcı sistemin boyutları ($r_h=180\pm22$ nm; $PDI=0,08\pm0,01$) ile Differin®Jel'de bulunan adapalen mikro kristallerinin boyutları ($3-10\ \mu m$)³⁸ karşılaştırıldığında, PDC-ADA misellerinin sahip oldukları daha küçük partikül boyutları sayesinde deri yüzeyine uygulanmalarını takiben uygulanan partiküllerin Differin®Jel'deki adapalen kristallerine göre, daha büyük bir kısmının kıl foliküllerine penetre olabilmesi etkili olmuş olabilir. Deri yüzeyine uygulanan farklı boyut ve yapıdaki partiküllerin foliküler açıklıklarda birikerek foliküler kanal boyunca penetre oldukları, penetrasyon derinliklerinin ise büyük ölçüde büyüklüklerine bağlı olduğu literatürde kayıtlıdır^{183,208}.

Kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli açısından karşılaştırma yapmak üzere hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerleri incelendiğinde, PDC-ADA misel formülasyonunda KF-Neg alanlara kıyasla kıl foliküllerine hedeflenen adapalen oranları Differin®Jel ile beklenen derecede daha yüksek bulunmamıştır (Tablo 4.73). Ek olarak, PDC-ADA yapısı ile pazarda bulunan ticari preparatla karşılaştırmalı olarak yapılan *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında, *infinite* doz koşulları sağlanmıştır. *Infinite* dozun sağlandığı durumlarda, genel olarak deney süresince donörde penetrasyona uğrayan maddenin konsantrasyonunda bir değişiklik olmadığı varsayılır. Franz difüzyon hücrelerinin kullanıldığı deney düzeneğinde bu yüzden donörde penetrasyona uğrayan maddenin konsantrasyonunun sabit olduğu; belki daha doğru bir ifadeyle termodinamik aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı kabul edilir⁴⁵⁴. Bu koşullarda deri örneklerine yüksek dozda uygulanan PDC-ADA misellerinin termodinamik aktivitesinde süreye bağlı azalma olmaması ve deri yüzeyine yoğun bir miktarda yükleme yapılması ile, nano boyutlu partiküllerin kıl folikülleri ile birlikte sınırları deride belli düzende çizilmiş desenli bir görünüme yol açan korneosit kümelerinin arasındaki hücreler arası yolda da önemli derecede birikiminin söz konusu olması sebebiyle, PDC-ADA misellerinin kıl folikülleri ile birlikte derinin tamamına etkin bir şekilde penetre olması ile deride adapalen birikiminin önemli derecede artış gösterdiği söylenebilir. Hesaplanan FHF (KF-Poz/KF-Neg) değerlerinin Differin®Jel'e göre beklenen derecede daha yüksek bulunmaması bu şekilde açıklanabilir. Polimerik misellerin bu şekilde, tek tek korneositler arasındaki hücreler arası yola göre çok daha geçirgen olan korneosit kümeleri arasındaki hücreler arası yolda lokalize olduğu literatürde kayıtlıdır^{184,497}.

PDC-ADA misel formülasyonu ve Differin®Jel'in ikisinde de KF-Poz'da tespit edilen adapalen miktarları deride kıl folikülü olmayan (KF-Neg) alanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.55). Bu noktada daha önce de açıklandığı gibi nanopartiküler taşıyıcı sistemle birlikte Differin®Jel'de de adapalenin kıl foliküllerindeki birikiminin deride KF-Neg alanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmasında, Differin®Jel'de adapalenin mikro kristaller halinde bulunmasının kıl foliküllerinde birikim açısından sağladığı avantajın¹⁷ etki ettiği düşünülmektedir.

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcıları ile 24 saat süre boyunca sürdürülen *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarını takiben ayrıca, PDC-ADA yapısı ve deride serbestleşen adapalenin *stratum corneum* tabakasında ve kalan derideki (*canlı epidermis/dermis*) birikim ve dağılımının değerlendirilmesi için bant ile soyma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, penetrasyon çalışmaları sonrasında deri yüzeyindeki formülasyon fazlası dikkatli bir şekilde silinerek uzaklaştırıldı. Ardından *stratum corneum* tabakası yapışkan bantlarla 20 kez soyularak derinin daha alttaki canlı *epidermis/dermis* tabakalarından ayrıldı. Bantla soyma işlemi sonrasında kalan deri küçük parçalar halinde kesilerek ayrı bir tüpe alındı. Bant grupları ve kalan deri ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon sonunda bant gruplarını içeren tüplerdeki ekstraksiyon sıvıları bir araya getirildi ve HPLC analizleri gerçekleştirildi. Bantlardan bir araya getirilerek ekstrakte edilen miktarlar *stratum corneum*'daki toplam birikimi, kalan deride ekstrakte edilen miktarlar ise canlı *epidermis/dermis* tabakalarındaki birikimi gösterildi.

PDC-ADA ile hazırlanan misel nanotaşıyıcılarından *stratum corneum* ve *canlı epidermis/dermis* tabakalarında tespit edilen serbest adapalen miktarları sırasıyla $47,7 \pm 8,1$ ng/cm² ve $3,9 \pm 1,5$ ng/cm²; PDC-ADA yapısında bağlı adapalen miktarları sırasıyla $829,2 \pm 178,3$ ng/cm² ve $77,1 \pm 15,4$ ng/cm² olarak saptandı (Tablo 4.74). PDC-ADA ile hazırlanan misel formülasyonundan deriye geçen PDC-ADA yapısında bağlı halde bulunan adapalen miktarları ile serbestleşen adapalen miktarlarının *stratum corneum* ve canlı *epidermis/dermis* tabakalarındaki birikim ve dağılımını gösteren karşılaştırmalı grafik Şekil 4.56'de verilmiştir.

PDC-ADA misel formülasyonundan derinin tamamında tespit edilen serbest adapalen miktarının ($52,4 \pm 8,1$ ng/cm²), PDC-ADA yapısında bağlı bulunan adapalen miktarına ($939,5 \pm 71,5$ ng/cm²) göre önemli derecede düşük olduğu, 24 saat içerisinde eksize domuz derisinde PDC-ADA yapısından adapalenin yeterli düzeyde salımının

olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.56). PLE ortamında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında saptanan serbestleşen ilaç miktarlarına kıyasla *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında deride tespit edilen bu düşük serbest ilaç miktarı, eksize domuz derisi ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmalarında derideki enzim aktivitesinin büyük ölçüde kaybolmasına bağlandı. PDC-ADA ile hazırlanan misel formülasyonundan *stratum corneum*'da tespit edilen serbest/bağlı toplam adapalen miktarları ile canlı *epidermis/dermis* tabakalarında tespit edilen serbest/bağlı toplam adapalen miktarları arasında önemli derecede fark olduğu görülmektedir. *Stratum corneum*'da canlı *epidermis/dermis* tabakalarına göre ~11 kat fazla birikim olmuştur. Bu bulgulara göre, nano boyutlu PDC-ADA misellerinin, deney koşullarında serbestleşen adapalen miktarlarının ihmal edilebilir düzeyde olduğu kabul edildiğinde, *stratum corneum* bariyerini büyük oranda aşmadığı sonucuna varıldı. Nanopartiküllerin penetrasyon sırasında deride kıl folikülleri gibi yan geçit ve/veya korneosit kümeleri arasından ya da derideki çatlaklardan giriş yolları bulmasına rağmen, *stratum corneum* bariyerini yenemedikleri literatürde özellikle vurgulanmaktadır^{193,497}.

5.18. Sonuçlar ve Öneriler

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile; aknenin topikal tedavisine yönelik adapalen yüklü nano boyutlu dendritik taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Optimize edilen nanotaşıyıcıların *in vitro* koşullarda deriden penetrasyon kabiliyetleri ve adapaleni derinin hedef bölgesine, kıl foliküllerine taşımadaki potansiyelleri incelenmiştir. Ayrıca, hazırlanan dendritik nanotaşıyıcı sistemlerin topikal uygulamaya yönelik konvansiyonel bir formülasyon ile kombine edilmesi düşünülmüştür. Geliştirilen formülasyonların performansı pazarda bulunan ticari orijinal ürün ile karşılaştırılmıştır.

Dendritik nanotaşıyıcı sistemler ile hazırlanan yenilikçi jel formülasyonları ile, ticari ürüne kıyasla daha düşük dozda adapalen içermelerine rağmen, amaca uygun olarak kıl foliküllerinde birikim açısından etkin bir performans gösterdikleri kanıtlanmıştır.

PAMAM-AQ formülasyonu ticari ürüne göre adapalenin kıl foliküllerindeki ve derinin tamamındaki birikimini arttırmıştır. PAMAM-Jel ile çok daha düşük dozda (%70 daha daha az) adapalen deriye uygulandığı halde deriye geçen etken madde miktarı ile benzer olarak bulunmuştur. Uygulanan doza oranla deriye geçen adapalen miktarları açısından; PAMAM-AQ'nun penetrasyon etkinliği ticari ürüne göre yaklaşık 2,8 kat; PAMAM-Jel'in penetrasyon etkinliği ise yaklaşık 3,2 kat artmıştır.

Kıl foliküllerine ulaştırılan adapalen miktarları açısından PDC-misel-Jel ile daha çok (%60) düşük dozda adapalen uygulanmasına rağmen ticari ürün ile kıl foliküllerinde elde edilen etken madde miktarları elde edilmiştir. Böylece, kıl foliküllerine hedeflendirme potansiyeli açısından PDC-misel-Jel ile ticari ürüne göre yaklaşık 2,3 kat artış gözlenmiştir. PDC-misel-Jel formülasyonunun, seçici olarak KF-Neg alanlarına kıyasla kıl foliküllerini tercih ettiği açıktır.

Topikal uygulama ve kıl foliküllerine hedeflendirmeye yönelik optimize edilen sulu koloidal dendritik nanotaşıyıcılar ile bu nanotaşıyıcıları içeren jel formülasyonlarının, adapalenin derideki birikimini ve foliküler lokalizasyonunu iyileştirdiği; pazarda onaylı topikal jel preparatına göre uygulanan adapalen dozu dikkate alındığında adapalenin yan etkilerin azaltılması potansiyelinin bulunduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında geliştirilen dendritik nanotaşıyıcıların; akne gibi deride foliküler bölgenin etkilendiği dermatolojik hastalıkların topikal tedavisinde, seçici olarak etki bölgesine hedeflendirilmesi ve uygulanacak doz düşürülerek ilaçların yan etkilerinin azaltılması potansiyeli nedeniyle konvansiyonel preparatlara alternatif olarak değerlendirilebileceği önerilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Akkurt ZM. *Dermatolojik Muayene Tanı ve Tedavi Prensipleri*. Erişim 10.11.2018, <https://www.dicle.edu.tr/Contents/f5abcc44-3b4a-495b-99fa-fb859dc3ab47.pdf>
2. Trommer H, Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 2006, **19** (2), 106-21.
3. Agrawal Y, Petkar KC, Sawant KK. Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *Int J Pharm* 2010, **401** (1-2), 93-102.
4. Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **59** (6), 427-43.
5. Jennings V, Gysler A, Schafer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2000, **49** (3), 211-8.
6. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res* 2004, **21** (10), 1818-25.
7. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **71** (2), 173-180.
8. Antonio JR, Antônio CR, Cardeal ILS, Ballavenuto JMA, Oliveira JR. Nanotechnology in dermatology. *Anais brasileiros de dermatologia* 2014, **89** (1), 126-136.
9. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J ve ark. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm* 2007, **66** (2), 159-64.
10. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, ve ark. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011, **63** (6), 470-91.
11. Gupta M, Agrawal U, Vyas S. Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opin Drug Deliv* 2012, **9**, 783-804.
12. Kahraman E, Ozhan G, Ozsoy Y, Gungor S. Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016, **146**, 692-9.
13. Lapteva M, Mondon K, Moller M, Gurny R, Kalia YN. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Mol Pharm* 2014, **11** (9), 2989-3001.
14. Takeuchi I, Suzuki T, Makino K. Skin permeability and transdermal delivery route of 50-nm indomethacin-loaded PLGA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017, **159**, 312-317.
15. Vogt A, Combadiere B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H ve ark. 40 nm, but not 750 or 1,500nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol* 2006, **126** (6), 1316-1322.
16. Guo C, Khengar RH, Sun M, Wang Z, Fan A, Zhao Y. Acid-responsive polymeric nanocarriers for topical adapalene delivery. *Pharm Res* 2014, **31** (11), 3051-9.
17. Kandekar SG, Del Rio-Sancho S, Lapteva M, Kalia YN. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. *Nanoscale* 2018, **10** (3), 1099-1110.

18. Rhein LD, Zatz JL, Motwani MR. Targeted delivery of actives from topical treatment products to the pilosebaceous unit. *İçinde Acne and its therapy*. Webster GF, Rawlings AV, editörler. New York, NY: Informa Healthcare Inc.; 2007. pp 223-252.
19. Ceilley RI. Advances in topical delivery systems in acne: new solutions to address concentration dependent irritation and dryness. *Skinmed* 2011, **9** (1), 15-21.
20. Stecova J, Mehnert W, Blaschke T, Kleuser B, Sivaramakrishnan R, Zouboulis CC ve ark. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation and skin uptake. *Pharm Res* 2007, **24** (5), 991-1000.
21. Liu, J, Hu, W, Chen, H, Ni, Q, Xu, H, Yang, X., Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm* 2007, **328** (2), 191-5.
22. Bhalerao SS, Raje Harshal A. Preparation, optimization, characterization, and stability studies of salicylic acid liposomes. *Drug Dev Ind Pharm* 2003, **29** (4), 451-67.
23. Castro GA, Oliveira CA, Mahecha GAB, Ferreira LAM. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. *Arch Dermatol Res* 2011, **303** (7), 513-520.
24. Dominguez-Delgado CL, Rodriguez-Cruz IM, Escobar-Chavez JJ, Calderon-Lojero IO, Quintanar-Guerrero D, Ganem A. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for the treatment of acne. *Eur J Pharm Biopharm* 2011, **79** (1), 102-7.
25. Fadel M, Salah M, Samy N, Mona S. Liposomal methylene blue hydrogel for selective photodynamic therapy of acne vulgaris. *J Drugs Dermatol: JDD* 2009, **8** (11), 983-90.
26. Honzak L, Sentjurc M. Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. *Pflugers Arch: European Journal of Physiology* 2000, **440** (5), R44-5.
27. Kaur N, Puri R, Jain SK. Drug-cyclodextrin-vesicles dual carrier approach for skin targeting of anti-acne agent. *AAPS PharmSciTech* 2010, **11** (2), 528-37.
28. Manconi M, Sinico C, Valenti D, Lai F, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *Int J Pharm* 2006, **311** (1-2), 11-9.
29. Mandawgade SD, Patravale VB. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. *Int J Pharm* 2008, **363** (1-2), 132-8.
30. Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *J Control Release* 2005, **103** (1), 123-36.
31. Westendorf AM. Applications of nanoparticles for treating cutaneous infection. *J Invest Dermatol* 2013, **133** (5), 1133-1135.
32. Shroot, B, Michel, S., Pharmacology and chemistry of adapalene. *J Am Acad Dermatol* 1997, **36** (6), 96-103.
33. Michel S, Jomard A, Démarchez M. Pharmacology of adapalene. *Br J Dermatol* 1998, **139** (s52), 3-7.
34. Czernielewski J, Michel S, Bouclier M, Baker M, Hensby C. Adapalene biochemistry and the evolution of a new topical retinoid for treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001, **15** (s3), 5-12.
35. Adapalene. Erişim 10.11.2018, <https://www.wikiwand.com/en/Adapalene#/citenoteGalermaPatent12>
36. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging* 2006, **1** (4), 327-48.

37. Trichard L, Delgado-Charro MB, Guy RH, Fattal E, Bochot A. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. *Pharm Res* 2008, **25** (2), 435-40.
38. Allec J, Chatelus A, Wagner N. Skin distribution and pharmaceutical aspects of adapalene gel. *J Am Acad Dermatol* 1997, **36**, 119-25.
39. Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res* 1993, **10** (12), 1738-44.
40. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2004, **56** (5), 603-18.
41. Moradi Tuchayi S, Alexander TM, Nadkarni A, Feldman SR. Interventions to increase adherence to acne treatment. *Patient Prefer Adherence* 2016, **10**, 2091-2096.
42. Tan X, Feldman SR, Chang J, Balkrishnan R. Topical drug delivery systems in dermatology: A review of patient adherence issues. *Expert Opin Drug Deliv* 2012, **9**, 1263-71.
43. Bhatia G, Zhou Y, Banga AK. Adapalene microemulsion for transfollicular drug delivery. *J Pharm Sci* 2013, **102** (8), 2622-2631.
44. Jain AK, Jain A, Garg NK, Agarwal A, Jain A, Jain SA ve ark. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, **121**, 222-9.
45. Pereira RL, Leites FI, Paese K, Sponchiado RM, Michalowski CB, Guterres SS ve ark. Hydrogel containing adapalene- and dapsone-loaded lipid-core nanocapsules for cutaneous application: development, characterization, in vitro irritation and permeation studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2016, **42** (12), 2001-2008.
46. Kumar V, Banga AK. Intradermal and follicular delivery of adapalene liposomes. *Drug Dev Ind Pharm* 2016, **42** (6), 871-9.
47. Pearson RM, Sunoqrot S, Hsu HJ, Bae JW, Hong S. Dendritic nanoparticles: the next generation of nanocarriers? *Ther Deliv* 2012, **3** (8), 941-59.
48. Ali ME, Rahman MM, Dhahi TS, Kashif M, Sarkar MS, Basirun WJ ve ark. Nanostructured materials: Bioengineering platforms for sensing nucleic acids. *İçinde Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier; 2016.
49. Carlmark A, Hawker C, Hult A, Malkoch M. New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem Soc Rev* 2009, **38** (2), 352-62.
50. Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **71** (3), 445-62.
51. Tomalia DA. Birth of a new macromolecular architecture: Dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 2004, **37** (2), 39-57.
52. Cheng Y, Xu Z, Ma M, Xu T. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. *J Pharm Sci* 2008, **97** (1), 123-43.
53. Winnicka K, Sosnowska K, Wieczorek P, Sacha PT, Tryniszewska E. Poly(amidoamine) dendrimers increase antifungal activity of clotrimazole. *Biol Pharm Bull* 2011, **34** (7), 1129-33.
54. Winnicka K, Wroblewska M, Wieczorek P, Sacha PT, Tryniszewska E. Hydrogel of ketoconazole and PAMAM dendrimers: Formulation and antifungal activity. *Molecules* 2012, **17** (4), 4612.
55. Chauhan AS, Sridevi S, Chalasani KB, Jain AK, Jain SK, Jain NK ve ark. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J Control Release* 2003, **90** (3), 335-43.

56. Kalhapure RS, Akamanchi KG. Oleodendrimers: a novel class of multicephalous heterolipids as chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Int J Pharm* 2013, **454** (1), 158-66.
57. Borowska K, Laskowska B, Magon A, Mysliwiec B, Pyda M, Wołowiec S. PAMAM dendrimers as solubilizers and hosts for 8-methoxypsoralene enabling transdermal diffusion of the guest. *Int J Pharm* 2010, **398** (1-2), 185-9.
58. Borowska K, Wołowiec S, Rubaj A, Głowniak K, Sieniawska E, Radej S. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene—In vivo study. *Int J Pharm* 2012, **426** (1), 280-283.
59. Agrawal U, Mehra NK, Gupta U, Jain NK. Hyperbranched dendritic nano-carriers for topical delivery of dithranol. *J Drug Target* 2013, **21** (5), 497-506.
60. Na M, Yiyun C, Tongwen X, Yang D, Xiaomin W, Zhenwei L ve ark. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies. *Eur J Med Chem* 2006, **41** (5), 670-4.
61. Yang Y, Sunoqrot S, Stowell C, Ji J, Lee CW, Kim JW ve ark. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity of poly(amidoamine) dendrimers on their skin penetration. *Biomacromolecules* 2012, **13** (7), 2154-62.
62. Yang Y, Pearson RM, Lee O, Lee C-W, Chatterton RT, Khan SA ve ark. Dendron-based micelles for topical delivery of endoxifen: A potential chemo-preventive medicine for breast cancer. *Adv Funct Mat* 2014, **24** (17), 2442-2449.
63. Gheybi H, Adeli M. Supramolecular anticancer drug delivery systems based on linear–dendritic copolymers. *Polymer Chemistry* 2015, **6** (14), 2580-2615.
64. Gillies ER, Jonsson TB, Frechet JM. Stimuli-responsive supramolecular assemblies of linear-dendritic copolymers. *J Am Chem Soc* 2004, **126** (38), 11936-43.
65. Tyagi R, Malhotra S, Thünemann AF, Sedighi A, Weber M, Schäfer A ve ark. Investigations of host–guest interactions with shape-persistent nonionic dendritic micelles. *J Phys Chem C* 2013, **117** (23), 12307-12317.
66. Forslind B. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* 1994, **74** (1), 1-6.
67. Williams AC. Structure and function of human skin. İçinde *Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice*, Williams AC, editör. London: Pharmaceutical Press; 2003. pp 1-25.
68. Aksoy B. Derinin doğal bağışıklık sistemi. *TURKDERM* 2013, **47** (1), 2-11.
69. Ohman H, Vahlquist A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 1994, **74** (5), 375-9.
70. Ryan E, Grice JE, Roberts MS. Nanotechnology for topical and transdermal drug delivery and targeting. İçinde *Nanotechnology and drug delivery: nano-engineering strategies and nanomedicines against severe diseases*. Arias JL, editör. CRC Press; 2016.
71. Maibach H, Patrick E. Dermatotoxicology. İçinde *Principles and Methods of Toxicology*, 4th ed, Hayes WA, editör. Philadelphia: Taylor and Francis; 2001.
72. Wang Y, Thakur R, Fan Q, Michniak-Kohn B. Transdermal iontophoresis: Combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, **60**, 179-91.
72. Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12** (9), 565-80.
73. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 8th ed. New York, USA: McGrawHill Companies Inc.; 2012.
74. Gray H. *Gray's Anatomy*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1985.

75. Wilhelm K-P, Elsner P, Berardesca E, Maibach Howard I. *Bioengineering of the Skin: Skin Imaging & Analysis*. 2th ed. CRC Press; 2006.
76. Igarashi T, Nishino K, Nayar SK. The appearance of human skin: A survey. *Found. Trends. Comput. Graph. Vis.* 2007, **3** (1), 1-95.
77. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv* 2006, **13** (3), 175-87.
78. Tur E, Physiology of the skin-differences between women and men. *Clin Dermatol* 1997, **15** (1), 5-16.
79. Klipper WA. Biotransformation capacity of reconstructed human skin versus human skin ex vivo-analysing prednicarbate and testosterone as example. Freie Universität Berlin, Berlin, 2013.
80. Menton D. Skin: Our living armor. *Answers in Genesis* 2009. Erişim 26.11.2018, <https://answersingenesis.org/human-body/skin/>
81. College O. Layers of the skin. İçinde *Anatomy and Physiology*, Rice University OpenStax College; 2013. Erişim 18.11.2018, <https://cnx.org/contents/FPtK1zmmh@8.79:RxywCGkA@5/Layers-of-the-Skin>
82. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 2006, **1758** (12), 2080-95.
83. Marks JG, Miller JJ. Structure and function of the skin. İçinde *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology* 6th ed, Marks JG, Miller JJ, editörler. London: Elsevier Inc.; 2018. pp 2-10.
84. Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica. Supplementum* 2000, **208**, 44-5.
85. Del Rosso JQ, Levin J. The clinical relevance of maintaining the functional integrity of the stratum corneum in both healthy and disease-affected skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 2011, **4** (9), 22-42.
86. Derinin katmanları. Erişim 17.10.2018, ThingLink: <https://www.thinglink.com/scene/889830976895582209>
87. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3** (2), 115-24.
88. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003, **121** (2), 231-41.
89. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983, **80**, 44s-49s.
90. Benson HA. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* 2005, **2** (1), 23-33.
91. Elias PM, Williams ML. What is the skin barrier, and why does it matter? Çizim: Jessica C. Kraft. Erişim 25.11.2018, <https://eliasandwilliams.com/skin-barrier/>
92. Benson HAE, Watkinson AC. Skin structure, function, and permeation. İçinde *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. Benson HAE, Watkinson AC, editörler. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012; pp 3-22.
93. Walters KA, Roberts MS. The structure and function of skin. İçinde *Dermatological and Transdermal Formulations*. Walters KA, editör. New York, NY: Informa Healthcare USA Inc.; 2007. pp 1-39.
94. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002, **12** (4), 390-9.
95. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* 2003, **42** (1), 1-36.

96. Zouboulis CC. Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol* 2004, **22** (5), 360-6.
97. Montagna W, Kligman A, Carlisle K. *Atlas of normal human skin: Plate 107*. New York, NY: Springer-Verlag; 1992.
98. John H, Balszuweit F, Kehe K, Worek F, Thiermann H. Toxicokinetics of chemical warfare agents: Nerve agents and vesicants. İçinde *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Gupta RC, editör. San Diego: Academic Press; 2009; pp 755-790.
99. Brain KR, Chilcott RP. Physicochemical factors affecting skin absorption. İçinde *Principles and Practice of Skin Toxicology*, Chilcott RP, Price S, editörler. England: John Wiley & Sons Ltd; 2008. pp 83-92.
100. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci* 2008, **34** (4), 203-222.
101. Kalia YN, Guy RH. Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **48** (2-3), 159-72.
102. Bolzinger M-A, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2012, **17** (3), 156-165.
103. Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry W ve ark. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. *Eur J Pharm Biopharm* 2011, **77** (3), 465-468.
104. Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemeister T, Linscheid M, Sinkgraven R, Sterry W ve ark. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 2008, **65** (4), 488-92.
105. Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J Pharm Sci* 1991, **80** (5), 424-427.
106. Lauer AC, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND. Transfollicular drug delivery. *Pharm Res* 1995, **12** (2), 179-186.
107. Lademann J, Otberg N, Richter H, Jacobi U, Schaefer H, Blume-Peytavi U ve ark. Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 2003, **54** (4), 321-3.
108. Wilkinson SC, Williams FM. Cutaneous metabolism. İçinde *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. 2nd ed. Roberts MS, editör. CRC Press; 2007. pp 89-115.
109. Prusakiewicz JJ, Ackermann C, Voorman R. Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm Res* 2006, **23** (7), 1517-24.
110. Değim T. Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. İçinde *Modern Farmasötik Teknoloji*. Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T ve ark., editörler. Ankara: TEB Eczacılık Akademisi; 2009.
111. Millington PF, Wilkinson R. Mechanical, thermal and electrical properties. İçinde *Skin* New York: Cambridge Univ. Press; 1983. pp 113-142.
112. Bierman W. The temperature of the skin surface. *J Am Med Assoc: JAMA* 1936, **106** (14), 1158-1162.
113. Shani J, Barak S, Levi D, Ram M, Schachner ER, Schlesinger T ve ark. Skin penetration of minerals in psoriatics and guinea-pigs bathing in hypertonic salt solutions. *Pharmacol Res Commun* 1985, **17** (6), 501-12.
114. Schaefer H, Zesch A, Stuttgen G. Penetration, permeation, and absorption of triamcinolone acetonide in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 1977, **258** (3), 241-9.

115. Gould AR, Sharp PJ, Smith DR, Stegink AJ, Chase CJ, Kovacs JC ve ark. Increased permeability of psoriatic skin to the protein, plasminogen activator inhibitor 2. *Arch Dermatol Res* 2003, **295** (6), 249-54.
116. Aalto-Korte K, Turpeinen M. Transepidermal water loss and absorption of hydrocortisone in widespread dermatitis. *Br J Dermatol* 1993, **128** (6), 633-5.
117. Hadgraft J, Guy RH. Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: Mathematical Models and In Vitro Studies. İçinde *Transdermal Drug Delivery*, 2nd ed. Guy RH, Hadgraft J, editörler. Marcel Dekker, Inc.; 2003.
118. Farahmand S, Maibach HI. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. *Int J Pharm* 2009, **367** (1), 1-15.
119. Winiwarter S, Ridderström M, Ungell AL, Andersson TB, Zamora I. Use of molecular descriptors for absorption, distribution, metabolism, and excretion predictions. İçinde *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Taylor JB, Trigg DJ, editörler. Oxford: Elsevier; 2007. pp 531-554.
120. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technolo Today* 2000, **3** (9), 318-326.
121. Yalkowsky SH. Solubility and partitioning V: Dependence of solubility on melting point. *J Pharm Sci* 1981, **70** (8), 971-973.
122. Lawrence Joseph Henderson. Erişim 14.11.2018, <https://www.britannica.com/biography/Lawrence-Joseph-Henderson>
123. Bhagavan NV. Water, Acids, Bases, and Buffers. İçinde *Medical Biochemistry* 4th ed. Bhagavan NV, editör. San Diego: Academic Press; 2002. pp 1-16.
124. Pugh WJ, Degim IT, Hadgraft J. Epidermal permeability-penetrant structure relationships: 4, QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge. *Int J Pharm* 2000, **197** (1-2), 203-11.
125. Pugh WJ, Chilcott RP. Principles of Diffusion and Thermodynamics. İçinde *Principles and Practice of Skin Toxicology*, Chilcott RP, Price S, editörler. England: John Wiley & Sons Ltd.; 2008. pp 93-107.
126. Dragicevic N, Maibach H. Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev* 2018, **127**, 58-84.
127. Sarunyoo S. An Overview of skin penetration enhancers: Penetration enhancing activity, skin irritation potential and mechanism of action. *Songklanakarin J Sci Technol (SJST)* 2009; **31**, 299-321.
128. Dragicevic N, Maibach HI. *Percutaneous Penetration Enhancers-Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2016.
129. Suffredini G, East JE, Levy LM. New applications of nanotechnology for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2014, **35** (7), 1246-53.
130. Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release* 2004, **97** (3), 477-84.
131. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release* 2005, **109** (1-3), 169-88.
132. Souto EB, Almeida A, Müller RH. Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol* 2007, **3**, 317-31.

133. Lin YK, Huang ZR, Zhuo RZ, Fang JY. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *Int J Nanomedicine* 2010, **5**, 117-28.
134. Yang Y, Bugno J, Hong S. Nanoscale polymeric penetration enhancers in topical drug delivery. *Polymer Chemistry* 2013, **4** (9), 2651-2657.
135. Mohammad EA, Elshemey WM, Elsayed AA, Abd-Elghany AA. Electroporation parameters for successful transdermal delivery of insulin. *Am J Ther* 2016, **23** (6), 1560-67.
136. Delgado-Charro, MB, Guy RH. Iontophoresis: Applications in Drug Delivery and Noninvasive Monitoring. İçinde *Transdermal Drug Delivery*. 2nd ed. Revised and Expanded. Guy RH, Hadgraft J, editörler. NY, USA: Marcel Dekker; 2002. pp 199-225.
137. del Río-Sancho S, Serna-Jiménez CE, Sebastián-Morelló M, Calatayud-Pascual MA, Balaguer-Fernández C, Femenía-Font A ve ark. Transdermal therapeutic systems for memantine delivery. Comparison of passive and iontophoretic transport. *Int J Pharm* 2017, **517** (1), 104-111.
138. Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002, **243** (1-2), 1-15.
139. Azagury A, Khoury L, Enden G, Kost J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014, **72**, 127-143.
140. Murthy SN, Sammeta SM, Bowers C. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. *J Control Release* 2010, **148** (2), 197-203.
141. Lee JW, Gadiraju P, Park J-H, Allen MG, Prausnitz MR. Microsecond thermal ablation of skin for transdermal drug delivery. *J Control Release* 2011, **154** (1), 58-68.
142. Sintov AC, Hofmann MA. A novel thermo-mechanical system enhanced transdermal delivery of hydrophilic active agents by fractional ablation. *Int J Pharm* 2016, **511** (2), 821-830.
143. Birchall J, Coulman S, Anstey A, Gateley C, Sweetland H, Gershonowitz A ve ark. Cutaneous gene expression of plasmid DNA in excised human skin following delivery via microchannels created by radio frequency ablation. *Int J Pharm* 2006, **312** (1), 15-23.
144. Sarpie DF, Johnson B, Cormier M, Burkoth TL, Bellhouse BJ. Bioavailability following transdermal powdered delivery (TPD) of radiolabeled inulin to hairless guinea pigs. *J Control Release* 1997, **47** (1), 61-69.
145. Kondo T, McGregor M, Chu Q, Chen D, Horimoto T, Kawaoka Y. A protective effect of epidermal powder immunization in a mouse model of equine herpesvirus-1 infection. *Virology* 2004, **318** (1), 414-419.
146. Zhang Z, Tsai PC, Ramezanli T, Michniak-Kohn BB. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2013, **5** (3), 205-18.
147. Escobar-Chávez J, Díaz-Torres R, Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL, Morales RS, Ángeles-Anguiano E ve ark. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Res Rep Transdermal Drug Deliv* 2012, **1**, 3-17.
148. Simon JA, ESTRASORB Study Group. Estradiol in micellar nanoparticles: the efficacy and safety of a novel transdermal drug-delivery technology in the management of moderate to severe vasomotor symptoms. *Menopause* 2006, **13** (2), 222-231.
149. Lee R, Shenoy D, Sheel R. Micellar Nanoparticles: Applications for Topical and Passive Transdermal Drug Delivery. İçinde *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery System*, Kulkarni VS, editör. Elsevier Inc.; 2010. pp 37-58.

150. Uchechi O, Ogbonna JDN, Attama AA. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. İçinde *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, Sezer AD, editör. IntechOpen; 2014. pp 193-235.
151. Kim DG, Jeong YI, Choi C, Roh SH, Kang SK, Jang MK ve ark. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* 2006, **319** (1-2), 130-8.
152. Ozbas-Turan S, Akbuga J. Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. *Drug Deliv* 2011, **18** (3), 215-22.
153. Hasanovic A, Zehl M, Reznicek G, Valenta C. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. *J Pharm Pharmacol* 2009, **61** (12), 1609-1616.
154. Tan Q, Liu W, Guo C, Zhai G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *Int J Nanomedicine* 2011, **6**, 1621-1630.
155. Tsujimoto H, Hara K, Tsukada Y, Huang CC, Kawashima Y, Arakaki M ve ark. Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17** (17), 4771-7.
156. Goyal R, Macri L, Kohn J. Formulation strategy for the delivery of cyclosporine a: comparison of two polymeric nanospheres. *Sci Rep* 2015, **5**, (13065).
157. Shah PP, Desai PR, Patel AR, Singh MS. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* 2012, **33** (5), 1607-17.
158. Alvarez-Roman R, Barre G, Guy RH, Fessi H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm* 2001, **52** (2), 191-5.
159. Turos E, Shim JY, Wang Y, Greenhalgh K, Reddy GS, Dickey S ve ark. Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17** (1), 53-6.
160. Unnithan AR, Barakat NA, Pichiah PB, Gnanasekaran G, Nirmala R, Cha Y-S ve ark. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. *Carbohydr Polym* 2012, **90** (4), 1786-1793.
161. Sheihet L, Chandra P, Batheja P, Devore D, Kohn J, Michniak B. Tyrosine-derived nanospheres for enhanced topical skin penetration. *Int J Pharm* 2008, **350** (1-2), 312-9.
162. Batheja P, Sheihet L, Kohn J, Singer AJ, Michniak-Kohn B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *J Control Release* 2011, **149** (2), 159-167.
163. Kilfoyle BE, Sheihet L, Zhang Z, Laohoo M, Kohn J, Michniak-Kohn BB. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *J Control Release* 2012, **163** (1), 18-24.
164. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2002, **54**, S77-S98.
165. Ravikumar P, Grampurohit N, Mallya R. Microemulsions for topical use– A review. *Ind J Pharm Edu Res* 2011, **45**, 100-107.
166. Sonnevile-Aubrun O, Simonnet JT, L'Alloret F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci* 2004, **108-109**, 145-9.

167. Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *Int J Pharm* 2004, **270** (1-2), 279-86.
168. Sharma BB, Jain SK, Vyas SP. Topical liposome system bearing local anaesthetic lignocaine: preparation and evaluation. *J Microencapsulation* 1994, **11** (3), 279-86.
169. Nounou M, El-Khordagui LK, Khalafallah NA, Khalil S. Liposomal formulation for dermal and transdermal drug delivery: past, present and future. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2008, **2**, 9-18.
170. Benson, HAE. Elastic Liposomes for Topical and Transdermal Drug Delivery. İçinde *Liposomes*, D'Souza, GGM, editör. New York, NY: Humana Press; 2017. pp 107-117.
171. Dubey V, Mishra D, Dutta T, Nahar M, Saraf DK, Jain NK. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *J ControlRelease* 2007, **123** (2), 148-154.
172. Chourasia MK, Kang L, Chan SY. Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery. *Results in Pharma Sciences* 2011, **1** (1), 60-67.
173. Fang YP, Huang YB, Wu PC, Tsai YH. Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **73** (3), 391-8.
174. Li G, Fan Y, Fan C, Li X, Wang X, Li M ve ark. Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm* 2012, **82** (1), 49-57.
175. Maheshwari RGS, Tekade RK, Sharma PA, Darwhekar G, Tyagi A, Patel RP ve ark. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment. *SPJ: Saudi Pharm J* 2012, **20** (2), 161-170.
176. Ainbinder D, Touitou E. Testosterone ethosomes for enhanced transdermal delivery. *Drug Deliv* 2005, **12** (5), 297-303.
177. Mignani S, El Kazzouli S, Bousmina M, Majoral J-P. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, **65** (10), 1316-1330.
178. Venuganti VV, Perumal OP. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *Int J Pharm* 2008, **361** (1-2), 230-8.
179. Wang Z, Itoh Y, Hosaka Y, Kobayashi I, Nakano Y, Maeda I ve ark. Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *J Biosci Bioeng* 2003, **95** (5), 541-3.
180. Cheng Y, Man N, Xu T, Fu R, Wang X, Wang X ve ark. Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *J Pharm Sci* 2007, **96** (3), 595-602.
181. Kakadia PG, Conway BR. Solid Lipid Nanoparticles: A potential approach for dermal drug delivery. *Am J Pharmacol Sci* 2014, **2** (5A), 1-7.
182. Zhang J, Purdon CH, Smith EW. Solid lipid nanoparticles for topical drug delivery. *Am J Drug Deliv* 2006, **4**, 215-220.
183. Makhmalzade BS, Chavoshy F. Polymeric micelles as cutaneous drug delivery system in normal skin and dermatological disorders. *J Adv Pharm Technol Res* 2018, **9** (1), 2-8.
184. Lapteva M, Santer V, Mondon K, Patmanidis I, Chiriano G, Scapozza L ve ark. Targeted cutaneous delivery of ciclosporin A using micellar nanocarriers and the possible role of inter-cluster regions as molecular transport pathways. *J Control Release* 2014, **196**, 9-18.

185. Bachhav YG, Mondon K, Kalia YN, Gurny R, Moller M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J Control Release* 2011, **153** (2), 126-32.
186. Deng P, Teng F, Zhou F, Song Z, Meng N, Feng R. Methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (delta-valerolactone) copolymeric micelles for improved skin delivery of ketoconazole. *J Biomater Sci Polym Ed* 2017, **28** (1), 63-78.
187. Lalatsa A, Emeriewen K, Protopsalti V, Skelton G, Saleh GM. Developing transcutaneous nanoenabled anaesthetics for eyelid surgery. *Br J Ophthalmol* 2016, **100** (6), 871-6.
188. Šmejkalová D, Muthný T, Nešporová K, Hermannová M, Achbergerová E, Huerta-Angeles G ve ark. Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery. *Carbohydr Polym* 2017, **156**, 86-96.
189. Patzelt A, Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv* 2013, **10** (6), 787-797.
190. Desai P, Patlolla RR, Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol Membr Biol* 2010, **27** (7), 247-59.
191. Rotomskis R. Quantum Dot Migration Through Natural Barriers and Distribution in the Skin. İçinde *Nanoscience in Dermatology*. Hamblin MR, Avci P, Prow TW, editörler. Boston: Academic Press; 2016. pp 307-321.
192. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J Pharm Sci* 2010, **99** (1), 21-50.
193. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* 2004, **99** (1), 53-62.
194. Wu X, Price GJ, Guy RH. Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. *Mol Pharm* 2009, **6** (5), 1441-8.
195. Rancan F, Blume-Peytavi U, Vogt A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014, **7**, 23-34.
196. Hoffman RM. The hair follicle and its stem cells as drug delivery targets. *Expert Opin Drug Deliv* 2006, **3** (3), 437-443.
197. Roberts MS, Mohammed Y, Pastore MN, Namjoshi S, Yousef S, Alinaghi A ve ark. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J Control Release* 2017, **247**, 86-105.
198. Lapteva M, Möller M, Gurny R, Kalia YN. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. *Nanoscale* 2015, **7** (44), 18651-18662.
199. Pan-In P, Wongsomboon A, Kokpol C, Chaichanawongsaroj N, Wanichwecharungruang S. Depositing α -mangostin nanoparticles to sebaceous gland area for acne treatment. *J Pharmacol Sci* 2015, **129** (4), 226-232.
200. Suwannateep N, Wanichwecharungruang S, Fluhr J, Patzelt A, Lademann J, Meinke MC. Comparison of two encapsulated curcumin particular systems contained in different formulations with regard to in vitro skin penetration. *Skin Res Technol* 2013, **19** (1), 1-9.
201. Li L, Lishko VK, Hoffman RM. Liposomes can specifically target entrapped melanin to hair follicles in histocultured skin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993, **29** (3), 192-194.
202. Li L, Hoffman RM. Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice. *J Dermatol Sci* 1997, **14** (2), 101-108.

203. Aljuffali IA, Sung CT, Shen F-M, Huang C-T, Fang J-Y. Squarticles as a lipid nanocarrier for delivering diphenylcyprone and minoxidil to hair follicles and human dermal papilla cells. *AAPS PharmSciTech* 2014, **16** (1), 140-150.
204. Hoffman, R. M., Topical liposome targeting of dyes, melanins, genes, and proteins selectively to hair follicles. *J Drug Target* 1998, **5** (2), 67-74.
205. Li L, Hoffman RM. The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. *Nat Med* 1995, **1**, 705.
206. Ulmer M, Patzelt A, Vergou T, Richter H, Müller G, Kramer A ve ark. In vivo investigation of the efficiency of a nanoparticle-emulsion containing polihexanide on the human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2013, **84** (2), 325-329.
207. Wu H, Ramachandran C, Weiner ND, Roessler BJ. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *Int J Pharm* 2001, **220** (1), 63-75.
208. Lademann J, Knorr F, Richter H, Blume-Peytavi U, Vogt A, Antoniou C ve ark. Hair follicles – An efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charite -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol* 2008, **21** (3), 150-155.
209. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N ve ark. Hair follicles – A long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 2006, **19** (4), 232-236.
210. Matos BN, Reis TA, Gratieri T, Gelfuso GM. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol* 2015, **75**, 225-9.
211. Tran N, Knorr F, Mak WC, Cheung KY, Richter H, Meinke M ve ark. Gradient-dependent release of the model drug TRITC-dextran from FITC-labeled BSA hydrogel nanocarriers in the hair follicles of porcine ear skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2017, **116**, 12-16.
212. Watt FM. Mammalian skin cell biology: at the interface between laboratory and clinic. *Science* 2014, **346** (6212), 937-40.
213. Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schäfer U, Lehr C-M, Dähne L ve ark. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release* 2011, **150** (1), 45-48.
214. Lademann J, Patzelt A, Richter H, Antoniou C, Sterry W, Knorr F. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *J Biomed Opt* 2009, **14** (2), 021014.
215. Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W ve ark. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol* 2007, **16** (11), 946-950.
216. Zaenglein AL, Thiboutot DM. Acne vulgaris. İçinde *Dermatology*. 3th ed. Bologna J, Jorizzo J, Schaffer J, editörler. Basel, Switzerland: Saunders; 2012.
217. Tom WL, Friedlander SF. Acne through the ages: case-based observations through childhood and adolescence. *Clin Pediatr (Phila)* 2008, **47** (7), 639-51.
218. Olutunmbi Y, Paley K, English JC 3rd. Adolescent female acne: etiology and management. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2008, **21** (4), 171-6.
219. Zaenglein AL, Graber EM, Thiboutot DM, Strauss JS. Acne vulgaris and acneiform eruptions. İçinde *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editörler. New York: McGraw-Hill; 2008. pp 690–702.

220. Smolinski KN, Yan AC. Acne update: 2004. *Curr Opin Pediatr* 2004, **16** (4), 385-91.
221. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS ve ark. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2016, **74** (5), 945-73 e33.
222. Thiboutot D, Gollnick H, Bettoli V, Dreno B, Kang S, Leyden JJ ve ark. New insights into the management of acne: An update from the global alliance to improve outcomes in acne group. *J Am Acad Dermatol* 2009, **60** (5 Suppl), S1-50.
223. Simpson NB, Cunliffe WJ. Disorders of the Sebaceous Glands. İçinde *Rook's Textbook of Dermatology*. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editörler. Blackwell Science; 2008. pp 2121-2196.
224. Cunliffe WJ, Holland DB, Jeremy A. Comedone formation: etiology, clinical presentation, and treatment. *Clin Dermatol* 2004, **22** (5), 367-74.
225. Gollnick HP. From new findings in acne pathogenesis to new approaches in treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol: JEADV* 2015, **29** Suppl 5, 1-7.
226. Ghodsi SZ, Orawa H, Zouboulis CC. Prevalence, severity, and severity risk factors of acne in high school pupils: a community-based study. *J Invest Dermatol* 2009, **129** (9), 2136-41.
227. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2013, **168** (3), 474-85.
228. Makrantonaki E, Ganceviciene R, Zouboulis C. An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermatoendocrinol* 2011, **3** (1), 41-49.
229. Azmahani A, Nakamura Y, McNamara KM, Sasano H. The role of androgen under normal and pathological conditions in sebaceous glands: The possibility of target therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2016, **9** (4), 311-319.
230. Özlü E, Baykan A, Ertaş R. Akne Vulgaris etiyopatogenezine genel bakış. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg* 2018, **8** (1), 44-54.
231. Thiboutot DM, Strauss JS. Diseases of the sebaceous glands. İçinde *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. 6th ed. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editörler. New York: McGraw-Hill; 2003.
232. Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM. Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 1975, **65** (4), 382-4.
233. Tanghetti EA. The role of inflammation in the pathology of acne. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013, **6** (9), 27-35.
234. Holland DB, Jeremy AH. The role of inflammation in the pathogenesis of acne and acne scarring. *Semin Cutan Med Surg* 2005, **24** (2), 79-83.
235. Leyden JJ. A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003, **49** (3, Supplement), S200-S210.
236. Katsambas AD, Stefanaki C, Cunliffe WJ. Guidelines for treating acne. *Clin Dermatol* 2004, **22** (5), 439-444.
237. Güngör E. Akne. *Turk J Dermatol* 2012, **6**, 138-49.
238. Vyas A, Kumar Sonker A, Gidwani B. Carrier-based drug delivery system for treatment of acne. *ScientificWorldJournal* 2014, **2014**, 276260-276260.
239. Gollnick HPM, Krautheim A. Topical treatment in acne: Current status and future aspects. *Dermatology (Basel)* 2003, **206** (1), 29-36.
240. Bilen H, Akdeniz N, Karadağ AS. Aknede topikal tedaviler. *Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics* 2016, **9** (2), 53-6.
241. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. *Lancet* 2012, **379** (9813), 361-72.

242. Williams HC, Dellavalle RP. The growth of clinical trials and systematic reviews in informing dermatological patient care. *J Invest Dermatol* 2012, **132** (3, Part 2), 1008-1017.
243. Date AA, Naik B, Nagarsenker MS. Novel drug delivery systems: potential in improving topical delivery of antiacne agents. *Skin Pharmacol Physiol* 2006, **19** (1), 2-16.
244. Gamble R, Dunn J, Dawson A, Petersen B, McLaughlin L, Small A ve ark. Topical antimicrobial treatment of acne vulgaris: an evidence-based review. *Am J Clin Dermatol* 2012, **13** (3), 141-52.
245. Feldman S, Careccia RE, Barham KL, Hancox J. Diagnosis and treatment of acne. *Am Fam Physician* 2004, **69** (9), 2123-30.
246. Tan J. Dapsone 5% gel: A new option in topical therapy for acne. *Skin Therapy Lett* 2012, **17** (8), 1-3.
247. Bershad SV. The modern age of acne therapy: A review of current treatment options. *Mt Sinai J Med* 2001, **68** (4-5), 279-86.
248. Del Rosso JQ. The use of sodium sulfacetamide 10%-sulfur 5% emollient foam in the treatment of acne vulgaris. *J Clin Aesthet Dermatol* 2009, **2** (8), 26-9.
249. Ergin Ç, Ergin Ş, Kaleli İ, Şengül M, Erdoğan BŞ. Screening of antibiotic resistant *Propionibacterium acnes* from acne vulgaris patients: Data from Pamukkale University. *TURKDERM* 2007, **41** (1), 19-21.
250. Simpson RC, Grindlay DJ, Williams HC. What's new in acne? An analysis of systematic reviews and clinically significant trials published in 2010–11. *Clin Exp Dermatol* 2011, **36** (8), 840-844.
251. Eady EA, Gloor M, Leyden JJ. *Propionibacterium acnes* resistance: A worldwide problem. *Dermatology (Basel)* 2003, **206** (1), 54-56.
252. Kamangar F, Shinkai K. Acne in the adult female patient: a practical approach. *Int J Dermatol* 2012, **51** (10), 1162-1174.
253. Katsambas AD, Dessinioti C. Hormonal therapy for acne: why not as first line therapy? facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010, **28** (1), 17-23.
254. Liao DC. Management of acne. *J Fam Pract* 2003, **52** (1), 43-51.
255. Kunynetz RA. A review of systemic retinoid therapy for acne and related conditions. *Skin Therapy Lett* 2004, **9** (3), 1-4.
256. Cyrulnik AA, Viola KV, Gewirtzman AJ, Cohen SR. High-dose isotretinoin in acne vulgaris: improved treatment outcomes and quality of life. *Int J Dermatol* 2012, **51** (9), 1123-30.
257. Korting HC., Schäfer-Korting M. Carriers in the topical treatment of skin disease. İçinde *Handbook of Experimental Pharmacology*. Schäfer-Korting M, editör. Berlin: Springer-Verlag; 2010. pp 435-468.
258. Castro GA, Ferreira LA. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. *Expert Opin Drug Deliv* 2008, **5** (6), 665-79.
259. Shroot B, Eustache J, Bernardon J-M. Benzonaphthalene derivatives and compositions. *US4717720A* 1988.
260. FDA approval of Differin® Gel (adapalene 0.1%). Erişim 10.11.2018, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=020380>
261. FDA approval of Differin® Solution (adapalene 0.1%). Erişim 10.11.2018, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=020338>

262. FDA approval of Differin[®] Cream (adapalene 0.1%). Erişim 10.11.2018, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=020748>
263. FDA approval of Differin[®] Gel (adapalene 0.3%). Erişim 10.11.2018, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=021753>
264. ChemSpider. Erişim 16.10.2018, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23164960.html>
265. Irby CE, Yentzer BA, Feldman SR. A review of adapalene in the treatment of acne vulgaris. *J Adolesc Health Care* 2008, **43** (5), 421-4.
266. Bouclier M, Chatelus A, Ferracin J, Delain C, Shroot B, Hensb CN. Quantification of epidermal histological changes induced by topical retinoids and CD271 in the rhino mouse model using a standardized image analysis technique. *Skin Pharmacol* 1991, **4** (2), 65-73.
267. Shroot B, Michel S, Allec J, Chatelus A, Wagner N. A new concept of drug delivery for acne. *Dermatology (Basel)* 1998, **196** (1), 165-170.
268. Griffiths CE, Ancian P, Humphries J, Poncet M, Rizova E, Michel S ve ark. Adapalene 0.1% gel and adapalene 0.1% cream stimulate retinoic acid receptor mediated gene transcription without significant irritative effects in the skin of healthy human volunteers. *Br J Dermatol* 1998, **139** Suppl 52, 12-6.
269. DIFFERIN[®] (adapalene) Cream, 0.1%. Erişim 30.11.2018, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2000/20748lbl.pdf
270. DIFFERIN[®] % 0,1 Jel 30 G-Kullanma Talimatı (KT). Erişim 30.11.2018, <https://www.eip.com.tr/urunler/ilac/d>
271. Tolaymat L, Pellegrini MV. Adapalene. Erişim 30.11.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482509/>
272. DIFFERIN[®] %0.1 Jel. Erişim 30.11.2018, <https://cdn.ilacrehberi.com/differin-01-jel-ebb9-kt.pdf>
273. Kircik LH. Microsphere technology: hype or help? *J Clin Aesthet Dermatol* 2011, **4** (5), 27-31.
274. Rao GR, Ghosh S, Dhurat R, Sharma A, Dongre P, Baliga VP. Efficacy, safety, and tolerability of microsphere adapalene vs. conventional adapalene for acne vulgaris. *Int J Dermatol* 2009, **48** (12), 1360-5.
275. Ramezanli T, Michniak-Kohn BB. Development and characterization of a topical gel formulation of adapalene-TyroSpheres and assessment of its clinical efficacy. *Mol Pharm* 2018, **15** (9), 3813-3822.
276. Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 2012, **64**, 102-115.
277. Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 2005, **23** (12), 1517-26.
278. Gao C, Yan D. Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. *Eur Polym J* 2004, **29**, 183-275.
279. Jang W-D, Kamruzzaman Selim KM, Lee C-H, Kang I-K. Bioinspired application of dendrimers: From bio-mimicry to biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2009, **34** (1), 1-23.
280. Baars M, Karlsson AJ, Sorokin V, de Waal BFW, Meijer EW. Supramolecular modification of the periphery of dendrimers resulting in rigidity and functionality. *Angew Chem Int Ed Engl* 2000, **39** (23), 4262-4265.

281. Hong S, Leroueil PR, Majoros IJ, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM. The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem Biol* 2007, **14** (1), 107-115.
282. Rosen BM, Wilson CJ, Wilson DA, Peterca M, Imam MR, Percec V. Dendron-mediated self-assembly, disassembly, and self-organization of complex systems. *Chem Rev* 2009, **109** (11), 6275-540.
283. Wurm F, Frey H. Linear–dendritic block copolymers: The state of the art and exciting perspectives. *Prog Polym Sci* 2011, **36** (1), 1-52.
284. Kaminskas LM, Boyd BJ, Porter CJ. Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties. *Nanomedicine (Lond)* 2011, **6** (6), 1063-84.
285. Gillies ER, Fréchet JMJ. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today* 2005, **10** (1), 35-43.
286. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S ve ark. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym J* 1985, **17**, 117.
287. Hawker CJ, Frechet JMJ. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* 1990, **112** (21), 7638-7647.
288. Bolu BS, Sanyal R, Sanyal A. Drug Delivery Systems from Self-Assembly of Dendron-Polymer Conjugates. *Molecules* 2018, **23** (7).
289. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X ve ark. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. *Bioconjug Chem* 2004, **15** (4), 774-82.
290. Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev* 2011, **40** (1), 173-90.
291. Bharti JP, Prajapati SK, Jaiswal MK, Yadav RD. Dendrimer multifunctional nano-device: A review. *Int J Pharm Sci Res (IJPSR)* 2011, **2** (8), 1947-1960.
292. Garg, T, Singh, O, Arora, S, Murthy, R., Dendrimer- a novel scaffold for drug delivery. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011, **7** (2), 211-220.
293. Tomalia DA, Naylor AM, Goddard WA. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew Chem Int Ed Engl* 1990, **29** (2), 138-175.
294. Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi FV, Nanjwade VK. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2009, **38** (3), 185-196.
295. Vidal F, Guzman L. Dendrimer nanocarriers drug action: perspective for neuronal pharmacology. *Neural Regen Res* 2015, **10** (7), 1029-31.
296. Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* 2001, **6** (8), 427-436.
297. Labieniec M, Watala C. PAMAM dendrimers — diverse biomedical applications. Facts and unresolved questions. *Central Eur Journal of Biology* 2009, **4** (4), 434–451.
298. Kannan RM, Perumal OP, Kannan S. Dendrimers and Hyperbranched Polymers for Drug Delivery. İçinde *Biomedical Applications of Nanotechnology*. Labhasetwar V, Leslie-Pelecky DL, editörler. Wiley; 2007. p 121.
299. Winnicka K, Wroblewska M, Sosnowska K, Car H, Kasacka I. Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers' dermal toxicity in the rat skin model. *Drug Des Devel Ther* 2015, **9**, 1367-77.
300. Samdaria NGI, William A, Diallo M. Dendrimer-Enhanced Filtration: A Novel Idea For Chloride Removal. *Caltech Undergrad Res J: CURJ* 2010, **11** (1), 15-21.

301. Birnbaum ER, Rau KC, Sauer NN. Selective Anion Binding from Water Using Soluble Polymers. *Sep Sci Technol* 2003, **38** (2), 389-404.
302. Markowicz M, Szymański P, Ciszewski M, Kłys A, Mikiciuk-Olasik E. Evaluation of poly(amidoamine) dendrimers as potential carriers of iminodiacetic derivatives using solubility studies and 2D-NOESY NMR spectroscopy. *J Biol Phys* 2012, **38** (4), 637-656.
303. Madaan K, Kumar S, Poonia N, Lather V, Pandita D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioallied Sci* 2014, **6** (3), 139-150.
304. Chen Y, Wang M, Fang L. Biomaterials as novel penetration enhancers for transdermal and dermal drug delivery systems. *Drug Deliv* 2013, **20** (5), 199-209.
305. Venuganti VV, Perumal OP. Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *J Pharm Sci* 2009, **98** (7), 2316-56.
306. Sun M, Fan A, Wang Z, Zhao Y. Dendrimer-mediated drug delivery to the skin. *Soft Matter* 2012, **8** (16), 4301-4305.
307. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly(amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2013, **9** (1), 85-93.
308. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **47** (1), 113-131.
309. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. *Nano Today* 2012, **7** (1), 53-65.
310. Shi B, Fang C, You MX, Zhang Y, Fu S, Pei YY. Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice. *Colloid Polym Sci* 2005, **283** (9), 954-967.
311. Clare H, Lin PK, Tetley L, Cheng WP. The use of nano polymeric self-assemblies based on novel amphiphilic polymers for oral hydrophobic drug delivery. *Pharm Res* 2012, **29** (3), 782-94.
312. Santos S, Medronho B, Santos T, Antunes FE. Amphiphilic Molecules in Drug Delivery Systems. İçinde *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment*. Coelho J, editör. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. pp 35-85.
313. Bae JW, Pearson RM, Patra N, Sunoqrot S, Vuković L, Král P, Hong S. Dendron-mediated self-assembly of highly PEGylated block copolymers: a modular nanocarrier platform. *Chem Commun* 2011, **47** (37), 10302-10304.
314. Pearson RM, Patra N, Hsu HJ, Uddin S, Kral P, Hong S. Positively charged dendron micelles display negligible cellular interactions. *ACS macro letters* 2013, **2** (1), 77-81.
315. Sumer Bolu B, Manavoglu Gecici E, Sanyal R. Combretastatin A-4 conjugated antiangiogenic micellar drug delivery systems using dendron-polymer conjugates. *Mol Pharm* 2016, **13** (5), 1482-1490.
316. Oelker AM, Berlin JA, Wathier M, Grinstaff MW. Synthesis and characterization of dendron cross-linked PEG hydrogels as corneal adhesives. *Biomacromolecules* 2011, **12** (5), 1658-65.

317. Lundberg P, Walter MV, Montañez MI, Hult D, Hult A, Nyström A ve ark. Linear dendritic polymeric amphiphiles with intrinsic biocompatibility: synthesis and characterization to fabrication of micelles and honeycomb membranes. *Polym Chem* 2011, **2** (2), 394-402.
318. Amir RJ. Enzyme-responsive PEG–dendron hybrids as a platform for smart nanocarriers. *Synlett* 2015, **26** (19), 2617-2622.
319. Gaucher G, Satturwar P, Jones M-C, Furtos A, Leroux J-C. Polymeric micelles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2010, **76** (2), 147-158.
320. Cholkar K, Patel A, Vadlapudi AD, Mitra AK. Novel nanomicellar formulation approaches for anterior and posterior segment ocular drug delivery. *Recent Pat Nanomed* 2012, **2** (2), 82-95.
321. Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2007, **66** (3), 303-17.
322. Liu J, Lee H, Allen C. Formulation of drugs in block copolymer micelles: drug loading and release. *Curr Pharm Des* 2006, **12** (36), 4685-701.
323. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release* 2001, **73** (2-3), 137-72.
324. Francis MF, Cristea M, Winnik FM. Exploiting the vitamin B12 pathway to enhance oral drug delivery via polymeric micelles. *Biomacromolecules* 2005, **6** (5), 2462-7.
325. Yi Y, Yoon HJ, Kim BO, Shim M, Kim SO, Hwang SJ ve ark. A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. *J Control Release* 2007, **117** (1), 59-67.
326. Sant VP, Smith D, Leroux JC. Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkyl acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. *J Control Release* 2005, **104** (2), 289-300.
327. Aliabadi HM, Elhasi S, Mahmud A, Gulamhusein R, Mahdipoor P, Lavasanifar A. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. *Int J Pharm* 2007, **329** (1-2), 158-65.
328. Letchford K, Zastre J, Liggins R, Burt H. Synthesis and micellar characterization of short block length methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) diblock copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004, **35** (2), 81-91.
329. Yokoyama M, Opanasopit P, Okano T, Kawano K, Maitani Y. Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin. *J Drug Target* 2004, **12** (6), 373-84.
330. Fournier E, Dufresne MH, Smith DC, Ranger M, Leroux JC. A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers. *Pharm Res* 2004, **21** (6), 962-8.
331. Meli L, Santiago JM, Lodge TP. Path-dependent morphology and relaxation kinetics of highly amphiphilic diblock copolymer micelles in ionic liquids. *Macromolecules* 2010, **43** (4), 2018-2027.
332. Yokoyama M, Satoh A, Sakurai Y, Okano T, Matsumura Y, Kakizoe T, Kataoka K. Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size. *J Control Release* 1998, **55** (2-3), 219-29.
333. Kohori F, Yokoyama M, Sakai K, Okano T. Process design for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems. *J Control Release* 2002, **78** (1-3), 155-63.

334. Le Garrec D, Gori S, Luo L, Lessard D, Smith DC, Yessine MA, Ranger M, Leroux JC. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release* 2004, **99** (1), 83-101.
335. Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102** (13), 4688-93.
336. Poree DE, Giles MD, Lawson LB, He J, Grayson SM. Synthesis of amphiphilic star block copolymers and their evaluation as transdermal carriers. *Biomacromolecules* 2011, **12** (4), 898-906.
337. Spornath A, Aserin A, Sintov AC, Garti N. Phosphatidylcholine embedded micellar systems: enhanced permeability through rat skin. *J Colloid Interface Sci* 2008, **318** (2), 421-9.
338. Narasimha Murthy S, Shivakumar HN. Topical and Transdermal Drug Delivery. İçinde *Handbook of non-invasive drug delivery systems*. Kulkarni VS, editör. Burlington: Elsevier Inc.; 2010. pp 14-15.
339. Allen LVP, Nicholas G, Ansel Howard C. Semisolid Dosage Forms and Transdermal Systems. İçinde *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
340. Pena LE. Gel dosage form: Theory, formulation and processing. İçinde *Topical Drug Delivery Formulations*. Osborne DWA, Anton H, editörler. New York: Taylor & Francis Group LLC; 1989. pp 381-388.
341. FDA Guidance on Pharmaceutical Quality/CMC. Erişim 30.01.2018, <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>
342. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1). Erişim 30.01.2018, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
343. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A* 2003, **987** (1), 57-66.
344. Abouelmagd SA, Sun B, Chang AC, Ku YJ, Yeo Y. Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right? *Mol Pharm* 2015, **12** (3), 997-1003.
345. Beriro DJ, Cave MR, Wragg J, Thomas R, Wills G, Evans F. A review of the current state of the art of physiologically-based tests for measuring human dermal in vitro bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil. *J Hazard Mater* 2016, **305**, 240-259.
346. Diallo MS, Christie S, Swaminathan P, Johnson JH, Jr Goddard WA 3rd. Dendrimer enhanced ultrafiltration. 1. Recovery of Cu(II) from aqueous solutions using PAMAM dendrimers with ethylene diamine core and terminal NH₂ groups. *Environ Sci Technol* 2005, **39** (5), 1366-77.
347. Beezer AE, King ASH, Martin IK, Mitchel JC, Twyman LJ, Wain CF. Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron* 2003, **59** (22), 3873-3880.

348. Fedeli E, Hernandez-Ainsa S, Lancelot A, Gonzalez-Pastor R, Calvo P, Sierra T ve ark. Nanoobjects formed by ionic PAMAM dendrimers: hydrophilic/lipophilic modulation and encapsulation properties. *Soft Matter* 2015, **11** (30), 6009-17.
349. Pubchem. Erişim 15.10.2018, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60164#section=LogP>
350. Bernard BA. Adapalene, a new chemical entity with retinoid activity. *Skin Pharmacol* 1993, **6 Suppl 1**, 61-9.
351. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szymanski P, Kozak, Oliwia K, Studniarek M, Mikiciuk-Olasik E. PAMAM Dendrimers as Potential Carriers of Gadolinium Complexes of Iminodiacetic Acid Derivatives for Magnetic Resonance Imaging. *J Nanomater* 2015, **2015**, 11.
352. Ankrum JA, Miranda OR, Ng KS, Sarkar D, Xu C, Karp JM. Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype. *Nat Protoc* 2014, **9**, 233.
353. Dabholkar RD, Sawant RM, Mongayt DA, Devarajan PV, Torchilin VP. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: Some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. *Int J Pharm* 2006, **315** (1), 148-157.
354. Sallam MA, Motawaa AM, Mortada SM. An insight on human skin penetration of diflunisal: lipogel versus hydrogel microemulsion. *Drug Dev Ind Pharm* 2015, **41** (1), 141-147.
355. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol* 2015, **66** (1), 14-21.
356. OECD, *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*. 2004. Erişim 24.11.2018, <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264071087-en>
357. Changez M, Chander J, Dinda AK. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: in vivo. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006, **48** (1), 58-66.
358. Filipowicz A, Wolowiec S. Solubility and in vitro transdermal diffusion of riboflavin assisted by PAMAM dendrimers. *Int J Pharm* 2011, **408** (1-2), 152-6.
359. Venuganti VV, Sahdev P, Hildreth M, Guan X, Perumal O. Structure-skin permeability relationship of dendrimers. *Pharm Res* 2011, **28** (9), 2246-60.
360. Hathout RM, Mansour S, Mortada ND, Geneidi AS, Guy RH. Uptake of microemulsion components into the stratum corneum and their molecular effects on skin barrier function. *Mol Pharm* 2010, **7** (4), 1266-73.
361. Alvarez-Roman R, Merino G, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. *J Pharm Sci* 2003, **92** (6), 1138-46.
362. Youn SH, Choi CW, Choi JW, Youn SW. The skin surface pH and its different influence on the development of acne lesion according to gender and age. *Skin Res Technol (ISBS, ISDIS, ISSI)* 2013, **19** (2), 131-6.
363. Hsu H-j, Han Y, Cheong M, Král P, Hong S. Dendritic PEG outer shells enhance serum stability of polymeric micelles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2018, **14** (6), 1879-1889.
364. Karaca M, Dutta R, Ozsoy Y, Mahato RI. Micelle mixtures for coadministration of gemcitabine and GDC-0449 to treat pancreatic cancer. *Mol Pharm* 2016, **13** (6), 1822-32.

365. Muller B, Kasper M, Surber C, Imanidis G. Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin. Correlation with topical pharmacological effect. *Eur J Pharm Sci* 2003, **20** (2), 181-95.
366. D'Souza AJ, Topp EM. Release from polymeric prodrugs: linkages and their degradation. *J Pharm Sci* 2004, **93** (8), 1962-79.
367. Jornada DH, dos Santos Fernandes GF, Chiba DE, de Melo TR, dos Santos JL, Chung MC. The prodrug approach: A successful tool for improving drug solubility. *Molecules* 2015, **21** (1), 42.
368. Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res* 1992, **9** (5), 663-669.
369. Jacobi U, Tassopoulos T, Surber C, Lademann J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res* 2006, **297** (7), 303-310.
370. Lindemann U, Wilken K, Weigmann HJ, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques. *J Biomed Opt* 2003, **8** (4), 601-7.
371. Chatelain E, Gabard B, Surber C. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003, **16** (1), 28-35.
372. Zhao Y, Moddarese M, Jones SA, Brown MB. A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **72** (3), 521-528.
373. Bhatia S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. *İçinde Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. Cham: Springer International Publishing; 2016. pp 33-93.
374. Zhao Y, Brown MB, Jones SA. Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? *Nanomedicine* 2010, **6** (2), 227-36.
375. Lohani A, Verma A, Joshi H, Yadav N, Karki N. Nanotechnology-based cosmeceuticals. *ISRN dermatology* 2014, **2014**, 843687-843687.
376. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 2004, **123** (1), 168-76.
377. Russell JJ. Topical therapy for acne. *Am Fam Physician* 2000, **61** (2), 357-66.
378. Goodman G. Cleansing and moisturizing in acne patients. *Am J Clin Dermatol* 2009, **10** (1), 1-6.
379. Fyrand O, Jakobsen HB. Water-based versus alcohol-based benzoyl peroxide preparations in the treatment of acne vulgaris. *Dermatologica* 1986, **172** (5), 263-7.
380. Motaparthy K, Hsu S. Topical Antibacterial Agents. *İçinde Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*. 3th ed. Wolverton SE, editör. China: Saunders Elsevier; 2013. pp 445-459.
381. Kurian A, Barankin B. Delivery vehicle advances in dermatology. *STL FP* 2011, **7** (2). Erişim 12.11.2018, <http://www.skintherapyletter.com/family-practice/delivery-vehicles-fp/>
382. Bhatia SC. Biodiesel. *İçinde Advanced Renewable Energy Systems*. Bhatia SC, editör. India: Woodhead Publishing; 2014. pp 573-626.
383. Schuchardt U, Sercheli R, Rogério Matheus V. Transesterification of vegetable oils: A review. *J Braz Chem Soc* 1998, **9** (3).

384. Smith MB, March J. Addition to Carbon–Hetero Multiple Bonds. İçinde *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. pp 1419-1420.
385. Gonzalo S, Rodea-Palomares I, Leganés F, García-Calvo E, Rosal R, Fernández-Piñas F. First evidences of PAMAM dendrimer internalization in microorganisms of environmental relevance: A linkage with toxicity and oxidative stress. *Nanotoxicology* 2015, **9** (6), 706-718.
386. Fernández Freire P, Peropadre A, Rosal R, Pérez Martín JM, Hazen MJ. Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the Allium cepa test. *Sci Total Environ* 2016, **563-564**, 899-903.
387. Ciolkowski M, Rozanek M, Szewczyk M, Klajnert B, Bryszewska M. The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2011, **1808** (11), 2714-2723.
388. Kolhe P, Misra E, Kannan RM, Kannan S, Lieh-Lai M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int J Pharm* 2003, **259** (1-2), 143-60.
389. Böhme U, Klenge A, Hänel B, Scheler U. Counterion condensation and effective charge of PAMAM dendrimers. *Polymers* 2011, **3**, 812-819.
390. Maiti PK, Messina R. Counterion distribution and ζ -potential in PAMAM dendrimer. *Macromolecules* 2008, **41** (13), 5002-5006.
391. Tally L. Effect of solution pH on the retention & flux of aqueous solutions of G3-NH₂ PAMAM dendrimer by regenerated cellulose ultrafiltration membranes. *NNIN REU Research Accomplishments* 2004, 138-139. Erişim 18.11.2018 <https://www.nnin.org/sites/default/files/files/2004NNINreuTally.pdf>
392. Zhou T, Xiao X, Li G, Cai ZW. Study of polyethylene glycol as a green solvent in the microwave-assisted extraction of flavone and coumarin compounds from medicinal plants. *J Chromatogr A* 2011, **1218** (23), 3608-15.
393. Ma TY, Hollander D, Krugliak P, Katz K. PEG 400, a hydrophilic molecular probe for measuring intestinal permeability. *Gastroenterology* 1990, **98** (1), 39-46.
394. Musselman ED. Insights into interactions between poly(ethylene glycol) and proteins from molecular dynamics simulations. *University of Iowa, Iowa*, 2010. Erişim 15.11.2018, <https://ir.uiowa.edu/etd/1164/>
395. Gómez JL, Rodríguez GA, Cristancho DM, Delgado DR, Mora CP, Yurquina A ve ark. Extended hildebrand solubility approach applied to nimodipine in PEG 400 + ethanol mixtures. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* 2013, **42**, 103-121.
396. Oliveira CP, Ribeiro ME, Ricardo NM, Souza TV, Moura CL, Chaibundit C ve ark. The effect of water-soluble polymers, PEG and PVP, on the solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of Pluronic F127. *Int J Pharm* 2011, **421** (2), 252-7.
397. Popescu M-C, Filip D, Vasile C, Cruz C, Rueff JM, Marcos M ve ark. Characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and 2D IR correlation spectroscopy of PAMAM dendrimer. *J Phys Chem B* 2006, **110** (29), 14198-14211.
398. Amir RM, Anjum FM, Khan MI, Khan MR, Pasha I, Nadeem M. Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *J Food Sci Technol* 2013, **50** (5), 1018-1023.

399. Kulhari H, Pooja D, Prajapati SK, Chauhan AS. Performance evaluation of PAMAM dendrimer based simvastatin formulations. *Int J Pharm* 2011, **405** (1-2), 203-9.
400. Gupta L, Sharma AK, Gothwal A, Khan MS, Khinchi MP, Qayum A ve ark. Dendrimer encapsulated and conjugated delivery of berberine: A novel approach mitigating toxicity and improving in vivo pharmacokinetics. *Int J Pharm* 2017, **528** (1-2), 88-99.
401. Gautam S, Gautam P, Gupta A, Agrawal S, Sureka S, Gyan S ve ark. Spectroscopic characterization of dendrimers. *Int J Pharm Pharm Sci* 2012, **4** (2), 77-80.
402. Ün İ, İbişoğlu H, Şahin Ün Ş, Çoşut B, Kılıç A. Syntheses, characterizations, thermal and photophysical properties of cyclophosphazenes containing adamantane units. *Inorganica Chim Acta* 2013, **399**, 219-226.
403. Adamantane. Erişim 16.11.2018, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C281232&Mask=80>
404. Kaping S. Green approaches for the synthesis of pyrazolopyrimidines and study of their biological activity. Assam Don Bosco University, Assam-India. *Shodhganga@INFLIBNET* 2016. Erişim 18.11.2018 http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/110821/11/11_chapter%206.pdf
405. Mustafa R, Luo Y, Wu Y, Guo R, Shi X. Dendrimer-functionalized laponite nanodisks as a platform for anticancer drug delivery. *Nanomaterials* 2015, **5** (4), 1716-1731.
406. Tawfik MA, Tadros MI, Mohamed MI. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as potential release modulators and oral bioavailability enhancers of vardenafil hydrochloride. *Pharm Dev Technol* 2018, 1-10.
407. Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 2014, **39** (2), 268-307.
408. Otto DP, de Villiers MM. Poly(amidoamine) dendrimers as a pharmaceutical excipient. Are we there yet? *J Pharm Sci* 2018, **107** (1), 75-83.
409. Chanphai P, Froehlich E, Mandeville JS, Tajmir-Riahi HA. Protein conjugation with PAMAM nanoparticles: Microscopic and thermodynamic analysis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017, **150**, 168-174.
410. Zhu K, Li J, Lai H, Yang C, Guo C, Wang C. Reprogramming fibroblasts to pluripotency using arginine-terminated polyamidoamine nanoparticles based non-viral gene delivery system. *Int J Nanomedicine* 2014, **9**, 5837-5847.
411. Jackson CL, Chanzy HD, Booy FP, Drake BJ, Tomalia DA, Bauer BJ ve ark. Visualization of dendrimer molecules by Transmission Electron Microscopy (TEM): Staining methods and cryo-TEM of vitrified solutions. *Macromolecules* 1998, **31** (18), 6259-6265.
412. Yang H, Yu D, Wang H, Xie Q, Wu J, Wang J. Aggregation behavior of amphiphilic PAMAM-based hyperbranched polymer in the presence of conventional small molecular surfactants. *Adv Chem Eng Sci: ACES* 2013, **3** (3), 8.
413. Li M, Song W, Tang Z, Lv S, Lin L, Sun H ve ark. Nanoscaled poly(l-glutamic acid)/doxorubicin-amphiphile complex as ph-responsive drug delivery system for effective treatment of nonsmall cell lung cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, **5** (5), 1781-1792.
414. Ottaviani MF, Matteini P, Brustolon M, Turro NJ, Jockusch S, Tomalia DA. Characterization of Starburst dendrimers and vesicle solutions and their interactions by CW- and pulsed-EPR, TEM, and Dynamic Light Scattering. *J Phys Chem B* 1998, **102** (31), 6029-6039.

415. Ding J, Shi F, Xiao C, Lin L, Chen L, He C ve ark. One-step preparation of reduction-responsive poly(ethylene glycol)-poly(amino acid)s nanogels as efficient intracellular drug delivery platforms. *Polym Chem* 2011, **2** (12), 2857-2864.
416. Aliabadi HM, Lavasanifar A. Polymeric micelles for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006, **3** (1), 139-162.
417. Shuai X, Merdan T, Schaper AK, Xi F, Kissel T. Core-cross-linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconj Chem* 2004, **15** (3), 441-8.
418. Shuai X, Ai H, Nasongkla N, Kim S, Gao J. Micellar carriers based on block copolymers of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *J Control Release* 2004, **98** (3), 415-26.
419. Liu L, Li C, Li X, Yuan Z, An Y, He B. Biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol)/polylactide triblock copolymer micelles as anticancer drug carriers. *J Appl Polym Sci* 2001, **80** (11), 1976-1982.
420. Jette KK, Law D, Schmitt EA, Kwon GS. Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope. *Pharm Res* 2004, **21** (7), 1184-91.
421. Aliabadi HM, Mahmud A, Sharifabadi AD, Lavasanifar A. Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A. *J Control Release* 2005, **104** (2), 301-11.
422. Tadros T. Colloid and interface aspects of pharmaceutical science. İçinde *Colloid and Interface Science in Pharm Res and Development*. Ohshima H, Makino K, editörler. Amsterdam: Elsevier; 2014. pp 29-54.
423. Amann M, Willner L, Stellbrink J, Radulescu A, Richter D. Studying the concentration dependence of the aggregation number of a micellar model system by SANS. *Soft Matter* 2015, **11** (21), 4208-4217.
424. Zhou J, Wang L, Ma J. Recent research progress in the synthesis and properties of amphiphilic block co-polymers and their applications in emulsion polymerization. *Des Monomers Polym* 2009, **12** (1), 19-41.
425. Zhang G, Liang F, Song X, Liu D, Li M, Wu Q. New amphiphilic biodegradable β -cyclodextrin/poly(l-leucine) copolymers: Synthesis, characterization, and micellization. *Carbohydr Polym* 2010, **80** (3), 885-890.
426. Wu Q, Zhou D, Kang R, Tang X, Yang Q, Song X, Zhang G. Synthesis and self-assembly of thermoresponsive amphiphilic biodegradable polypeptide/poly(ethyl ethylene phosphate) block copolymers. *Chem Asian J* 2014, **9** (10), 2850-8.
427. Liu J, Zeng F, Allen C. Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent. *J Control Release* 2005, **103** (2), 481-97.
428. Satturwar P, Eddine MN, Ravenelle F, Leroux JC. pH-responsive polymeric micelles of poly(ethylene glycol)-b-poly(alkyl(meth)acrylate-co-methacrylic acid): influence of the copolymer composition on self-assembling properties and release of candesartan cilexetil. *Eur J Pharm Biopharm* 2007, **65** (3), 379-87.
429. Lu Y, Chowdhury D, Vladislavljević GT, Koutroumanis K, Georgiadou S. Production of fluconazole-loaded polymeric micelles using membrane and microfluidic dispersion devices. *Membranes* 2016, **6** (2), 29.
430. Cammas S, Matsumoto T, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Design of functional polymeric micelles as site-specific drug vehicles based on poly (α -hydroxy ethylene oxide-co- β -benzyl l-aspartate) block copolymers. *Mater Sci Eng C* 1997, **4** (4), 241-247.

431. Zhou W, Li C, Wang Z, Zhang W, Liu J. Factors affecting the stability of drug-loaded polymeric micelles and strategies for improvement. *J Nanopart Res* 2016, **18**, 1-18.
432. Lin Y-N, Su L, Smolen J, Li R, Song Y, Wang H ve ark. Co-assembly of sugar-based amphiphilic block polymers to achieve nanoparticles with tunable morphology, size, surface charge, and acid-responsive behavior. *Mater Chem Front* 2018, **2**, 2230-2238.
433. Marinova KG, Alargova RG, Denkov ND, Velev OD, Petsev DN, Ivanov IB ve ark. Charging of oil–water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir* 1996, **12** (8), 2045-2051.
434. Radomska-Soukharev A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **59** (6), 411-418.
435. Savian AL, Rodrigues D, Weber J, Ribeiro RF, Motta MH, Schaffazick SR ve ark. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. *Mater Sci Eng C* 2015, **46**, 69-76.
436. Patel NA, Patel NJ, Patel RP. Comparative development and evaluation of topical gel and cream formulations of psoralen. *Drug Discov Ther* 2009, **3** (5), 234-42.
437. Wuestenberg T. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons; 2014.
438. Ashland™, Klucel™ Hydroxypropylcellulose physical and chemical properties. Erişim 20.10.2018, https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC_11229_Klucel_HPC.pdf
439. Jennings V, Schafer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release* 2000, **66** (2-3), 115-26.
440. Çelebi N. Reoloji. İçinde *Modern Farmasötik Teknoloji*. 2th ed. TEB, Eczacılık Akademisi; 2009.
441. Altuntaş E, Yener G. Formulation and evaluation of thermoreversible in situ nasal gels containing mometasone furoate for allergic rhinitis. *AAPS PharmSciTech* 2017, **18** (7), 2673-2682.
442. Casson N. A Flow Equation for Pigment Oil Suspensions of Printing Ink Type. İçinde *Rheology of Dispersed System*. Mill CC, editör. Oxford: Pergamon Press; 1959. pp 84-102.
443. Björn A, Segura P, Karlsson A, Ejlertsson J, Svensson B. Rheological Characterization. İçinde *Biogas*. Kumar S, editör. InTech; 2012.
444. The pH of Milli-Q® water. Erişim 20.11.2018, <https://www.merckmillipore.com/TR/tr/water-purification/learning-centers/applications/environment-water-analysis/ph-measurement/water-impact/7c2b.qB.xDkAAAFAdFsENFl2,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F&bd=1>
445. Perk M. Basic Environmental Chemistry. İçinde *Soil and Water Contamination*. 2nd ed. CRC Press; 2013. p 17.
446. Ramachandran S, Chen S, Etzler F. Rheological Characterization of Hydroxypropylcellulose Gels. *Drug Dev Ind Pharm* 1999, **25** (2), 153-161.
447. Singh I, Singh T. Effect of addition of non ionic surfactant on the gas sensing properties of CuO films. *J Phys Conf Ser* 2014, **534** (012012).

448. Ramezanli T, Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. *Nanomedicine* 2017, **13** (1), 143-152.
449. Brown MC, Turner R, Lim ST. Topical Product Formulation Development. İçinde *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice*. Benson HAE, Watkinson AC, editörler. John Wiley and Sons; 2012. pp 255-286.
450. Marsh H. Differin® (adapalene) Gel, 0.1% for the treatment of acne. Erişim 20.11.2018, <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/NonprescriptionDrugsAdvisoryCommittee/UCM498775.pdf>
451. Nasr M, Abdel-Hamid S. Optimizing the dermal accumulation of a tazarotene microemulsion using skin deposition modeling. *Drug Dev Ind Pharm* 2016, **42** (4), 636-43.
452. Contri RV, Fiel LA, Alnasif N, Pohlmann AR, Guterres SS, Schafer-Korting M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *Int J Pharm* 2016, **507** (1-2), 12-20.
453. Babaei S, Ghanbarzadeh S, Adib ZM, Kouhsoltani M, Davaran S, Hamishehkar H. Enhanced skin penetration of lidocaine through encapsulation into nanoethosomes and nanostructured lipid carriers: a comparative study. *Die Pharmazie* 2016, **71** (5), 247-51.
454. Lau WM, Ng KW. Finite and Infinite Dosing. İçinde *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations*. Dragicevic N, Maibach HI, editörler. Springer Berlin Heidelberg; 2017. pp 35-44.
455. Selzer D, Abdel-Mottaleb MMA, Hahn T, Schaefer UF, Neumann D. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, **65** (2), 278-294.
456. Franz TJ, Lehman PA, Franz SF, North-Root H, Demetrulias JL, Kelling CK ve ark. Percutaneous penetration of N-Nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): Comparison of finite and infinite dose applications from cosmetic vehicles. *Toxicological Sciences* 1993, **21** (2), 213-221.
457. OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*. 2004. Erişim 18.11.2018, <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264078796-en>
458. Schaefer UF, Selzer U, Hansen S, Lehr C-M. Human Native and Reconstructed Skin Preparations for In Vitro Penetration and Permeation Studies. İçinde *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations: Methodology and General Considerations*. Dragicevic N, Howard IM, editörler. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2017. pp 185-203.
459. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *Test Guideline 428: Skin Absorption: In Vitro Method*. Erişim 21.11.2018, <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddcs/oecd/oecd428-508.pdf>
460. Bhushan B. Introduction—Human Hair, Skin, and Hair Care Products. İçinde *Biophysics of Human Hair: Structural, Nanomechanical, and Nanotribological Studies*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. pp 1-19.
461. Patzelt A, Sterry W, Lademann J. Hair Follicle Delivery. İçinde *Toxicology of the Skin*. Monteiro-Riviere N, editör. New York, NY: Informa Healthcare; 2010. pp 101-109.
462. Jung S, Oberg N, Thiede G, Richter H, Sterry W, Panzner S ve ark. Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles. *J Invest Dermatol* 2006, **126** (8), 1728-32.

463. Higuchi T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem* 1960, **11**, 85-97.
464. Tsai CJ, Hsu LR, Fang JY, Lin HH. Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. *Biol Pharm Bull* 1999, **22** (4), 397-401.
465. Lademann J, Knorr F, Richter H, Jung S, Meinke MC, Rühl E ve ark. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. *J Innov Opt Health Sci* 2015, **8** (4), 1530004.
466. Mohd F, Todo H, Yoshimoto M, Yusuf E, Sugibayashi K. Contribution of the hair follicular pathway to total skin permeation of topically applied and exposed chemicals. *Pharmaceutics* 2016, **8** (4), 32.
467. Mitragotri S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release* 2003, **86** (1), 69-92.
468. Wosicka H, Cal K. Targeting to the hair follicles: current status and potential. *J Dermatol Sci* 2010, **57** (2), 83-9.
469. Todo H, Kimura E, Yasuno H, Tokudome Y, Hashimoto F, Ikarashi Y ve ark. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol Pharm Bull* 2010, **33** (8), 1394-9.
470. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW. The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **72** (2), 317-23.
471. Mossberg K, Ericsson M. Detection of doubly stained fluorescent specimens using confocal microscopy. *J Microsc* 1990, **158** (2), 215-224.
472. Majoros IJ, Myc A, Thomas T, Mehta CB, Baker JR. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules* 2006, **7** (2), 572-579.
473. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. 3th ed. Academic Press; 2013.
474. Huttunen KM, Raunio H, Rautio J. Prodrugs--from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev* 2011, **63** (3), 750-71.
475. N'Da DD. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules* 2014, **19** (12), 20780-807.
476. Liu KS, Hsieh PW, Aljuffali IA, Lin YK, Chang SH, Wang JJ ve ark. Impact of ester promoieties on transdermal delivery of ketorolac. *J Pharm Sci* 2014, **103** (3), 974-86.
477. Hsieh PW, Aljuffali IA, Fang CL, Chang SH, Fang JY. Hydroquinone-salicylic acid conjugates as novel anti-melasma actives show superior skin targeting compared to the parent drugs. *J Dermatol Sci* 2014, **76** (2), 120-31.
478. Jacobson E, Kim H, Kim M, T. Wondrak, G, Jacobson. Developing Topical Prodrugs for Skin Cancer Prevention. İçinde *Fundamentals of Cancer Prevention*. Alberts D, Hess LM, editörler. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. pp 215-237.
479. Lobo S, Li H, Farhan N, Yan G. Evaluation of diclofenac prodrugs for enhancing transdermal delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2014, **40** (3), 425-32.
480. Montenegro L, Carbone C, Maniscalco C, Lambusta D, Nicolosi G, Ventura CA, Puglisi G. In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs. *Int J Pharm* 2007, **336** (2), 257-62.
481. Najlah M, Freeman S, Attwood D, D'Emanuele A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. *Int J Pharm* 2006, **308** (1-2), 175-182.
482. Halen PK, Murumkar PR, Giridhar R, Yadav MR. Prodrug designing of NSAIDs. *Mini Rev Med Chem* 2009, **9** (1), 124-39.

483. Ullah N, Huang Z, Sanaee F, Rodriguez-Dimitrescu A, Aldawsari F, Jamali F ve ark. NSAIDs do not require the presence of a carboxylic acid to exert their anti-inflammatory effect - why do we keep using it? *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016, **31** (6), 1018-28.
484. Gupta SK, Sathyan G, Hwang SS. Clinical assessment of transdermal drug delivery systems. İçinde *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*. Gosh TK, Pfister WR, Yum SI, editörler. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press; 1997. pp 215-248.
485. Pannatier A, Jenner P, Testa B, Etter JC. The skin as a drug-metabolizing organ. *Drug metabolism reviews* 1978, **8** (2), 319-43.
486. Bickers DR, Kappas A. The skin as a site of chemical metabolism. İçinde *Extrahepatic Metabolism of Drugs and other Foreign Compounds*. Gram TE, editör. Lancaster: MTP Press; 1980. pp 295-318.
487. Chan SY, Li Wan Po A. Prodrugs for dermal delivery. *Int J Pharm* 1989, **55** (1), 1-16.
488. Tojo K. The prediction of transdermal permeation: Mathematical models. İçinde *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems* Gosh TK, Pfister WR, Yum SI, editörler. Buffalo Grove, IL, USA: Interpharm Press; 1997. pp 113-138.
489. Tokudome Y, Katayanagi M, Hashimoto F. Esterase activity and intracellular localization in reconstructed human epidermal cultured skin models. *Ann Dermatol* 2015, **27** (3), 269-274.
490. Lau WM, Ng KW, Sakenyte K, Heard CM. Distribution of esterase activity in porcine ear skin, and the effects of freezing and heat separation. *Int J Pharm* 2012, **433** (1-2), 10-5.
491. Gyun Shin IL, Yeon Kim S, Moo Lee Y, Soo Cho C, Yong Kiel S. Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: I. Preparation and characterization. *J Control Release* 1998, **51** (1), 1-11.
492. Solmaz A. *Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Vehicles*, University of Groningen 2010. Erişim 23.11.2018, <https://www.rug.nl/research/zernike/education/topmasternanoscience/ns190solmaz.pdf>
493. Jones M-C, Leroux J-C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 1999, **48** (2), 101-111.
494. FDA Differin® Gel Adapalene 0.1% Topical Gel. Erişim 24.11.2018, <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/NonprescriptionDrugsAdvisoryCommittee/UCM495797.pdf>
495. Gullick DR, Ingram MJ, Pugh WJ, Cox PA, Gard P, Smart JD ve ark. Metabolism of captopril carboxyl ester derivatives for percutaneous absorption. *J Pharm Pharmacol* 2009, **61** (2), 159-65.
496. Ostacolo C, Marra F, Laneri S, Sacchi A, Nicoli S, Padula C, Santi P. Alpha-tocopherol pro-vitamins: synthesis, hydrolysis and accumulation in rabbit ear skin. *J Control Release* 2004, **99** (3), 403-13.
497. Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release* 2010, **141** (3), 277-299.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DENDRİTİK NANO TAŞIYICI SİSTEMLERİN DERMAL HEDEFLENDİRME AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%2	%1	%0	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	dspace.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	BEYZA BETÜL	Soyadı	GÖKÇE
Doğ.Yeri	ERZİNCAN	Doğ.Tar.	31/05/1989
Uyruğu	TC	TC Kim No	
Email	bbetulkocak@gmail.com	Tel	+90 541 878 2026

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	2018
Lisans	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezuniyet puanı: 3.44/4 (Üçüncülük derecesi)	2012
Lise	Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi Mezuniyet puanı: 93.12/100	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı	2014-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	YÖKDİL Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	81,25	98,75
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	88,87	88,45	70,74
(Diğer)			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (Proceedings) basılan bildiriler:

Beyza B. Gökçe, Filiz Emlik Çalık, Rana Sanyal, Richard H. Guy, Sevgi Güngör. Dendron-based micelles for dermal delivery and follicular targeting. "EUFEPS Annual Meeting 2018 - Crossing Barriers for Future Medicines", 24-26 Mayıs 2018, Athens, Greece (poster).

Beyza B. Gokce, Sevgi Gungor. Dermal hedeflendirmede nanofarmasötikler ve kozmetikteki uygulamaları. "8. Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi", 23-25 Şubat 2018, Antalya, Türkiye (sözlü bildiri).

Beyza B. Gokce, Sarah F. Cordery, Richard H. Guy, Sevgi Gungor. G2-PAMAM dendrimer-based nanocarriers for delivery and targeting of adapalene to hair follicles. "Skin@Bath Network Symposium", 13-14 Aralık 2017, Bath, UK (poster).

Beyza B. Koçak, Anna Bergstrand, Anette Larsson. Lithium incorporation into PLGA films by the emulsion technique. "4th International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences (IMPPS-4)", 18-21 Eylül 2014, İstanbul, Türkiye (poster).

Beyza B. Koçak, Melek Karaca, Emre Ş. Çağlar, Burcu Mesut. The role of internship in pharmacy education. "19th Annual Conference of the European Association of Faculties of Pharmacy (EAFP)", 16-18 Mayıs 2013, Ankara, Türkiye (poster).

Melek Karaca, Beyza B. Koçak, Emre Ş. Çağlar, Burcu Mesut. Solid dosage forms practices at pharmacy education. "19th Annual Conference of the European Association of Faculties of Pharmacy (EAFP)", 16-18 Mayıs 2013, Ankara, Türkiye (poster).

Yazılan Ulusal kitaplar veya kitaplarda bölümler:

Prof.Dr. Betül Dortunç, Doç.Dr. Oya Kerimoğlu, Doç.Dr. Timuçin Uğurlu, Öğr.Gör.Dr. Fatma Özaydın, Öğr.Gör.Dr. Gökçen Yaşayan, Yrd.Doç.Dr. Emine Alarçin, Öğr.Gör.Dr. Sevinç Şahbaz, Uzm.Ecz. Nesrin Uğurlu, Ecz. Beyza B. Koçak. Farmasötik Teknoloji & Kozmetoloji Laboratuvar Kitabı (2015).