

ASLI GÜRBÜZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

PSORİASİS TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
TOPIKAL TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ

ASLI GÜRBÜZ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MERYEM SEDEF ERDAL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca tezimin yönetilmesi ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde her zaman gösterdiği yakın ilgi, destek ve yardımlarından dolayı, bilimsel bakış açısıyla vizyonumu genişleten sabrı, güler yüzü ve hoşgörüsüyle manevi desteğini her zaman hissettiğim sevgili danışman hocam Sayın **Doç. Dr. M. Sedef Erdal**'a;

Yardım ve desteklerinden dolayı Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Eczacılık Teknolojisi Bölümü başkanı Sayın **Prof. Dr. Erdal Cevher**'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gösterdiği samimiyet ve yardımlarından dolayı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer**'e;

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardımlarını benden esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Sevgi Güngör**'e, Sayın **Doç. Dr. Ayca Yıldız Peköz**'e,

Acıbadem Üniversitesi'ndeki çalışmalarımı yürütmeme imkan sağlayan, bilgi, deneyimleri ve geniş vizyonu ile tezime katkıda bulunan Sayın **Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu**'na,

Her zaman maddi manevi desteklerini hissettiğim **Dr. Öğr. Üyesi Burcu Mesut**'a, **Dr. Öğr. Üyesi Ebru Altuntaş**'a ve **Dr. Ecz. Meltem Ezgi Durgun**'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını, ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim **Dr. Öğr. Üyesi İmren Esentürk Güzel**'e

Araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma;

Tüm sevgisi, sabrı, inancı, özverisi, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım **Ailem**'e ve müstakbel eşim **Ahmet Esad Yurtsever**'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30432.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Xİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	XVİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XXVİİ
ÖZET	XXİX
ABSTRACT.....	XXX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler	10
2.1.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri	10
2.1.2. Derinin Tabakaları	10
2.1.2.1. Epidermis	10
2.1.2.2. Dermis	13
2.1.2.3. Hipodermis.....	13
2.1.3. Topikal İlaç Uygulamasına Ait Genel Bilgiler	13
2.2. Psoriasis Hakkında Genel Bilgiler	15
2.2.1. Tanımı, Epidemiyolojisi.....	15
2.2.2. Patofizyolojisi	16
2.2.3. Tedavisi.....	18
2.2.3.1. Topikal Tedavi	18
2.2.3.2. Fototerapi	19
2.2.3.3. Sistemik Tedavi.....	20
2.2.3.4. Biyolojik Moleküller	21
2.3. Statin Grubu İlaçlar Hakkında Genel Bilgiler	22
2.3.1. Tanımı, Tarihçesi ve Tedavide Kullanımı	22
2.3.2. Pleiotropik Etkileri.....	23
2.3.3. Psoriasis Tedavisindeki Yeri.....	24
2.4. Fluvastatin Sodyum Hakkında Genel Bilgiler	26

2.4.1. Tanımı, Tarihçesi, Yapısı ve Özellikleri	26
2.4.2. Farmakolojik Özellikleri	27
2.4.3. Pleiotropik Etkileri	29
2.4.4. Psoriasis Tedavisindeki Yeri	31
2.5. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemler Hakkında Bilgiler	35
2.5.1. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yapısı ve Özellikleri	35
2.5.2. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri	36
2.5.2.1. Vorteksleme-Sonikasyon Yöntemi	36
2.5.2.2. Eter Enjeksiyon Yöntemi	37
2.5.2.3. Etanol Enjeksiyon-Sonikasyon Yöntemi	37
2.5.2.4. Klasik Soğuk Yöntem	37
2.5.2.5. Sıcak Yöntem	38
2.5.2.6. İnce Film Hidratasyon Yöntemi	38
2.5.2.7. Ters Faz Evaporasyon Yöntemi	38
2.5.2.8. Transmembran-pH Gradyent Yöntemi	39
2.5.3. Lipozomlar	39
2.5.4. Ultradeforme Olabilen Veziküler Sistemler	40
2.5.4.1. Transferzomlar	40
2.5.4.2. Etozomlar	41
2.5.4.3. Transetozomlar	42
2.6. Lipit Nanopartiküller Hakkında Bilgiler	42
2.6.1. Lipit Nanopartiküllerin Yapısı ve Özellikleri	42
2.6.2. Lipit Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri	43
2.6.2.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi	44
2.6.2.2. Solvent Emülsifikasyon/ Evaporasyon Yöntemi	46
2.6.2.3. Mikroemülsiyon Yöntemi	46
2.6.2.4. Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi	47
2.6.2.5. Emülsifikasyon-Ultrasonikasyon Yöntemi	47
2.6.2.6. Püskürterek Kurutma Yöntemi	48
2.6.2.7. Solvent Difüzyon ve Solvent Enjeksiyon Yöntemi	48
2.6.2.8. Çoklu Emülsiyon Yöntemi	49
2.6.2.9. Faz İnversiyon Yöntemi	49
2.6.3. Katı Lipit Nanopartiküller	50

2.6.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar	51
2.7. Nanoemülsiyonlar	54
2.7.1. Nanoemülsiyonların Yapısı ve Özellikleri.....	54
2.7.2. Nanoemülsiyonların Hazırlama Yöntemleri	55
2.7.2.1. Faz İnversiyon Bileşimi (PIC) Yöntemi	55
2.7.2.2. Faz inversiyon Sıcaklığı (PTT) Yöntemi	56
2.7.2.3. Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi	56
2.7.2.4. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi	56
2.7.2.5. Ultrasonikasyon Yöntemi.....	57
2.7.2.6. Mikroakışkanlaştırma Yöntemi.....	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	58
3.1. GEREÇLER.....	58
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	58
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	60
3.1.2.1. Kullanılan Aletler.....	60
3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler	62
3.2. YÖNTEM	64
3.2.1. Fluvastatin Sodyum'un Infrared (IR) Spektrumu	64
3.2.2. Fluvastatin Sodyum'un DSC Termogramı	64
3.2.3. Fluvastatin Sodyum' un HPLC Miktar Tayini Yöntemi.....	64
3.2.3.1. Kromatografik Koşullar	64
3.2.3.2. Mobil Fazın hazırlanması.....	64
3.2.3.3. Örneklerin Hazırlanması	65
3.2.4. Fluvastatin'in HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....	65
3.2.4.1. Doğrusallık.....	65
3.2.4.2. Kesinlik	66
3.2.4.3. Doğruluk	66
3.2.4.4. Seçicilik.....	66
3.2.4.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL).....	67
3.2.4.6. Örneklerin Stabilesi	67
3.2.5. Transetozom Formülasyon Çalışmaları	67
3.2.5.1. Transetozom Formülasyonlarının Hazırlanması	68
3.2.5.2. Transetozom Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmaları	68

3.2.5.2.1. Hidratasyon Ortamının Belirlenmesi	71
3.2.5.2.2. Sonikasyon Süresinin Belirlenmesi.....	74
3.2.5.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilité Çalışmaları.....	75
3.2.5.3.1. Partikül Boyutu ve Boyut Dağılımının Belirlenmesi	75
3.2.5.3.2. pH Değerlerinin Belirlenmesi	75
3.2.5.3.3. Stabilitenin Belirlenmesi	76
3.2.5.4. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları	76
3.2.5.4.1. Zeta Potansiyelin Belirlenmesi	76
3.2.5.4.2. İletkenlik Belirlenmesi	76
3.2.5.4.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	77
3.2.5.4.4. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri.....	78
3.2.5.4.5. ATR-FTIR Spektroskopi Analizi.....	78
3.2.5.5. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu	79
3.2.5.6. <i>İn Vitro</i> Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini	79
3.2.5.6.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması	79
3.2.5.6.2. <i>İn vitro</i> Dermal Penetrasyon Çalışması.....	79
3.2.5.6.3. <i>İn vitro</i> Dermal Penetrasyon Çalışması Optimizasyonu	80
3.2.5.6.4. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktarının Bant ile Soyma Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi	80
3.2.5.7. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	81
3.2.5.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi	81
3.2.5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	82
3.2.5.9.1. Hücre Hatları	82
3.2.5.9.2. Hücre Kültür Koşulları.....	82
3.2.5.9.3. <i>İn Vitro</i> Sitotoksité Çalışmaları	83
3.2.5.9.4. <i>İn Vitro</i> Antipsoriatik Aktivite Çalışmaları.....	84
3.2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistem (NLC) Formülasyon Çalışmaları	87

3.2.6.1. NLC Formülasyonlarının Hazırlanması	87
3.2.6.2. NLC Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmaları	88
3.2.6.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilité Çalışmaları.....	93
3.2.6.4. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	94
3.2.6.4.1. Zeta Potansiyel, İletkenlik, Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi ve ATR-FTIR Analizleri.....	94
3.2.6.4.2. DSC Analizi	94
3.2.6.5. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Optimizasyonu	94
3.2.6.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Karakterizasyonu	95
3.2.6.7. <i>İn Vitro</i> Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini	96
3.2.6.8. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	96
3.2.6.9. Floresan Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi.....	96
3.2.6.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	96
3.2.7. Transetozom ve NLC'lerin Jel Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar	97
3.2.7.1. Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	97
3.2.7.2. Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	98
3.2.7.2.1. pH Değerlerinin İncelenmesi	98
3.2.7.2.2. Reolojik özelliklerinin değerlendirilmesi.....	98
3.2.7.2.3. Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	99
3.2.7.2.4. Yayılabilirliğin Değerlendirilmesi	99
3.2.7.3. <i>İn Vitro</i> Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini	99
3.2.7.4. ATR-FTIR Analizi ile Nanotaşıyıcı İçeren Jel Formülasyonlarının Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	100
4. BULGULAR.....	101
4.1. Fluvastatin Sodyum'un Infrared (IR) spektrumu.....	101
4.2. Fluvastatin Sodyum'un DSC Termogramı	101

4.3. Fluvastatin Sodyum'un HPLC Miktar Tayini Yöntemi.....	102
4.4. Fluvastatin Sodyum'un HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	102
4.4.1. Doğrusallık.....	102
4.4.2. Kesinlik	103
4.4.3. Doğruluk	104
4.4.4. Seçicilik.....	105
4.4.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)	106
4.4.6. Örneklerin Stabilesi	106
4.5. Transetozom Formülasyon Çalışmaları	107
4.5.1. Transetozom Formülasyonlarının Hazırlanması	107
4.5.2. Transetozom Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	108
4.5.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Belirlenmesi	112
4.5.4. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilitelerine Ait Bulgular.....	114
4.5.5. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular	124
4.5.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Belirlenmesi.....	128
4.5.7. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular.....	129
4.5.8. İn Vitro Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular	130
4.5.8.1. İn vitro Dermal Penetrasyon Çalışması Optimizasyonu	130
4.5.8.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular.....	132
4.5.9. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	136
4.5.10. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular	144
4.5.11. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	147
4.5.11.1. <i>İn Vitro</i> Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular	147
4.5.11.2. <i>İn Vitro</i> Antipsoriyatik Aktivitenin Değerlendirilmesine Ait Bulgular ...	153
4.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistem (NLC) Formülasyon Çalışmaları	156

4.6.1. NLC Formülasyonlarının Hazırlanması.....	156
4.6.2. NLC Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	157
4.6.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Belirlenmesi	163
4.6.4. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilitelerine Ait Bulgular	164
4.6.5. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular	174
4.6.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Optimizasyonuna Ait Bulgular	182
4.6.7. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonlarının Belirlenmesi	184
4.6.8. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular.....	184
4.6.9. İn Vitro Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular	186
4.6.9.1. İn vitro Dermal Penetrasyon Çalışması Prosedür Optimizasyonu	186
4.6.9.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular.....	187
4.6.10. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	192
4.6.11. Floresan Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular	199
4.6.12. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	204
4.6.12.1. <i>İn Vitro</i> Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular	204
4.6.12.2. <i>İn Vitro</i> Antipsoriatik Aktivitenin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	209
4.7. Transetozom ve NLC'lerin Jel Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar....	212
4.7.1. Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	212
4.7.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular.....	220
4.7.3. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	222
5. TARTIŞMA	226

5.1. Giriş.....	226
5.2. Fluvastatin Sodyum Karakterizasyonu ve Miktar Tayini Yöntemi Validasyonunun Değerlendirilmesi.....	235
5.3. Transetozom Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	236
5.4. NLC Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	262
5.5. Transetozomal jel ve NLC jel Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi ..	288
KAYNAKLAR	293
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	322



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Transetozom ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon bileşenleri ve kullanılan miktar ve oranlar	69
Tablo 3-2: Etkin madde içermeyen transetozomların kodları ile bileşen ve oranları	70
Tablo 3-3: Fluvastatin sodyum yüklenen transetozomların kodları ile bileşen ve oranları	71
Tablo 3-4: Hidratasyon ortamının pH'sı 3'e ayarlanarak hazırlanan formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları.....	72
Tablo 3-5: Hidratasyon çözeltileri ve bu çözeltiler ile hazırlanan formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları.....	73
Tablo 3-6: Hidratasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların kodları ile bileşen ve oranları	74
Tablo 3-7: Sonikasyon süresinin optimizasyonunda kullanılan model transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları	75
Tablo 3-8: NLC ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon bileşenleri ve kullanılan miktar ve oranlar	89
Tablo 3-9: Etkin madde içermeyen ve tek sürfaktan ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları.....	90
Tablo 3-10: Etkin madde içermeyen ve iki farklı sürfaktan ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları	91
Tablo 3-11: Etkin madde içermeyen ve farklı katı ve sıvı lipidler ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları	92
Tablo 3-12: Kontrol amaçlı hazırlanan model SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları	95
Tablo 4-1: Fluvastatin sodyum'un doğrusallık çalışmasına ait bulgular (n=3)	103
Tablo 4-2: Fluvastatin sodyum'un doğrusallık çalışmasına ait determinasyon katsayısı ve doğru denklemi	103
Tablo 4-3: Fluvastatin sodyum'un miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları	104
Tablo 4-4: Fluvastatin sodyum'un miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları	104

Tablo 4-5: Plasebo 1 (TEZ-T20) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları.....	104
Tablo 4-6: Plasebo 2 (TEZ-T80) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları.....	105
Tablo 4-7: Plasebo 3 (NLC-T20) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları.....	105
Tablo 4-8: Plasebo 4 (NLC-T80) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları.....	105
Tablo 4-9: Fluvastatin sodyum örneklerinin stabilitesine ait bulgular	106
Tablo 4-10: Etkin madde içermeyen formülasyonlara ait ön formülasyon çalışması bulguları	108
Tablo 4-11: Fluvastatin sodyum yüklü formülasyonlara ait ön formülasyon çalışması bulguları	109
Tablo 4-12: Hidratasyon ortamının pH'sı 3 ayarlanarak hazırlanan formülasyonlara ait bulgular	110
Tablo 4-13: Farklı çözünme ortamlarında fluvastatin sodyum' un çözünürlüğü (n=3) 110	
Tablo 4-14: Hidratasyon çözeltileri ve bu çözeltiler ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular	111
Tablo 4-15: Hidratasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü formülasyonlara ait bulgular	111
Tablo 4-16: Sonikasyon süresi optimizasyonuna ait bulgular	112
Tablo 4-17: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları	113
Tablo 4-18: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları	114
Tablo 4-19: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların karakterizasyon bulguları.....	115
Tablo 4-20: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların karakterizasyon bulguları.....	116
Tablo 4-21: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-1	118
Tablo 4-22: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-2	119

Tablo 4-23: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-3	120
Tablo 4-24: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-1	121
Tablo 4-25: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-2	122
Tablo 4-26: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-3	123
Tablo 4-27: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozomların zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları	124
Tablo 4-28: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozomların enkapsülasyon etkinliği bulguları	125
Tablo 4-29: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların bileşen ve oranları	129
Tablo 4-30: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH bulguları	129
Tablo 4-31: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları	130
Tablo 4-32: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların enkapsülasyon etkinliği bulguları	130
Tablo 4-33: Seçilmiş TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarları	131
Tablo 4-34: Transetozom ve transferzom formülasyonları ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarları	132
Tablo 4-35: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları.....	136
Tablo 4-36: Transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksosite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri	148

Tablo 4-37: Boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri	150
Tablo 4-38: Kontrol Triton X-100, serbest fluvastatin sodyum ve IL-17A çözeltileri ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri.....	151
Tablo 4-39: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 miktarları	153
Tablo 4-40: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları	154
Tablo 4-41: Etkin madde içermeyen ve tek sürfaktan ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular	158
Tablo 4-42: Etkin madde içermeyen ve iki farklı sürfaktan ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular	159
Tablo 4-43: Etkin madde içermeyen ve farklı katı ve sıvı lipitler ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular	160
Tablo 4-44: Etkin madde yüklü NLC formülasyonlarına ait bulgular.....	161
Tablo 4-45: Optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan NLC formülasyonları üzerine hazırlama yönteminin etkisini gösteren bulgular	161
Tablo 4-46: NLC formülasyonuna uygulanan sonikasyon güç ve süresinin etkisini inceleyen çalışmaya ait bulgular	162
Tablo 4-47: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin bileşen ve oranları.....	163
Tablo 4-48: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin bileşen ve oranları.....	164
Tablo 4-49: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin karakterizasyon bulguları	165
Tablo 4-50: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin karakterizasyon bulguları	166
Tablo 4-51: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-1.....	168
Tablo 4-52: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-2.....	169
Tablo 4-53: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-3.....	170

Tablo 4-54: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-1.....	171
Tablo 4-55: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-2.....	172
Tablo 4-56: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-3.....	173
Tablo 4-57: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları	174
Tablo 4-58: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği bulguları.....	175
Tablo 4-59: Kontrol amaçlı hazırlanan model SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarına ait bulgular	182
Tablo 4-60: SLN formülasyonları üzerine hazırlama yönteminin etkisini gösteren bulgular	183
Tablo 4-61: SLN formülasyonlarına uygulanan sonikasyon güç ve süresinin etkisini inceleyen çalışmaya ait bulgular	183
Tablo 4-62: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların bileşen ve oranları.....	184
Tablo 4-63: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların partikül boyutu, PDI ve pH bulguları	185
Tablo 4-64: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoemülsiyonların zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları.....	185
Tablo 4-65: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların yükleme etkinliği bulguları.....	185
Tablo 4-66: Seçilmiş NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları.....	186
Tablo 4-67: NLC ve nanoemülsiyon (NE) formülasyonları ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları	188
Tablo 4-68: Fluvastatin sodyum yüklü NLC ve nanoemülsiyon formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları.....	192

Tablo 4-69: NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri.....	205
Tablo 4-70: Boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları, fluvastatin sodyum ve Triton X-100 ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri.....	207
Tablo 4-71: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 miktarları.....	210
Tablo 4-72: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları.....	210
Tablo 4-73: Jel sistemlerin pH değerlerine ait bulgular	212
Tablo 4-74: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonları için hesaplanan farklı akış modellerine ait bulgular.....	215
Tablo 4-75: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının osilasyon testine ait bulgular	218
Tablo 4-76: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular	220
Tablo 4-77: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının yayılabilirlik testine ait bulgular	220
Tablo 4-78: Transetozom jel ve NLC jel formülasyonları ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları	221
Tablo 4-79: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları.....	222

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Derini yapısı: a) Derinin tabakaları, b) Epidermisin tabakaları, c) <i>Stratum corneum</i> “tuğla ve harç” modeli, d) Lipit çifte tabaka, e) Lipit tabakanın yapısal düzeni-Smeden ve Bouwstra 2016 p.10	12
Şekil 2-2: Fluvastatin sodyum’un formülü* ve fizikokimyasal özellikleri	27
Şekil 4-1: Fluvastatin Sodyum’a ait ATR-FTIR spektrumu.....	101
Şekil 4-2: Fluvastatin Sodyum’a ait DSC termogramı	101
Şekil 4-3: Fluvastatin sodyum’a ait HPLC kromatogramı	102
Şekil 4-4: Fluvastatin sodyum’un doğrusallık çalışmasına ait standart eğri grafiği.....	102
Şekil 4-5: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom tipi veziküler nanotaşıyıcıların hazırlanması	107
Şekil 4-6: Fluvastatin sodyum yüklü veziküler nanotaşıyıcıların sonikasyon öncesi (A) ve sonrası (B) fiziksel görünümleri	107
Şekil 4-7: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği.....	117
Şekil 4-8: TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği.....	117
Şekil 4-9: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait TEM görüntüleri	126
Şekil 4-10: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait SEM görüntüleri.....	126
Şekil 4-11: Fluvastatin sodyum’a ait ATR-FTIR spektrumu	127
Şekil 4-12: Phospholipon 90 G’ ye ait ATR-FTIR spektrumu.....	127
Şekil 4-13: Etkin madde içermeyen TEZ-T20-4 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	127
Şekil 4-14: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	128
Şekil 4-15: Etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonları ile etkin maddeye ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu.....	128
Şekil 4-16: Seçilmiş TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışmalarında oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların fluvastatin sodyum penetrasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	131

Şekil 4-17: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası <i>stratum corneum</i> da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması	133
Şekil 4-18: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	133
Şekil 4-19: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması	134
Şekil 4-20: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası <i>stratum corneum</i> da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması	134
Şekil 4-21: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	135
Şekil 4-22: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması	135
Şekil 4-23: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	137
Şekil 4-24: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-6 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	137
Şekil 4-25: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-8 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	138
Şekil 4-26: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-11 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	138
Şekil 4-27: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	139
Şekil 4-28: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-5 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	139
Şekil 4-29: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-6 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	140

Şekil 4-30: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-10 kodlu transetozom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	140
Şekil 4-31: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-2 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	141
Şekil 4-32: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-3 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	141
Şekil 4-33: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-4 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	142
Şekil 4-34: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-1 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	142
Şekil 4-35: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-2 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	143
Şekil 4-36: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-4 kodlu transferzom formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	143
Şekil 4-37: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	144
Şekil 4-38: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta 4X büyütme (a) ve 10X büyütme (b, c, d) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri	145
Şekil 4-39: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 µm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)	145
Şekil 4-40: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta 4X büyütme (a ve b) ve 10X büyütme (c ve d) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri ..	146
Şekil 4-41: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 µm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)	146
Şekil 4-42: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri a) 4X büyütme, b) 10X büyütme	147

Şekil 4-43: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X).....	147
Şekil 4-44: Transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	149
Şekil 4-45: Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	151
Şekil 4-46: Etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ve serbest fluvastatin sodyum çözeltileri ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	152
Şekil 4-47: Farklı konsantrasyonlardaki IL-17A çözeltileri ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırılması.....	152
Şekil 4-48: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik	154
Şekil 4-49: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren kat değişim grafiği	155
Şekil 4-50: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik	155
Şekil 4-51: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren kat değişim grafiği	156
Şekil 4-52: Fluvastatin sodyum yüklü NLC tipi nanotaşıyıcıların hazırlanması.....	156
Şekil 4-53: Fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının sonikasyon öncesi (A) ve sonrası (B) fiziksel görünimleri	157
Şekil 4-54: NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği.....	167
Şekil 4-55: NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği.....	167
Şekil 4-56: Fluvastatin sodyum'a ait ATR-FTIR spektrumu	175
Şekil 4-57: Compritol 888 ATO'ya ait ATR-FTIR spektrumu	176
Şekil 4-58: Etkin madde içermeyen NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	176

Şekil 4-59: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	176
Şekil 4-60: Etkin madde içermeyen NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	177
Şekil 4-61: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu.....	177
Şekil 4-62: Compritol 888 ATO ve Fluvastatin sodyum ile etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonlarına ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu.....	177
Şekil 4-63: Compritol 888 ATO ve Fluvastatin sodyum ile etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonlarına ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu.....	178
Şekil 4-64: Fluvastatin sodyum'a ait DSC termogramı.....	178
Şekil 4-65: Compritol® 888 ATO' ya ait DSC termogramı.....	179
Şekil 4-66: Etkin madde içermeyen NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı.....	179
Şekil 4-67: Etkin madde içermeyen NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı.....	180
Şekil 4-68: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı.....	180
Şekil 4-69: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı.....	181
Şekil 4-70: Etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonları ile katı lipid ve etkin maddeye ait karşılaştırmalı DSC termogramı	181
Şekil 4-71: Seçilmiş NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> penetrasyon çalışmalarında oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların fluvastatin sodyum penetrasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması	187
Şekil 4-72: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası <i>stratum corneum</i> da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	189
Şekil 4-73: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	189

Şekil 4-74: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	190
Şekil 4-75: T80 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası <i>stratum corneum</i> da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	190
Şekil 4-76: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	191
Şekil 4-77: T80 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması.....	191
Şekil 4-78: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	193
Şekil 4-79: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-3 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	193
Şekil 4-80: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-5 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	194
Şekil 4-81: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-9 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	194
Şekil 4-82: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	195
Şekil 4-83: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-3 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	195
Şekil 4-84: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-5 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	196
Şekil 4-85: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-9 kodlu NLC formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	196
Şekil 4-86: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T20-1 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	197
Şekil 4-87: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T20-3 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	197

Şekil 4-88: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T80-1 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	198
Şekil 4-89: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T80-3 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu.....	198
Şekil 4-90: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	199
Şekil 4-91: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesit (a, b ve c) (10X) ve yatay kesit örnekleri d) 20 µm derinlik (10X), e) 160 µm derinlik (10X) ve f) 400 µm derinlik (10X)' e ait floresan mikroskop görüntüleri.....	200
Şekil 4-92: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta 4X büyütme (a, b, c ve d) ve 10X büyütme (e ve f) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri ...	200
Şekil 4-93: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 µm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri.....	201
Şekil 4-94: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta 4X büyütme (a) ve 10X büyütme (b ve c) uygulanarak alınan dikey kesit örnekleri ile yatay kesit örnekleri d) 20 µm derinlik (10X), e) 160 µm derinlik (10X), f) 400 µm derinlik (4X) ve g) 400 µm derinlik (10X)'e ait floresan mikroskop görüntüleri	201
Şekil 4-95: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta 4X büyütme (a ve b) ve 10X büyütme (c, d, e ve f) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri	202
Şekil 4-96: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 µm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri.....	202
Şekil 4-97: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan a) dikey kesit örneği (4X büyütme) ve yatay kesit örnekleri b) 20 µm derinlik (10X), c) 160 µm derinlik (10X) ve d) 400 µm derinlik (10X)' e ait floresan mikroskop görüntüleri.....	203

Şekil 4-98: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri a) 4X büyütme, b) 10X büyütme.....	203
Şekil 4-99: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X).....	204
Şekil 4-100: NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	206
Şekil 4-101: Etkin madde içermeyen NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	208
Şekil 4-102: Etkin madde yüklü NLC formülasyonları ve serbest fluvastatin sodyum çözeltisi ile yapılan <i>in vitro</i> sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği	208
Şekil 4-103: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik	211
Şekil 4-104: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik	211
Şekil 4-105: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi	213
Şekil 4-106: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi	213
Şekil 4-107: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi	214
Şekil 4-108: NLC-T80-1 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi	214
Şekil 4-109: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi	216
Şekil 4-110: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi	216
Şekil 4-111: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi.....	217
Şekil 4-112: NLC-T80-1 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi.....	217
Şekil 4-113: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği	218
Şekil 4-114: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği	219

Şekil 4-115: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği	219
Şekil 4-116: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonları ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması	221
Şekil 4-117: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyon ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	223
Şekil 4-118: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyon ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	223
Şekil 4-119: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 jel kodlu formülasyon ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	224
Şekil 4-120: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 jel kodlu formülasyon ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	224
Şekil 4-121: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	225
Şekil 4-122: Plasebo jel formülasyonu ile <i>in vitro</i> penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu	225

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

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

a/a: Ağırlık/Ağırlık

CCL20: CC kemokin ligandı 20

CCR6: CC kemokin reseptörü 6

COX: Siklooksijenaz

CLSM: Konfokal lazer taramalı mikroskopu

DC: Dentritik hücre

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)

DSC: Diferansiyel Tarama Kalorimetresi

ERK: Ekstraselüler Sinyal Düzenlenen Kinaz

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration)

HaCaT: Immortal İnsan Keratinosit Hücre Hattı

HEKn: İnsan Primer Keratinosit Hücreleri

HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

h/h: Hacim/Hacim

ICAM: Hücreler arası adezyon molekülü

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IPM: İzopropil Miristat

IR: Infrared Spektrumu

IRF: İnterferon düzenleyici faktör

LFA: Lenfosit fonksiyonlu adezyon molekülü

MAPK: Mitojenle aktive edilen protein kinaz

MTT: Miktar Tayin Limiti (LOD)

NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa β

NLC: Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı

NMR: Nükleer Manyetik Rezonans

NO: Nitrik Oksit

PIC: Faz İnversiyon Kompozisyonu

PDI: Poli Dispersite İndeksi

PBS: Fosfat Tamponu

PTT: Faz İnversiyon Sıcaklığı

r^2 : Determinasyon Katsayısı

rpm: Dakikadaki Dönüş Sayısı

RSD: Bağlı Standart Sapma

SIRT: Silent Information Regulator

SD: Standart Sapma

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

SLN: Katı lipit nanopartikül

SLS: Statik Işık Saçılımı (Static Light Scattering)

S/Y/S: Su/Yağ/Su

S/Y: Su/Yağ

TEM: Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu

TEWL: Transepidermal Su Kaybı

Th: T helper (yardımcı)

TL: Teşhis Limiti (LOQ)

TNF: Tümör nekroz faktörü

UDV: Ultra Deforme Olabilen Veziküller

ÖZET

Gürbüz, A. (2014). Psoriasis tedavisinde kullanılmak üzere topikal taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Yüksek Doktora Tezi. İstanbul.

Psoriasis dünya nüfusunun %2-5'ini etkileyen, genellikle dirsek, diz, kafa derisi ve tırnaklarda lokalize, eritemli, skuamöz, kronik enflamatuvar bir deri hastalığıdır. Psoriasis tedavisinde kullanılacak topikal taşıyıcı sistemler, derinin lipit düzeni bozulmuş, aşırı dehidrate ve kalınlaşmış yapısı göz önünde bulundurularak geliştirilmelidir. Statinler, HMG-CoA redüktazı ihhabe ederek kolesterol biyosentezini engelleyen lipit düşürücü ajanlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar statinlerin psoriasis de dahil olmak üzere çeşitli otoimmün hastalıklarda yararlı olabilecek anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Bu doktora tez çalışmasında, fluvastatin sodyum'un transetozomlarının ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ve optimizasyonları gerçekleştirildi. Partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, pH'sı, iletkenliği, stabilitesi ve ATR-FTIR ve DSC ile yapı analizleri, TEM ve SEM analizleri ile morfolojik özellikleri değerlendirilerek fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Seçilen formülasyonlarla gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki birikimi bant ile soyma yöntemi ile incelendi. Taşıyıcı sistemlerin deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spektroskopisi ile değerlendirildi. Konfokal lazer mikroskopi çalışmaları ile etkin maddenin derinin farklı tabakalarındaki birikimi, lokalizasyonu ve penetrasyonun gerçekleştiği yollar görüntülendi. Dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan fluvastatin sodyum yüklü taşıyıcı sistemlerin *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksiteleri ve antipsoriatik aktiviteleri değerlendirildi. Son olarak seçilen transetozomların ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin jel formülasyonları hazırlanarak karakterizasyonları gerçekleştirildi. Aynı şekilde penetrasyon çalışmaları ile fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki birikimi ve ATR-FTIR analizleri ile deri lipitleri üzerine etkileri incelendi. Sonuç olarak, psoriasis tedavisindeki etkinliği *in vitro* hücre çalışmaları ile kanıtlanmış, deri ile uyumlu, stabil ve etkin maddenin derideki hedef bölgede lokalizasyonunu sağlayarak etkinliğini arttıran fluvastatin sodyum yüklü yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Psoriasis, Topikal, Fluvastatin Sodyum, Transetozom, Nanoyapılı lipit taşıyıcı sistem

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30432

ABSTRACT

Gürbüz, A. (2014). Development and evaluation of topical delivery systems for use in the treatment of psoriasis. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Psoriasis is an erythematous, squamous, chronic inflammatory skin disease that affects 2-5% of the world's population and is usually localized on the elbows, knees, scalp and nails. Topical delivery systems to be used in the treatment of psoriasis should be developed considering the lipid disorder of the skin, its excessively dehydrated and thickened structure. Statins are lipid-lowering agents that inhibit cholesterol biosynthesis by inhibiting HMG-CoA reductase. Recent studies have shown that statins have anti-inflammatory and immunomodulatory effects that may be beneficial in various autoimmune diseases, including psoriasis.

In this doctoral thesis, the preparation and optimization of the transethosomes and nanostructured lipid carrier systems of fluvastatin sodium were performed. Transethosomes and NLCs were characterized by evaluating particle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, pH, conductivity, stability, and structure analysis with ATR-FTIR and DSC, and morphological properties with TEM and SEM. After in vitro penetration studies performed with selected formulations, the accumulation of fluvastatin sodium in the dermal layers was investigated by tape stripping. The effects of delivery systems on the skin were evaluated by ATR-FTIR spectroscopy. The accumulation, localization and penetration pathways of the active substance in different layers of the skin were visualized by confocal laser microscope studies. The cytotoxicity and antipsoriatic activities of the carrier systems loaded with fluvastatin sodium, which had the highest accumulation in the dermal layers, were evaluated by in vitro cell culture studies. Finally, gel formulations of selected transethosomes and nanostructured lipid carrier systems were prepared and their characterizations were performed. Likewise, the accumulation of fluvastatin sodium in the dermal layers by penetration studies and the effects of formulations on skin lipids were investigated by ATR-FTIR analysis. As a result, innovative drug delivery systems loaded with fluvastatin sodium have been developed, which has been proven to be effective in the treatment of psoriasis by in vitro cell studies, is compatible with the skin, is stable, and increases the effectiveness by localizing the active substance in the target area of the skin.

Key Words: Psoriasis, Topical, Fluvastatin Sodium, Transethosome, Nanostructured Lipid Carrier

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2018-30432

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psoriasis (sedef hastalığı) derinin bariyer fonksiyonunun azalmasına yol açan inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Psoriasisın en sık görülen fiziksel semptomları kaşıntı, deride yanma, şişlik, eklem ağrısı, pullanma ve deri dökülmesi olarak sıralanabilir (Segre 2006; Richards ve ark. 2006; Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017). Hastalığın sebebi henüz tam olarak anlaşılamasa da, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Sun ve Zhang 2014; Palmer ve DeLouise 2016; Lowes ve ark. 2014). İmmün hücrelerin aktivasyonu ve onlar tarafından salgılanan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi sinyal molekülleri psoriasisde görülen hiperkeratoz, epidermis kalınlaşması ve vaskülarizasyonu artırır (Arora ve ark. 2017).

Psoriasisın hastaların yaşam kalitesi üzerinde hem fiziksel hem de psikolojik olumsuz etkileri bulunmaktadır. Yaşamı tehdit eden bir hastalık olmamakla birlikte genel popülasyon ile karşılaştırıldığında hastalarda metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve depresyon gelişme riski artmış ve şiddetli psoriasisli hastalarda mortalite riski yüksek bulunmuştur (Pradhan ve ark. 2013; Pinto ve ark. 2014; Prosperi ve ark. 2017). Ayrıca hastaların yaklaşık %30'unda artrit gelişir (Samarasekera ve ark. 2012). Psoriasis her yaş grubunda görülebilmekle birlikte psoriatik artrit genellikle 30-50 yaş aralığında ortaya çıkmaktadır (Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017).

Psoriasisde mevcut tedavi yöntemleri derinin bariyer fonksiyonunu arttırmayı, keratinositlerin hiperproliferasyonunu azaltmayı ve bakteriyel enfeksiyonları ortadan kaldırmayı amaçlar. Psoriatik *stratum corneum*'da derinin lipid yapısı bozulur ve epidermal proliferasyonda anormal artış görülür. Kolesterol seviyelerindeki artma ve seramid seviyelerindeki azalmanın deride kalınlaşmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Bu durum psoriasisde derinin bariyer fonksiyonunun önemli derecede azalmasına sebep olur. Ayrıca psoriatik deride doğal nemlendirici faktörler neredeyse yoktur ve psoriatik plaklarda TEWL değerlerinde de artış gözlenmiştir Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda topikal yolla psoriatik dokuları hedeflemek oldukça zordur (Katare ve ark. 2010; Smeden ve ark. 2014; Palmer ve DeLouise 2016).

Hafif ve orta şiddetli plak tipi psöriazisin tedavisinde oral ya da topikal yolla kullanılan tedaviler mevcuttur ancak oral yol ile başta hepatotoksisite, nefrotoksisite ve ilaç etkileşimleri olmak üzere çeşitli yan etkiler ortaya çıkabilir. Psöriazis tedavisinde

topikal yol oldukça avantajlıdır. Topikal uygulama ile ilaçlar hastalıklı bölgeye hedeflendirilebilir, olası yan etkiler en aza indirilebilir. Krem, jel, sprey, toz gibi konvansiyonel dozaj formları topikal tedavide sıklıkla kullanılır. Topikal uygulama ile görülen yan etkiler sistemik uygulama ile görülen yan etkilerden daha azdır fakat topikal uygulama ile ortaya çıkabilen yanma, iritasyon, kızarıklık, şişme gibi yan etkiler hasta uyuncunu azaltmakta ve psöriazis tedavisinin etkinliğini azaltmaktadır. Ayrıca konvansiyonel dozaj formlarının uygulanmasıyla ilaçların derinin tabakalarına penetrasyonları ve derideki birikimleri yetersiz olabilir. Bu durumda ilaçların topikal biyoyararlanımları düşük olmaktadır. Psöriatik derinin topikal tedavisini sağlamak için derinin hedef bölgesinde yüksek ilaç seviyelerinin sağlanması ve yan etkilerinin azaltılmasının sağlanması gerekmektedir (Agrawal ve ark. 2015).

Derinin bariyer özelliklerinin yanı sıra etkin maddelerin fizikokimyasal özellikleri de deriden geçişi etkileyen faktörler arasındadır. Etkin bir tedavi için uygulanan ilaç moleküllerinin derinin hedef tabakalarına ulaşması gerekir. Bu yüzden deride etkin ilaç konsantrasyonlarının sağlanması açısından *stratum corneum* tabakası önemli bir bariyerdir (Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013). Ayrıca uygulanan ilaçların derinin en dış tabakası olan *stratum corneum*'u geçerek hedef bölgelere ulaşmasında formülasyonun önemi büyüktür (Marianecci ve ark. 2014).

Psöriatik derinin hiperkeratotik yapısı nedeniyle, yüksek molekül ağırlıklı aktif bileşenlerin derinin tabakalarına ulaşmasını ve daha etkili bir tedavi sağlanmasını engelleyen mevcut tedaviler ile tam remisyon sağlanamamaktadır (Andrade ve ark. 2017). Psoriasis tedavisinde non-irritan komponentler ile formüle edilmiş ve psoriasis etkili bir şekilde tedavi edebilecek yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır (Fang ve ark. 2008). Nanotaşıyıcılar ilaç molekülleri için bir rezervuar ve taşıyıcı işlevi görerek derinin tabakalarındaki birikimlerini artırmaktadırlar. Nanotaşıyıcı sistemler bu tip deri hastalıklarının tedavisinde ilacın dermal penetrasyonunu ve mevcut tedavilerin etkinliğini arttırmak için ideal adaylardır (Gupta ve ark. 2012; Palmer ve DeLouise 2016). Lipozom, niozom, etozom, transferzom, transetozom gibi veziküler sistemler; mikroemülsiyon, nanoemülsiyon, nanosüspansiyon, nanoyapılı lipit taşıyıcılar gibi kolloidal sistemler ile katı lipit nanopartikül ve nanoyapılı lipit partikül gibi nanopartiküller; nanolifler ve nanosüngerler deriye uygulanmak üzere geliştirilen

nanotaşıyıcı sistemlerdir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017).

Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler 1-500 nm boyut aralığında, partiküler veya veziküler yapılardır. Konvansiyonel sistemler ile karşılaştırıldıklarında, etkin maddenin stabilitesinin iyileştirilmesi, biyoyararlanımın artması, hedef bölgede ilaç birikiminin sağlanması ve hasta uyuncunun iyileşmesi gibi üstünlüklere sahiptirler. Topikal tedavide konvansiyonel dozaj şekilleri ile karşılaşılan problemlerin (özellikle lipofilik etkin maddelerin deriden penetrasyon sorunu) üstesinden gelmek ve antipsoriatik ilaçların etkin ve güvenli bir şekilde derideki hedef bölgelere taşınmasını sağlamak için nano-kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yapılan araştırmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır (Güngör ve Rezigue, 2017; Pradhan ve ark. 2013).

Psoriazisin kontrolü ve önlenmesi için yapılan çalışmalarda lipozom, transferzom, niozom, etozom ve transetozom gibi kolloidal taşıyıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır (Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017; Ascenso ve ark. 2015). Ayrıca SLN ve NLC'lerin perkütanöz uygulanmasının derinin epidermis ve dermis tabakasının hedeflendiği psoriasis yanı sıra birçok deri hastalığının tedavisinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Montoto ve ark. 2020).

Lipit nanotaşıyıcıların deri ile etkileşimi asıl olarak nanotaşıyıcının yapısı dolayısıyla içerdiği lipit ve sürfaktan bileşimleri ile ilgilidir. Lipozomların *stratum corneum* lipit yapısında değişikliklere sebep olarak etkili olduğu, buna karşılık SLN ve NLC gibi nanotaşıyıcıların deri yüzeyinde birikerek lipit film oluşturduğu ve derinin hidrasyonunu artırarak ilaç permeasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (Souto, Souza ve ark. 2021).

Psoriasis de dahil olmak üzere hiperproliferatif deri hastalılarında kullanılan lipit nanotaşıyıcının seçimi yüklenecek ilacın hidrofilik ve lipofilik yapısına bağlıdır. Bu taşıyıcılar toksikolojik problemler oluşturmayan biyoyumlu, biyoparçalanabilen ve biyotolere edilebilen lipitlerden üretilir. Hiperproliferatif deri hastalıklarını tedavi etmek için lipit nanotaşıyıcıları kullanmanın amacı, ilacın *stratum corneum* yapısı bozulmuş hasta deriden daha derin cilt katmanlarına ilaç nüfuzunu/penetrasyonunu artırmak olsa da, diğer topikal uygulamalar için (örn. kozmetikler) ilacın cilde nüfuz etme riski minimum olacak şekilde sağlıklı cilt üzerinde kalması gerekir (Souto, Souza ve ark. 2021).

Veziküler taşıyıcılar fosfolipitler gibi amfifilik lipitler veya non iyonik sürfaktanlar sürfaktanlar kullanılarak hazırlanan sistemlerdir. Literatürde birkaç veziküler sistem tanımlanmıştır. Temel olarak bileşenlerine bağlı olarak deforme olmayan (lipozom, emülzom, niozom, serozom, vd) ve deforme olabilen (transferzom, etozom, transetozom ve penetrasyon arttırıcı veziküller) ve sistemler olarak sınıflandırılırlar (El-Zaafarany ve Nasr 2021).

Lipozomlar, farklı yapıda lipitlerin kullanılması ile hazırlanan, iç kompartımanda sulu faz bulunan, bir veya birden fazla lipit çifte tabaka ile çevrili küresel veziküllerdir (Bozzuto ve Molinari 2015). Konvansiyonel lipozomlar ilaçların deriden permeasyon oranlarını arttırmak için kullanılan ilk nanotaşıyıcılardır (Menezes ve ark. 2016) Ancak lipozomların esnek bir yapıya sahip olmaması derinin üst tabakalarında birikmesine sebep olur ve daha derin tabakalarına penetre olmasını engeler (Verma ve ark. 2003; Manosroi ve ark. 2008). Bununla birlikte bu veziküler sistemler daha derin tabakalara ilaç taşınmasını arttırmak amacıyla sürfaktan veya etanol gibi penetrasyon arttırıcılar kullanılarak modifiye edilmiştir (Akhtar 2014).

Deforme olabilen veya elastik lipozom olarak da tanımlanan tranferzomlar fosfolipitlerin yanı sıra yüzey etkin maddeler gibi bir kenar aktivatörü kullanılarak hazırlanmaktadır. Tek zincirli bir lipit ya da bir sürfaktan olabilen kenar aktivatörleri transferzomların lipit çifte tabakaları arasından bütünlüklerini koruyarak geçebilecek düzeyde esnek olmasını sağlar (Gillet ve ark. 2011; Song ve ark. 2012). Bu ilacın derinin daha derin tabakalarına penetre olmasını sağlayacaktır (Cevc 1996; El Maghraby ve ark. 2004). Deforme olabilen lipozomların ardından Touitou ve ark. tarafından etozom olarak adlandırılan elastik veziküler sistemler geliştirilmiştir (Touitou ve ark. 2000). Klasik etozomlar fosfolipitler, yüksek konsantrasyonda etanol (%20-45) ve sudan oluşan noninvaziv taşıyıcılardır. Etozomların yapısında bulunan yüksek orandaki etanol bu sistemlerin konvansiyonel lipozomlara oranla daha elastik yapıda olmalarını sağlar (Pradhan ve ark. 2013; Abdulbaqi ve ark. 2016; Verma ve Pathak 2010).

Transetozomlar ilk defa 2012’de Song ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Song ve ark. 2012). Transferzomlar deriden geçişte oldukça başarılı olmalarına rağmen, özellikle lipofilik etkin maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkili bir tedavi sağlanabilmesi için

içerdikleri etanol miktarı arttırılarak, yüksek oranda etanol içeren transetozomlar geliştirilmiştir (Song ve ark. 2012) Transetozomlar klasik etozomların ve transferzomların avantajlarını bir araya getiren yeni jenerasyon etozomal sistemlerdir. Bu sistemler klasik etozomlarda yer alan temel bileşenlere ek olarak bir köşe aktivatörü veya penetrasyon arttırıcı içerirler (Abdulbaqi ve ark. 2016; Sawant ve Khan 2017; Song ve ark. 2012). Klasik etozomlara göre üstün oldukları birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Garg, Singh, Singh ve ark. 2017).

Lipit nanopartiküler sistemler lipozom, ultraderme olabilen lipozom ve etozomlar gibi veziküler sistemlere ve polimerik nanopartiküllere alternatif olarak son yıllarda popülerlik kazanmıştır (Das ve Chaudhury 2011; Jain ve ark. 2017). Katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) sürfaktan tabakası ile stabilize edilmiş trigliserit veya yağ asitleri içeren katı lipit çekirdekten oluşan lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerdir (Müller ve ark. 2002a). SLN'ler birinci nesil nanopartiküller olarak ilişkilendirilirken NLC'ler SLN'lerdeki eksikliklerin üstesinden gelebilmek için geliştirilmiş ikinci nesil lipit nanopartiküllerdir (Jain ve ark. 2017). SLN'ler ile karşılaştırıldığında NLC'ler, bir dizi aktif bileşen için daha yüksek etkin madde yükleme kapasitesi, daha düşük su içeriğine sahip dispersiyonlarının hazırlanabilmesi, saklama sırasında meydana gelebilecek polimerik geçişler sebebiyle etkin madenin formülasyondan sızmasının önlenmesi veya en az indirilmesi gibi üstünlüklere sahiptir (Müller ve ark. 2002a; Pardeike ve ark. 2009; Weber ve ark. 2014).

Lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında kullanılan lipitler biyoyumlu olmalarının yanı sıra epidermisi ve özellikle *stratum corneum*u oluşturan lipitlerle yapısal benzerlik göstermektedir (Sala ve ark. 2018). Bu sistemler deri yüzeyine tutunur ve böylece *stratum corneum*un en dıştaki tabakaları arasında lipit değişimine izin verirler (Bikkad ve ark. 2014). Bu sistemler deri ile etkileşime girerek derinin bariyer özelliklerini değiştirirler (Arora ve ark. 2017). Ayrıca nanoyapılı lipit taşıyıcılar oklüzif özellikleri nedeniyle derinin hidrasyonunu arttırırlar (Montenegro ve ark. 2016). Bu özellik psoriasisın aşırı dehidrate yapısı dikkate alındığında (Katare ve ark. 2010) deriden su kaybının azalması ve hidrasyonun artması açısından önemlidir (Montenegro ve ark. 2016).

Nanoemülsiyonlar, birbiriyle karışmayan iki fazın, birinin diğeri içerisinde dağıtılması ile hazırlanan ve iç fazı oluşturan damlacıkların nanometre büyüklüğünde olduğu heterojen sistemlerdir. Nanoemülsiyonlar, miniemülsiyon ya da mikron altı emülsiyonlar olarak da isimlendirilir (Fast ve ark. 2009, Tırnaksız 2014). Nanoemülsiyonlar derinin daha derin tabakalarına penetre olabilme yeteneğine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Pawar ve Babu 2014). Aktif bileşenin derinin istenen tabakalarına dağılması ve kontrollü ilaç taşınması gibi avantajları sebebiyle son yıllarda özellikle kozmetik alanda nanoemülsiyon sistemlere artan bir talep söz konusudur (Marzuki ve ark. 2019).

Psoriasis TNF- α /IL-23/IL-17A aracılı inflamauvar bir deri hastalığıdır. Psoriasis hastalarında dolaşımda nötrofil seviyeleri yükselir, özelleşmiş makrofajlar ve dentritik hücreler cilt lezyonlarında erken ortaya çıkar. Bunu, belirgin Th1- ve Th17- aracılı patolojiye sahip bir döngüyü sürdüren aktive edilmiş doğal öldürücü hücreler ve T hücreleri takip eder. Tümör nekroz faktörü- (TNF)- α ve interferon- γ (IFN- γ), interlökin- (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler ve CXCL9, CXCL10, CXCL11 gibi kemokinler, ve siklooksijenaz-2 (COX-2) psoriatik lezyonların başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol oynar. Th17 hücreleri ve imza sitokini IL-17 ile IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 gibi sitokinler ve inflamatuvar biyobelirteçler psoriasis patolojisinde yer almaktadır (Furue ve ark. 2019; Mavropoulos ve ark. 2013).

CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesi olan Th17 hücreleri, IL-17'nin (IL-17A olarak da adlandırılır) yanı sıra otoimmün hastalık modellerinde doku hasarının kritik araçları olarak gösterilen diğer sitokinleri de üretir. Bu Th17 hücreleri ve bunların efektör molekülleri IL-17A, IL-17F, TNF- α , IL-22 ve IL-26, psoriatik lezyonlarda bol miktarda bulunur (Mabuchi ve ark. 2012).

IL-17A dermal ve mukozal immüniteyi düzenler ve psoriasisli hastalarda artarak plak histopatolojisinde rol oynar. Keratinosit stresi, dendritik hücre (DC) aktivasyonu ve katelisidin gibi antimikrobiyal peptitlere karşı otoreaktif deriye yerleşen T hücrelerinin koordineli olarak plak oluşumunu başlattığı varsayılmaktadır. Mevcut modellerde yerleşik deri hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler IFN- α IFN- γ , ve TNF- α üretilir, ve bunlar miyeloid dendritik hücreleri aktive ederek IL-12 ve IL-23 üretilmesini sağlar. IL-12 proinflamatuvar Th1 yolaklarını tetikler. IL-23 ise Th17 hücreleri ve diğer lökositleri aktive ederek IL-17A ve IL-17F ve IL-26 yı da

içeren diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar. IL-17A, farklı hücre tiplerinde farklı etkileri olan IL-17 reseptörleri aracılığıyla etki gösterir (Krauger ve ark. 2019).

IL-17A, T hücrelerinde kendi sentezini otomatik olarak aktive eder, dermiste proinflamatuvar IL-6 ve IL-8/CXCL8'i indükler ve mitojenik faktörlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve antimikrobiyal proteinlerin sentezini teşvik ederek keratinosit hiperplazisine yol açar (Krauger ve ark. 2019).

Dermal dentritik hücreler büyük miktarlarda TNF- α ve IL-23 üretir ve IL-17A üreten yardımcı T (Th17) hücrelerinin farklılaşmasını indükler. IL-17A keratinosit proliferasyonunu indüklerken farklılaşmasını inhibe eder. IL-17A keratinositlerin nötrofil çeken sitokin/kemokinler olan IL-36, CXCL1, CXCL2 ve CXCL8 (IL-8) üretimini artırır. IL-17A keratinosit proliferasyonunu artırır ve CCL20 üretimi için keratinositleri uyarır. Th17 hücreleri de ayrıca CCL20 üretebilir. Ayrıca Th17 hücreleri yüksek miktarda TNF-a üretir. Böylece TNF- α /IL-23/IL-17A eksenini bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve sonunda tam teşekküllü psoriasis gelişmesine neden olur. CCL20/CCR6 kemotaktik sistemi TNF- α /IL-23/IL-17A ekseninin sürdürülmesinde ve psoriasis patogeneğinde kritik rol oynar (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). CCL20/CCR6 eksenini psoriasis tedavisi için umut verici bir hedef olabilir (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). IL-17 sinyal yolağı inhibitörleri ile orta-şiddetli psoriasis olan hasta grubunda gerçekleştirilen erken klinik deneylerde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kirkham ve ark. 2014).

Son çalışmalar, CCR6'nın psoriasis patogeneğindeki rolüne dikkat çekmektedir. CCR6 ilk olarak T hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler üzerinde keşfedilmiştir. CCR6'nın Th17 sinyal yolunda ve psoriasis gelişiminde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Hedrick ve ark. 2010). CCL20, normal insan derisinde epidermal keratinositler ve endotelyal hücreler tarafından yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, keratinositlerde ve endotel hücrelerinde CCL20 üretimi, TNF- α , IL1, IL17 ve INF- γ gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından kuvvetle artırılır. Psoriatik cilt lezyonlarında, CCL20 epidermisin suprabazal tabakasında yüksek oranda eksprese edilir. CCL20, CCR6'yı tetikleyen tek kemokindir ve bilinen diğer kemokin reseptörleri aracılığıyla biyolojik bir cevap ortaya çıkaramaz (Mabuchi ve ark. 2012).

Psoriasis, akut koroner sendrom, arteriyel hipertansiyon ve miyokard enfarktüsü dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalık riskinin artması ile ilişkili metabolik bir sendrom olarak kabul edilir (Chen ve ark. 2021). Oksidatif strese ek olarak, ateroskleroz, hiperlipidemi veya insülin direnci gibi metabolik risk faktörleri psoriasisli hastalarda yaygındır (Pietrzak ve ark. 2018). Psoriasisli hastaların sıklıkla kolesterol ve trigliserit değerlerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle anormal lipit metabolizması hastalığı olan hiperkolesterolemi tedavisinde sıklıkla kullanılan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü statin grubu ilaçların psoriasis tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmüştür (Chen ve ark. 2021).

Statinler anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkileri nedeniyle 1990'larda psoriasis için potansiyel bir deneysel tedavi seçeneği olarak öne sürülmüştür. Kolesterol düşürücü tedavinin psoriasis üzerine yararlı etkileri çeşitli mekanizmalar ile açıklanmıştır. Bunlar sırasıyla lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1'in down-regülasyonu, lökositlerin endotel adezyonunun, ekstrasvazasyonun ve doğal öldürücü hücre aktivitesinin inhibisyonu, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, C-reaktif proteinin düşürülmesi, promotion of a Th1 to Th2 cells, T hücreleri üzerindeki Th1 sitokin reseptörlerinin inhibisyonu şeklindedir. Yukarıda bahsedilen patomekanizmalar lenfosit aktivasyonunun sınırlandırılmasına ve sonuç olarak inflamasyon bölgelerine infiltrasyonun bozulmasına sebep olur (Mosiewicz ve ark. 2013).

Fluvastatin, kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktazın güçlü bir inhibitörüdür (Yamamoto ve ark. 1998). Piyasada sodyum tuzu halinde bulunur ve iyonizasyon sabiti (pKa) 5.5'tir (Asberg ve Holdaas 2004). Fluvastatin'in bilinen kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra "pleiotropik etki" olarak adlandırılan lipit dışı mekanizmalar ile etkili olduğuna dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Corsini 2000).

Kim ve arkadaşları tarafından statinlerin psoriasisde önemli rol oynayan CCL20/CCR6 etkileşimi üzerindeki inhibitör etkilerini araştırılmıştır. Statin grubunda yer alan fluvastatin ve simvastatinin CCR6 kemotaktik etkileşime müdahale ederek psoriasisin hafifletilmesine faydalı olabileceği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2011).

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada psoriasisli hastaların deri lezyonlarında galektin-7 ekspresyonunun azaldığı ve keratinositlerde galektin-7

ekspresyonunun, psoriasis gelişiminden sorumlu sitokinler tarafından baskılandığı bildirilmiştir. Galektin-7 indükleyicisi olduğu tanımlanan fluvastatin'in bu etkisi, IL-17A tarafından indüklenen keratinositlerde IL-6 ve IL-8 üretimini azalttığı gösterilerek kanıtlanmıştır. Bu çalışmada hem epidermal hiperplazi hem de keratinosit aracılı inflamatuvar yanıtlarda psoriasis patogeneğinde galektin-7'nin rolünü doğrulanmış ve psoriasis tedavisinde statin (fluvastatin) kullanımının yararlı olabileceği yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Chen ve ark. 2021).

Bu doktora tez çalışmasının amacı, fluvastatin sodyum'un psoriasis tedavisinde kullanımına yönelik yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler olarak topikal transetozom ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi, *in vitro* yöntemler ile terapötik etkinliklerinin ve hücre kültürü çalışmaları ile antipsoriatik aktivitelerinin değerlendirilmesidir.

Bu kapsamda, psoriasis tedavisinde kullanılmak üzere fluvastatin sodyum'un topikal uygulamaya yönelik transetozom ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ve optimizasyonu; partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, pH'sı, iletkenliği, stabilitesi ve ATR-FTIR ve DSC ile yapı analizleri, TEM ve SEM analizleri ile morfolojik özellikleri değerlendirilerek fizikokimyasal karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi; seçilen formülasyonlarla gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki birikiminin bant ile soyma yöntemi ile incelenmesi, taşıyıcı sistemlerin deri üzerindeki etkilerinin ATR-FTIR spektroskopisi ile değerlendirilmesi ve konfokal lazer mikroskopi (CLSM) çalışmaları ile etkin maddenin derinin farklı tabakalarındaki birikimi, lokalizasyonu ve penetrasyonun gerçekleştiği yolların incelenmesi ve dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan fluvastatin sodyum yüklü taşıyıcı sistemlerin *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksitelerinin ve antipsoriatik aktivitelerinin değerlendirilmesi, son olarak ise seçilen transetozom ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin topikal uygulamaya yönelik jel formülasyonları hazırlanarak karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi, aynı şekilde dermal penetrasyon ve ATR-FTIR analizleri ile incelenmesi hedeflenmiştir.

Sonuç olarak, psoriasis tedavisinde kullanılabilecek, deri ile uyumlu, stabil ve etkin maddenin derideki hedef bölgede lokalizasyonunu sağlayarak, etkinliğini arttıran yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri

Deri, yetişkinlerde yaklaşık 1,5 m² yüzey alanı ile vücudun en büyük organıdır ve vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Derinin temel işlevi vücudu dış ortamdan korumaktır. Patojenlerin ve ekzojen maddelerin vücuda girişini engeller, vücuttan ısı ve su kaybını düzenler. *Stratum corneum* derinin en üst tabakasıdır ve çok hidrofobik bir karaktere sahiptir. Bu özelliğinden dolayı yabancı maddelerin penetrasyonuna karşı mükemmel bir fiziksel bariyer oluşturur ve aynı zamanda su kaybını dengeler (Madison 2003; Proksch ve ark. 2008; Burton 2008). Deri yüzeyinden nem ve ter buharlaşması yoluyla ısı alışverişi gerçekleşir ve vücut sıcaklığının korunması sağlanır. Deri aynı zamanda bir duyu organı olarak işlev görür ve sıcak, soğuk, basınç ve ağrı gibi uyarımları algılar (Blatteis 2012; Schmelz 2011).

2.1.2. Derinin Tabakaları

Deri; epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç ana tabakadan oluşur (Benitez ve Montans 2017). Derinin tabakaları Şekil 2-1'de gösterilmiştir.

2.1.2.1. Epidermis

Derinin en dış tabakası olan epidermisin kalınlığı 150-180 µm arasında olup koruyucu özelliğe sahiptir. Kan damarları içermez. Keratinositler epidermiste bulunan baskın hücre tipidir. Ayrıca langerhans hücreleri, melanositler, merkel hücreleri ve T lenfositleri de mevcuttur. Beş farklı tabakadan oluşur. Bu tabakalar sırasıyla, *Stratum corneum*, *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum*, *Stratum basale* olarak dıştan içe doğru sıralanır. Epidermisin tabakaları Şekil 2-1'de gösterilmiştir (Eckert 1989; Eckert ve Borke 1989; Fuchs 1990).

Stratum corneum

Epidermisin en üst dış tabakası olan *stratum corneum* 15-30 korneosit hücre katmanından oluşan 10-20 µm kalınlığa sahiptir. Ölü, yassı ve protein bakımından zengin korneosit hücreleri 0.5 µm kalınlık ve 30-40 µm genişliğe sahiptir (Roberts ve ark. 2002; Benson 2012 p.7). Korneositler lipid çift tabaka içine gömülü halde bulunmaktadır. Epidermisin diğer tabakalarındaki çekirdekli hücrelerden farklı olarak

stratum corneum tabakasındaki bu hücreler çekirdek içermez. Bu nedenle *stratum corneum* cansız epidermis, diğer tabakalar ise canlı epidermis olarak isimlendirilir. Bu tabaka her dört hafta da bir yenilenir. Kornifikasyon adı verilen bu süreçte, yeni hücreler *stratum corneum*'a geldiklerinde üstteki hücreler deri yüzeyinden pul pul dökülürler (Gibson 2004; Değim 2009 p. 340-341).

Stratum corneum keratin proteinlerinden zengindir. Seramitler, kolesteroller, kolesterol esterleri, serbest yağ asitleri, skualen ve trigliseritlerden oluşur. %20 su içeriğine sahiptir. Deriden su kaybının önler ve bariyer özelliği gösterir (Wang, Thakur ve ark. 2005; Ramadon ve ark. 2022). Canlı epidermisteki gibi *stratum corneum*'daki korneositler de birbirlerine desmozomlar ile ancak daha gevşek olarak bağlıdır (Elias 1983; Walters ve Roberts 2002).

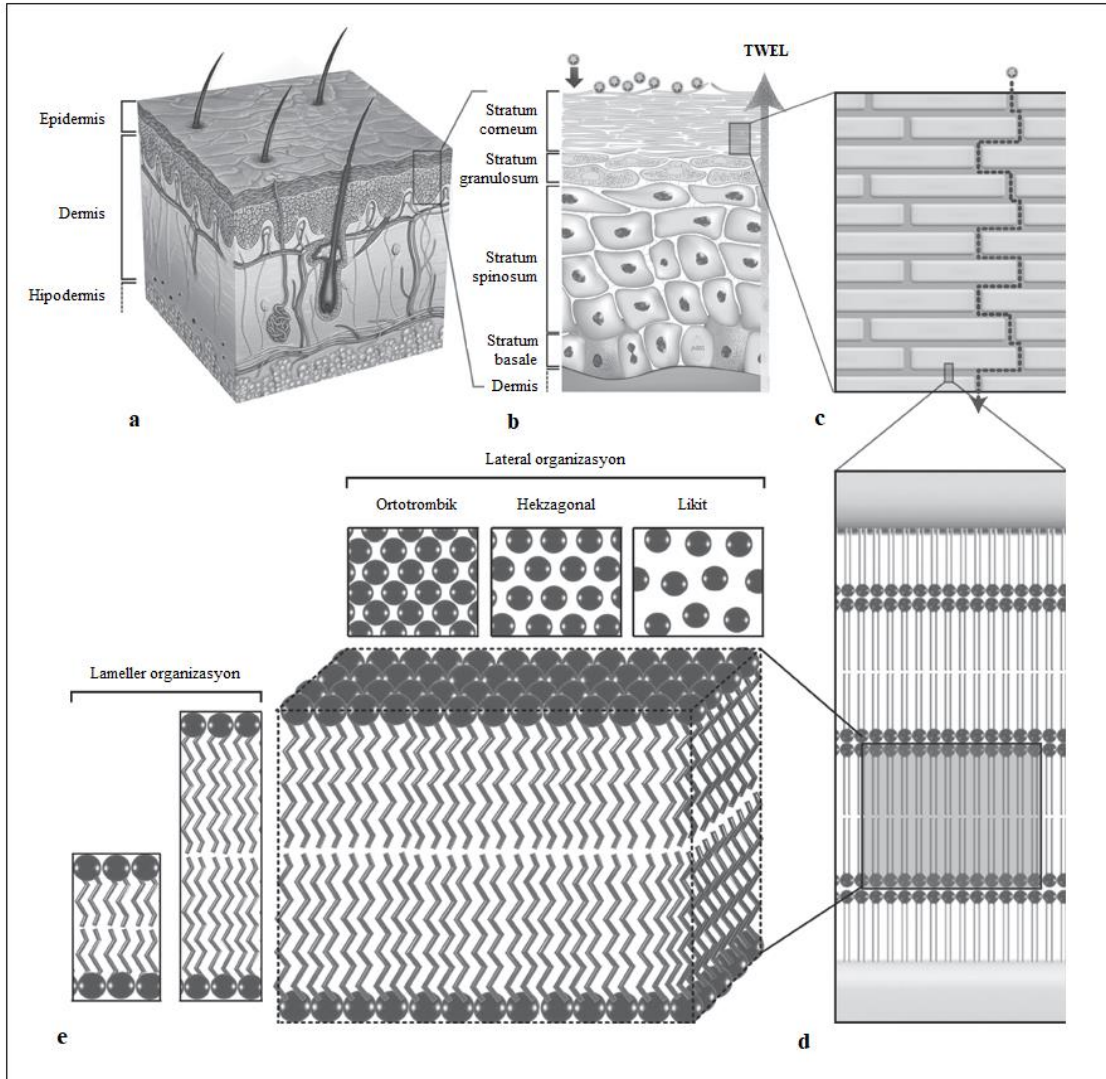
Stratum corneum topikal ve transdermal uygulamalarda etkin maddenin perkütan penetrasyonundaki en önemli engeldir. *Stratum corneum*'un yapısı “tuğla ve harç” modeli olarak tanımlanır. Korneositler içinde yer alan hidrate keratin tuğla yapısını, hücreler arasını dolduran lipitleri oluşturan yağ asitleri, seramitler, kolesteroller ve kolesterol esterleri harç yapısını temsil etmektedir. *Stratum corneum*'un “tuğla ve harç” yapısı Şekil 2-1'de gösterilmiştir. Yapısı nedeniyle *stratum corneum* perkütan absorpsiyonda hidrofobik membran olarak davranmaktadır (Elias 1981; Steiling ve ark. 2001; Roberts ve ark. 2002; Barry 2006 p. 4-5).

Stratum lucidum

Stratum corneum'un altında bulunan ince bir tabakadır. *Stratum lucidum* 2-3 tabaka keratinosit hücresinden oluşur ve sadece parmaklarda, avuç içlerinde ve ayak tabanlarında bulunur. *Stratum lucidum* içinde hücre çekirdekleri ve diğer organeller parçalanır, keratinizasyon artar, hücreler düzleşir ve sıkıştırılır (Benson 2012 p.6; Ramadon ve ark. 2022).

Stratum granulosum

Stratum lucium'un altındaki tabakadır. *Stratum granulosum* veya granüler tabakadaki keratinositler farklılaşmaya devam eder. *Stratum spinosum* tabakasındaki keratinositler düzleşir ve *stratum granulosum* tabakasına doğru hareket eder. *Stratum granulosum*'a girdikten sonra keratibositler profilagrin, lorikrin ve involukrin gibi bir dizi bariyer proteini içeren keratohiyalin granülleri biriktirir (Steven ve ark. 1990; Ishida-Yamamoto ve ark. 1993).



Şekil 2-1: Derini yapısı: a) Derinin tabakaları, b) Epiderminin tabakaları, c) *Stratum corneum* “tuğla ve harç” modeli, d) Lipit çift tabaka, e) Lipit tabakanın yapısal düzeni- Smeden ve Bouwstra 2016 p.10

Stratum spinosum

Stratum granulosum altındaki epidermal bir tabakadır. 8-10 tabaka tek sıralı keratinositlerden oluşur. Hücreler arasında hücre bağlayıcıları yani dezmozomların bulunması bu tabakanın “dikenli” tabaka (*stratum spinosum*) olarak adlandırılmasına neden olur. Langerhans hücreleri olarak bilinen antijen sunun hücreler bu tabakada bulunur (Ramadon ve ark. 2022).

Stratum basale

Stratum germinativum veya bazal tabaka olarak da adlandırılır. Epiderminin en derin ve dermis ile doğrudan temas eden tabakasıdır. Duyusal sistemlerin işlevsel bir hücresi olan merkel hücreleri ve melanositler bu katmanda bulunur. Bu tabakada bulunan hücreler deri yüzeyine doğru farklılaşarak ilerler ve diğer tabakaları oluşturmak üzere yer değiştirir. Hemidesmozom adı verilen bağlantı birimleri ile dermise bağlanırlar (Değim 2009 p. 340; Benson 2012 p.5-6; Ramadon ve ark. 2022).

2.1.2.2. Dermis

Dermis mekanik ve dermal bakımdan derinin en önemli tabakasıdır. Kalınlığı 0.5-3 mm arasında değişir. Derinin kalınlığının yüzde 90'ını oluşturur. Dermis, papiller ve retiküler tabakalar olarak adlandırılan iki tabakadan oluşur. Spesifik olarak, adipositler, kan damarları ve lenfatik kılcal damarlar derminin papiller tabakasında bulunur. Retiküler tabaka, yüksek kollajen lif içeriği nedeniyle papiller tabakadan çok daha yoğundur ve elastikiyeti sağlar. Dermal tabaka, fagositler, fibroblastlar, lökositler ve mast hücrelerinin varlığı nedeniyle bağışıklık fonksiyonunda önemli bir rol oynar. Kıl folikülleri, yağ ve ter bezleri bu tabakada yer almaktadır (Benitez ve Montans 2017; Ramadon ve ark. 2022).

2.1.2.3. Hipodermis

Dermisin altında yer alan derinin en derin tabakasıdır. Subkütan tabaka olarak da bilinen hipodermis deri, kas ve kemikler arasında bağlantı dokusu olarak işlev görür ve bu tabaka proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar açısından zengindir. Yağ üreten ve depolayan adiposit hücrelerinden oluşur. Kan ve lenf damarları ve sinir lifleri bu tabakada bulunmaktadır. Hipodermis yağ dokusu vücut sıcaklığının korunmasına yardımcı olur. Yapısındaki kolojen sayesinde deriye esneklik kazandırır ve fiziksel destek sağlar (Walters ve Roberst 2002; Benitez ve Montans 2017; Ramadon ve ark. 2022).

2.1.3. Topikal İlaç Uygulamasına Ait Genel Bilgiler

Deri yoluyla ilaç uygulanmasına topikal ve transdermal olarak iki yaklaşım bulunmaktadır. Topikal ve transdermal terimleri sıklıkla karıştırılır ve birbirinin yerine kullanılır. Dermatolojik hastalıkların tedavisinde topikal uygulama, derideki patolojik bölgelerin hedef alındığı ve en az düzeyde sistemik absorpsiyonun sağlandığı bir tedavi

yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (Brown ve ark. 2006; Wilbur 2017). Transdermal uygulamada ise ilacın *stratum corneum* ve epidermisi aşarak dermise ulaşması ve kan damarları yoluyla sistemik dolaşıma geçisi sağlanır. Deriye uygulanan ilaçlar öncelikle formülasyondan serbestleşir ve derinin *stratum corneum* tabakasına difüze olur. Ardından canlı epidermise ulaşır ve daha derin dokulara penetre olur. Bu şekilde ilacın deri altındaki dokularda etkin konsantrasyonlara ulaşması sağlanır (Brown ve ark. 2006; Lee ve Maibach 2006).

Topikal yol deri hastalıklarının tedavisinde öncelikle tedavi yaklaşımıdır. Topikal uygulama ile ilacın doğrudan hedef bölgeye uygulanmasını takiben etkinliğini arttırmak ve hedef bölgeye uygulanan ilaç miktarını azaltarak toksisite ve sistemik dolaşıma geçme riskini azaltmak hedeflenir (Zhang ve ark. 2013; Sala ve ark. 2018). Diğer uygulama yolları ile karşılaştırıldığında, topikal uygulama yaklaşımları önemli avantajlara sahiptir (Naik ve ark. 2000; Jager ve ark. 2007; Katare ve ark. 2010; Alam ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2013; Sala ve ark. 2016; Wilbur 2017):

- Deri hastalıklarının tedavisinde topikal ilaç uygulaması yaklaşımları ilaçların doğrudan hedef hücre yada dokulara taşınmasını sağlar.
- Terapötik etki sağlaması için daha az miktarda ilaç uygulaması yeterlidir.
- İlaçların plazmada çok yüksek seviyelere ulaşmasını önler.
- Hepatik ilk geçiş metabolizmasının ortadan kalkacağı için biyoyararlanım artar.
- Dozlama sıklığını azaltarak hasta uyuncunu iyileştirir.
- Hedef bölgeye ilacın daha güvenli, daha etkili ve daha hızlı taşınmasını sağlar.
- İlacın etki bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmasını sağlarken sistemik dolaşıma geçmesini de önler veya en aza indirir.
- Kontrollü ilaç salımı sağlanabilir.
- Gerketiğinde tedavinin hızla sonlandırılmasına izin verir.
- Oral yol ile tedavi edilemeyen hastalar için alternatif sunar.

2.2. Psoriasis Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Tanımı, Epidemiyolojisi

Psoriasis, deriyi ve/veya eklemleri etkileyen, dünya çapında yaygınlığı %0,6 ile %4,8 arasında değişen, ciltte açık cilt lezyon sınırları olan eritem ve pullarla karakterize, immün aracılı kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Almutawa ve ark. 2013; Gao ve ark. 2021). Hem erkeklerde hem de kadınlarda eşit olarak görünen Psoriasis, genel olarak erkeklerde kadınlardan daha şiddetli türevlerinin gözlemlenmesinin yanı sıra, hastaların yaşam kalitesi üzerinde hem fiziksel hem de psikolojik olumsuz etkiler gösterebilmektedir (Hägg ve ark. 2013; Pradhan ve ark. 2013; Singh ve ark. 2021). Psoriasisın en sık görülen fiziksel semptomlarından biri kaşıntıdır ve hastaların yaklaşık % 67-95’inde ortaya çıkmaktadır. Diğer belirgin semptomlar ise deride yanma, şişlik, eklem ağrısı, pullanma ve deri dökülmesi olarak özetlenebilir (Richards ve ark. 2006; Dubertret ve ark. 2006; Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017). Psoriasis, hastaların yaklaşık %80’inde hafif ila orta derecede seyrederek ve hastaların vücut yüzey alanlarının %5’e kadarı etkilenir. Daha da önemlisi, sedef hastalığı, remisyon ve alevlenmelerle birlikte kronik bir seyir izleme eğilimindedir (Menter ve ark. 2008; Blakely ve Gooderham 2016).

Psoriasis’in altında yatan patogeneze, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Psoriasis hastalığı olan bireylerde, diğer kronik hastalıkların da gelişme riski oldukça fazladır (Boehncke ve Schön 2015; Armstrong ve Read 2020). Bu komorbid hastalıklar arasında; psoriatik artritis, metabolik sendrom veya sendromun bileşenleri, kardiyovasküler bozukluklar, anksiyete ve depresyon, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, Crohn hastalığı ve lenfoma gibi diğer bazı hastalıklar yer alır (Golden ve ark. 2013; Griffiths ve Barker 2007; Nestle ve ark. 2009).

Klinik özelliklerine bakıldığında Psoriasis; değişken morfoloji, dağılım, şiddet ve seyir gösteren papüloskuamöz bir hastalıktır. Lezyonlar genellikle birkaç farklı özelliğe sahiptir. İlk olarak, belirgin sınırlarla iyi bir şekilde sınırlandırılmıştır. İkincisi, lezyonların yüzeyi uyumsuz, gümüşü pullara sahiptir. Son olarak ciltte parlak bir eritem vardır (Weinstein ve Menter, 2003 Langley ve ark. 2005; Myers ve ark. 2006). Psoriasis’in çeşitli formları vardır. Bunlar; plak psoriasis, püstüler psoriasis, eritrodermik psoriasis, guttat psoriasis, ters psoriasis ve psoriasis vulgaris olarak sınıflandırılır (Jean ve Pouliot 2010; Boehncke ve Schön 2015; Rajguru ve ark. 2020).

Tüm vakaların %90 kadarını oluşturan en yaygın Psoriasis türü, papüloskuamöz plakların çevredeki normal deriden iyi bir şekilde ayrıldığı “*psoriasis vulgaris*”tir. Ayrıca Psoriasis’in genetik yatkınlığına dair belgelenmiş kanıtlar mevcuttur ve Psoriasis olan hastaların yaklaşık üçte birinin, hastalığa sahip başka akrabaları olduğu tespit edilmiştir (Langley ve ark. 2005; Griffiths ve Barker 2007). Psoriasis şiddetine göre ise hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılabilir (Vincent ve ark. 2014).

2.2.2. Patofizyolojisi

Psoriasis derinin bariyer fonksiyonunun azalmasına yol açan TNF- α /IL-23/IL-17A aracılı inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Segre 2006; Furue ve ark. 2019). Psoriasis keratinositlerin çoğalması ve anormal farklılaşması, vasküler değişiklikler, deriye enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve sitokin üretimi ile karakterizedir (Sala ve ark. 2016). Hastalığın sebebi henüz tam olarak anlaşılamasa da, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Sun ve Zhang 2014; Palmer ve DeLouise 2016; Lowes ve ark. 2014). İmmün hücrelerin aktivasyonu ve onlar tarafından salgılanan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi sinyal molekülleri, psoriasisde görülen hiperkeratoz, epidermis kalınlaşması ve vaskülarizasyonu arttırır (Arora ve ark. 2017).

Psoriasis hastalarında dolaşımda nötrofil seviyeleri yükselir, özelleşmiş makrofajlar ve dentritik hücreler cilt lezyonlarında erken ortaya çıkar. Bunu, belirgin Th1 ve Th17 aracılı patolojiye sahip bir döngüyü sürdüren aktive edilmiş doğal öldürücü hücreler ve T hücreleri takip eder. Tümör nekroz faktörü- (TNF)- α ve interferon- γ (IFN- γ), interlökin- (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler ve CXCL9, CXCL10, CXCL11 gibi kemokinler, ve siklooksijenaz-2 (COX-2) psoriatik lezyonların başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol oynar. Th17 hücreleri ve imza sitokini IL-17 ile IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 gibi sitokinler ve inflamatuvar biyobelirteçler psoriasis patolojisinde yer almaktadır (Furue ve ark. 2019; Mavropoulos ve ark. 2013).

CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesi olan Th17 hücreleri, IL-17’nin (IL-17A olarak da adlandırılır) yanı sıra otoimmün hastalık modellerinde doku hasarının kritik araçları olarak gösterilen diğer sitokinleri de üretir. Bu Th17 hücreleri ve bunların efektör molekülleri IL-17A, IL-17F, TNF- α , IL-22 ve IL-26, psoriatik lezyonlarda bol miktarda bulunur (Mabuchi ve ark. 2012).

IL-17A dermal ve mukozal immüniteyi düzenler ve psoriasisli hastalarda artarak plak histopatolojisinde rol oynar. Keratinosit stresi, dendritik hücre (DC) aktivasyonu ve katelisin gibi antimikrobiyal peptitlere karşı otoreaktif deriye yerleşen T hücrelerinin koordineli olarak plak oluşumunu başlattığı varsayılmaktadır. Mevcut modellerde yerleşik deri hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler IFN- α IFN- γ , ve TNF- α üretilir, ve bunlar miyeloid dendritik hücreleri aktive ederek IL-12 ve IL-23 üretilmesini sağlar. IL-12 proinflamatuvar Th1 yolaklarını tetikler. IL-23 ise Th17 hücreleri ve diğer lökositleri aktive ederek IL-17A ve IL-17F ve IL-26 yı da içeren diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar. IL-17A, farklı hücre tiplerinde farklı etkileri olan IL-17 reseptörleri aracılığıyla etki gösterir (Krauger ve ark. 2019).

IL-17A, T hücrelerinde kendi sentezini otomatik olarak aktive eder, dermiste proinflamatuvar IL-6 ve IL-8/CXCL8'i indükler ve mitojenik faktörlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve antimikrobiyal proteinlerin sentezini teşvik ederek keratinosit hiperplazisine yol açar (Krauger ve ark. 2019).

Dermal dentritik hücreler büyük miktarlarda TNF- α ve IL-23 üretir ve IL-17A üreten yardımcı T (Th17) hücrelerinin farklılaşmasını indükler. IL-17A keratinosit proliferasyonunu indüklerken farklılaşmasını inhibe eder. IL-17A keratinositlerin nötrofil çeken sitokin/kemokinler olan IL-36, CXCL1, CXCL2 ve CXCL8 (IL-8) üretimini artırır. IL-17A keratinosit proliferasyonunu artırır ve CCL20 üretimi için keratinositleri uyarır. Th17 hücreleri de ayrıca CCL20 üretebilir. Ayrıca Th17 hücreleri yüksek miktarda TNF- α üretir. Böylece TNF- α /IL-23/IL-17A eksenini bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve sonunda tam teşekküllü psoriasis gelişmesine neden olur. CCL20/CCR6 kemotaktik sistemi TNF- α /IL-23/IL-17A ekseninin sürdürülmesinde ve psoriasis patogeneğinde kritik rol oynar (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). CCL20/CCR6 eksenini psoriasisde olası terapötik hedeflerden biri olarak kabul edilir (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). IL-17 sinyal yolağı inhibitörleri ile orta-şiddetli psoriasis olan hasta grubunda gerçekleştirilen erken klinik deneylerde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kirkham ve ark. 2014).

Kemokin reseptörleri ve bunlara karşılık gelen kemokin ligandları, psoriasis de dahil olmak üzere, T hücre aracılı inflamatuvar deri hastalıklarında önemli roller oynar. Kemokin reseptörü eksprese eden immün hücrelerin (örn., CXCR3 eksprese eden Th1 hücreleri ve kemokin reseptörleri CCR6 ve CCR4'ü eksprese eden Th17 hücreleri),

kemokin gradyanları boyunca psoriatik cilde göç ettiği bilinmektedir (Mabuchi ve ark. 2012).

Son çalışmalar, CCR6'nın psoriasis patogenezindeki rolüne dikkat çekmektedir. CCR6 ilk olarak T hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler üzerinde keşfedilmiştir. CCR6'nın Th17 sinyal yolunda ve psoriasis gelişiminde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Hedrick ve ark. 2010). CCL20, normal insan derisinde epidermal keratinositler ve endotelial hücreler tarafından yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, keratinositlerde ve endotel hücrelerinde CCL20 üretimi, TNF- α , IL1, IL17 ve IFN- γ gibi proinflatuar sitokinler tarafından kuvvetle artırılır. Psoriatik cilt lezyonlarında, CCL20 epidermin suprabazal tabakasında yüksek oranda eksprese edilir. CCL20, CCR6'yı tetikleyen tek kemokindir ve bilinen diğer kemokin reseptörleri aracılığıyla biyolojik bir cevap ortaya çıkaramaz (Mabuchi ve ark. 2012).

2.2.3. Tedavisi

Psoriasis şiddetine göre ise hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılabilir (Vincent ve ark. 2014). Psoriasis için günümüzde tanımlanan tedavi seçenekleri hastalığın tipine ve şiddetine göre topikal tedavi, fototerapi ve sistemik tedavi olarak üç grupta incelenebilmektedir (Sala ve ark. 2016; Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017). Hafif ve orta şiddette psoriasisli hastalarda topikal ajanlar tedavide ilk seçenek olarak yer alırken, topikal tedavinin etkisiz olduğu durumlarda fototerapi ve üçüncü seçenek olarak da sistemik tedavi önerilmektedir. Dirençli lezyonlarda bu üç tedavi seçeneğinin kombinasyonu da kullanılabilir (Menter ve ark. 2009). Fototerapi ve sistemik ajanlar doza bağlı olarak hepatotoksisite, renal toksisite, hipertansiyon, hiperlipidemi ve deri kanseri gibi yan etkilere sebep olmakta ve uzun süreli kullanımda azalmış güvenlik profili ile ilişkilendirilmektedir (Pradhan ve ark. 2013).

2.2.3.1. Topikal Tedavi

Psoriasis hastalarının yaklaşık %80'i hafif-orta şiddette hastalığa sahiptir. Ayrıca psoriasis'in fizyopatogenezi ağırlıklı olarak cilt dokusunda lokalizedir ve deri lezyonları vücut yüzey alanının %5'inden azında yerleşmiştir (Menter ve ark. 2009). Hafif ve orta şiddetli plak tipi psöriazisin tedavisinde oral ya da topikal yolla kullanılan tedaviler mevcuttur ancak oral yol ile başta hepatotoksisite, nefrotoksisite ve ilaç etkileşimleri olmak üzere çeşitli yan etkiler ortaya çıkabilir. Psöriazis tedavisinde

topikal yol oldukça avantajlıdır. Topikal uygulama ile ilaçlar hastalıklı bölgeye hedeflendirilebilir, olası yan etkiler en aza indirilebilir. Hedef bölgeye doğrudan yapılan uygulama daha hızlı ve daha etkili terapötik cevap elde edilmesini sağlar. Terapötik etki elde edebilmek için daha düşük miktarda ilaç uygulaması gerektirmesi ise toksisite riskini azaltır (Zhang ve ark. 2013; Agrawal ve ark. 2015; Sala ve ark. 2016).

Hafif şiddetli psoriasisli hastalar için tedavi seçenekleri arasında topikal kortikosteroidler, vitamin D analogları, kalsinörün inhibitörleri, keratolitikler ve fototerapi yer alır. Ayrıca, cildi nemlendiren nemlendiriciler ve yumuşatan emolyantlar gibi tedaviler derinin bariyer fonksiyonunu iyileştirir ve alevlenmeleri azaltabilir. Topikal tedavilerin kombinasyonlar halinde kullanımı oldukça yaygındır (Gelmetti 2009; Hendriks ve ark. 2013; Armstrong ve Read 2020).

Topikal kortikosteroidler immunosupresif özellikleri, antienflamatuvar ve antiproliferatif etkileri nedeniyle psoriasis tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlar arasındadır (Lamba ve Lebwohl 2001; Pearce ve ark. 2004). Ancak uzun süreli topikal kortikostretoid kullanımı, atrofi, dermatit, sistemik emilim riski gibi yan etkiler bu ilaçların kullanımını sınırlamaktadır (Horn ve ark. 2010; Mason ve ark. 2019). Topikal vitamin D analogları T hücreleri ve keratinositler üzerindeki D vitamini reseptörlerine bağlanarak keratonist proliferasyonunu inhibe eder ve farklılaşmasını normal seyrine çevirir. Deri tahrişi, kaşıntı ve yanma gibi yan etkiler gözlenebilmektedir. Diğer topikal ilaçlarla kombine halde kullanılabilir (Lin ve ark. 2010; Armstrong ve Read 2020). Topikal kalsinörün inhibitörleri IL-2 ve IFN- γ sentezini inhibe ederek T hücre aktivasyonunu bloke eder. Topikal kalsinörün inhibitörleri olan takrolimus ve pimekrolimus'un uzun dönem kullanımı ile ilişkili atrofi gibi yan etkiler görülmemesi sebebiyle yüz ve kıvrımlı bölgelerin tedavisinde sıklıkla tercih edilir. Keratinosit proliferasyonu, epidermal farklılaşma ve keratinizasyon üzerindeki etkileri nedeniyle retinoidler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tazaroten, sedef hastalığının tedavisi için geliştirilen ilk topikal retinoittir. Topikal tazarotenin en sık görülen yan etkisi lokal iritasyondur (Beckenbach ve ark. 2015; Armstrong ve Read 2020).

2.2.3.2. Fototerapi

Fototerapi ışık tedavisi olarak da adlandırılır, ışığın belirli dalga boylarında uygulanan tedaviyi içerir. Fototerapi, plak tipi psoriasisin tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Daha yaygın psoriasis tüm vücudu çevreleyen fototerapi

uygulanırken, lokalize plak psoriasisinin tedavisinde hedefe yönelik fototerapi uygulanır. Hedefli fototerapiye bir örnek yüksek yoğunluklu UV-B (308 nm) yayan excimer ışık tedavisidir. Hastalar tipik olarak haftada iki kez fototerapiye tabi tutulur ve yaklaşık 2 ay sonra önemli iyileşme görmeye başlar. Excimer ışık tedavisi çok düşük karsinojenik potansiyele sahiptir ve başlıca yan etkileri yanma ve kabarmadır (Armstrong ve Read 2020).

Orta şiddetli ve şiddetli psoriasis için fototerapi kullanımı biyolojik moleküllerin ortaya çıkmasından bu yana azalmıştır. Sedef hastalığının tedavisinde kullanılan başlıca fototerapi türleri arasında dar bant UV-B, geniş bant UV-B, veya psoralen ve UV-A (PUVA) bulunur. Genel olarak dar bant UV-B kullanılarak yapılan tedavi, daha etkili olduğu için geniş bant formuna tercih edilir. Dar bant UV-B kullanımı daha uygun bir güvenlik profiline sahip olması sebebiyle PUVA yerine de tercih edilir. Dar bant UV-B çocuklar ve hamilelerin tedavisinde de kullanılabilir. Excimer ışık gibi hedefe yönelik fototerapi ise lokalize psoriasisli hastalarda kullanılır (Dvorakova ve Markham 2013; Armstrong ve Read 2020).

2.2.3.3. Sistemik Tedavi

Orta şiddetli ve şiddetli psoriasis tanımlaması konusunda klinisyenler arasında fikir birliği yoktur. Bazı klinisyenler psoriasis vücut yüzeyinin %3 ila %10'unu kapladığında orta düzeyde tanımlarken, diğerleri vücut yüzey alanının %5 ila %10'unu kapladığında orta şiddetli olarak tanımlar. Şiddetli psoriasis ise tipik olarak vücut yüzey alanının %10 veya daha fazlasını kapladığı kabul edilir. Sistemik tedaviler, orta şiddetli ve şiddetli psoriasis tedavisinin temelini oluşturur. Sistemik ilaçlar ayrıca kafa derisi, avuç içi, ayak tabanı ve cinsel organlar gibi özel alanları içeren kolalaze durumlar ve topikal tedavilere yanıt vermeyen inatçı psoriasis olgularında da kullanılabilir. Amerikan dermatoloji akademisi- ulusal psoriasis vakfı kılavuzları orta ve şiddetli psoriasisli hastalarda biyolojik moleküller, oral ajanlar ve fototerapinin eş zamanlı uygulanmasını önermektedir. Topikal tedaviler orta ila şiddetli psoriasis tedavisinde ek tedavi olarak uygulanabilir ancak tek başına kullanılmaz (Armstrong ve Read 2020).

Psoriasisin sistemik tedavisinde kullanılan üç eski sistemik ajan metotreksat, siklosporin ve asitretindir. Sistemik ajanların kullanımı yan etkileri nedeniyle sınırlıdır (Hoffman ve ark. 2016). Metotreksat endojen adenozin salımını artırır ve immün modulator ve antienflamatuvar etkilere sahiptir. Metotratsat tedavisi sonucu yaygın

görülen yan etkiler enfeksiyon, nazofarenjit ve baş ağrısıdır. Ayrıca teratojenite, hepatotoksisite, böbrek yetmezliği, diyare, ülseratif stomatit, pulmoner fibroz, cilt reaksiyonları ve fırsatçı enfeksiyonlar ciddi yan etkilere (Goldenberg ve ark. 2016). Siklosporin kalsinörin fosforilasyonunu ve böylece IL-2 transkripsiyonunu inhibe eder. Siklosporin şiddetli psoriasis alevlenmeleri özellikle püstüler ve eritrodermik psoriasis için kısa süreli veya aralıklı olarak kullanılır. Siklosporin hızlı etkisi nedeniyle avantajlıdır. Hipertansiyon, hiperkalemi, hiperlipidemi ve hipermagnezemi durumlarına karşı takip edilmesi gerekmektedir. Kılavuzlar kullanımını bir yıl ile sınırlar. Uzun dönem tedavi kronik nefrotoksisite, hepatotoksisite, trombotik mikroanjiyopati, maligniteler, nörotoksisite ve ciddi enfeksiyonlara neden olabilir (Hoffman ve ark. 2016; Goldenberg ve ark. 2016). A vitamini türevi bir retinoid olan asitretin tarihsel olarak hafif ve orta dereceli püstüler, palmoplantar, eritrodermik varyant psoriasis tedavisinde kullanılmıştır. Asitretin plak tipi psoriasis tedavisinde fototerapi ve biyolojik moleküllerle kombinasyon tedavisi olarak uygulandığında yararlıdır. Tek başına kullanımı ile remisyon oranları düşüktür (<%50). Asitretin immünosupresif değildir. En önemli güvenlik sorunu teratojenitedir. Asitretinin yarı ömrü 49 saat olsa da kendiliğinden veya alkol varlığında yarı ömrü 168 gün olan etrinata dönüşebilir. Etrinatın kan dolaşımından temizlenmesi 3 yıla kadar sürebileceğinden asitretin hamile kalmayı planlayan veya tedavi kesildikten 3 yıl boyunca kontrasepsiyon kullanamayan kadınlarda kontrendikedir. Tedaviye bağlı görülen diğer yan etkiler arasında göz, ağız ve burun mukozası kuruluğu, saç dökülmesi, lipid düzensizlikleri, pankreatit, hiperkeratoz, psödotümör serebri, hepatotoksisite ve teratojenite yer alır. Hastalar her 6 ila 12 haftada bir izlenmelidir (Hoffman ve ark. 2016; Goldenberg ve ark. 2016).

2.2.3.4. Biyolojik Moleküller

Orta ve şiddetli plak psoriasisinin tedavisinde kullanılan biyolojik moleküller dermatoloji alanındaki en önemli terapötik gelişmelerden biridir. Biyolojik moleküller siklosporin, metotreksat, ve fototerapi gibi sistemik tedavilere yanıt vermeyen veya bu tedavilerin kontrendike olduğu, orta ve şiddetli plak tipi psoriasis ve psoriatik artritli hastaların tedavisinde kullanılır (Koç 2016; Armstrong ve Read 2020). Psoriasis tedavisinde kullanılan 4 biyolojik molekül sınıfı bulunmaktadır. Bunlar TNF inhibitörleri, IL-12/23 inhibitörleri, IL-17 inhibitörleri ve IL-23 inhibitörleridir. TNF- α inhibitörleri (adalimumab, etanercept, infliksimab), IL-12/23 inhibitörleri (ustekinumab)

ve IL-17 inhibitörleri (sekukinumab, iksekizumab) psoriasis tedavisi için FDA onayı almıştır. Biyolojik tedaviler oral ilaçlar ve fototerapi ile karşılaştırıldığında daha yüksek etkinliğe sahiptir. Biyolojik moleküllerin kullanımı ile ilgili en önemli zorluk pahalı bir tedavi olmasıdır. Ciddi enfeksiyon ve iç malignite oranlarında artış görülmemiştir. Plasebodan biraz daha yüksek oranlarda ortaya çıkan ve tüm biyolojik moleküllerde ortak olan yan etkiler, enjeksiyon bölgesi reaksiyonu, nazofarenjit ve üst solunum yolu enfeksiyonlarıdır (Hoffman ve ark. 2016; Armstrong ve Read 2020).

2.3. Statin Grubu İlaçlar Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Tanımı, Tarihçesi ve Tedavide Kullanımı

Statinler, 3-hidroksi-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktazı yarışmalı olarak ihhabe ederek kolesterol biyosentezini engelleyen lipit düşürücü ajanlardır. Kardiyovasküler hastalıklardan birincil ve ikincil korunmada en çok çalışılan ve reçete edilen ilaçlar arasındadır (Zhou ve Liao 2010; Gheorghe ve ark. 2014; Ramkumar ve ark. 2016).

Endo ve ark.'nın 1976'de yaptıkları çalışmada, kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı basamak olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini inhibe edebilecek mikrobiyal metabolitleri tespit etmeyi amaçlamış ve bu çalışmalar sonunda *Penicillium citrinum* adlı mantardan ilk statin (mevastatin) elde edilmiştir (Endo ve ark. 1976). “Monakolin” adlı metabolitin sıçanların kanındaki yüksek lipoprotein miktarını azalttığı gösterilmiş ve olumsuz etkileri nedeniyle piyasaya çıkmamıştır. Daha sonra Merck & Co ilaç şirketi bu çalışmalara ilgi gösterip *Aspergillus terreus* adlı mantar kullanılarak lovastatin elde etmiştir; bu da pazarlanan ilk ticari statin olmuştur (Endo 2010; Gheorghe ve ark. 2014; Yu ve Liao 2022). Kısa süre sonra *Nocardia autotrophica* (1988)'nin fermentasyonu ile üretilen Pravastatin, *Aspergillus terreus*'un fermentasyon ürünlerinden sentetik olarak türetilen Simvastatin, Fluvastatin ve tamamen sentezle üretilen Atorvastatin, Rosuvastatin ile Pitavastatin ortaya çıkmıştır.

2020 itibarıyla, çeşitli yapılara ve farmakolojik parametrelere sahip 9 statin grubu ilaç geliştirilmiştir. Bunlar birinci jenerasyon statinler olan mevastatin, lovastatin, provastatin ve simvastatindir ve ikinci jenerasyon statinler olan rosuvastatin, atorvastatin, pitavastatin, fluvastatin ve serivastatindir. Bunlardan 7'si şu anda Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Yu ve Liao 2022). Ancak sentez yoluyla da

üretilen ve çok güçlü lipit düşürücü statin olan serivastatin, yan etkileri nedeniyle piyasadan çekilmiştir. Günümüzde kullanılan statinler; lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin ve rosuvastatindir (Gheorghe ve ark. 2014; Mennickent 2015).

Statinler mevalonatın yapısal analoglarıdır ve hepatik HMG-CoA redüktazı reversible olarak bloke ederek mevalonate yolu denilen kolesterol sentezinin hız sınırlandırıcı ilk basamağını oluşturur. Kolesterol sentezinin uzun vadeli kontrolü, HMG-CoA redüktaz sentezi ve bozulması arasındaki dengeye bağlıdır. Statinler, mikrozomal HMG-CoA redüktazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder ve hücre içi kolesterol biyosentezini azaltır. Kolesterol miktarının azalması karmaşık mekanizmalarla HMG-CoA redüktaz geninin transkripsiyonunu artırır. Transkripsiyonel aktivasyonun sonucu olarak, mikrozomal HMG-CoA redüktaz üretimi ve ayrıca LDL kolesterol membran reseptörlerinin sayısı artar. Dolaşımdaki LDL kolesterol partikülleri hücre içinde tutulur ve ekstrahepatik dokularda kolesterol dengesini ayarlar. Kandaki LDL kolesterol düzeyi, statin kan konsantrasyonuna bağlı olmaksızın, statin dozuna dayalı olarak 4-6 haftada, genellikle %20-35 oranında azalır. Bu durum, statinlerin karmaşık metabolizması sırasında aktif metabolitlerin ortaya çıkabilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca statinlerin lipit düşürücü etkileri, HMG-CoA redüktazın genetik polimorfizmine bağlıdır ve bu nedenle statinlere düşük yanıt veren hastalar da vardır (Corsini ve ark. 1995; Gheorghe ve ark. 2014).

2.3.2. Pleiotropik Etkileri

Statinler veya 3-hidroksi-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, kolesterol biyosentezinin güçlü inhibitörleridir ve koroner arter hastalığının birincil ve ikincil önlenmesi için yerleşik tedavilerdir. Serum kolesterol düzeyi koroner kalp hastalığı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğundan, genel olarak statin tedavisinin altında yatan yararlı etkilerin tamamen kolesterolün düşürülmesine bağlı olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte klinik çalışmalar, statinlerle gözlemlenen genel faydaların, yalnızca lipit düşürücü özelliklerinden değil, muhtemelen kolesterolden bağımsız veya pleiotropik etkilerden kaynaklanabileceğini göstermektedir (Zhou ve Liao 2010).

Statin grubu ilaçların kolesterol metabolizması üzerine etkilerinin yanı sıra antienflamatuvar etkilerinin olduğu ve LDL oksidasyonunu azaltarak ve nitrik oksit

biyoyararlanımını arttırarak endotel disfonksiyonunu iyileştirici etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, antioksidan, plak oluşumunu önleyici, koagülasyon profilini iyileştirici, trombosit agreasyonunu önleyici etkileri bildirilmiştir. Antiproliferatif ve immünosupresif etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir. Tümör hücre gelişimi ve metastazını önleme, kemik oluşumunu arttırma gibi birçok pleiotropik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Statin grubu ilaçların sahip olduğu tüm bu özellikler çok çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir (Garrett ve ark. 2001; Stancu ve Sima 2001; McFarlane ve ark. 2002; Mihos ve Santana 2011; Rajpara ve ark. 2010; Yu ve Liao 2022).

2.3.3. Psoriasis Tedavisindeki Yeri

Psoriasis bölgeye ve etnik kökene bağlı olarak % 0.6 ile % 4.8 arasında değişen insidansa sahip yaygın bir deri hastalığıdır. Keratinositlerin hiperproliferasyonu ve inflamatuvar süreçlerle karakterize edilir. Naif T hücreleri, antijen sunan hücreler tarafından aktive edilir. Aktive olan hücreler deriye nüfuz eder ve birbirlerini ve keratinositleri birkaç sitokin vasıtasıyla aktive eder. Bu süreç keratinosit proliferasyonunun artmasına ve inflamasyona neden olur (Mosiewicz ve ark. 2013; Brauchli ve ark. 2011).

Psoriasis, akut koroner sendrom, arteriyel hipertansiyon ve miyokard enfarktüsü dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalık riskinin artması ile ilişkili metabolik bir sendrom olarak kabul edilir. Oksidatif strese ek olarak, ateroskleroz, hiperlipidemi veya insülin direnci gibi metabolik risk faktörleri psoriasisli hastalarda yaygındır. Psoriasisli hastaların sıklıkla kolesterol ve trigliserit değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir (Pietrzak ve ark. 2018; Chen ve ark. 2021). Yüksek vücut kitle indeksi ve lipit anormallikleri özellikle yüksek kolesterolün psoriasisli hastaları olumsuz etkilediği, oysa sağlıklı diyetlerin yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle anormal lipit metabolizması hastalığı olan hiperkolesterolemi tedavisinde sıklıkla kullanılan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (CoA) redüktaz inhibitörü statin grubu ilaçların psoriasis tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmüştür (Brauchli ve ark. 2011; Chen ve ark. 2021).

Statinler anti-inflamatuvar ve immün modülatör etkileri nedeniyle 1990'larda psoriasis için potansiyel bir deneysel tedavi seçeneği olarak öne sürülmüştür (Mosiewicz ve ark. 2013; Brauchli ve ark. 2011). Kolesterol düşürücü tedavinin

psoriasis üzerine yararlı etkileri çeşitli mekanizmalar ile açıklanmıştır. Bunlar sırasıyla lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1'in down-regülasyonu, lökositlerin endotel adezyonunun, ekstrasvazasyonun ve doğal öldürücü hücre aktivitesinin inhibisyonu, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, C-reaktif proteinin düşürülmesi, T hücreleri üzerindeki Th1 sitokin reseptörlerinin inhibisyonu şeklindedir. Mast hücrelerinin degranülasyonunun inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu da rapor edilmiştir. Yukarıda bahsedilen patomekanizmalar lenfosit aktivasyonunun sınırlandırılmasına ve sonuç olarak inflamasyon bölgelerine infiltrasyonun bozulmasına sebep olur (Mosiewicz ve ark. 2013).

ICAM-1 (hücreler arası adezyon molekülü-1) lökosit hücre yüzey reseptörü olan LFA-1 (lökosit fonksiyonlu adezyon molekülü-1)'in ligandıdır. Statinlerin klinik etkilerinin lökositlerin LFA-1/ICAM-1 aracılı adezyonunun inhibisyonu veya proinflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonu arağılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür (Mosiewicz ve ark. 2013).

Statinler immünolojik yanıtı düzenleme potansiyeline sahiptir. Günümüzde, lipit düşürücü ajanlar ile bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) arasındaki ilişkiye vurgu yapılmaktadır. Psoriasisdeki hücrel proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz ile ilişkili inflamatuvar süreçlerde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar NF- κ B aktivitesi ve keratinosit proliferasyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, farklı anti-psoriatik tedavi yaklaşımları, aktif NF- κ B seviyelerinin azaltılmasına odaklanır. Bahsedilen tedaviler yaklaşımları arasında glukokortikoidler veya TNF- α ve IL-17 blokörleri gösterilebilir (Mosiewicz ve ark. 2013).

Statin grubu ilaçların psoriasis tedavisinde kullanımı ile ilişkili literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, bazı yazarlar statinlerin psoriasis üzerindeki etkisini tespit edememişken, diğerleri sedef hastalığı dahil olmak üzere çeşitli dermatolojik bozuklukların tedavisinde yararlı olabileceğini öne sürmüştür (Mosiewicz ve ark. 2013). Shirinsky ve Shirinsky tarafından yılında yapılan pilot çalışmada simvastatin'in günlük 40 mg dozda uygulama sonrası plak psoriasisinde yararlı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışma 7 hasta ile yapılmış ve sadece 8 hafta sürmüştür (Shirinsky ve Shirinsky 2007). Naseri ve arkadaşları tarafından yapılan küçük plasebo

kontrollü çalışmada oral simvastatinin psoriasis tedavisi için topikal steroidlerin terapötik etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir (Naseri ve ark. 2010). Oysaki Irajı ve ark. tarafından yapılan çalışmada psoriasis tedavisinde topikal vitamin D analogu ile tedaviye bir topikal simvastatin merhemini eklenmesinin önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir (Irajı ve ark. 2014).

Brauchli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (1994 ve 2005 yılları arasında tespit edilen 36,702 psoriasis hastası ile yapılan vaka-kontrol retrospektif analiz) statinlerin kısa süreli kullanımı ile etkinlik tespit edilirken uzun süreli kullanımda bir etkinlik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar statinlerin antipsöriyatik etkilerinin, doz ve zamana bağlı olduğu, uzun ve yoğun şekilde maruz kaldıktan sonra etkinliğin azalmış olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Brauchli ve ark. 2011). Wolkenstein ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise statin kullanımı ile psoriasis riskinde düşüş rapor edilmiştir (Wolkenstein ve ark. 2009).

Faghihi ve arkadaşları tarafından yapılan prospektif randemize çift kör plasebo kontrollü çalışmada plak tipi psoriasisde atorvastatin verilmesinin klinik etkileri araştırılmıştır. 12 hafta boyunca oral atorvastatin 40 mg/gün (20 hasta) veya plasebo (20 hasta) uygulanmış ve hastaların nemlendiriciler, keratolitikler ve/veya kortikosteroidler ile topikal tedavilerine çalışma süresi boyunca devam edilmiştir. Atorvastatin ile kombine tedavinin plaseboya karşı etkileri incelenmiştir. İki hasta grubu arasında ortalama PASI skorunda istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunamamıştır (Faghihi ve ark. 2011).

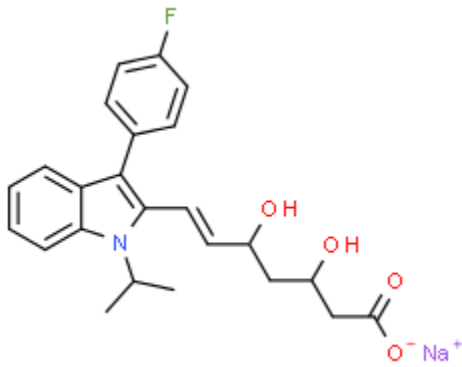
2.4. Fluvastatin Sodyum Hakkında Genel Bilgiler

2.4.1. Tanımı, Tarihçesi, Yapısı ve Özellikleri

Fluvastatin, kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktazın güçlü bir inhibitörüdür (Yamamoto ve ark. 1998). Fluvastatin HMG-CoA'nın kolesterolün öncül molekülü olan mevalonata dönüşümünü engeller (Sadowitz ve ark. 2010; Gheorge ve ark. 2014). İlk tamamen sentetik HMG-koA redüktaz inhibitörüdür (Gheorghe ve ark. 2014; Mennickent 2015). Fluvastatin sodyum 1998'de FDA tarafından onaylanmıştır. Lescol'un patenti 1994 yılında tescil edilmiş ve 2011 yılında sona ermiştir (Borgmann ve ark. 2013).

Piyasada sodyum tuzu halinde bulunur ve iyonizasyon sabiti (pKa) 5.5'tir (Asberg ve Holdaas 2004). Beyaz veya beyazımsı, veya soluk sarı veya soluk

kırmızımsı sarı, çok nem çeken, amorf veya kristal tozdur. Suda çözünür, metanolde kolay çözünür, asetonitrilde hemen hemen hiç çözünmez. Hava sızdırmaz kaplarda, ışıktan korunarak saklanır (Avrupa Farmakopesi 8.0). Fluvastatin sodyum'un kimyasal formülü ve fizikokimyasal özellikleri Şekil 2-2'de verilmiştir (Lawrence ve Reckless 2002; Asberg ve Holdaas 2004). Fluvastatin sodyum, iki enantiyomerik formu olan (+) - 3S,5R ile 30 kat daha yüksek aktiviteye sahip (-) - 3R,5S 'nin rasemik karışımı olarak piyasada bulunmaktadır (Borgmann ve ark. 2013).



Sodyum (3RS, 5SR, 6E)-7-[3-(4-florofenil)-1-(1-metiletil)-1H-2-il]-3,5-dihidroksihep-6-enoat

Kapalı Formülü: C₂₄H₂₅FNNaO₄

Molekül Ağırlığı: 433.5 Da

Erime Noktası: 194 °C

Log P: 6.8

pKa: 5.5

Şekil 2-2: Fluvastatin sodyum'un formülü* ve fizikokimyasal özellikleri

* <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8086370.html>;

2.4.2. Farmakolojik Özellikleri

Fluvastatin, HMG-CoA redüktazı inhibe ederek HMG-CoA'nın, kolesterol dahil çok sayıda sterolün öncül molekülü olan mevalonata dönüşümünü engelleyen statin grubunun bir üyesidir. HMG-CoA redüktazın reversiblen inhibisyonu sonucunda plazma kolesterol ve LDL kolesterol seviyeleri azalmakta ve ayrıca hepatik LDL reseptör aktivitesinin artışı ile birlikte LDL'nin karaciğer tutulumu artmaktadır (Corsini ve ark. 1995; Gheorghe ve ark. 2014). Aterosklerozda kolesterolün rolünün anlaşılması ve

iskemik kalp hastalığında birincil ve ikincil korunmanın önemli hale gelmesi ile statinlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Gheorghe ve ark. 2014).

Statinler HMG-CoA redüktazı kompetitif, geri dönüşümlü ve doz bağımlı inhibe eder. Statin dozunun iki katına çıkarılması, LDL kolesterol seviyesinin % 6 daha azalmasına sebep olur. Statinler oral yoldan kullanılır. İntestinal hücrelerden pasif mekanizma ve aktif transport yoluyla absorbe olurlar. Absorpsiyonları %30 (lovastatin) ve %98 (fluvastatin) arasında değişir. Fluvastatin sodyumun absorpsiyonu hızlıdır ve maksimum seviyeye yaklaşık 4 saatte ulaşır. Yemekler ile birlikte alındığında fluvastatin sodyum'un emilimi azalır. Aç iken alındığında absorpsiyonu daha iyidir Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanırlar. Fluvastatinin plazma proteinlerine bağlanma oranı %95'in üzerindedir (Schachter 2004; Gheorghe ve ark. 2014).

Lovastatin, fluvastatin, simvastatin, atorvastatin, pitavastatin lipofiliktir. Pravastatin ve rosuvastatin hidrofiliktir. Statinlerin lipofilitesi sistemik biyoyararlanımlarını etkiler. Lipofilik statinler hepatositlere pasif difüzyonla girerler. Kısmen dolaşımda kalırlar ve pasif mekanizma ile periferik dokulara girerler. Hidrofilik statinler spesifik taşıyıcılar ile hepatositlere geçer ve ekstrahepatik dokularda bulunmaz (Gheorghe ve ark. 2014; Oesterle ve Liao 2019). Fluvastatin ağırlıklı olarak CYP 2C9, aynı zamanda CYP 3A4 ve CYP 2C8 yolu ile ve çoğunlukla inaktif metabolitlerine metabolize olur (Schachter 2004; Gheorghe ve ark. 2014). Atorvastatin (10 saat) ve rosuvastatin (12 saat) hariç, statinlerin yarılanma ömrü 0,5-3 saattir. Kolesterol sentezi geceleri daha aktif olduğu için statinlerin akşam alınması tavsiye edilir. Atorvastatin ve rosuvastatin günün herhangi bir zamanında verilebilir. LDL kolesterol seviyelerindeki %20-35 oranında düşüş major kardiyavasküler olaylarda %30-40 oranında bir azalmaya sebep olmaktadır. Bu azalma, her bir statin için farklı dozlarda gerçekleşir: atorvastatin 10 mg, rosuvastatin 5 mg, simvastatin 20 mg, fluvastatin 80 mg, lovastatin 40 mg, pravastatin 40 mg (Gheorghe ve ark. 2014).

Statinlerin istenmeyen etkileri nadiren ve çoğunlukla da yüksek dozlarda görülmektedir. Kas semptomları (ağrı, güçsüzlük, kramplar) statin tedavisinin yaygın görülen yan etkileridir. Genellikle tolere edilebilir, nadiren tedaviyi durdurmaya da sebep olabilir. Rabdomiyoliz, geri dönüşü olmayan böbrek yetmezliğine yol açabilen akut kas yıkımı ve miyoglobinüri ile karakterize ciddi bir kas hastalığıdır. Fluvastatin veya pravastatinin, belki de HMG-CoA redüktazın daha zayıf inhibitörleri oldukları

için, diğer statinlere göre rabdomiyolize neden olma olasılığı daha düşük görünmektedir. Periferik nöropati statin kullanımına bağlı bir diğer nadir görülen istenmeyen etkidir. Fluvastatin, karaciğer yetmezliği olan hastalarda kontrendikedir. Ayrıca, karaciğer hastalığı veya ağır alkol alımı öyküsü olan hastalarda dikkatli olunmasını önerilir. Ciddi hipoglisemi potansiyeli nedeniyle fluvastatinin glibenklamid ile kombinasyon halinde kullanımından mümkün olduğunca kaçınılmalıdır (McKenney 2005; Lamperti ve ark. 2005; Lam ve Rudnicka 2006).

2.4.3. Pleiotropik Etkileri

Fluvastatin, hiperkolesterolemi tedavisinde iyi bilinen, sınıfının yapısal olarak benzersiz ve güçlü bir üyesidir. Fluvastatin'in bilinen kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra "pleiotropik etki" olarak adlandırılan lipit dışı mekanizmalar ile etkili olduğuna dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Corsini 2000).

Statin ilaçlarının, endotelial hücre apoptozunu azaltmak, anjiyogenezi artırmak ve endotel hücre anjiyogenez ve apoptozun bilinen aracılarını olan TSPLerin sinyalini bloke etmek dahil olmak üzere faydalı pleiotropik etkileri olduğu gösterilmiştir. Muqri ve ark. tarafından yapılan çalışmada fluvastatin tedavisinin proapoptotik genleri ve apoptozu azaltırken, proanjiyogenik genleri ve anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir ve Fluvastatinin endotel hücreleri üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Muqri ve ark. 2020). Fluvastatin antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir. Fluvastatin, fungisidal ve/veya fungistatik özellikler dahil olmak üzere en geniş ve en güçlü mantar önleyici aktiviteye sahip en etkili statin olarak kabul edilir (Tavakkoli ve ark. 2020).

Fluvastatin, bir dizi deneysel çalışmada potansiyel olarak antiaterojenik etkiler göstermiştir. Fluvastatinin antioksidatif özellikler sergilediği ve kolesterolle beslenen tavşanlarda aterosklerozun önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Fluvastatin ayrıca tavşanlarda karotis lezyonunda makrofaj birikimini azaltmıştır. Fluvastatin ile tedavi, hiperkolesterolemik sıçanların postkapiller venüllerinde trombosit aktive edici faktöre ve lökotrien B₄'e karşı lökosit-endotelial hücre adezyon yanıtlarını önemli ölçüde azaltmıştır. Fluvastatinin insan vasküler düz kas hücrelerinde *in vitro* olarak IL-6'yı azalttığı ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Asberg ve Holdaas 2004).

Toplam 36 hasta ile günde 40 mg fluvastatin uygulanarak gerçekleştirilen plasebo kontrollü randomize çalışmada, 6. ay sonunda brakıyel arter endotel fonksiyonunun fluvastatin grubunda plaseboya kıyasla anlamlı derecede daha iyi olduğu ve bu etkinin 3 yıl boyunca korunduğu bildirilmiştir (Kosch ve ark. 2003). Fluvastatinin hiperlipidemili hastalarda mikrosirkülasyonu iyileştirdiği (Haak ve ark. 2001) ve koroner arter hastalığı olan hastalarda miyokardiyal kan akışı üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Eichstädt ve ark. 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fluvastatinin insan vasküler düz kas hücrelerinde IL-8 üretimini (Ito ve ark. 2002) ve C-reaktif protein ile uyarılmış insan endotel hücrelerinde TNF- α üretimini (Wang, Li ve ark. 2005) inhibe ettiği bildirilmiştir. Samson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fluvastatinin alerjik astımlı hastalardan alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde Th2 ile ilişkili kemokin TARC ve Th1 ile ilişkili kemokin IP-10 üretimini baskıladığını gösterilmiştir (Samson ve ark. 2006).

Qi ve ark. 2009 tarafından yapılan çalışmada farklı statinlerin (atorvastatin, fluvastatin ve simvastatin) HaCaT hücrelerinde IFN- γ ile indüklenen MDC ekspresyonunu inhibe edip edemediği incelenmiştir. Sadece fluvastatinin p38 MAPK yolu yoluyla NF-kB aktivasyonunu inhibe ederek HaCaT hücrelerinde Th2 tip kemokin olan MDC/CCL22 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylece Th2 hücrelerinin deri lezyonlarına infiltrasyonunu baskılayarak atopik dermatit gibi hastalıklarda görülen deri iltihabını azaltacağı düşünülmektedir (Qi ve ark. 2009).

Nyambuya ve arkadaşları fluvastatinin kompleman bozunma hızlandırıcı faktör (DAF/CD55) antijeninin ekspresyonu üzerindeki etkilerini ve hiperkolesterolemide dolaşımdaki T hücrelerindeki transkripsiyon faktörlerinin seviyelerini incelemiştir. T-hücreleri, aterosklerozdaki inflamatuvar yanıtları düzenler ve işlevleri lipoprotein ortamı ve kompleman aktivitesi tarafından değiştirilir. Hiperkolesterolemik durum dolaşımdaki T-hücrelerinde DAF ekspresyonunun artması, nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve interferon düzenleyici faktör 4 (IRF4)'nin seviyelerindeki artış ile ilişkilidir. Fluvastatinin kolesterol metabolizmasını düzenleme etkisine ek olarak pleotropik kardiyoprotektif etkileri, kısmen T-hücre yanıtlarına aracılık etme ve kompleman aktivitesini düzenleme yeteneğine atfedilmiştir (Nyambuya ve ark. 2021).

Çok sayıda ve çeşitli kanser türün ortak özelliği mevalonat yolağında görülen düzensizliktir. Kardiyovasküler hastalıklarda lipit düzeylerini düşürmek için geleneksel olarak uygulanan statinlerin, daha sonraları antikanser aktivitelere sahip olduğu keşfedilmiştir. Statinler, Rho, Ras ve Rac gibi önemli sinyal proteinlerini düzenleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve canlılığını etkiler. Son zamanlarda birkaç çalışma simvastatin, fluvastatin ve lovastatinin antineoplastik ajanlarla kombinasyon halinde verilerek, tedavi gören kanserli hastaların hayatta kalma süresini artıran farklı yollarda rol oynadığını göstermiştir (Di Bello ve ark. 2020). Fluvastatinin çoklu kanser gelişimini ve metastazını inhibe ettiği bildirilmiştir (Chai ve Zhao 2021).

Garwood ve ark. tarafından yapılan çalışmada kısa süreli fluvastatin maruziyetinin in situ ve invaziv meme kanseri üzerindeki biyolojik etkileri doku, kan ve görüntüleme tabanlı biyomarkırlar aracılığıyla belirlenmiştir. Fluvastatinin tümör proliferasyonunu azaltarak ve apoptotik aktiviteyi arttırarak ölçülebilir biyolojik değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar statinlerin etki mekanizmaları, preklinik deneyler ve bazı epidemiyolojik çalışmaların sonuçların ile uyumlu bulunmuştur (Garwood ve ark. 2010) Yakın tarihli bir çalışmada fluvastatinin tüysüz farelerde akciğer adnokarnnomunun kemik metastazını etkili bir şekilde önleyebileceği gösterilmiştir (Yang ve ark. 2017). Chai ve Zhao tarafından yapılan çalışmada ise fluvastatinin SIRT6 ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu baskıladığı ve endometriyal kanser hücrelerinin apoptozunu desteklediği kanıtlanmıştır (Chai ve Zhao 2021).

2.4.4. Psoriasis Tedavisindeki Yeri

Psoriasisste immun-inflamatuvar mekanizmaların önemli rol oynadığı ve kemokinlerin ve reseptörlerin psoriasis ile olan ilişkisi bilinmektedir. CC kemokin ligandı 20 (CCL20), 19-kemokin ailesinin yeni üyesi ve esas olarak karaciğer, akciğer, lenf nodu ve periferik kan hücrelerinde eksprese edilen CC kemokin reseptörü 6' nın (CCR6) tek ligandıdır (Yan ve Jiawen 2004). CCR6 ilk olarak T hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler üzerinde keşfedilmiştir. CCR6'nın Th17 sinyal yolunda ve psoriasis gelişiminde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Hedrick ve ark. 2010). Deri dokusunda, CCL20' nin ana kaynakları keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri ve dendritik hücreleridir (Yan ve Jiawen 2004). CCL20, normal insan

derisinde epidermal keratinositler ve endotelial hücreler tarafından yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, keratinositlerde ve endotel hücrelerinde CCL20 üretimi, TNF- α , IL1, IL17 ve INF- γ gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından kuvvetle artırılır. Psoriatik cilt lezyonlarında, CCL20 epidermin suprabazal tabakasında yüksek oranda eksprese edilir (Mabuchi ve ark. 2012).

Dermal dentritik hücreler büyük miktarlarda TNF- α ve IL-23 üretir ve IL-17A üreten yardımcı T (Th17) hücrelerinin farklılaşmasını indükler. IL-17A keratinosit proliferasyonunu indüklerken farklılaşmasını inhibe eder. IL-17A keratinositlerin nötrofil çeken sitokin/kemokinler olan IL-36, CXCL1, CXCL2 ve CXCL8 (IL-8) üretimini artırır. IL-17A keratinosit proliferasyonunu artırır ve CCL20 üretimi için keratinositleri uyarır. Th17 hücreleri de ayrıca CCL20 üretebilir. Ayrıca Th17 hücreleri yüksek miktarda TNF- α üretir. Böylece TNF- α /IL-23/IL-17A eksenini bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve sonunda tam teşekküllü psoriasis gelişmesine neden olur. CCL20/CCR6 kemotaktik sistemi TNF- α /IL-23/IL-17A ekseninin sürdürülmesinde ve psoriasis patogeneğinde kritik rol oynar. CCL20/CCR6 eksenini psoriasis tedavisi için umut verici bir hedef olabilir (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). IL-17 sinyal yolağı inhibitörleri ile orta-şiddetli psoriasis olan hasta grubunda gerçekleştirilen erken klinik deneylerde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kirkham ve ark. 2014).

Statinler, lipid düşürücü etkilerine ek olarak, psoriasis de dahil olmak üzere çeşitli otoimmün hastalıklarda yararlı olabilecek anti-inflamatuvar ve immünomodülatör aktivitelere sahiptir. Statinler lökosit aktivasyonu, lökositlerin inflamatuvar bölgelere göçü ve immünolojik sitotoksite için gerekli olan lökositler ve endotelial hücreler üzerindeki LFA-1 ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini azaltır. Statinler MHC II moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek lökosit aktivasyonunu daha da azaltır. Statinler ayrıca Th-1 hücreleri üzerindeki kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu engeller, bu da onların inflamatuvar bölgelere göç etme yeteneklerine müdahale eder. Ek olarak statinler NO sentaz üretimini ve makrofajlar tarafından TNF- α , INF- γ ve IL-17A gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin üretimini bloke eder (Rajpara ve ark. 2010).

Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmada statinlerin CCL20/CCR6 etkileşimi üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Statinlerin (fluvastatin, simvastatin ve pravastatin) uyarılmış HaCaT hücrelerinde CCL20 üretimini inhibe edip etmediği ve

CCL20'ye yanıt olarak CD4⁺ T hücrelerinin kemotaktik göçünü azaltıp azaltmayacağı incelenmiştir. Öncelikle hücrelerin uyarılması IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-22 ve IFN- γ gibi sitokinler varlığında incelenmiş ve CCL20 proteini seviyeleri ölçülmüştür. IL-1 β , TNF- α ve IL-17A'nın CCL20 protein üretimini önemli derecede indüklediği gösterilmiştir. Daha sonra statinlerin bu sitokinler ile uyarılmış hücrelerdeki CCL20 üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Fluvastatin ile simvastatin aktive HaCaT hücrelerinde CCL20 üretimini önemli derecede inhibe ederken pravastatin inhibitör etki göstermemiştir. Son olarak statinlerin CD4⁺ T hücrelerinin CCL20'ye doğru kemotaktik göçünü işlevsel olarak önleyip önleyemeyeceğini incelenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, hem fluvastatin hem de simvastatin ile tedavi, CCL20'ye verilen kemotaktik yanıtı inhibe ettiği ve fluvastatinin, simvastatinden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak kemotaksin pravastatin tarafından baskılanmadığı görülmüştür. Ayrıca statinler ile tedavinin CD4⁺ T hücre yüzeyindeki CCR6 yüzey ekspresyonu üzerine etkileri incelenmiş ve statinlerin bellek CD4⁺ T hücre üzerindeki CCR6 yüzey ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda fluvastatin'in psoriasis patogeneğinde önemli bir rol oynayan CCL20/CCR6 etkileşimini inhibe ettiği gösterilmiş ve psoriasis tedavisinde etkili bir tedavi yaklaşımı olabileceği sonucuna varılmıştır (Kim ve ark. 2011).

Galektin-7 β -galaktozid bağlayıcı proteinlerin galektin ailesine ait 15 kDa ağırlığında bir proteindir. Epidermal keratinositlerde yüksek oranda eksprese edilir ve tümör baskılayıcı p53 tarafından indüklenir (Chen ve ark. 2016). Normal yetişkin insan derisinde, galektin-7, proliferatif (esas olarak bazal) veya farklılaşmış (esas olarak suprabazal) bölümlerde herhangi bir belirgin yoğunluk farkı olmaksızın epidermin derinliği boyunca dağılmıştır (Saussez ve Kiss 2006). Cilt yaralanması sonrası deri homeostazına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Galektin-7'nin JNK1-miR-203-p63 yoluyla aracılığıyla keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasının düzenlenlediği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2016).

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada psoriasisli hastaların deri lezyonlarında galektin-7 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. İnsan primer keratinosit hücreleri (HEKn) ve immortal insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ile yapılan çalışmada psoriatik lezyonların gelişiminde önemli rol oynayan iki sitokin olan IL-17A ve TNF- α 'nın galektin-7 ekspresyonunun baskıladığı bildirilmiştir. Galektin-7 gen susturma işlemi uygulanmış hücreler IL-17A ile uyarıldığında IL-6 ve IL-8 üretimi

ve ERK sinyali artmıştır. Galektin-7 mikroRNA-146a/ERK yolağı yoluyla keratinositler tarafından IL-17A indüklü inflamatuvar mediyatör üretimini azaltmıştır. Ayrıca, galektin-7 eksikliği olan farelerde, intradermal IL-23 enjeksiyonuna yanıt olarak gelişmiş epidermal hiperplazi ve cilt iltihabı görülmüştür. Galektin-7 ekspresyonunu indükleyebilen onaylanmış ilaçların mikrodizi veritabanlarını incelenmiş ve 4 bileşik metilprednizolon, tobramisin, fluvastatin ve pempidin tanımlanmıştır. HaCaT hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda öngörülen ilaçlar arasında sadece fluvastatinin galektin-7, mRNA ve protein ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Daha sonra diğer statin grubu bileşiklerin etkisi incelenmiş atorvastatin, cerivastatin, pitavastatin, mevastatin ve simvastatin'in hem HaCaT hem de HEK293T hücrelerinde galektin-7 ekspresyonunu arttırdığı ve en az artışın pravastatin ile elde edildiği bildirilmiştir. Galektin-7 indükleyicisi olduğu tanımlanan fluvastatin'in bu etkisi, IL-17A tarafından uyarılmış keratinositlerde IL-6 ve IL-8 üretimini azalttığı gösterilerek doğrulanmıştır. Ayrıca fluvastatinin, galektin-7 ekspresyonunu baskılayan sitokinlerin (TNF- α ve IL-17A) varlığında bile, galektin-7 ekspresyonunu bazal seviyelerin üzerinde arttırdığı bildirilmiştir. Fareler ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada fluvastatin, IL-23'ün neden olduğu kulak derisi kalınlaşmasını ve epidermal hiperplaziyi hafifletmiştir. HaCaT hücreleri ile yapılan çalışmada galektin-7 ekspresyonundaki düşük artma ile tutarlı olacak şekilde *in vivo* çalışmada cilt kalınlaşması üzerine etkisi oldukça düşük bulunmuştur. Fluvastatin'in kulak kalınlaşması üzerine etkisinin galektin-7 ile ilişkili olup olmadığı galektin-7 eksikliği olan (galektin-7 knockdown) fareler kullanılarak test edilmiştir. Fluvastatin'in galektin-7 eksikliği olan farelerde kulak kalınlaşmasını baskılamada başarısız olduğu görülmüştür. Bu sonuç fluvastatin'in etkisinin galektin-7 ekspresyonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Fluvastatin, IL-17A ve IL-23 ile indüklenen sitokin üretimini ve epidermal hiperplaziyi baskılayabilen güçlü bir galektin-7 indükleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada hem epidermal hiperplazi hem de keratinosit aracılı inflamatuvar yanıtlarda psoriasis patogenezinde galektin-7'nin rolünü doğrulanmış ve psoriasis tedavisinde statin (fluvastatin) kullanımının yararlı olabileceği yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Chen ve ark. 2021).

2.5. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemler Hakkında Bilgiler

2.5.1. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Yapısı ve Özellikleri

Veziküler taşıyıcılar fosfolipitler gibi amfifilik lipidler veya non iyonik sürfaktanlar sürfaktanlar kullanılarak hazırlanan sistemlerdir. Literatürde birkaç veziküler sistem tanımlanmıştır. Bileşenlerine bağlı olarak deforme olmayan (lipozom, emülzom, niozom, serozom, vd) ve deforme olabilen (transferzom, etozom, transetozom ve penetrasyon arttırıcı veziküller) sistemler olarak sınıflandırılırlar (El-Zaafarany ve Nasr 2021).

Yenilikli taşıyıcı sistemlerin topikal uygulanması cilt kanseri ve diğer deri hastalıkları için önemli bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Fosfolipit içeren veziküler sistemlerin topikal ve transdermal uygulamalar açısından dikkat çekici olmalarının nedenleri arasında biyolojik bakımdan parçalanabilir olmaları, amfifilik karakterleri ve ilaç serbestleşmesini modifiye edebilmeleri başta gelmektedir. Bu sistemlerin etkinliği; bileşimleri, büyüklükleri, yükleri, çifte tabaka sayıları gibi fizyolojik özellikleri ve uygulama koşulları ile ilişkilidir Ancak *stratum corneum* ilaç geçişi için önemli bir engeldir. İlaçların *stratum corneum* bariyerini aşarak deri yoluyla etkili bir şekilde verilebilmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Mezei ve ark. 1980; Choi ve Maibach 2005; Sabitha ve ark. 2013).

Konvansiyonel lipozomlar ilaçların deriden permeasyon oranlarını artırmak için kullanılan ilk nanotaşıyıcılardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ile lipozomların ilacı *stratum corneumun* ötesine taşıyamadıkları gösterilmiştir (Menezes ve ark. 2016; Palmer ve Delouise 2016). Lipozomların esnek bir yapıya sahip olmaması derinin üst tabakalarında birikmesine sebep olur ve daha derin tabakalarına penetre olmasını engeler (Verma ve ark. 2003; Manosroi ve ark. 2008). Bu nedenle etkin topikal tedavi sağlayamamaktadır. Lipozomların bu özelliği, uygulamalarını dünya genelinde çok sınırlı hale getirmektedir Bununla birlikte bu veziküler sistemler daha derin tabakalara ilaç taşınmasını arttırmak amacıyla sürfaktan veya etanol gibi penetrasyon arttırıcılar kullanılarak modifiye edilmiştir (Akhtar 2014). Cevc ve arkadaşları tarafından deforme olabilen lipozomların keşfi ile lipozomların katı membran yapısı ile ilgili sorun çözülmüştür (Cevc ve Blume 1992). Kenar aktivatörlerinin varlığı lipid çifte tabakayı destabilize ederek vezikülleri daha esnek hale getirir. Bu ilacın derinin daha derin tabakalarına penetre olmasını sağlayacaktır (Cevc 1996; El Maghraby et al., 2004; Ahad

ve ark. 2012). Deforme olabilen lipozomların ardından Touitou ve ark. tarafından etozom olarak adlandırılan elastik veziküler sistemler geliştirilmiştir (Touitou ve ark. 2000).

2.5.2. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri

Veziküler ilaç taşıyıcı sistemler çeşitli tekniklerle hazırlanabilir. İlacın sisteme yüklemesi, aktif ve pasif olmak üzere iki farklı yöntem ile gerçekleştirilebilir. Aktif ilaç yükleme teknikleri lipit-ilac etkileşimlerine dayanır ve ilaç lipozomal sistem oluştuktan sonra yüklenir. Aktif yükleme ile yüksek ilaç yükleme etkinliği elde edilebilir. Pasif yükleme prosedüründe ilaç yükleme ve vezikül oluşumu eş zamanlı meydana gelir. Pasif ilaç yükleme işlemi farklı teknikler ile gerçekleştirilebilir (Mishra ve ark. 2019; Tran ve ark. 2019; Pauli ve ark. 2019).

Veziküler sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler ince film hidrasyon yöntemi, ters fazlı buharlaştırma yöntemi ve eter enjeksiyon yöntemidir. Transferzomların hazırlanmasında genelde ince film hidrasyon ve vorteksleme-sonikasyon yöntemleri kullanılırken, etozomal sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla; klasik soğuk yöntem, etanol enjeksiyon-sonikasyon, sıcak yöntem, ince film hidrasyon, ters-faz evaporasyon ve transmembran pH-gradyent yöntemleri kullanılmaktadır. Tüm yöntemler aşağıda sırasıyla anlatılmıştır (Kumar ve ark. 2012; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Seçilen yöntemden bağımsız olarak elde edilen veziküller büyüktür ve dermal penetrasyonun gerçekleşebilmesi için boyutların yaklaşık 200-400 nm'ye küçültülmeleri gerekir (Akhtar ve Pathak 2012; Kumari ve Pathak 2013). Boyut küçültme genellikle sonikasyon ve ekstrüzyon olmak üzere iki farklı yolla yapılır. Ekstrüzyon işlemi klasik lipozom ekstrüderlerinde ve istenilen boyutta (yaklaşık 200-400 nm) bir polikarbonat membrandan belirli sayıda geçiş uygulayarak gerçekleştir ve küçük tek katmanlı (tabakalı) veziküller elde edilir. Sonikasyon veziküllerin parçalanmasına yol açacağı için dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir (Maestrelli ve ark. 2009).

2.5.2.1. Vorteksleme-Sonikasyon Yöntemi

Farklı oranlarda fosfolipit, ilaç ve kenar aktivatörü bir beher içine alınır ve etanolde çözündürülür. Bu karışıma su veya fosfat tamponu sürekli vorteks ile çalkalanarak ilave edilir ve bulanık görümlü veziküler süspansiyon elde edilir.

Lipozom ve transferzom hazırlamak ise lipit faz direk su veya fosfat tamponuna eklenir. Hazırlanan veziküler süspanسیون daha küçük boyutlu veziküller elde edilebilmesi için sonikasyon ya da ekstrüzyon işlemi uygulanır (El Zaafarany ve ark. 2010; Akram ve ark. 2021).

2.5.2.2. Eter Enjeksiyon Yöntemi

Veziküler sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Organik solvent içindeki lipit faz sulu faza ince bir iğne yardımıyla 55°C ila 65°C'de veya indirgenmiş basınç altında kademeli olarak enjekte edilir. Bu yöntem ile yaklaşık 25-30 nm boyutunda küçük tek katmanlı veziküller elde edilir. Organik çözücü diyaliz veya jel filtrasyon yöntemi ile uzaklaştırılır. Bu yöntemin avantajı basit olması ve olası zararlı bir fiziksel işlemin olmamasıdır. En büyük dezavantajı ise sulu fazda kalıntı organik çözücü varlığıdır (Kaur ve ark. 2012; Akbarzadeh ve ark. 2013; Souto, Macedo ve ark. 2021).

2.5.2.3. Etanol Enjeksiyon-Sonikasyon Yöntemi

Bu yöntemde, etanol içinde çözünmüş fosfolipit, köşe aktivatörü ve ilaç içeren organik faz, sulu faza bir şırınga sistemi kullanılarak 200 µL/dk akış hızında enjekte edilir ve ardından 5 dakika boyunca ultrasonik prob ile homojenize edilir (Liu ve ark. 2011; Abdulbaqi ve ark. 2016).

2.5.2.4. Klasik Soğuk Yöntem

Etozomal sistemlerin hazırlanmasında kullanılan en basit ve yaygın yöntemdir. İlk kez 1996'da Tavitou tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde organik faz ve sulu faz ayrı ayrı hazırlanır. Organik faz fosfolipitlerin yanısıra sürfaktanlar ve penetrasyon artırıcılar gibi diğer bileşenlerin etanolde çözündürülmesi ile hazırlanır. Sulu faz olarak su, tampon veya izotonik çözelti kullanılabilir. Sulu faz ve organik faz sıcaklığı su banyosunda 30 °C'ye getirilir. Sulu faz, organik faza ince bir akışla damla damla ilave eklenir veya sabit bir hızda bir şırınga pompası kullanılarak eklenir. Karışım manyetik karıştırıcı kullanılarak ve 700-2000 rpm aralığında belirlenen sabit bir hızla, 5-30 dk boyunca karıştırılır. Etozomal sisteme dahil edilecek ilaç, fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak sulu fazda veya organik fazda çözülecektir. Yöntem gerekirse azot gazı altında uygulanabilmektedir. İstenirse etozomal formülasyonların vezikül boyutu

sonikasyon veya ekstrüzyon yöntemleri kullanılarak azaltılabilir (Verma ve Pathak 2010; Abdulbaqi ve ark. 2016).

2.5.2.5. Sıcak Yöntem

Etozomal sistemlerin hazırlanmasında kullanılan bu yöntem ilk kez etozomların mucidi Touitou ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk olarak fosfolipit su içinde dağıtılır ve kolloidal bir süspansiyon elde edilene kadar 40°C'de su banyosuna yerleştirilir. Başka bir kapta etanol 40 °C'ye ısıtılır ve manyetik veya mekanik karıştırıcı ile devamlı karıştırarak fosfolipit dipersiyonuna damla damla ilave edilir. İlaç hidrofilik/hidrofobik özelliklerine bağlı olarak organik veya sulu fazda çözülür. Hazırlanan vezikül süspansiyonunun boyutunu küçültmek için sonikasyon işlemi uygulanabilir (Verma ve Pathak 2010; Abdulbaqi ve ark. 2016).

2.5.2.6. İnce Film Hidratasyon Yöntemi

Konvansiyonel lipozom hazırlama yöntemidir. Ancak etozomal sistemlerin hazırlanmasında lipit film hidroetanolik çözelti ile hidrate edilir. İlk olarak fosfolipitler, penetrasyon arttırıcılar ve sürfaktanlar temiz ve kuru bir kapta kloroform veya kloroform metanol karışımında çözülür. Organik çözücüler lipit faz geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta, döner vakumlu evaporator kullanılarak uzaklaştırılır. Organik çözücü uzaklaştırıldığında şişenin iç çerperinde ince bir film oluşur. Lipit film gece boyunca vakum altında tutularak solvent kalıntıları uzaklaştırılır. Daha sonra bu lipit film tabakası su veya tampon çözeltileri ile, etazomal sistemler için ise etanol-su karışımı veya tampon-etanol karışımı ile hidrate edilir. Hidratasyon sırasında lipit film gerekli sıcaklığa getirilir ve fosfolipitin özelliğine bağlı olarak 30 dk, 1 saat veya 6 saat kadar döndürülür. İstenen boyutta veziküller elde edilebilmesi için istenirse sonikasyon veya ekstrüzyon işlemi uygulanabilir (Verma ve Pathak 2010; Song ve ark. 2012; Abdulbaqi ve ark. 2016; Akram ve ark. 2021).

2.5.2.7. Ters Faz Evaporasyon Yöntemi

En az kullanılan yöntemdir ve büyük tek katmanlı veziküller üretmek için özel olarak tasarlanmıştır. Fosfolipit ve köşe aktivatörü yuvarlak tabanlı organik solventte çözündürülür. Çözünürlük profiline bağlı olarak ilaç lipit faza veya sulu faza eklenir. Organik faz sulu faz ile 3:1 (v/v) oranında, ultrasonik banyoda 0 °C'de 5 dk boyunca karıştırılır. Elde edilen süspansiyon istenilen boyutta veziküller elde edilene kadar 35 dk

4 °C’de sonikasyon uygulanır. Organik çözücü vakum altında uzaklaştırılır (Abdulbaqi ve ark. 2016; Akram ve ark. 2021).

2.5.2.8. Transmembran-pH Gradiyent Yöntemi

Bahsedilen tüm yöntemlerde ilaç ya organik faza ya da sulu faza eklenir ve veziküler sisteme kendiğilinden veya pasif olarak yüklenir. Transmembran pH-gradiyent yönteminde ilaç etozomal sistemin asidik iç fazı ile bazik dış fazı arasındaki pH gradiyetine göre aktif olarak yüklenir. Bu yöntem ilk olarak lipozomların hazırlanmasında kullanılmıştır. Daha sonra ise Zhou ve ark. ve Fan ve ark. tarafından etozomal sistemlerin hazırlanmasında uygulanmıştır. Bu yöntem sadece protonlanabilen amin gruplarına sahip suda çözünen ilaçlar için uygundur. Bu yöntem temel olarak; boş etozomal sistemin hazırlanması, ilacın aktif yüklenmesi ve inkübasyon olmak üzere 3 aşamadan oluşur. İlk aşamada bahsedilen herhangi yöntem kullanılarak boş etozomal süspansiyon hazırlanır ve sulu faz olarak asidik tampon (genellikle pH 3 sitrat tamponu) kullanılır. İkinci aşama, ilacın boş etozomal süspansiyona aktif olarak yüklenmesini ve ardından sürekli karıştırmayı içerir. Dış fazı daha alkali hale getirmek ve etozomal sistemin asidik iç fazı ile bazik dış fazı arasında pH gradiyeti oluşturmak amacıyla genellikle 0,5 M sodyum hidroksit çözeltisi kullanılır ve dış faz pH 7.4'e ayarlanır. Üçüncü aşamada etozomal sistem belirli bir süre ve sıcaklıkta (30-60 °C) inkübe edilir. Noniyonize ilacın etozomal veziküllerin çifte tabakasının aktif olarak geçmesi ve iç faza yüklenmesi sağlanır. Bu yöntem kullanılarak etozomal sistemlerin hazırlanması ile ilgili sırasıyla, yüklenecek ilacın fizikokimyasal özellikleri, iç ve dış fazların pH'sı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi çeşitli faktörlerin dikkate alınması gerekir (Zhou ve ark. 2010; Fan ve ark. 2013; Abdulbaqi ve ark. 2016; Almeida ve ark. 2020).

2.5.3. Lipozomlar

Lipozomlar, farklı yapıda lipitlerin kullanılması ile hazırlanan, iç kompartımanda sulu faz bulunan, bir veya birden fazla lipit çifte tabaka ile çevrili küresel veziküllerdir. Lipozomlar Alec D Bangham tarafından 1960'larda keşfedilmiştir (Bozzuto ve Molinari 2015). Lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının en önemli nedenleri arasında farklı lipofiliteye sahip etkin maddeleri taşıyabilmeleri ve yapı olarak biyolojik membranlara benzerlik göstermeleri başta gelmektedir. Biyolojik bakımdan geçimli ve biyoparçalanabilir özellikte olan lipozomlar immunojenik ve toksik etki göstermezler. Deriye uygulandıklarında deri yüzeyine adsorbe

olabilmektedirler. *Stratum corneum* üst tabakasında birikerek ilaç deposu gibi etki gösterirler (Ascenso ve ark. 2015). Bununla birlikte konvansiyonel lipozomların deriden permeasyonlarının zayıf olması, daha çok *stratum corneum* un yüzeyinde ve üst kısımlarında birikmeleri, agregasyon ve veziküllerin füzyonu gibi nedenlerden dolayı günümüzde topikal/transdermal taşıyıcı sistemler olarak çok tercih edilmemektedirler (Celia ve ark. 2012; Gangwar ve ark. 2012).

Lipozomların *stratum corneum*'un üst kısımlarında ve foliküllerde birikme eğilimi ve daha derin dokulara minimum düzeyde penetre olmaları gerek büyüklüklerine gerekse esneklikten yoksun olmalarına bağlanmıştır. Vezikül bileşimlerinin modifiye edilmesine dayanan yeni yaklaşımlarla etkin maddeleri daha altta yer alan dokulara taşıyabilen sistemler olarak etozomlar, transferzomlar (ultradeforme olabilen lipit bazlı elastik veziküller) ve bu iki taşıyıcı sistemin avantajlarını bir arada barındıran transetozomlar tasarlanmıştır (Celia ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Verma ve Pathak 2010).

2.5.4. Ultradeforme Olabilen Veziküler Sistemler

Lipozomların kararsız yapıları ve dermal penetrasyonlarının düşük olması gibi sınırlamaların üstesinden gelebilmek için 1990'ların başlarında deforme olabilen veya elastik lipozomlar ve ultradeforme olabilen veziküller (UDV) olarak bilinen yeni lipit veziküller geliştirilmiştir. Ultradeforme olabilen veziküllerin klasik lipozoma göre daha iyi deforme olabilme özelliği göstermeleri sebebiyle sağlam deriden geçerek ilacın epidermis ve dermis tabakalarına ve hatta sistemik dolaşıma geçmesini sağlayabildikleri bildirilmiştir. Bu elastik veziküllerin hazırlanmasında fosfolipitler, etanol, safra tuzları ve birçok yüzey aktif madde kullanılmaktadır. Ultradeforme olabilen veziküller non toksik ve termodinamik olarak stabil formülasyonlardır. Pepitid ve proteinler de dahil olmak üzere birçok molekülün transdermal ve topikal taşınmasında kullanılmaktadır. Ayrıca üretimleri nispeten basit ve ölçek büyütme kolaydır. Şu anda hem farmasötikler hem de kozmetikler için başarıyla geliştirilmiş birçok UDV türü bulunmaktadır, bunlar arasında transferzomlar, etozomlar ve daha yakın zamanda transetozomlar yer alır (Ascenso ve ark. 2015).

2.5.4.1. Transferzomlar

Deforme olabilen veya elastik lipozom olarak da tanımlanan tranferzomlar ilk kez 1992'de Cevc ve Blume tarafından tanımlanmıştır. Transferzomlar olarak da

tanımlanan deforme olabilen lipozomlar fosfolipitlerin yanı sıra yüzey etkin maddeler (Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 60, Span 65, Span 80 dipotasyum gliserhizat, sodyum kolat veya sodyum deoksikolat) gibi bir kenar aktivatörü kullanılarak hazırlanmaktadır. Tek zincirli bir lipit ya da bir sürfaktan olabilen kenar aktivatörleri transferzomların lipit çifte tabakaları arasında bütünlüklerini koruyarak geçebilecek düzeyde esnek olmasını sağlar (Cevc ve Blume 1992; Gillet ve ark. 2011; Song ve ark. 2012).

Ultradeforme olabilen veziküllerin klasik lipozomlardan daha iyi deforme olabilmeleri sayesinde deriden geçebildikleri yönünde yaklaşımlar mevcuttur. Transferzomlar hidrotaksis ile deriden geçer. *Stratum corneum*un %15 su içeriğine sahip üst kısmında dehidratasyonla deformasyona uğrar, su kaybederek boyutunda küçülme olur ve interselüler boşluklardan geçebilir boyuta ulaşır. *Stratum corneum* un %75 su içeriğine sahip alt kısımlarına geldiğinde ise rehidratasyonla tekrar eski boyutuna kavuşur. Transferzomların deriden intraselüler geçişi ise transferzomun yapısındaki sürfaktanın hücre membranının yapısını bozmasıyla ilgilidir (Cevc ve Blumeg 2001; Kumar ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015).

2.5.4.2. Etozomlar

Etozomlar ilk kez 1997’de Touitou ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Klasik etozomlar fosfolipitler, yüksek konsantrasyonda etanol (%20-45) ve sudan oluşan noninvaziv taşıyıcılardır. Etozomların yapısında bulunan yüksek orandaki etanol bu sistemlerin konvansiyonel lipozomlara oranla daha elastik yapıda olmalarını sağlar (Touitou ve ark. 2000; Pradhan ve ark. 2013; Abdulbaqi ve ark. 2016; Verma ve Pathak 2010). Daha düşük vezikül boyutu ve negatif zeta potansiyele sahip olmaları yanı sıra ilaç yükleme etkinliğinin daha yüksek olması nedeniyle transdermal ilaç taşınmasında konvansiyonel lipozomlardan daha üstün oldukları gösterilmiştir. Etozomal sistemler konvansiyonel lipozomlara oranla daha iyi permeasyon ve stabilite profili göstermiştir (Jain ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016). Etanol negatif yüzey yükü sağladığından veziküllerin stabilitesine de yardımcı olmakta ve agregasyonu önlemektedir. Ayrıca etozomlar, *stratum corneum* lipit moleküllerinin polar baş grupları ile etkileşerek lipitlerin erime derecesini düşürür ve lipit tabakanın akışkanlığını arttırırlar. İçerdikleri yüksek orandaki etanol etozomların deri lipit çifte tabakanın yapısını bozarak etki

göstermesini ve *stratum corneum* kolayca penetre olabildiğini sağlar (Verma ve Pathak 2010; Pradhan ve ark. 2013).

2.5.4.3. Transetozomlar

Transetozomlar ilk defa 2012’de Song ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Etozom ve transferzomların konvansiyonel lipozomlara göre en önemli üstünlükleri derideki ilaçların lokalizasyonunu arttırmalarıdır. Transferzomlar deriden geçişte oldukça başarılı olmalarına rağmen, özellikle lipofilik etkin maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkili bir tedavi sağlanabilmesi için içerdikleri etanol miktarı artırılarak, yüksek oranda etanol içeren transetozomlar geliştirilmiştir (Celia ve ark. 2012; Song ve ark. 2012). Transetozomlar klasik etozomların ve transferzomların avantajlarını bir araya getiren yeni jenerasyon etozomal sistemlerdir. Bu sistemler klasik etozomlarda yer alan temel bileşenlere ek olarak bir köşe aktivatörü veya penetrasyon artırıcı içerirler (Abdulbaqi ve ark. 2016; Sawant ve Khan 2017; Song ve ark. 2012). Klasik etozomlara göre üstün oldukları birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Garg, Singh, Singh ve ark. 2017). Yapılan çalışmalarda transetozomların düzensiz küresel şekle sahip olduğu ve daha yüksek permeasyon/penetrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu durumun transetozomların etanol ve kenar aktivatörü kombinasyonuna bağlı olarak veziküllerin lipit çifte tabakada bir yeniden düzenlenmeye sebep olması nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (Ascenso ve ark. 2015).

2.6. Lipit Nanopartiküller Hakkında Bilgiler

2.6.1. Lipit Nanopartiküllerin Yapısı ve Özellikleri

Katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) sürfaktan tabakası ile stabilize edilmiş trigliserit veya yağ asitleri içeren katı lipit çekirdekten oluşan lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerdir. SLN’ler birinci nesil nanopartiküller olarak ilişkilendirilirken NLC’ler SLN’lerdeki eksikliklerin üstesinden gelebilmek için geliştirilmiş ikinci nesil lipit nanopartiküllerdir (Müller ve ark. 2002a; Jain ve ark. 2017). Lipit nanopartiküller boyutları tipik olarak 40-1000 nm arasında değişen küresel morfolojiye sahip kolloidal taşıyıcılardır (Naseri ve ark. 2015; Montenegro ve ark. 2016).

Lipit nanopartiküllerin tarihi 1990 yılında, M. R. Gasco'nun Turin/İtalya'daki ve Almanyadan R. H. Müller'in Berlin ve J. S. Lucks'ın Kiel'deki akademik laboratuvarlarında paralel olarak gerçekleştirilen ilk deneylerle başlamıştır. Ancak farklı üretim yöntemleri kullanılmıştır. Gasco ve ekibi bu yeni taşıyıcı sistemin üretimini mikroemülsiyon yöntemi ile Müller ve ekibi ise yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile gerçekleştirmiştir. Bu taşıyıcılar nanoemülsiyona benzer yapı göstermekle birlikte farklı olarak katı lipit matriks içermektedir. Bu nedenle katı lipit nanopartikül olarak isimlendirilmiştir (Müller ve ark. 2011; Montenegro ve ark. 2016). SLN'ler diğer nanobuyutlu taşıyıcı sistemlerin avantajlarını bir arada içerirken bu taşıyıcı sistemlere ait problemleri en aza indirerek kısa sürede tüm dünyadaki araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Puglia ve Bonina 2012; Montenegro ve ark. 2016).

İlerleyen zamanlarda SLN'lerde görülen potansiyel zorlukların üstesinden gelebilmek için lipit nanopartiküllerin ikinci versiyonu olan nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) 1999 yılında geliştirilmiştir (Pardeike ve ark. 2009; Müller ve ark. 2011; Montenegro ve ark. 2016). SLN'ler katı lipitler veya katı lipit karışımlarından oluşurken, NLC'ler katı ve sıvı lipit karışımlarından oluşan katı bir lipit çekirdek ile karakterize edilir. SLN'ler ile karşılaştırıldığında NLC'ler, bir dizi aktif bileşen için daha yüksek etkin madde yükleme kapasitesi, daha düşük su içeriğine sahip dispersiyonlarının hazırlanabilmesi, saklama sırasında meydana gelebilecek polimerik geçişler sebebiyle etkin madenin formülasyondan sızmasının önlenmesi veya en az indirilmesi gibi üstünlüklere sahiptir (Müller ve ark. 2002a; Pardeike ve ark. 2009; Weber ve ark. 2014; Ferreira ve ark. 2021).

Lipit taşıyıcıların diğer geleneksel ilaç taşıyıcılarına göre başlıca avantajları, yüksek biyoyumluluk, düşük sitotoksikite, ucuz hammadde nedeniyle maliyetinin düşük olması, büyük ölçekli üretimlerinin mümkün olması, kontrollü ilaç salımı, etkin madde stabilitesini arttırması, organik çözücü içermeyen hazırlama yöntemleri ile hazırlanabilmesi ve farklı uygulama yolları (oral, dermal, intravenöz vb.) ile verilebilmesi şeklinde sıralabilir (Puglia ve Bonina 2012; Weber ve ark. 2014; Montenegro ve ark. 2016; Pardeike ve ark. 2019).

2.6.2. Lipit Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri

SLN ve NLC'lerin hazırlanması için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Genel olarak tüm yöntemler etkilidir ve yüklenecek bileşiğe ve nihai uygulama veya uygulama

yoluna göre seçilir. Lipit nanopartiküller; yüksek basınçlı homojenizasyon, solvent emülsifikasyon/evaporasyon, süperkritik sıvı, mikroemülsiyon, yüksek devirli (hızlı) homojenizasyon ve/veya ultrasonikasyon ve püskürterek kurutma gibi yöntemler kullanılarak hazırlanabilir (Naseri ve ark. 2015; Montenegro ve ark. 2016; Jain ve ark. 2017; Borges ve ark. 2020).

2.6.2.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi SLN ve NLC'lerin hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemdir (Montenegro ve ark. 2016; Borges ve ark. 2020; Ferreira ve ark. 2021). Bu yöntem yüksek devirli homojenizasyon veya ultrasonikasyon yöntemlerine göre daha iyi submikron partiküller içeren SLN'lerin elde edilmesinde etkili ve güvenilir bir teknik olarak kabul edilir. Bu yöntem ile laboratuvar ölçekli üretimden büyük ölçekli üretime geçiş kolaydır. Ayrıca organik solvent kullanılmaması, nanonoyutta üretime izin vermesi, uygun fiyatlı çok sayıda marka ve modellerde homojenizatör bulunması gibi avantajları bu yöntemin endüstride uygulanabilen yaygın bir teknik olmasını sağlamıştır (Jain ve ark. 2017; Souto ve ark. 2020).

Bu teknik, örneğin yüksek basınç ile dar bir boşluktan itilerek yüksek kesme ve kavitasyon gücü sayesinde mikron altı aralığa inmesini sağlar. Bu yöntemde partikül dispersiyonu, dar bir boşluktan (birkaç mikrometre) yüksek basınçla (100-2000 bar) sürülür ve çok kısa bir mesafede çok yüksek bir hızla (1000 km/saatın üzerinde) hızlandırılır. Kayma gerilmeleri ve çok yüksek kavitasyon kuvvetleri partikülleri parçalayarak nanoboyuta ulaşmalarını sağlar (Souto ve ark. 2020; Ferreira ve ark. 2021).

Bu yöntem sıcak ve soğuk homojenizasyon olarak ikiye ayrılır. Her iki teknik de hem ucuz hem de basittir. Yüksek sıcaklık ile gerçekleştirilen yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ısıya duyarlı ilaçların degradasyonuna neden olabilir. Ayrıca yüksek sıcaklık nedeniyle hidrofilik bileşenler lipit fazda sulu faza geçebilir. Yüksek enerji yoğunluğu gerektiren bir süreç olması nedeniyle numunelerin sıcaklığını artırır. Isıya duyarlı bileşikler için uygun değildir. Soğuk teknik ise özellikle ısıya duyarlı bileşikler içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında tercih edilir (Fang ve ark. 2013; Montenegro ve ark. 2016; Borges ve ark. 2020; Souto ve ark. 2020).

Sıcak Homojenizasyon

Sıcak homojenizasyon lipitlerin erime derecelerinin üzerinde bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. İlk olarak lipit faz ve sulu faz ayrı ayrı hazırlanır. Lipit faz katı lipit veya katı lipit ve sıvı lipit karışımı ile lipofilik emülgatör içerir. Sulu faz ise distile su ve hidrofilik emülgatör karışımından oluşur (Fang ve ark. 2013). Her iki faz ayrı ayrı belirli bir süre boyunca lipit erime derecesinin 5-10 °C üzerine ısıtılır ve yüksek hızlı karıştırma (örneğin ultra-turrax) yöntemi ile ön emülsiyonu hazırlanır. Ardından sıcak ön-emülsiyon kontrollü sıcaklıkta yüksek basınçta homojenize edilir. Homojenizasyon döngüsü sayısı emülsiyonun lipit konsantrasyonuna bağlıdır. Hem SLN hem de NLC'ler için, %5-10 aralığında lipit konsantrasyonuna sahip ön-emülsiyonlar kullanılarak 250-300 nm aralığında parçacık boyutuna sahip bir sıcak emülsiyon üretmek için tek bir homojenizasyon döngüsü yeterlidir. Homojenizasyon döngü sayısının artırılması, partiküllerin kinetik enerjisini arttığı ve koalesansa sebep olduğu için, genellikle parçacık boyutunun artmasıyla sonuçlanır. Son olarak, elde edilen nanoemülsiyon oda sıcaklığına soğutulur ve yeniden kristalleşerek SLN ve NLC'yi oluşturur. Dispersiyon oda sıcaklığının yanı sıra bileşimine bağlı olarak buzdolabında ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda soğutularak kristalleştirme gerçekleştirilebilir (Shidhaye ve ark. 2008; Souto ve ark. 2020).

Soğuk Homojenizasyon

Nanopartiküller soğuk homojenizasyon tekniği ile de hazırlanabilir. Soğuk homojenizasyon yönteminde ilaç içeren lipit eriyik karışımı sıvı nitrojen veya kuru buz ile soğutularak hızla katı hale gelir. Bu hızlı soğuma aktif bileşenin lipit faz içinde homojen dağılmasını sağlar. Oluşan katı toz, mikropartiküllere öğütülür ve mikropartiküller pre-süspansiyon oluşturmak için soğuk sürfaktan çözeltisinde disperse edilir. Dispersiyon lipit nanoparçacıklarını oluşumu için oda sıcaklığında veya altında, genellikle 500 bar'da ve beş döngü boyunca homojenizatörden geçirilir. Bu proses lipitlerin erimesini önleyerek hidrofilik ilaçların sulu faza geçmesini en aza indirir. Ancak partikül boyutu, sıcak işlem yapılmaması nedeniyle nano boyut aralığına ulaşamayabilir, daha büyük ve daha polidispers partiküller meydana gelir (Shidhaye ve ark. 2008; Souto ve ark. 2020).

Soğuk homojenizasyon tekniği sıcak teknikte görülen problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Bu yöntem yüksek sıcaklığa duyarlı ve hidrofilik ilaçlar için

tavsiye edilir. Ayrıca kolesterol gibi 100°C'nin üzerinde bir erime sıcaklığına sahip lipit matris malzemesinin işlenmesine de izin verir. Ancak yöntemin başlangıç aşamasında aktif bileşen eritilmiş lipit fazda çözündürülmelidir. Bu nedenle termal maruziyeti en aza indirmesine rağmen tamamen engelleyemez. Bu tekniğin diğer önemli dezavantajı ise yüksek enerji gerektirmesidir (Shidhaye ve ark. 2008; Souto ve ark. 2020).

2.6.2.2. Solvent Emülsifikasyon/ Evaporasyon Yöntemi

Genel olarak, nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan en basit yöntemlerden biridir ve daha ayrıntılı bir optimizasyon gerektirmez. Bu yöntemde lipit matris suyla karışmayan bir organik çözücü içinde çözülür ve sulu faz ile emülsifiye edilir. Solvent düşük basınç altında buharlaştırılır ve sulu faz içinde lipit matris çökerek nanopartikül dispersiyonu oluşumu sağlanır (Montenegro ve ark. 2016; Borges ve ark. 2020; Souto ve ark. 2020). Lipitin organik çözücü içinde iyi çözünmesi sebebiyle küçük partikül boyutları elde edilebilir. Kullanılan bileşenlerin özelliklerine de dayalı olarak 100 nm'ye kadar partikül boyutunun elde edilebildiği ısı uygulanmayan bir tekniktir. Özellikle yüksek sıcaklıkta bozulan maddeler için uygundur. Termal stres veya ısının olmaması yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemine karşı önemli bir avantaj olarak kabul edilir. Diğer önemli avantajı ise basit bir yöntem olmasıdır. Ancak bazı durumlarda biyomoleküller işlem sırasında zarar görebilir. Ayrıca organik solvent kullanımı bu yöntemin en önemli dezavantajıdır (Borges ve ark. 2020; Souto ve ark. 2020).

2.6.2.3. Mikroemülsiyon Yöntemi

Bu yöntem ilk kez Gasco ve arkadaşları (1997) tarafından kullanılmıştır. Mikroemülsiyonlar tipik olarak doymamış yağ asitleri, sürfaktanlar, kosürfaktanlar ve su içerir. Bu yöntemde ilk olarak lipit veya lipit karışımı eritilir ve yüzey aktif madde içeren sulu faz aynı sıcaklığa ısıtılır. Sulu faz lipit faza karıştırma işlemi uygulanarak eklenir ve mikroemülsiyon elde edilir. Oluşan mikroemülsiyon soğuk su (2-10 °C) içinde karıştırarak dağıtılır ve bu da lipit nanopartiküllerin katılaşması ile sonuçlanır (Souto ve ark. 2020; Ferreira ve ark. 2021).

Mekanik strese duyarlı bileşiklerin enkapsülasyonunda en uygun yöntemlerden biridir. Lipit nanopartiküllerin mikroemülsiyon tekniği ile büyük ölçekli üretimi ilaç endüstrisi için uygun görünmektedir. Bununla birlikte elde edilen ürünler genellikle değişime çok duyarlıdır. Sürfaktan konsantrasyonunun yüksek olması ve düşük partikül

konsantrasyonuna sahip dilüe nanopartikül süspansiyonlarının elde edilmesi en önemli dezavantajlarıdır. Bu durumda bazen ürünün ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon yoluyla konsantre edilmesi gerekebilir (Fang ve ark. 2013; Borges ve ark. 2020; Souto ve ark. 2020).

2.6.2.4. Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi

Bu yöntemde homojenizasyon lipitlerin erime derecelerinin üzerinde bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Lipit faz ve sulu faz ayrı ayrı hazırlanır. Lipit fazı lipofilik sürfaktanların yanı sıra katı lipit veya katı lipit sıvı lipit karışımlarından oluşurken, sulu faz distile su ve hidrofilik sürfaktanları içerir. Her iki faz da belirlenen süre boyunca yüksek bir sıcaklığa ayrı ayrı ısıtılır. Sulu faz lipit faza eklenir ve karıştırılır. Karışım yüksek devirli homojenizatör ile homojenize edilir. Daha küçük ve daha dar boyut dağılımı elde edebilmek için bazı durumlarda karışıma su banyosu veya prob-tipi sonikatör kullanılarak sonikasyon işlemi uygulanabilir. Az sayıda reaktif ve ekipman gerektiren basit ve hızlı bir yöntemdir. En önemli dezavantajı özellikle hidrofilik moleküller için düşük lipit çözünürlüğü ve sonuç olarak daha büyük partikül boyutları elde edilmesidir (Fang ve ark. 2013; Borges ve ark. 2020).

2.6.2.5. Emülsifikasyon-Ultrasonikasyon Yöntemi

Ultrasonikasyon yöntemi yüksek devirli homojenizasyon yöntemi gibi bir dispersiyon tekniğidir. Bu yöntemde öncelikle emülsifikasyon işlemi gerçekleştirilir. İlaç içeren lipit matriks erime derecesinin 5-10 °C üzerinde eritilir, ardından aynı sıcaklıkta sürfaktan içeren sulu faz ile yüksek hızlı karıştırma işlemi uygulayarak diperse edilir ve emülsiyon oluşumu gerçekleşir. Bu karışım daha sonra damlacık boyutunu küçültmek için sonikasyon işlemine tabi tutulur ve kademeli olarak soğutularak nanopartikül dispersiyonu oluşturulur (Souto ve ark. 2020).

Bu yöntemde partiküller, sıvılarda kavitasyon oluşturan ultrasonik dalgalarla oluşturulur. Böylece sıvı, yüksek yoğunlukta sonikasyon işlemine tabi tutulduğunda ses dalgaları sıvının ortasında yayılır. Yüksek ve düşük basınçlı ses dalgalarının dönüşümü meydana gelir. Düşük basınç ve yüksek yoğunluk fazında dalgalar enerjiyi emerek çapı artıran vakum kabarcıkları üretir. Yüksek basınç fazına ulaştıktan sonra baloncuklar patlayana kadar sıkıştırılır. Bu yöntemin kullanılması durumunda, formülasyonların fiziksel stabilitesinin bozulması sırasında görülen geniş partikül boyutu dağılımının önlenmesi için deney koşulları sıkı bir şekilde takip edilmelidir. Laboratuvarda yaygın

kullanılan bir ekipman olması önemli bir avantajdır. Ancak lipid nanopartikül elde edilebilmesi için uzun sonikasyon zamanları gerekir, bu da probdan metal kontaminasyonu riskini artırır. Ayrıca numunedeki enerji dağılımı tamamen homojen olmadığı için ortaya çıkan partiküller yüksek oranda polidisperstir (Souto ve ark. 2020; Ferreira ve ark. 2021).

2.6.2.6. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma, gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde halihazırda yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir dehidratasyon yöntemidir. Sulu SLN dispersiyonlarından farmasötik ürün üretmesi amacıyla kullanılan liyofilizasyon yöntemine alternatif bir yöntemdir. Liyofilizasyon yönteminden daha uygun maliyetlidir. Hızlı kurutma, yüksek verim, otomasyon, tekrarlanabilirlik, ölçek büyütme, kesintisiz üretim, farklı özelliklere sahip tozlar üretme gibi avantajlara sahiptir. Termal olarak kararsız biyoaktif maddeler, sıcak hava ile nispeten kısa temas süreleri nedeniyle bu yöntem kullanılarak kurutulabilir (Naseri ve ark. 2015; Mozaffar ve ark. 2021).

Püskürterek kurutma kullanılarak yüksek kaliteli tozların oluşturulması, formülasyonun ve çalışma koşullarının optimizasyonunu gerektirir. Bir dizi çalışma, bunun SLN veya NLC süspansiyonları için genellikle zor olduğunu göstermiştir. Yöntemde uygulanan yüksek sıcaklıklar ve kesme gücü sebebiyle partikül agregasyonu görülebilir. Ancak yapılan çalışmalar 70 °C' den daha yüksek erime noktasına sahip lipidlerin bu yöntem için uygun olduğunu göstermiştir (Naseri ve ark. 2015; Mozaffar ve ark. 2021)

2.6.2.7. Solvent Difüzyon ve Solvent Enjeksiyon Yöntemi

Solvent difüzyon yöntemi düşük toksisiteye sahip kısmen suyla karışabilen bir çözücü ile su içinde yağ emülsiyonunun oluşumunu içerir. Bu yöntem ilaç içeren bu çözücülerin suyla karışabilirliğine dayanmaktadır. Ardından bu geçici su içinde yağ emülsiyonu sürekli karıştırma altında su aktarılır ve çözücü dış faza yayılır. Bu durum dispers fazın katılaşması ve nanopartiküllerin oluşumu ile sonuçlanır. Kaynama noktasına bağlı olarak solvent indirgenmiş basınç altında buharlaştırılarak daha fazla uzaklaştırılabilir. Bu yöntem çok yönlü, tekrarlanabilir ve uygulanması kolaydır. Yüksek enerji kaynakları gerektirmez, ısı ve çalkalama gibi stres koşulları gerektirmez ve dar boyut dağılımı elde edilir. Ancak lipid dispersiyonlarının temizlenmesi ve konsantre edilmesini gereklidir (Montenegro ve ark. 2016; Souto ve ark. 2020).

Solvent enjeksiyon yönteminde katı lipit matriks suyla karışabilen bir çözücü içinde çözündürülür ve karışım bir enjeksiyon iğnesi aracılığıyla yüzey aktif madde içeren sulu faza hızla enjekte edilir. Uygulaması kolay, çok yönlü ve lipit nanopartikül üretiminde etkili bir tekniktir. Organik solvent kullanılması en önemli dezavantajdır (Montenegro ve ark. 2016; Souto ve ark. 2020).

Bu yöntemlerin en önemli avantajı küçük partikül boyutu elde edilmesi ve işlem sırasında ısı uygulamasının olmamasıdır. Bununla birlikte nihai üründe artık solvan bulunma olasılığı en önemli dezavantajlarıdır (Borges ve ark. 2020; Montenegro ve ark. 2016).

2.6.2.8. Çoklu Emülsiyon Yöntemi

Bu yöntemde ilk olarak lipitler organik solventte çözünürken hidrofilik bileşenler suda çözünür. Su fazı organik solventte dağıtılır ve primer emülsiyon oluşturulur (S/Y). Daha sonra bu emülsiyon su-yağ-su (S/Y/S) emülsiyonu oluşturmak için sülfatsız içeren eksternal su fazında dağıtılır. Lipit nanopartiküller organik çözücü buharlaştırıldıktan sonra elde edilir (Borges ve ark. 2020).

Genellikle polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bu yöntem ile hidrofilik ilaçların yükleme kapasitesinin artırılması için önemli bir avantaj sunabilir. Ancak bu yöntemin proses optimizasyonu sırasında dikkate alınması gereken özellikle hazırlama ve saklama ile ilgili sınırlamaları mevcuttur. Saklama sırasında ilaç sızması, partikül boyutunun artması, jelleşme fenomeni, partikül şekli değişimi gibi problemler görülebilir (Garcia-Fuentes ve ark. 2003; Borges ve ark. 2020).

2.6.2.9. Faz İnversiyon Yöntemi

Solvent içermeyen bir tekniktir. Formülasyon bileşenlerinin (lipit matriks, ilaç, su ve sürfaktan) manyetik karıştırıcı altında karıştırılması ve inversiyon prosesinin sağlanması için 3 sıcaklık siklusu (85-60-85-60-85) uygulanmasından oluşur. Daha sonra, karışım soğuk distile su içinde seyreltilerek bir termal şok uygulanır ve bu da lipit nanopartikül oluşumuyla sonuçlanır. Bu teknikte organik solvent kullanılmaz ve ısıtma kısa bir süre ile uygulanır. Ancak birkaç adım gerektiren zaman alıcı bir prosese sahiptir (Souto ve ark. 2020).

2.6.3. Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller fizyolojik ve biyobozunur lipitler, sürfaktan karışımı ve su ile hazırlanan, hem hidrofilik hem de lipofilik ilaç moleküllerinin yüklenebildiği, bir katı lipofilik matriksten oluşan boyutları 50-1000 nm arasında değişen, dar partikül boyut dağılımı gösteren koloidal taşıyıcı sistemlerdir (Joshi ve Müller 2009; Pardeike ve ark. 2009; Jain ve ark. 2017). SLN'ler iyi salım profili göstermesi ve yüksek fiziksel stabilitesi ve hedef bölgeye ilaç taşınması gibi avantajlara sahip olması ile diğer koloidal taşıyıcı sistemde görülen sınırlamaların üstesinden gelmek için geliştirilmiştir (Naseri ve ark. 2015).

SLN'lerin bileşiminde non iyonik sürfaktanlar ve genel olarak GRAS kategorisinde yer alan biyouyumlu, biyoparçalanabilir özelliğe sahip oda sıcaklığında ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan katı lipit veya katı lipit karışımları kullanılır (Pardeike ve ark. 2009; Tamjidi ve ark. 2013; Weber ve ark. 2014).

SLN'ler ilaç molekülünün bulunduğu konuma göre 3 farklı tipte bulunur (Müller ve ark. 2002a; Naseri ve ark. 2015; Borges ve ark. 2020).

- *SLN tip I:* Homojen matriks modeli; İlaç molekülleri lipit matriks içinde homojen olarak dağılmıştır.
- *SLN tip II:* İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli; İlaç içermeyen bir iç çekirdek ve lipit ve ilaç ile oluşturulmuş bir dış kabuktan oluşur.
- *SLN tip III:* İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli; İlaç konsantrasyonu, lipit içindeki doygunluk çözünürlüğüne yakın olduğunda elde edilir. Bu ilacın çekirdekte çökmesine ve bir lipit örtüsünün oluşumuna yol açacaktır.

Deri yüzeyinden uygulanan düşük penetrasyon gösteren ilaçların nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ilaç absorpsiyonunu iyileştirdiği kanıtlanmıştır. Hem SLN'le hem de NLC'ler topikal kozmetik ve farmasötik ürünler ilgi çekici ve umut verici taşıyıcılardır. Katı lipit matrikse sahip lipit nanopartiküller kimyasal olarak kararsız etkin maddelerin stabilitesini iyileştirirler (Müller ve ark. 2002a; Küchler ve ark. 2010; Montenegro ve ark. 2016). SLN dispersiyonlarının lipozomlar ile karşılaştırıldığında daha stabil olduğu, etkinliği ve lokal tolere edilebilirliği bir çok çalışmada gösterilmiştir (Küchler ve ark. 2010).

Deri lipitleri (epidermal lipitler ve sebum) penetrasyon bariyeri oluşturur. SLN'lerin deri yüzeyi ile yoğun etkileşimleri tespit edilmiştir. Deri yüzeyi ile partiküllerin lipit değişimi SLN'lerin potansiyel ilaç taşıma mekanizması olarak varsayılmaktadır. SLN ve deri yüzey arasındaki etkileşim tam olarak bilinmese de taşıyıcı matriksin doğası ve lipit matriks ile ilacın etkileşim biçimi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Küçük partikül boyutu ve yüksek yüzey alanı nedeniyle bu nanopartiküller, korneosit kümelerinin yüzeysel bağlantı noktaları ve *stratum corneum* kanalları ile yakın temas sağlar. Bu durum ilacın dermal tabakalarda birikimini iyileştirerek kontrollü salımına izin verir (Küchler ve ark. 2010; Jain ve ark. 2017).

SLN'ler belirgin oklüzif özelliğe sahiptir ve transepidermal su kaybını azaltır ve derinin hidrasyonunu arttırlar. Bu yolla ilaçların *stratum corneum*u geçerek penetrasyonu arttırabilir. Ayrıca, SLN'lerin aktif maddelerin, özellikle lipofilik ajanların penetrasyonunu ve taşınmasını arttırdığı ve dolayısıyla bu ajanların derideki konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Müller ve ark. 2002a; Montenegro ve ark. 2016; Jain ve ark. 2017).

Özellikle hidrofilik ilaçlar ile görülen düşük yükleme kapasitesi ve saklama sırasında etkin maddenin formülasyondan sızması bu taşıyıcı sistemler için büyük zorluklara sebep olmaktadır. SLN'lerin fiziksel stabilitesi de raf ömrü boyunca sorunlara neden olabilmektedir. Düşük viskoziteli SLN dispersiyonu, dispersiyonun soğutulması sırasında viskoz jele dönüşebilir. Hızlı, ön görülemeyen ve geri dönüşsüz bu jelleşme fenomeni partikül boyutu ve partikül agregasyonuna sebep olabilir. SLN'lerin ilaç yükleme kapasitesinin düşük olması, jelasyon riski, partikül aglomerasyonu ve saklama sırasında ilaç sızıntısı gibi bu bahsedilen dezavantajları topikal ilaç taşınmasındaki başarısını sınırlar. SLN'lerde görülen potansiyel sınırlamaların üstesinden gelebilmek için NLC'ler geliştirilmiştir (Pardeike ve ark. 2009; Jain ve ark. 2017).

2.6.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar

Nanoyapılı lipit taşıyıcılar katı ve sıvı lipit karışımından oluşan bir iç faz ve sulu bir dış fazdan oluşan sistemin bir veya iki sürfaktan ile stabilize edildiği lipit bazlı nanotaşıyıcılardır. Boyutları 40-1000 nm arasındadır (Montenegro ve ark. 2016; Garces ve ark. 2018). SLN'lerde görülen potansiyel sınırlamaların üstesinden gelebilmek için geliştirilen bu ikinci nesil lipit partiküller; yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyouyumlu yapısı, organik solvent içermeyen yöntemler ile hazırlanabilmesi, büyük ölçekli üretime

uygun olması gibi avantajları sebebiyle hem ilaç hem de kozmetik uygulamalar açısından önemli bir yere sahiptir (Jain ve ark. 2017; Borges ve ark. 2020; Ferreira ve ark. 2021).

NLC'lerin bileşiminde katı lipidler, sıvı lipidler ve sürfaktanlar yer alır. Formülasyon bileşeni olarak kullanılan katı yağlar oda sıcaklığında katı halde bulunan ve nanopartiküllerin de katı halde bulunmasını sağlayan bileşiklerdir. Sıklıkla kullanılan katı lipidlere gliseril behenat (Compritol® 888 ATO), gliseril palmitostearat (Precirol® ATO 5), yağ asitleri (stearik asit), trigliseritler (tristearin), steroidler (kolesterol) ve mumlar (ör. setil palmitat) örnek verilebilir. NLC'lerin hazırlanmasında genellikle doğal kaynaklardan elde edilebilen sıvı lipidler kullanılır. Miglyol® 812 gibi orta zincirli trigliseritler, Compritol®'e benzer yapıları nedeniyle sıklıkla tercih edilir (Fang ve ark. 2013). Sıklıkla kullanılan diğer sıvı lipidlere parafin yağı, 2-oktil dodekanol, propilen glikol dikaprilokaprat (Labrafac®), izopropil miristat, skualen, oleik asit, linoleik asit, dekanolik asit örnek verilebilir. Kullanılan lipidlerin çoğu klinik uygulamalar için Avrupa ve Amerikadaki düzenleyici otoriteler tarafından onaylı ve GRAS kategorisinde yer alan fizyolojik olarak iyi tolere edilebilen bileşiklerdir. Emülgatörler lipid dispersiyonlarını stabilize etmek için kullanılır. Araştırmaların çoğunda polisorbatsız poloksomer 188, polisorbatsız (Tween), polivinil alkol ve sodyum deoksikolat gibi hidrofilik sürfaktanlar kullanılır. Gerekirse Span gibi lipofilik veya lesitin gibi amfifilik sürfaktanlar da kullanılabilir. Emülgatörlerin kombinasyonunun partikül agregasyonunu daha etkili bir şekilde önleyebildiği gösterilmiştir (Shah ve ark. 2015; Fang ve ark. 2013).

NLC'ler lipid karışımının içeriğine bağlı olarak 3 farklı tipte bulunur (Müller ve ark. 2002a; Müller ve ark. 2002b; Shidhaye ve ark. 2008; Bhise ve ark. 2017; Talegaonkar ve ark. 2019; Borges ve ark. 2020).

- *NLC Tip I:* Kusurlu kristal model; Dağılmış ilaç moleküllerinin yanı sıra çözünmüş maddeleri de barındırabilen oldukça düzensiz, kusurlu bir lipid matris yapısından oluşur. Bu tip bir yapı katı ve sıvı lipidlerin yapılarının farklı olması ve kristalizasyon işlemi sırasındaki koşullar nedeniyle meydana gelir. Bu sistemler oluşan boşluklu yapı sayesinde daha fazla ilaç yükleme kapasitesine sahiptir.
- *NLC Tip II:* Amorf model; Homojenizasyon ve soğutma sırasında tekrar kristalize olmayan özel lipidler kullanılarak elde edilir. Yüksek

konsantrasyonda sıvı lipit içerir. Genel olarak ilaçların çözünürlüğü sıvı lipitlerde katı lipitlere oranla daha yüksek olduğu için yüksek ilaç yükleme kapasitesi gösterir. İlaç sızıntısını en aza indiren amorf bir lipit matriks oluşur. Oluşan lipit matriks katı haldedir.

- *NLC Tip III: Çoklu model; Faz ayrımı nedeniyle katı lipit matrisinin içinde bulunan küçük yağ nanoparçacıklarından oluşur. Katı lipit içinde çözünebilir maksimum sıvı lipit miktarının üzerindeki bir oranda sıvı lipitin ve katı lipit ile karışımından oluşur. Lipofilik etkin maddelerin sıvı lipitlerdeki çözünürlüğünün katı lipitlerden daha yüksek olmasından hareketle geliştirilmiştir. Bu ilaç yükleme kapasitesinin de artırır. Etkin madde bu katı lipit içindeki bu küçük yağ nanoparçacıklarında çözüldüğü ve katı lipit ile çevrelendiği için kontrollü ilaç salımına izin verir.*

Lipit nanopartiküler sistemler lipozom, ultraderme olabilen lipozom ve etozomlar gibi veziküler sistemlere ve polimerik nanopartiküllere alternatif olarak son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Mevcut koloidal taşıyıcı sistemlerde görülen sınırlı fiziksel stabilite, agregasyon, saklama sırasında ilacın formülasyondan sızması, üretimden kaynaklı solvent kalıntısı ve polimer sitotoksitesi gibi dezavantajları önlemek ya da azaltmak için araştırmacılar suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların taşınmasında biyouyumlu ve nontoksik lipitlere odaklanmıştır (Das ve Chaudhury 2011; Jain ve ark. 2017). Nanoyapılı lipit taşıyıcıların biyouyumlu olması, toksisitesinin düşük olması, ölçek büyütme için uygun olması, kontrollü ilaç salımı sağlaması, gerektiğinde organik çözücü gerektirmeyen yöntemlerle de üretilebilmesi, oral, dermal, intravenöz gibi farklı uygulama yolları ile kullanıma uygun olması en önemli avantajlarıdır. Nanoyapılı lipit taşıyıcılar oda sıcaklığında katı olan bir lipit iç fazına sahiptir. Sıklıkla lipofilik aktif bileşenler bu taşıyıcı sistemlerin iç fazlarına yüklenir. Bu katı matriks enkapsüle etkin maddenin kontrollü salımına izin verir ve degradasyonunu önler (Müller ve ark. 2007; Pinto ve ark. 2014; Montenegro ve ark. 2016; Garcés ve ark. 2018).

Lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında kullanılan lipitler biyouyumlu olmalarının yanı sıra epidermisi ve özellikle *stratum corneum*u oluşturan lipitlerle yapısal benzerlik göstermektedir. Bu sistemler deri yüzeyine tutunur ve böylece *stratum corneum*un en dıştaki tabakaları arasında lipit değişimine izin verirler.

Bu sistemler deri ile etkileşime girerek derinin bariyer özelliklerini değiştirirler (Bikkad ve ark. 2014; Arora ve ark. 2017; Sala ve ark. 2018). Ayrıca nanoyapılı lipit taşıyıcılar oklüzif özellikleri nedeniyle derinin hidrasyonunu arttırmırlar. Bu özellik psoriasisin aşırı dehidrate yapısı dikkate alındığında deriden su kaybının azalması ve hidrasyonun artması açısından önemlidir (Katare ve ark. 2010; Montenegro ve ark. 2016).

2.7. Nanoemülsiyonlar

2.7.1. Nanoemülsiyonların Yapısı ve Özellikleri

İlk kez 1943'te, Hoar ve Schulman yağ, alkol, su ve katyonik bir sürfaktan oluşun transparan karışımında mikroskobik emülsiyon benzeri yapıları tanımlamıştır. Yaklaşık on beş yıl sonra, Schulman ve arkadaşları elektron mikroskobu ile küçük emülsiyon benzeri yapıların varlığını doğrulamış ve “mikroemülsiyon” olarak tanımlamıştır. Yağ, sürfaktan, kosürfaktan ve su karışımında oluşun 10-100 nm boyut aralığına sahip bu şeffaf, optik olarak izotropik ve termodinamik olarak stabil sistemler için yanlış bir adlandırma yapılmıştır. Bununla beraber nanoemülsiyonlar terimi ise 250 nm'den daha küçük damlacık boyutuna sahip sistemler için kullanılmaktadır (Sharma ve Sharma 2012; Montenegro ve ark. 2016; Marzuki ve ark. 2019).

Nanoemülsiyonlar yağ, sürfaktan/kosürfaktan ve su fazından oluşun, iç fazı oluşturan damlacıkların nanometre boyutunda olduğu emülsiyon sistemlerdir. Nanoemülsiyonlar; mini emülsiyonlar, yarı transparan emülsiyonlar, submikron emülsiyonlar olarak da adlandırılırlar. Mikroemülsiyonlara kıyasla daha düşük sürfaktan kullanılarak hazırlanabilirler (Fernandez ve ark. 2004; Lovelyn ve Attama 2011; Montenegro ve ark. 2016).

Nanoemülsiyonlar morfolojilerine göre sınıflandırılırlar. Su bazlı veya su içinde yağ (O/W) emülsiyonunda dış faz yani sürekli faz sudan, iç faz yani dispers faz ise yağdan oluşur. Tam tersi durumda ise yağ bazlı veya yağ içinde su (W/O) emülsiyonu olarak isimlendirilirler. Mikroemülsiyonlar ile karşılaştırıldığında yarı kararlı (metastabil) durumda olan sistemlerdir. Yüksek kinetik stabilite gösterirler. %3-10 arasında sürfaktan içerirler (Sharma ve Sharma 2012; Marzuki ve ark. 2019).

Nanoemülsiyonlar derinin daha derin tabakalarına penetre olabilme yeteneğine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Aktif bileşenin derinin istenen tabakalarına dağılması, hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların kütanöz taşınmasını iyileştirmesi ve kontrollü

ilaç salımı gibi avantajları sebebiyle son yıllarda özellikle kozmetik alanda nanoemülsiyon sistemlere artan bir talep söz konusudur (Pawar ve Babu 2014; Montenegro ve ark. 2016; Marzuki ve ark. 2019). Düşük yüzey gerilimi ve geniş yüzey alanı sayesinde yüksek penetrasyon etkinliğine sahiptir. Bununla birlikte; nanoemülsiyonların hazırlanabilmesi için özel hazırlanma teknikleri ve özel cihazların kullanılması maliyeti arttır (Bouchemal ve ark. 2004; Setya ve ark. 2014; Jasmina ve ark. 2017).

2.7.2. Nanoemülsiyonların Hazırlama Yöntemleri

Nanoemülsiyonlar, düşük enerjili veya yüksek enerjili emülsifikasyon yaklaşımları veya her ikinin birlikte kullanıldığı çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanır. Yüksek enerjili yaklaşımlar, nanoboyutlu yağ damlacıkları oluşumu için yağ ve su fazlarını parçalayan yoğun yıkıcı kuvvetler oluşturan mekanik cihazların kullanımı ile karakterize edilir. Bu etki yüksek basınçlı homejenizatörler, yüksek devirli homojenizatörler, mikrofluidizerler ve ultrasonikatörler ile sağlanır. Düşük enerjili teknikler ise, emülsifikasyonu gerçekleştirmek için sistemin iç kimyasal enerjisini kullanır Bu düşük enerjili yöntemler faz inversiyon bileşimi (kompozisyonu) yöntemi ve faz inversiyon sıcaklığı yöntemidir (Marzuki ve ark. 2019).

2.7.2.1. Faz İncersiyon Bileşimi (PIC) Yöntemi

Faz inversiyon bileşimi yönteminde nanoemülsiyonların hazırlanması sabit sıcaklıkta sistemin bileşenlerinde meydana gelen değişime bağlı olarak gerçekleşir. Nanoemülsiyonlar oluşumu için yağ fazının su fazı ile kademeli olarak seyreltilmesi veya tam tersi uygulanır. Su-yag oranındaki küçük değişikliklerle inversiyon bileşiminin aşılması üzerine, emülsiyon dengesiz hale gelir ve ardından kinetik olarak stabilize edilmiş nanoemülsiyonu elde etmek için parçalanır. PIC yöntemi temelde sürekli fazın bileşenlerinin, dağılmış fazın bileşenlerine yavaşça eklenmesiyle gerçekleştirilir. Faz inversiyonu, sisteme elektrolitlerin, alkollerin, diğer yüzey etkin maddeler gibi bileşimi sistemin hidrofilik lipofilik dengesinin değiştirecek maddelerin eklenmesiyle de gerçekleştirilebilir (Salager ve ark. 2004; Marzuki ve ark. 2019; Salim ve ark. 2016).

2.7.2.2. Faz inversiyon Sıcaklığı (PTT) Yöntemi

Faz inversiyon sıcaklığı yönteminde emülsifikasyon, iyonik olmayan poli etoksillenmiş yüzey etkin maddelerin spesifik özelliklerine yani sıcaklığın bir fonksiyonu olarak su ve yağ afinitesini değiştirebilme özelliğine dayanır. Etoksillenmiş yüzey etkin maddeler ile yüksek sıcaklıkta hazırlanan S/Y emülsiyonu soğutulduğunda belirli bir sıcaklıkta faz inversiyonu gerçekleştirir ve Y/S emülsiyonu oluşur. Faz inversiyon sıcaklığına yakın sıcaklıklarda çok düşük arayüzey gerilimleri sebebiyle küçük damlacıklar oluşur ancak bu damlacıklar tekrar birleşir. Bu nedenle stabil nanoemülsiyonların hazırlanabilmesi için sisteme hızla soğutma işlemi uygulanması gereklidir (Solans ve ark. 2005; Gupta ve ark. 2016; Salim ve ark. 2016; Marzuki ve ark. 2019).

2.7.2.3. Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi

Hidrokinematik kayma bu yüksek hızlı karıştırma tekniğinin itici gücüdür. Bu yöntemde rotor/stator tipi aparatlar büyük damlacıkları daha küçük damlacıklara parçalar. Emülsifikasyonun iki adımda gerçekleşir. İlk olarak yüksek kayma gerilimi damlacıkları parçalar ve spesifik yüzey alanını artırır. İkinci olarak oluşan yeni ara yüzeyler emülgatörler ile stabilize edilir (Yukuyama ve ark. 2016; Marzuki ve ark. 2019). Damlacık boyutunu ve emülsiyon stabilitesini etkileyen parametreler, karıştırma hızı, karıştırma süresi, emülgatörün yapısı ve konsantrasyonu, sürekli fazın viskozitesi, rotor açıklığının büyüklüğü ve iç faz hacmi şeklinde sıralanabilir (Scholz ve Keck 2015; Hall ve ark. 2011; Marzuki ve ark. 2019). Ancak bu yöntemle nano boyutlu damlacıkların elde edilmesi zordur. Bu yöntem, pre-emülsiyonların oluşturulması aşamasında ve ardından elde edilen nanoemülsiyonların damlacık boyutlarını istenen nano aralığa getirebilmek için diğer yöntemler ile kombine edilebilir (Yukuyama ve ark. 2016).

2.7.2.4. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Bu yöntem yüksek enerji uygulanarak nanoemülsiyonların hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Yüksek basınçlı homjenizasyon yönteminde gerekli damlacık büyüklüğünün elde edilmesi için birçok teknik kullanılır. Bu teknikler arasında hidrolik kesme, kavitasyon ve yoğun türbülans yer alır ve genellikle 500 ila 5000 psi basınç altında uygulanır. Hazırlanan emülsiyon dar bir aralıktan geçerek bu sırada oluşan hidrolik kesme, yoğun türbülans ve kavitasyon etkisiyle ara yüzeyin parçalanır ve küçük damlacıklar oluşur. Boyut istenen aralığa getirilene kadar

homojenizatörden birçok kez geçirilebilir. Emülsiyonun homojenizatörden geçirilme sayısı, uygulanan basınç, sıcaklık, emülsiyonun viskozitesi damlacık boyutu üzerine etkili olan faktörlerdir (Koroleva ve Yurtov 2012; Tırnaksız 2014; Marzuki ve ark. 2019; Shaker ve ark. 2019).

2.7.2.5. Ultrasonikasyon Yöntemi

Ultrasonikasyon yöntemi çok küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan kolay ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde, belirli dalga boylarında titreşimler üreten ve kavitasyon oluşturan bir ultrasonik prob kullanılarak, kaba emülsiyonlardan küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonlar elde edilir. Hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutu, formülasyon bileşenlerinin konsantrasyonlarına ve oranlarına, emülsiyonun viskozitesine, sisteme verilen enerjiye ve uygulanan sonikasyonun süresine bağlı olarak değişir. Bu yöntem ile büyük hacimli üretimler mümkün olmadığı için yalnızca laboratuvar ortamında kullanılabilir (Ghosh, Saranya ve ark. 2013; Ghosh, Mukherjee ve ark. 2013; Marzuki ve ark. 2019; Shaker ve ark. 2019).

2.7.2.6. Mikroakışkanlaştırma Yöntemi

Mikroakışkanlaştırma patentli bir karıştırma teknolojisidir. 500–20.000 psi'lik bir basınca sahip yüksek basınçlı pozitif deplasmanlı bir pompa ve çok sayıda mikrokanal içerir (Shaker ve ark. 2019). Sıvıyı özel olarak yapılandırılmış mikrokkanallardan geçirmek için yüksek basınç kullanılır (Shen ve Tang 2012). Bu basınç fazları mikrokkanallardan geçmeye zorlar. Ürün yüksek basınç altında mikrokkanallardan geçer (Salim ve ark. 2016; Shaker ve ark. 2019). Mikrokkanallardan geçerken uygulanan kesme, çarpma ve kavitasyonun kombine etkileri sıvıyı mikron altı damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonlar haline getirir (Shen ve Tang 2012; Salim ve ark. 2016). Basınç altında mikroakışkanlaştırıcı ünitelerden geçirme işlemi nanoemülsiyonlar için istenilen damlacık boyutu elde edilene kadar tekrarlanır. Daha sonra hazırlanan nanoemülsiyon nitrojen gazı altında bir filtre sisteminden geçirilerek büyük damlacıklar uzaklaştırılır (Salim ve ark. 2016; Shaker ve ark. 2019). Bu yöntem yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemine kıyasla daha dar boyut dağılımına sahip küçük damlacıklar elde edilmesini sağlar ve daha verimli bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ancak yöntem pahalıdır ve büyük miktarlarda nanoemülsiyon üretilmesi için uygun değildir (Marzuki ve ark. 2019; Shaker ve ark. 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Fluvastatin Sodyum Ph. Eur. (*Aurobindo Pharma*)
- Asetonitril (HPLC grade) (*Merck*)
- Metanol (HPLC grade) (*Merck*)
- Tetrametilamonyum hidroksit pentahidrat, $(\text{CH}_3)_4\text{N}(\text{OH}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (*Sigma-Aldrich*)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (*Merck*)
- Sodyum Klorür, NaCl (*Merck*)
- Potasyum klorür, KCl (*Merck*)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (*Merck*)
- Sodyum Hidroksit, NaOH (*Merck*)
- Orto fosforik asit (*Merck*)
- Sitrik asit monohidrat (*Merck*)
- Trisodyum sitrat dihidrat (*Merck*)
- Phospholipon 90 G (Soya fosfatidilkolin) (*Lipoid*)
- Tween 20 (Polietilen Glikol Sorbitan Monolaurat) (*Sigma-Aldrich*)
- Tween 80 (Polietilen Glikol Sorbitan Monooleat) (*Sigma-Aldrich*)
- Span 20 (Sorbitan Monolaurat) (*Sigma-Aldrich*)
- Span 80 (Sorbitan Monooleat) (*Sigma-Aldrich*)
- Span 85 (Sorbitan Trioleat) (*Sigma-Aldrich*)
- Etanol (*Merck*)
- Compritol 888 ATO (*Gattefosse*)
- Precirol ATO 5 (*Gattefosse*)

- Capryol 90 (*Gattefosse*)
- Kolliphor EL (*BASF*)
- Kolliphor RH 40 (*BASF*)
- Kolliphor HS 15 (*BASF*)
- Kolliphor P 188 (*BASF*)
- Sodyum Kolat (*Sigma-Aldrich*)
- Oleik asit (*Sigma-Aldrich*)
- Lauroglycol FCC (*Gattefosse*)
- Lauroglycol 90 (*Gattefosse*)
- Plurol Oleique CC 497 (*Gattefosse*)
- Labrafil M 2125 CS (*Gattefosse*)
- Labrafac PG (*Gattefosse*)
- Labrafac Lipophile WL 1349 (*Gattefosse*)
- Izopropil Miristat (*Merck*)
- Gelucire 44/14 (*Gattefosse*)
- Gelucire 48/16 (*Gattefosse*)
- Cremophor A25 (*BASF*)
- Hidroksipropil selüloz, HPC (MA: 1,000,000) (*Sigma-Aldrich*)
- Hidroksipropil metil selüloz, HPMC K100M (*IMCD*)
- Karboksi metil selüloz (*Nisso*)
- Ksantan zamkı (*Sigma-Aldrich*)
- Sodyum Aljinat (*Sigma-Aldrich*)
- Carbopol 980 NF (*Lubrizol*)
- Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- Fosfotungustik asit (*Sigma-Aldrich*)

- Nil Kırmızısı (*Sigma-Aldrich*)
- Tissue Freezing Medium (*Leica*)
- DMEM (Life Technologies)
- MEM (Gibco)
- Normal İnsan Fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA)
- HaCaT (T0020001, AddexBio, USA)
- SRB kit (ab235935 Sulforhodamine B Cell Cytotoxicity Assay Kit, abcam)
- DPBS (Gibco)
- Fetal Bovin Serum (Gibco)
- IL-6 ELISA kiti (Invitrogen, Human IL-6 ELISA kit, EH2IL6, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria)
- IL-8 ELISA kiti (Invitrogen, Human IL-8 ELISA kit, KHC0081, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria)
- Recombinant Human IL-17A (Peprotech)
- Sodyum piruvat (Life Technologies)
- Penisilin streptomisin (Life Technologies)
- Ultra saf su, 25 °C'de 18.2 MΩ cm (*Millipore Milli-Q*)

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

- Damlacık Büyüklüğü Ölçüm Cihazı (*Malvern Zetasizer, Nano ZS*)
- Rota Evaporatör (*Büchi R-210*)
- Ultrasonik prob (*Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap*)
- ATR-FTIR Spektroskopi cihazı (*Perkin Elmer ZnSe Spectrum One*)
- ATR-FTIR Spektroskopi cihazı (*Shimadzu*)
- Liyofilizatör (*Virtis, SP Industries, ABD*)

- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (*Shimadzu, LC 20AT*)
- C18 Kolon (*GL Sciences, Inertsil ODS-3, 4.6 mm, 150 cm, 5 μ m*)
- pH Metre (*Hanna*)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (*IKA-Werke, RT15*)
- Solvan süzme sistemi (*Sartorius, D-3400*)
- Orbital çalkalayıcı (*IKA, KS 501*)
- Terazî (*Sartorius, Analytical Balance ENTRIS v224-1S*)
- Terazî (*Sartorius, CPA2P Microbalance*)
- Franz Difüzyon Sistemi (*PermeGear, V6A Stirrer*)
- Otomatik mikropipet (100-1000 μ l) (*Eppendorf Research® Plus*)
- Otomatik mikropipet (10-100 μ l) (*Eppendorf Research® Plus*)
- Otomatik mikropipet (1-10 μ l) (*Eppendorf Research® Plus*)
- Santrifüj cihazı (*Eppendorf, 5418R*)
- Geçirimli Elektron Mikroskobu (*Talos L120C, ThermoScientific*)
- Taramalı Elektron Mikroskobu (*Quattro S ESEM, ThermoScientific*)
- Diferansiyel taramalı kalorimetri (*DSC 250, TA Instruments*)
- Ultra saf su cihazı (*Merck Millipore Milli-Q Integral*)
- Ultrasonik Banyo (*Bersonik*)
- Vorteks (*IKA® Vortex Genius 3*)
- Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (*Leica TCS SPE*)
- Kriyotom Cihazı (*Leica, CM1850 UV*)
- Reometre (*Thermo Scientific HAAKE RS1*)
- Doku analizi cihazı (*Brookfield, CT3*)
- İnkübatör (*Thermo Scientific*)
- 9 kuyucuklu plaka (*Costar*)

- ELISA mikropłaka okuyucu (PowerWave XS2, BioTek)
- Santrifüj (SL16, Thermo Scientific)
- Kabin (Thermo Scientific)
- 4°C dolabı (Kirsch)
- -80 °C dolabı (GFL)
- Etüv (Thermo Scientific)
- Orbital çalkalayıcı (IKA MS 3)

3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler

- Mikropipet uçları (1-10 mL, 10-100 mL, 100-1000 mL) (*Eppendorf*)
- Manyetik balıklar (*Isolab*)
- Cam malzemeler (Beher, Balon joje, Erlen, Mezür, Cam şişe, Cam flakonlar, Lam, Cam viyaller, Balon joje, Petri kutusu vb.)
- Rotaevapör balonu (100 mL) (*Borucam*)
- Steril enjektör (1 mL) (*Hayat*)
- HPLC viyalleri ve kapakları
- Cerrahi Makas
- Bisturi
- Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (15 mL) (*Labsolute*)
- Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (50 mL) (*Labsolute*)
- Parafilm (*Brand*)
- Eldiven (*Beybi*)
- Spatül (ince ve kalın uçlu) (*Isolab*)
- Pens (*Isolab*)
- Domuz derisi (Yerel bir kesimhaneden)
- Tek kullanımlık polistiren spektrofotometre küveti (*LP Italiana*)

- Pastör pipeti (3 mL)
- Zeta potansiyel ölçüm küveti (Folded Capillary Cell) (*Malvern*)
- Yapışkan Bant (Scotch: Book Repair Tape) (*3M*)
- Vivapsin 6 (cut-off 10,000 MW centrifugal concentrator) (*Sartorius*)
- Kristalizasyon kabı (*Isolab*)
- Mikrosantrifüj tüpü (2 ml) (*Eppendorf*)
- Diyaliz Membran (cut-off 14,000 MW, 25 mm) (*Sigma-Aldrich*)
- Enjektör ucu filtre (0,20 μm , 13 mm) (*CHROMAFIL Xtra PTFE, Macherey-Nagel*)
- Enjektör ucu filtre (0,45 μm , 13 mm) (*CHROMAFIL Xtra PTFE, Macherey-Nagel*)
- Hücre kültür kapları (75 cm²) (*Corning*)
- 96 kuyucuklu plakalar (*Costar*)
- Steril tek kullanımlık pipetler (*Axygen*)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Fluvastatin Sodyum'un Infrared (IR) Spektrumu

Fluvastatin sodyum'un IR analizi ATR-FTIR spektrofotometre (PerkinElmer ZnSe Spectrum 100) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Toz haldeki fluvastatin sodyum cihazın ATR kristali üzerine yerleştirildi ve 4000-650 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 100 N kuvvet uygulanarak spektrum alındı.

3.2.2. Fluvastatin Sodyum'un DSC Termogramı

Fluvastatin sodyum'un DSC analizi diferansiyel termal kalorimetre (TA Instruments-DSC 250) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Fluvastatin sodyum'un DSC termogramı alüminyum plaklar üzerinde, 10-300 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ sıcaklık artışı ve 20 mL/dk azot akış hızında alındı ve referans olarak boş alüminyum plak kullanılarak değerlendirildi.

3.2.3. Fluvastatin Sodyum' un HPLC Miktar Tayini Yöntemi

Nanotaşıyıcıların enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarında hazırlanan numunelerdeki fluvastatin sodyum miktar tayini analizleri için HPLC yöntemi kullanıldı. Uygulanan HPLC yöntemi ingiliz farmakopesinde fluvastatin sodyum için geliştirilen yöntemden modifiye edilmiştir (BP 2017).

3.2.3.1. Kromatografik Koşullar

Fluvastatin sodyum'un miktar tayini analizlerinde 150 x 4.6 mm boyutlarına ve 5 μm partikül büyüklüğüne sahip C18 HPLC kolonu (Inertsil ODS-3) kullanıldı. Analizler 305 nm dalga boyunda PDA dedektör kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40 $^{\circ}\text{C}$ ve enjeksiyon hacmi 100 μL olarak ayarlandı. Bu koşullar altında etkin maddenin 1,2 mL/dk akış hızındaki retensiyon zamanı yaklaşık 12 dk olarak belirlendi.

3.2.3.2. Mobil Fazın hazırlanması

Mobil faz olarak pH 7.2 Tampon: Asetonitril: Metanol (500: 240: 360, h/h/h) karışımı hazırlandı. Mobil faz karışımı manyetik karıştırıcıda ağzı kapalı olacak şekilde homojen olması için en az 5 dk karıştırıldı. Analiz öncesi vakum sistemi kullanılarak 0.45 μm membran filtreden (HVHP, Millipore) süzüldü ve ultrasonik banyo kullanılarak 15 dk boyunca degaze edildi.

pH 7,2 Tamponun (0,069 M) hazırlanışı: 12,5 g tetrametilamonyum hidroksit tartıldı. Ultra saf su ile çözülüp pH' sı ortofosforik asit ile 7,2' ye ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

3.2.3.3. Örneklerin Hazırlanması

Standart çözelti örnekleri fluvastatin sodyum'un metanol ile hazırlanan stok çözeltisinden hareketle hazırlandı. İstenilen konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin seyreltmelerinde ise mobil faz karışımı kullanıldı.

3.2.4. Fluvastatin'in HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, seçilen analitik yöntemin belirlenen amaçlar doğrultusunda belirli koşullardaki uygunluğunun kanıtlanması amacıyla yapılan çalışmaların tamamıdır. Analitik yöntemin validasyonunun değerlendirilmesi için gerekli parametreler temel olarak, doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk (accuracy), seçilicilik (sepcificity), stabilite (stability), teşhis limiti (LOD) ve miktar tayin limitidir (LOQ) (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2017).

3.2.4.1. Doğrusallık

Fluvastatin sodyum'a ait HPLC yönteminin doğrusallığı için öncelikle 10 mg fluvastatin sodyum hassas terazide tartılarak balon jojeye alındı. Üzerine metanol ilave edildi, vortekslenerek çözünmesi sağlandı. Hacmi 50 mL'ye tamamlanarak 200 µg/ml konsantrasyonda fluvastatin sodyum içeren stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden hesaplı miktarda mobil faz ile seyreltme yapılarak sırasıyla 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 ve 0.025 mg/mL konsantrasyonlarında 9 adet standart fluvastatin sodyum standart çözeltileri hazırlandı. Homojen karışması için seyreltmeler sonrası balon jojeler vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan standartlar enjektör ucu fitrelerden (PTFE, 0.45 µm) süzülerek HPLC viyallerine alındı. Standart çözeltiler yöntem 3.2.3'te belirtilen koşullar altında analiz edildi. Her örnek için 3 ayrı enjeksiyon gerçekleştirildi. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanları hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi çizildi. Doğru denklemi oluşturuldu ve determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SD) ile yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı.

3.2.4.2. Kesinlik

Fluvastatin sodyum'a ait HPLC yönteminin doğrusallığı için, Yöntem 3.2.4.1'de belirtilen konsantrasyonda hazırlanan fluvastatin sodyum stok çözeltisinden hareketle aşağıda sırasıyla verilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları gerçekleştirildi.

Gün içi kesinlik: Fluvastatin sodyum'un stok çözeltisinden mobil faz ile gerekli seyreltmeler yapılarak üç farklı konsantrasyonda (0.5, 1, 2.5 µg/mL) standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler üç ayrı seride hazırlandı ve 3 ayrı enjeksiyon ile HPLC'de analiz edildi. Elde edilen sonuçların ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı.

Günler arası kesinlik: Birinci gün gerçekleştirilen gün içi kesinlik çalışmaları 2. ve 3. günlerde tekrar edildi. Üç gün boyunca elde edilen sonuçların ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı.

3.2.4.3. Doğruluk

Kullanılan HPLC yönteminin doğruluğunu saptamak için transetozom ve NLC formülasyonlarında farklı olarak kullanılan yardımcı maddelerin formülasyonda kullanılan en yüksek konsantrasyonları kullanılarak etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar hazırlandı. Formülasyondaki % 0.1'lik ilaç miktarına eşdeğer olacak şekilde her bir plasebo formülasyon için 3 farklı konsantrasyonda (0.5, 1 ve 2,5 µg/ml) çalışıldı. Her bir plasebo formülasyondan hesaplı miktarlarda ayrı ayrı balon jojelere aktarıldı. Üzerlerine stok çözeltiden 0.5, 1 ve 2,5 µg/ml'lik konsantrasyonları sağlayacak şekilde ilave edildi. Mobil faz ile hacmine tamamlandı ve vorteklendi. Hazırlanan örnekler HPLC'ye verilmeden önce enjektör ucu filtreden (0.45 µm, PTFE) süzüldü. Analiz sonrası elde edilen pik alanlarından yöntem 3.2.4.1' de belirlenen doğru denklemi kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Analitik yöntemin doğruluğu fluvastatin sodyum'un yüzde geri kazanma değerlerinin hesaplanması yoluyla belirlendi.

3.2.4.4. Seçicilik

Fluvastatin sodyum için kullanılan HPLC yönteminin seçiciliğini göstermek için nanotaşıyıcıların enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarında hazırlanan numunelerdeki etkin madde ile girişim yapabilecek tüm bileşenlerin analizi yapıldı. Bunun için tüm formülasyon bileşenleri, tampon sistemler, reseptör fazlar, penetrasyon çalışması sırasında soyma işleminde kullanılacak olan bant ve domuz derisi

uygun şekilde ekstre edilerek HPLC sistemine verildi ve etkin madde ile aynı alıkonma zamanına sahip olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.4.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Analitik yöntemin TL ve MTL değerlerini belirleyebilmek için en az 3 kalibrasyon doğrusunun eğimleri ortalaması ve kesişim noktalarına ait standart sapma (SD) değerleri kullanıldı. Kalibrasyon doğrularına ait y kesişim değerlerinin standart sapması kalibrasyon doğrusunun eğimleri ortalamasına bölündü. Bu değer 3,3 ile çarpılarak TL; 10 ile çarpılarak MTL hesaplandı.

3.2.4.6. Örneklerin Stabilitesi

HPLC örneklerinde fluvastatin sodyumun analiz boyunca stabil olduğunu göstermek amacıyla stabilite çalışması gerçekleştirildi. Yöntem 3.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak stok çözeltiden 0,5, 1 ve 2,5 µg/ml'lik konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı. Her bir örnek 0., 24., 48. ve 72. saatlerde analiz edildi. Örneklerin farklı aralıklarla analizi sonucu fluvastatin sodyum konsantrasyonlarında bir değişiklik olup olmadığı ve farklı yeni bir pikin var olup olmadığı saptandı.

3.2.5. Transetozom Formülasyon Çalışmaları

Fluvastatin sodyumun transetozom ve kontrol formülasyonları olarak transferzom tipi veziküler taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Her iki taşıyıcı sistem için çalışmalar birlikte yürütülmüştür. Bu çalışmalar kapsamında öncelikli olarak transetozom ve transferzomların hazırlama yöntemi belirlenmiştir. Ardından, formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesine yönelik ön formülasyon çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyon geliştirmenin bir sonraki aşamasında da transetozom ve transferzomlara fluvastatin sodyum'un yüklenmesi ve uygun partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımına sahip, etkin madde yüklü formülasyonların hazırlanması için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları yer almaktadır. Optimize formülasyonların fizikokimyasal karakterizasyonları ve stabilite analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerin sonunda seçilen formülasyonlar ile *in vitro* dermal penetrasyon çalışmaları, ATR-FTIR çalışmaları, konfokal ve floresan mikroskop çalışmaları ve son olarak hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Transetozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Transetozomların hazırlanmasında, literatürde kayıtlı olan “ince film hidrasyon” yöntemi kullanıldı (Song ve ark. 2012; Garg, Singh, Singh ve ark. 2017). Bu amaçla öncelikle fosfolipit, sürfaktan ve etkin madde, klorofom: metanol (2:1, h/h) karışımında yuvarlak tabanlı bir balonda çözündürüldü. Organik çözücü karışımı, rotaevaporatörde (Büchi R-210) lipit geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta (45 °C), 120 rpm dönüş hızı ve 100 milibar (yaklaşık 0,1 atm) basınç altında uzaklaştırıldı. Geriye kalan ince lipit film tabakasından organik çözücü artıklarının tamamen uzaklaştırılabilmesi için balon bir gece çeker ocakta vakum altında bırakıldı. Daha sonra bu kuru lipit film tabakası, farklı konsantrasyonlarda etanol içeren sulu dispersiyon ortamları ile 2 saat boyunca hidrate edildi. Hazırlanan transetozom süspansiyonu, oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek veziküllerin şişmeleri sağlandı. Ardından, transetozom süspansiyonunun partikül büyüklüğünü küçültmek ve düşük polidispersite indeksine sahip homojen bir sistem elde edebilmek için prob sonikatör kullanılarak buz banyosunda 2 buçuk dakikalık setler halinde sonikasyon işlemi uygulandı. Her bir formülasyona uygulanması gereken sonikasyonun süresi optimizasyon çalışmaları ile belirlendi.

Transetozom formülasyonlarının etkinliğini karşılaştırmak için kontrol amaçlı olarak transferzom tipi taşıyıcı sistemler de geliştirildi. Bu sistemler de aynı yöntemle hazırlandı. Transferzomlar etanol içermeyen dispersiyon ortamı kullanılarak hidrate edildi.

3.2.5.2. Transetozom Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında öncelikli olarak formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesi hedeflendi. Bir sonraki aşamada transetozomlara fluvastatin sodyum’un yüklenmesi ve uygun partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımına sahip, etkin madde yüklü formülasyonların hazırlanması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Optimum formülasyonların belirlenmesinde formülasyon bileşenleri dışında hazırlama parametrelerinin de etkili olduğu göz önünde bulundurularak ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. Çalışmalara etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlanması ile başlandı. Uygun olduğu düşünülen formülasyonlara etkin madde yüklenerek görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisi değerlendirildi. Formülasyonlar Yöntem 3.2.5.1’de

anlatıldığı şekilde hazırlandı. Tablo 3-1’ de verilen formülasyon bileşen ve oranları kullanılarak çalışmalara başlandı.

Tablo 3-1: Transetozom ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon bileşenleri ve kullanılan miktar ve oranlar

Formülasyon bileşenleri	Kullanılan miktar ve oranlar
Fosfolipit Phospholipon 90G	400-500 mg
Sürfaktan Tween 80, Tween 20, Span 20, Span 80, Span 85, Kolliphor EL, Kolliphor RH40, Kolliphor HS15, Gelucire 44/14, Gelucire 48/16, Sodyum kolat hidrat	50 - 171 mg
Fosfolipit: Sürfaktan oranları	80:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 (a/a)
Etanol	% 10 - % 30 (h/h)

Transetozom ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan boş formülasyonların kodları, bileşenleri ve oranları Tablo 3-2’de gösterilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirilmiştir. Bu formülasyonlardan uygun bulunanlar ise Tablo 3-3’de verilmiştir. Tablo 3-3’de gösterilen formülasyonlara fluvastatin sodyum yüklenmesi için çalışılmıştır.

Tablo 3-2: Etkin madde içermeyen transetozomların kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Sürfaktan		Hidratasyon	
			Tür	(mg)	Etanol (%)	Distile Su (%)
TEZ-T80-50-DS	400	8:1	Tween 80	50	30	70
TEZ-T80-100-DS	400	8:2	Tween 80	100	30	70
TEZ-T20-50-DS	400	8:1	Tween 20	50	30	70
TEZ-T20-100-DS	400	8:2	Tween 20	100	30	70
TEZ-G44/14-50-DS	400	8:1	Gelucire 44/14	50	30	70
TEZ-G44/14-100-DS	400	8:2	Gelucire 44/14	100	30	70
TEZ-G48/16-50-DS	400	8:1	Gelucire 48/16	50	30	70
TEZ-G48/16-100-DS	400	8:2	Gelucire 48/16	100	30	70
TEZ-KEL-50-DS	400	8:1	Kolliphor EL	50	30	70
TEZ-KRH40-50-DS	400	8:1	Kolliphor RH40	50	30	70
TEZ-KHS15-50-DS	400	8:1	Kolliphor HS15	50	30	70
TEZ-SKH-50-DS	400	8:1	Sodyum Kolat	50	30	70
TEZ-S20-50-DS	400	8:1	Span 20	50	30	70
TEZ-S80-50-DS	400	8:1	Span 80	50	30	70
TEZ-S85-50-DS	400	8:1	Span 85	50	30	70

TEZ: Transetozom, DS: Distile Su, T80: Tween 80, T20: Tween 20, KEL: Kolliphor EL, G44/14: Gelucire 44/14, G48/16: Gelucire 48/16, KRH40: Kolliphor RH40, KHS15: Kolliphor HS15, SKH: Sodyum kolat hidrat, S20: Span 20, S80: Span 80; S85: Span 85

Tablo 3-3: Fluvastatin sodyum yüklenen transetozomların kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Sürfaktan		Hidratasyon	
			Tür	(mg)	Etanol (%)	Distile Su (%)
TEZ-T80-50-DS-FVS	400	8:1	Tween 80	50	30	70
TEZ-T20-50-DS-FVS	400	8:1	Tween 20	50	30	70
TEZ-T20-100-DS-FVS	400	8:2	Tween 20	100	30	70
TEZ-KEL-50-DS-FVS	400	8:1	Kolliphor EL	50	30	70
TEZ-SKH-50-DS-FVS	400	8:1	Sodyum Kolat	50	30	70

FVS: Fluvastatin sodyum, Fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Tablo 3-3'te verilen etkin madde yüklü formülasyonlar hem görsel hem de partikül boyutöl boyutu ve PDI değerleri açısından değerlendirildiğinde fluvastatin sodyum'un formülasyonlara yüklenmediğini görüldü. Bunun üzerine optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışması kapsamında denenen yöntemler ilgili başlıklar altında aşağıda sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.5.2.1. Hidratasyon Ortamının Belirlenmesi

Ön formülasyon çalışmaları sırasında fluvastatin sodyum yüklü uygun partikül boyutu ve boyut dağılımına sahip formülasyonlar elde edilememiştir. Bunun üzerine fluvastatin sodyumun hazırladığımız taşıyıcı sistemlere yüklenebilmesi için etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri de göz önüne alınarak çalışmalara devam edilmiştir.

a) Hidratasyon Ortamının pH Değeri

Hidratasyon ortamı olarak kullanılacak etanol-su (30:70) karışımının pH'sı fosforik asit çözeltisi ile 3'e ayarlandı. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri değerlendirildi. Sürfaktan türünün de etkili olabileceği düşünülerek biri non-iyonik sürfaktan ve diğeri anyonik sürfaktan içeren iki formülasyon ile çalışma gerçekleştirildi. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri

incelenerek uygun olup olmadığı değerlendirildi. Bu şekilde hazırlanan transetozom formülasyonlarının bileşenleri Tablo 3-4'te verilmiştir.

Tablo 3-4: Hidratasyon ortamının pH'sı 3'e ayarlanarak hazırlanan formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Fluvastatin (%)	Fosfolipit (mg)	Sümfaktan		Hidratasyon
			Tür	(mg)	
TEZ-T20-50-pH3-FVS	0,1	400	Tween 20	50	pH 3
TEZ-SKH-50-pH3-FVS		400	Sodyum kolat hidrat	50	Etanol-su karışımı (30:70)

b) Hidratasyon Ortamı Olarak Tampon Kullanılması

Hidratasyon ortamı etanol: su (30:70) karışımının pH değerinin 3'e ayarlanması ile hazırlanan formülasyonların uygun olmamasından dolayı tampon sistemlerin denenmesine karar verildi. Bu amaçla, pH 3 sitrat tamponu ve pH 3 fosfat tamponu kullanılarak aşağıda yer alan çalışmalar sırasıyla gerçekleştirildi.

pH 3 sitrat tamponunun hazırlanışı: 0,1 M sitrik asit monohidrat çözeltisinden 46.5 mL ve 0,1 M sodyum sitrat dihidrat çözeltisinden 3,5 mL alındı. Ultra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. pH'sı 0.1 M NaOH çözeltisi ile 3'e ayarlandı.

pH 3 fosfat tamponunun hazırlanışı: 3.4 g potasyum dihidrojen fosfat tartıldı. 900 mL ultra saf su içinde çözündürüldü ve pH'sı ortofosforik asit çözeltisi ile 3'e ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Çözünürlük Çalışması

Ön formülasyon çalışmaları sırasında etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle veziküler sisteme yüklenemediği ve çözünürlüğün önemli bir parametre olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle etkin maddenin tampon sistemlerdeki çözünürlüğü değerlendirilerek uygun tampon sistemin seçilmesi hedeflendi. Bu amaçla, eppendorf tüplere 1'er mL çözünme ortamı ilave edildi. Üzerlerine Fluvastatin sodyumun aşırı miktarı doymuş çözelti elde etmek için ilave edildi. Numuneler oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 270 rpm hızda 24 saat süre ile çalkalandı. Daha sonra tüpler 15000 rpm hızda 10 dk. süre ile santrifüj edildi ve çözünmeyen etkin maddede çöktürülerek uzaklaştırıldı. Üstte kalan kısım ayrı bir tüpe alındı, enjektör ucu filtre ile

süzülerek ve mobil faz ile uygun oranlarda seyreltildi. Hazırlanan numuneler HPLC ile analiz edildi ve etkin madde miktarları tespit edildi.

Tamponlama Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Kullanılan tampon sistemin pH'sının yanı sıra bu tampon sistem ile hazırlanmış final ürünün pH'sının da ilacın pH bağımlı çözünürlüğü ve dolayısıyla taşıyıcı sisteme yüklenmesinde önemli olduğu düşünüldü. Bu amaçla Tablo 3-5'da bileşen ve oranları verilen çözeltiler ve formülasyonlar'ın pH değerleri incelenmiştir. Kullanılan hidrasyon ortamı ve bu ortamlar ile hazırlanmış formülasyonların pH değerleri karşılaştırıldı. Sonuç olarak pH değerindeki değişimin ilk ölçülen pH değerlerine göre mümkün olduğunca az olması hedeflendi.

Tablo 3-5: Hidratasyon çözeltileri ve bu çözeltiler ile hazırlanan formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları

Çözelti ve Formülasyonların Kodları	Fosfolipit (mg)	Sümfaktan		Etanol (%)	Hidrasyon	
		Tür	(mg)		Sitrat Tamponu (%)	Fosfat Tamponu (%)
pH 3 ST + Etanol (70:30) çözeltisi	-	-	-	30	70	-
pH 3 PBS + Etanol (70:30) çözeltisi	-	-	-	30	-	70
TEZ-T20-50-ST-FVS	400	Tween 20	50	30	70	-
TEZ-T20-50-PBS-FVS	400	Tween 20	50	30	-	70

PBS: pH 3 fosfat tamponu, ST: pH 3 sitrat tamponu, Formülasyona fluvastatin %0,1 oranında yüklenmiştir.

Çözünürlük çalışması ve tamponlama kapasitesinin değerlendirilmesi çalışmaları sonuçlarına dayanarak, hidrasyon ortamının bileşiminde pH 3 PBS yerine etkin maddenin çözünürlüğünün düşük, tamponlama kapasitesinin ise yüksek olduğu saptanan pH 3 sitrat tamponu kullanılmasına karar verildi. Noniyonik bir sümfaktan olan Tween 20 ile gerçekleştirilen bu çalışmalardan elde edilen başarılı sonuçlara dayanarak diğer sümfaktanlar ve farklı oranları kullanılarak formülasyonlar hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. Hidrasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan formülasyon kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-6'te gösterilmiştir.

Tablo 3-6: Hidratasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Sürfaktan		Hidratasyon	
			Tür	(mg)	Etanol (%)	Sitrat Tamponu (%)
TEZ-T80-50-ST-FVS	400	8:1	Tween 80	50	30	70
TEZ-T80-71-ST-FVS	400	8:1	Tween 80	71	30	70
TEZ-T80-100-ST-FVS	400	8:2	Tween 80	100	30	70
TEZ-T20-50-ST-FVS	400	8:1	Tween 20	50	30	70
TEZ-T20-71-ST-FVS	400	8:1	Tween 20	71	30	70
TEZ-T20-100-ST-FVS	400	8:2	Tween 20	100	30	70
TEZ-KEL-50-ST-FVS	400	8:1	Kolliphor EL	50	30	70
TEZ-KEL-100-ST-FVS	400	8:2	Kolliphor EL	100	30	70
TEZ-SKH-50-ST-FVS	400	8:1	Sodyum Kolat	50	30	70

ST: pH 3 Sitrat Tamponu, Fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

3.2.5.2.2. Sonikasyon Süresinin Belirlenmesi

Ultrason aracılı boyut küçültme uygulaması ile homojen boyut dağılımı ve yüksek stabiliteye sahip formülasyonlar üretilebilmektedir (Iurian ve ark. 2015). İnce film hidratasyon yöntemi ile üretilen formülasyonlara istenen partikül boyutu ve boyut dağılımının elde edilebilmesi için sonikasyon işlemi uygulanmıştır (Khadke ve ark. 2018). Transetozom formülasyonunlarının optimizasyonu kapsamında ikinci basamak olarak sonikasyon süresinin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Ön formülasyon çalışmaları sırasında etanol miktarının formülasyon oluşumunda önemli bir parametre olduğu görüldü. Bu nedenle formülasyonlara uygulanacak sonikasyonun süresi etanol içeriklerine dayalı olarak ve aynı şekilde partikül boyutu ve boyut dağılımı verileri dikkate alınarak optimize edildi. Seçilen formülasyonlarda sonikasyon süresi kademeli olarak arttırıldı. Sonikasyon gücü %35 amplitude olarak sabitlendi. Sonikasyon süresi

olarak 5-40 dk çalışıldı. Sonikasyon 2,5'er dakikalık setler şeklinde uygulandı. Setler arası 30'ar saniyelik dinlenme süresi verildi. Bu amaçla kullanılan farklı etanol oranlarına sahip model transetozom formülasyonları ile bileşen ve oranları Tablo 3-7'de verilmiştir.

Tablo 3-7: Sonikasyon süresinin optimizasyonunda kullanılan model transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit (mg)	Sürfaktan		Hidratasyon	
		Tür	(mg)	Etanol (%)	Sitrat Tamponu (%)
TEZ-T20-ST-30				30	70
TEZ-T20-ST-20	400	Tween 20	71	20	80
TEZ-T20-ST-10				10	90

Formülasyona fluvastatin %0,1 oranında yüklenmiştir.

3.2.5.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilite Çalışmaları

Ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak bileşen ve oranları belirlenen optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının fizikokimyasal karakterizasyonları yapıldı. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH ölçümleri gerçekleştirildi. Fizikokimyasal stabilite takipleri yapıldı.

3.2.5.3.1. Partikül Boyutu ve Boyut Dağılımının Belirlenmesi

Optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının partikül boyutu ve boyut dağılımı analizleri dinamik ışık saçılımı tekniği ile Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçümler 25 °C'de ve formülasyonlar seyreltilmeden gerçekleştirildi. Her formülasyon 3'er kez ölçüldü ve sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.5.3.2. pH Değerlerinin Belirlenmesi

Optimize formülasyonların pH ölçümleri dijital pH metre (Hanna Instruments, ABD) kullanılarak oda sıcaklığında ve her formülasyon 3'er kez olacak şekilde

gerçekleştirildi. Ölçümler öncesi cihaz kalibrasyonu pH 4, 7 ve 10 standartları ile gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.5.3.3. Stabilitenin Belirlenmesi

Optimize formülasyonların fizikokimyasal stabiliteleri buzdolabı koşullarında ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) 24 ay süre ile izlendi. Formülasyonların 15.gün, 1.ay, 3.ay, 6.ay, 12.ay ve 24.ay sonunda partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH'ları ölçülerek fiziksel stabiliteleri değerlendirildi.

3.2.5.4. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar ile diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla zeta potansiyel, iletkenlik, enkapsülasyon etkinliği ölçümleri gerçekleştirildi. Seçilmiş bir adet formülasyonun Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri alındı ve ATR-FTIR cihazı kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi.

3.2.5.4.1. Zeta Potansiyelin Belirlenmesi

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının zeta potansiyel ölçümleri elektroforetik ışık dağılımı tekniği ile Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçümler 25°C 'de ve formülasyonlar seyreltilmeden gerçekleştirildi. Örnekler kıvrımlı kapiler kuvetlere enjektör yardımı ile hava kabarcığı oluşturmada dikkatli bir şekilde dolduruldu. Her formülasyon 3'er kez ölçüldü ve sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.5.4.2. İletkenlik Belirlenmesi

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının iletkenlik ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçümler 25°C 'de ve formülasyonlar seyreltilmeden gerçekleştirildi. Her formülasyon 3'er kez ölçüldü ve sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.5.4.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarına yüklenen fluvastatin miktarı literatürde yer alan 2 farklı yöntem ile hesaplandı. Diyaliz yöntemi ve ultrafiltrasyon yöntemi aşağıda sırasıyla anlatılmaktadır.

Diyaliz Yöntemi

Transetozom ve transferzom formülasyonlarına yüklenebilen etkin madde miktarının hesaplanmasında literatürde geçen diğer bir yöntem olan diyaliz yöntemi kullanılmıştır (Berger ve ark. 2001; Li ve ark. 2016; Moya ve ark. 2019). Bu çalışma, formülasyona yüklenmeyen ilacın diyaliz membran (D9777-100FT, Sigma-Aldrich)'dan reseptör ortamına geçmesi sonucu yüklenen ilaç miktarının belirlenmesi esasına dayanır. Reseptör ortam olarak her bir formülasyon için kendi hidrasyon ortamları kullanıldı. Öncelikle diyaliz membran reseptör fazda 1 saat kadar bekletildi. Diyaliz tüplere 3'er ml formülasyon yerleştirildi ve diyaliz tüplerin iki ucu sıkıca kapatıldı. Beher içine 100'er ml reseptör faz ilave edildi. Diyaliz tüpler beher içerisine daldırıldı ve 140 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı yardımıyla 25 °C' de 24 saat boyunca karıştırıldı ve yüklenmeyen etkin maddenin uzaklaştırılması sağlandı. 24 saat sonunda diyaliz tüp içindeki formülasyondan 0.5 mL numune alınarak metanol ile 10 mL'ye tamamlandı ve sistemin yapısının bozulması sağlandı. Elde karışımlar 0,45 µm'lik membran filtreden süzüldü ve belirli oranda mobil faz ile seyreltilti. Fluvastatin sodyum miktarı Yöntem 3.2.3'de verilen HPLC yöntemi ile analiz edildi. Toplam ilaç konsantrasyonunu belirlemek için aynı şekilde 0.5 ml transetozomal süspansiyon önce metanol ile 10 mL'ye tamamlandı, membran filtreden süzüldü ve mobil faz ile seyreltilerek HPLC ile analiz edildi. Her formülasyon için çalışma 3 kez tekrarlandı. Formülasyonlara yüklenen etkin madde miktarı başlangıçta ilave edilen madde miktarına kıyasla hesaplandı.

Ultrafiltrasyon Yöntemi

Transetozom ve transferzom formülasyonlarına yüklenmeyen etkin madde miktarından hareketle enkapsülasyon etkinliğinin (%EE) belirlenebilmesi için filtre bölmesi bulunan özel santrifüj tüpleri (Sartorius Vivaspin 6, MWCO 10000) kullanıldı (Bal ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2016). Bu amaçla öncelikle yaklaşık 2 mL'lik örnekler tüplere yerleştirildi ve Swing Bucket tipi rotora sahip soğutmalı santrifüj cihazı (Centrifuge 5810R, Eppendorf™, Hamburg, Germany)

kullanılarak 25 °C’ de ve 3000 g’ de 90 dakika santrifüj edildi. Filtrattan alınan örnekler belirli oranlarda mobil faz ile seyreltilerek Yöntem 3.2.3’de verilen HPLC yöntemi ile analiz edildi ve yüklenmeyen ilaç miktarı hesaplandı. Toplam ilaç konsantrasyonunu belirlemek için ise 0.5 ml transetozomal süspansiyon önce metanol ile 10 mL’ye tamamlandı ve transtozomal sistemin yapısının bozulması sağlandı. Daha sonra mobil faz ile seyreltilerek HPLC ile analiz edildi. Her formülasyon için çalışma 3 kez tekrarlandı. Formülasyonlara yüklenen etkin madde miktarı başlangıçta ilave edilen madde miktarına kıyasla hesaplandı. % EE değeri aşağıdaki eşitlikten yararlanarak hesaplandı:

$$\%EE = (C_{\text{toplam}} - C_{\text{yüklenmeyen}}) / C_{\text{toplam}} \times 100$$

3.2.5.4.4. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Transetozom formülasyonlarının şekil ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve FEG (Alan Emisyon Tabancalı) taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. TEM analizi için dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20-4 kodlu formülasyon seçildi. Örnek karbon kaplı bir bakır grid üzerine ince bir film oluşturacak şekilde 10 µl ilave edildi ve bir süre bekledikten sonra sıvının fazlası filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı. Ardından %1’lik fosfotungustik asit çözeltisinden 10 µl ilave edilerek, aynı şekilde sıvının fazlası filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Son olarak bakır grid üzerindeki örnek 80 kV voltajda geçirimli elektron mikroskobu (Talos L120C, ThermoScientific, USA) kullanılarak görüntülendi. SEM analizi de TEZ-T20-4 kodlu formülasyon ile gerçekleştirildi. Bunun için geçirimli elektron mikroskobu ile incelenen örnek kullanıldı. Elektrostatik yük oluşumunu engellemek ve daha iyi görüntü alabilmek amacıyla örnek yüzeyi çok ince altın film ile kaplandı. Altın kaplanan örnek taramalı elektron mikroskobu (Quattro S ESEM, ThermoScientific, USA) ile görüntülendi.

3.2.5.4.5. ATR-FTIR Spektroskopi Analizi

Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan fosfolipit Phospholipon 90G ile çalışma için seçilen dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20-4 kodlu boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonlarının ATR-FTIR spektrofotometre (PerkinElmer ZnSe Spectrum 100) cihazı kullanılarak yapı analizleri Yöntem 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

3.2.5.5. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzom formülasyonlarının Yöntem 3.2.5.3 ve Yöntem 3.2.5.4'te anlatıldığı şekilde çalışılarak partikül boyutu, boyut dağılımı, pH, iletkenlik, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirildi.

3.2.5.6. *In Vitro* Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini

Fluvastatin sodyumun transetozom ve kontrol transferzom formülasyonlarından deriye penetrasyonunun değerlendirilebilmesi için tam kalınlıklı domuz derisi kullanılarak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan deri örneklerinin hazırlanması, *in vitro* dermal penetrasyon çalışması prosedürü ve prosedür optimizasyonu ile bant ile soyma yönteminin uygulanması aşağıda sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.5.6.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması

In vitro penetrasyon çalışmalarında yerel bir kesimevinden alınan tam kalınlıklı domuz derisinin dormal bölgesi kullanıldı. Domuz derisi kesildiği gün ve soğuk zincir ile taşınarak laboratuvara getirildi. Aynı gün derinin üst yüzeyi su ile temizlendi, kurulandı. Derideki kıllar cerrahi makas yardımı ile *stratum corneum* tabakasına zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı ve subkütan yağ tabakası çıkarıldı. Uygun boyuta getirilerek kullanılacakları zamana kadar -20 °C'de en fazla üç ay süre boyunca saklandı. Çalışma öncesi derin dondonrucudan çıkarılarak bir süre oda sıcaklığında sonrasında yarım saat reseptör ortamında bekletildi.

3.2.5.6.2. *In vitro* Dermal Penetrasyon Çalışması

In vitro dermal penetrasyon çalışmalarında 12 mL reseptör hacmi olan ve 1,77 cm² difüzyon alanına sahip Franz difüzyon hücreleri (PermeGear V6A Strirrer, Hellertown, ABD) kullanıldı. Reseptör faz olarak PBS pH 7,4 kullanıldı. Reseptör faz ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra difüzyon hücreleri reseptör faz ile dolduruldu ve sıcaklık 37 °C'ye ayarlandı. Çalışma boyunca 250 rpm'lik bir dönme hızı uygulandı. Her bir hücreye uygun boyutta birer manyetik balık konuldu. Domuz derileri *stratum corneum* tabakası üstte olacak şekilde hücrelerin donör ve reseptör faz

bölümleri arasına yerleştirildi. Kısaça sabitlendi. Reseptör fazda hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Donör faza her bir formülasyonardan 1'er mL otomatik pipet ile ilave edildi. Oklüzif koşul için donör fazın bulunduğu kısım çalışma süresinde parafilm ile sıkıca kapatıldı. Oklüzif olmayan koşul içinse bu kısım açık bırakıldı. İn vitro penetrasyon çalışmasına her bir formülasyon için 24 saat devam edildi ve en az 3 hücre ile çalışıldı.

3.2.5.6.3. *In vitro* Dermal Penetrasyon Çalışması Optimizasyonu

Bu çalışma kapsamında *in vitro* dermal penetrasyon çalışması sırasında uygulanan oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların dermal penetrasyon etkileri incelendi. Optimize edilen seçilmiş bir adet transetozom formülasyonundan fluvastatin sodyumun deriye penetrasyonu, oklüzyon uygulanmadan ve oklüzyon uygulanarak iki farklı koşulda değerlendirildi. Yöntem 3.2.5.6.4'de anlatıldığı şekilde çalışılarak, oklüzif ve oklüzif olmayan koşullar altında dermal tabakalarda biriken etkin madde miktarı hesaplandı. Bu çalışmanın sonucuna göre transetozom ve kontrol transferzom formülasyonlarına ait *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarının tamamının oklüzif koşullar altında mı yoksa oklüzif olmayan koşullarda mı gerçekleştirileceğine karar verildi.

3.2.5.6.4. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktarının Bant ile Soyma Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi

İn vitro penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakada biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edildi (Erdal ve ark. 2016). 24 saatlik sürenin sonunda franz difüzyon hücrelerinden alınan derilerin yüzeyindeki formülasyonun fazlası kağıt peçete yardımıyla uzaklaştırıldı. Penetre olmayan ve deri yüzeyinde kalan kısmın tam olarak uzaklaştırılabilmesi için ayrıca distile su geçirildi ve kağıt peçete ile baskı uygulanmadan kurulandı. Tape stripping yönteminin uygulanması sırasında kullanılacak yapışkan bantlar (Scotch® Book Tape) uygun boyutta kesilerek önceden hazırlandı. Deriler köpük levhalar üzerine *stratum corneum* tabakası üstte kalacak şekilde yerleştirildi. Her bir deri yüzeyin yapışkan bant uygulandı ve belirli bir süre belirli bir miktar basınç uygulanması sonrası bant deriden hızlıca çekildi ve ayrı olarak değerlendirilmek üzere tek başına bir tüpe alındı ve aynı deriye arda arda bu işlem 20 kez uygulandı ve bu kez bantlar 5'erli gruplar halinde tüplere yerleştirildi. Soyma işlemi tamamlandıktan sonra kalan deri çok küçük parçalar halinde kesilerek ayrı bir tüpe alındı. Her bir tüpe 5'er mL mobil faz ilave edilerek sıkıca kapatıldı.

Tüpler birer dakika vortekslelendikten sonra orbital çalkalayıcıya (IKA Shaker, Staufen, Almanya) yerleştirildi. Bant örneklerindeki fluvastatin sodyumun ekstraksiyonu için tüpler oda sıcaklığında, 250 rpm’de 12 saat boyunca çalkalandı. Ekstraksiyon işlemi sonrası ekstraksiyon sıvısı 0,45 µm por çapına sahip PTFE enjektör ucu membran filtreden süzüldü ve Yöntem 3.2.3’de belirtilen HPLC yöntemi ile fluvastatin sodyum miktarı analiz edildi.

3.2.5.7. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Yöntem 3.2.5.6.2’de belirtildiği şekilde yapılan *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası franz difüzyon hücrelerinden alınan ve yüzeyindeki fazla formülasyon Yöntem 3.2.5.6.4’de belirtildiği şekilde uzaklaştırılan deriler ATR-FTIR cihazı (Perkin Elmer Spectrum 100, Shelton, CT, USA) ile analiz edildi.

Deri numuneleri elmas-ZnSe kristalli ATR ünitesine sahip FTIR cihazının infrared spektroskopisi tablasına *stratum corneum* tabakası kristal ile temas edecek şekilde yerleştirildi. Deri üzerine cihazın kolu yardımıyla 60 N’luk sabit bir güç uygulandı. Analizler sonucu alınan her bir spektrum 4000-650 cm⁻¹ frekans aralığında ve 4 cm⁻¹ spektral çözünürlükte kaydedilen 40 taramanın birleşiminden oluşturuldu. Her formülasyon için çalışma 3 kez tekrarlandı. Herhangi bir uygulama yapılmayan bir adet deri numunesi yüzeyinden de spektrum alındı ve kontrol olarak kullanıldı. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinin alkil zincir düzeninde meydana gelen değişimler, deri lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2950 cm⁻¹) gerilme bantları incelenerek değerlendirildi. Analizlerde Perkin Elmer Spectrum (Version 6.0.2) yazılımı kullanıldı.

3.2.5.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi

Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla CLSM analizleri gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu ile çalışıldı. Bu analiz için öncelikle etkin maddeye benzer lipofilik özelliğe sahip floresan model madde Nil kırmızı yüklü (1µg/mL) formülasyonlar hazırlandı. Kontrol olarak ise nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu kullanıldı. Yöntem 3.2.5.6.2’de

belirtildiği şekilde yapılan *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deriler Franz difüzyon hücrelerinden alındı ve yüzeyindeki fazla formülasyon Yöntem 3.2.5.6.4'de belirtildiği şekilde uzaklaştırıldı. Her bir deri örneğinin penetrasyon gerçekleşen bölgesinden küçük parçalar alındı ve deri örnekleri doku gömme ortamı (TissueTek™ Cryo) içerisine yerleştirildi ve -25 °C'de donduruldu. Donmuş deri örneklerinden kriyotom cihazı (Leica CM 1850 UV) kullanılarak 20 µm kalınlıkta yatay ve dikey kesitler alındı. Derinin *stratum corneum* yüzeyinden başlayarak yatay olarak alınan her kesit dikkatlice sayıldı ve uzaklaştırılan doku ile deride inilen derinlik saptandı. Lam üzerine alınan dikey ve yatay (20 µm, 160 µm ve 400 µm derinliklerdeki) deri kesitleri HeNe diode lazer içeren CLSM cihazı (Leica TCS SPE) ile incelenerek model boya nil kırmızısının derideki birikimi ve lokalizasyonu görüntülendi. Nil kırmızısının sahip olduğu eksitasyon (543 nm) ve emisyon (630 nm) dalga boyları dikkate alınarak çalışıldı. Uygun objektif lensler kullanılarak 10X ve 4X büyütme ölçekleri uygulandı.

3.2.5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında dermal tabaklarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20 (TEZ-T20-4) ve TEZ-T80 (TEZ-T80-4) kodlu optimum transetozom formülasyonları ile *in vitro* sitotoksitesite çalışmaları ve devamında *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.5.9.1. Hücre Hatları

Çalışmalar kapsamında insan deri dokusundan izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (T0020001, AddexBio, USA) ile normal insan akciğer dokusundan izole edilen ve Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection, ATCC) temin edilen normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) kullanıldı.

3.2.5.9.2. Hücre Kültür Koşulları

Hücreler 75 cm²'lik hücre kültürü kaplarında (Corning), 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan hücre kültürü için ayrılmış inkübatörde (Thermo Scientific) büyütüldü. Normal insan fibroblast hücre hattı için %10 FBS (fetal bovin serum) (Gibco) ve %1 penisilin streptomisin (100 IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin) (Life Technologies) içeren besiyeri MEM (Gibco), insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) için %10 FBS (fetal bovin serum) (Gibco), %1 penisilin streptomisin (100

IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin) (Life Technologies) ve 2 mM sodyum piruvat (Life Technologies) içeren besiyeri DMEM (Life Technologies) büyüme ortamı olarak kullanıldı. Hücrelerin büyütüldüğü kaplarda hücre yoğunluğu yaklaşık % 80-85 oranına ulaştığında hücrelerin pasajı gerçekleştirildi.

3.2.5.9.3. *In Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

Sulforhodamin B (SRB) testi, 1990'da Skehan ve arkadaşları tarafından hücre bazlı çalışmalarda sitotoksositeyi incelemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Negatif yüklü pembe aminoksantin boyası olan Sulforhodamin B (SRB)'nin hücrelerde bazik amino asitler tarafından alınmasına dayanır. Hücresel protein içeriğinin ölçümüne dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılır (Skehan ve ark., 1990; Houghton ve ark. 2007; Vichai ve Kirtikara 2006).

Transetozom formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (T0020001, AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile değerlendirildi. HaCaT ile gerçekleştirilen çalışmalarda sitotoksik potansiyelin değerlendirilmesinin yanı sıra *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A (Recombinant Human IL-17A, Peprotech) ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi de amaçlandı.

Yöntem 3.2.5.9.2'de belirtilen hücre kültürü koşullarında büyütülen hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında tripsinize edilip sayıldı. Sitotoksosite deneyleri için 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara (Costar) ekildi. Ardından hücreler 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde (Thermo Scientific) inkübe edildi. Transetozomların Yöntem 3.2.5.9.2'de belirtilen tam büyüme ortamları (complete medium) ile seyreltilmiş farklı oranlardaki karışımları hazırlandı. Hücre büyüme kontrolü olarak besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak Triton X-100 (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Triton X-100, IL-17A ve fluvastatin sodyum'un DPBS (Gibco) ile önce stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra ise tam büyüme ortamı ile hesaplı miktarda seyreltildi ve hücrelere uygulanacak çözeltileri hazırlandı. 24 saatin sonunda hücreler bu farklı konsantrasyondaki örnekler ile muamele edildi ve 48 saat boyunca aynı koşullarda (37 °C, %5 CO₂) inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 48 saat inkübasyon sonunda hücrenin mevcut kültür ortamını uzaklaştırmaksızın plakadaki her bir kuyucuğa SRB kit

(ab235935 Sulforhodamine B Cell Cytotoxicity Assay Kit, abcam) içeriğinde yer alan fiksasyon çözeltisinden 50'şer µl ilave edildi ve plaka 4 °C dolabında (Kirsch) 1 saat boyunca bekletildi. Sürenin sonunda kuyulardaki tüm sıvı uzaklaştırıldı ve kuyucukların dibinde fikse olan hücre tabakasına zarar vermeden 3 kez 200'er µl distile su ile nazikçe yıkandı. Yıkamanın ardından kuyucuklarda artakalan suyun giderilmesi için 30 dk 45-50°C etüvde (Thermo Scientific) kurutuldu. Kurutulan plakadaki tüm kuyuculara 45 µl SRB çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında ışıksız ortamda 15 dk bekletildi. Sürenin sonunda boya çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 4 kez 200'er µl yıkama çözeltisi ile nazikçe yıkandı. Plaka tamamen kuruduktan sonra her bir kuyuya boyanın çözünmesi için 200'er µl çözündürme sıvısı ilave edildi. Orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında (IKA MS 3) 10 dk boyunca çalkalandı. Sürenin sonunda absorbans ELISA mikrolaka okuyucu (PowerWave XS2, BioTek) kullanılarak 565 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hücrelerin canlılık oranları tespit edildi. Çalışmalar iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.5.9.4. *In Vitro* Antipsoriyatik Aktivite Çalışmaları

In vitro antipsoriyatik aktivite çalışmaları psöriyatik epidermal keratinositlerin hiperproliferatif ve bozulmuş farklılaşmasını taklit eden bir hücre hattı olan insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (Breitkreutz ve ark. 1991) kullanılarak gerçekleştirildi. Transetozom formülasyonlarının *in vitro* antipsöriyatik etkinlikleri; hücre kültür ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarının ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile değerlendirildi.

Yöntem 3.2.5.9.3'de anlatılan *in vitro* sitotoksikite çalışması çalışması sonucu *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmasında hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlendi. Bu konsantrasyonlar kullanılarak *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Antipsoriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında; IL-17A, serbest haldeki fluvastatin sodyum ve boş ve etkin madde yüklü transetozomların tek başına hücrelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Ayrıca IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücrelere serbest haldeki fluvastatin sodyum, boş ve etkin

madde yüklü transetozomlar ayrı ayrı uygulanarak antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi.

Yöntem 3.2.5.9.2’de belirtilen kültür koşullarında büyütülen hücreler uygun sayıda elde edildikten sonra tripsinize edilip sayıldı. Sayılan hücreler 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve hücrelerin tutunması için 24 saat 37°C ’de ve %5 CO_2 ’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Yukarıda belirtilen ve antipsoriyatik aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan örnekler hücreye uygulanmadan önce Yöntem 3.2.5.9.2’de belirtilen tam büyüme ortamı (complete medium) ile hesaplı miktarda seyreltildi. 24 saatin sonunda hücreler bu çözeltiler ile tedavi edildi ve 48 saat aynı koşullarda inkübatörde bekletildi. 48 saat inkübasyon sonrası kuyucuklarda yüzen hücreleri dibe çöktürmek için 96 kuyucuklu plakalar oda sıcaklığında ve 1400 rpm’de 1 dk santrifüj (SL16, Thermo Scientific) edildi. Her bir kuyucuktaki süpernatant mikropipet yardımıyla kuyucuk dibine değmeden dikkatlice temiz tüplere aktarıldı ve buz üzerine alındı. Daha sonra kullanılacak numuneler ise bölünerek -80°C dolabında (GFL) saklandı. Hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarlarının belirlenebilmesi için IL-6 (Invitrogen, Human IL-6 ELISA kit, EH2IL6, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria) ve IL-8 (Invitrogen, Human IL-8 ELISA kit, KHC0081, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria) ELISA kitleri kullanıldı. Her bir ELISA kiti ile prosedürüne uygun olarak çalışıldı.

IL-6 kitinin uygulanması;

IL-6 ELISA kit (Invitrogen, Human IL-6 ELISA kit, EH2IL6, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria) içeriğinde yer alan liyofilize haldeki standart distile su ile çözündürülerek stok çözelti (1000 pg/mL) hazırlandı. Bu stok çözeltilerden tam kültür ortamı kullanılarak seri seyreltme işlemi yapıldı ve 400, 160, 64, 25.6, 10.24 ve 0 pg/mL’lik konsantrasyonlarda IL-6 içeren standartlar hazırlandı ve buz üzerinde muhafaza edildi. ELISA kit içeriğinde yer alan 96 kuyucuklu plakadaki analiz yapılacak her bir kuyuya 50 μL biyotinlenmiş antikor reaktifi ilave edildi. Daha sonra sırasıyla her bir kuyuya 50 μL standart veya test çözeltisi ilave edildi. Plaka kit içeriğinde yer alan yapışkan bant ile sıkıca kapatıldı. Oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. 2 saatlik sürenin sonunda yapışkan bant dikkatlice kaldırıldı ve kuyucuklar 3 kez 200’er μL ’lik yıkama çözeltisi ile nazikçe yıkandı. Yıkamanın ardından her bir kuyuya

bu kez 100'er μL Streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Plaka yapışkan bant ile sıkıca kapatıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yapışkan bant dikkatlice kaldırıldı ve 3 kez 200'er μL 'lik yıkama çözeltisi ile nazikçe yıkandı. Her bir kuyuya TMB substrat çözeltisi ilave edildi. Renk reaksiyonunun oluşması için oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk bekletildi. Verilen sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak için her bir kuyuya 100'er μL stop çözeltisi ilave edildi ve 30 dk içinde absorbans ELISA mikroparka okuyucu kullanılarak 450 nm ve 550 nm dalga boylarında ölçüldü. Her bir numune için 450 nm deki değerlerden 550 nm absorbans değerleri çıkarılarak çalışıldı. Standart absorbansları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve her bir numunedeki IL-6 miktarları kantitatif olarak tayin edildi. Çalışmalar iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

IL-8 ELISA kitinin uygulanması;

IL-8 ELISA kit (Invitrogen, Human IL-8 ELISA kit, KHC0081, Bender MedSystems GmbH, Thermofisher, Austria) içeriğinde yer alan liyofilize haldeki standart şişe üzerinde yazan miktar kadar standart dilüsyon tamponu ile çözündürülerek stok çözelti (1000 pg/mL) hazırlandı. Bu stok çözeltiden aynı tampon kullanılarak seri seyreltme işlemi yapıldı ve 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 0 pg/mL'lik konsantrasyonlarda IL-8 içeren standartlar hazırlandı ve buz üzerinde muhafaza edildi. ELISA kit içeriğinde yer alan 96 kuyucuklu plakadaki analiz yapılacak her bir kuyuya sırasıyla 50 μL standart veya test çözeltisi ilave edildi. İki adet kuyu kromojen kontrol olarak kullanıldı. Bu kuyulara herhangi bir çözelti ilave edilmedi. Daha sonra kromojen kontrol hariç her kuyuya 50'er μL IL-8 biotin kojugat çözeltisi ilave edildi. Plaka kit içeriğinde yer alan yapışkan bant ile sıkıca kapatıldı. Oda sıcaklığında 1 buçuk saat inkübe edildi. Sürenin sonunda yapışkan bant dikkatlice kaldırıldı ve kuyucuklar 4 kez 200'er μL 'lik yıkama çözeltisi ile nazikçe yıkandı. Yıkamanın sonunda her bir kuyuya bu kez 100'er μL Streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Aynı şekilde kromojen kontrol kuyularına ilave yapılmadı. Plaka yapışkan bant ile sıkıca kapatıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yapışkan bant dikkatlice kaldırıldı ve 3 kez 200'er μL 'lik yıkama çözeltisi ile nazikçe yıkandı. Her bir kuyuya stabilize kromojen ilave edildi. Renk reaksiyonunun oluşması için oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk bekletildi. Verilen sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak için her bir kuyuya 100'er μL stop çözeltisi ilave edildi ve 30 dk içinde absorbans ELISA

mikroplaka okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü ve kromojen kontrol absorbans değerinden çıkarılarak çalışıldı. Standart absorbansları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve her bir numunedeki IL-8 miktarları kantitatif olarak tayin edildi. Çalışmalar iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistem (NLC) Formülasyon Çalışmaları

Fluvastatin sodyum'un NLC ve kontrol formülasyonları olarak nanoemülsiyon tipi lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Her iki formülasyon tipi için çalışmalar birlikte yürütülmüştür. Çalışmalar kapsamında öncelikle NLC ve nanoemülsiyonların hazırlama yöntemi, formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesi için yapılan ön formülasyon çalışmaları ve etkin maddenin formülasyona yüklenebilmesi ve istenen partikül boyutu ve boyut dağılımı değerlerine sahip formülasyonların hazırlanması için yapılan optimizasyon çalışmaları yer almaktadır. Optimize formülasyonlar belirlendikten sonra bu formülasyonların karakterizasyonları ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilecek formülasyonlara karar verilmiştir. Seçilen formülasyonlar ile gerçekleştirilen diğer karakterizasyon çalışmalarından sonra *in vitro* dermal penetrasyon çalışmaları, ATR-FTIR çalışmaları, konfokal ve floresan mikroskop çalışmaları ve son olarak hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm bu çalışmalar aşağıda başlıklar halinde sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.6.1. NLC Formülasyonlarının Hazırlanması

NLC Formülasyonları emülsifikasyon-ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı (Zhang ve ark. 2013; Yu ve ark. 2017). Formülasyon bileşenleri olarak katı lipit, sıvı lipit, sürfaktanlar gibi yardımcı maddeler kullanıldı. Ön emülsiyonu oluşturmak için sulu faz ve lipit faz ayrı ayrı hazırlandı. İlk olarak katı ve sıvı lipit karışımı tartıldı ve sıcaklığı 70-80 °C' ye (katı lipit erime derecesinin yaklaşık 5-10 °C üstüne) kadar ısıtıldı. Sulu faz ise sürfaktanın sulu fazda çözündürülmesi ile elde edildi ve lipit faz ile aynı sıcaklığa getirildi. Sulu faz lipit-etkin madde karışımına 1000 rpm 'de karıştırılarak damla damla ilave edildi. Bu sırada sistem sıcaklığı 70-80 °C'de sabit tutuldu. Ön emülsiyon hazırlandıktan sonra karışım bir süre daha aynı sıcaklıkta karıştırıldı ve sonra 4 °C'de sulu dispersiyon ortamında dağıtıldı. Daha sonra karışıma bir ultrasonik prob (Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap) ile sonikasyon işlemi

uygulanarak nanoyapılı lipit taşıyıcı sistem süspansiyonunun homojen olması ve nano boyuta gelmesi sağlandı. Son olarak sistem önce buz banyosunda daha sonra ise buzdolabında bekletildi. NLC formülasyonlarının etkinliğini karşılaştırmak için kontrol amaçlı olarak nanoemülsiyon tipi taşıyıcı sistemler de geliştirildi. Bu sistemler de aynı yöntemle ancak ısıtma işlemi uygulamadan hazırlandı.

3.2.6.2. NLC Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında öncelikli olarak formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesi hedeflendi. Bir sonraki aşamada NLC'lere fluvastatin sodyum'un yüklenmesi ve uygun partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımına sahip, etkin madde yüklü formülasyonların hazırlanması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Optimum formülasyonların belirlenmesinde formülasyon bileşenleri dışında hazırlama parametrelerinin de etkili olduğu göz önünde bulundurularak ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. Çalışmalara etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlanması ile başlandı. Uygun olduğu düşünülen formülasyonlara etkin madde yüklenenerek görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisi değerlendirildi. Tüm NLC formülasyonları transetozom optimizasyon çalışmaları sonunda kullanılmasına karar verilen pH 3 sitrat tamponu ile hazırlandı. Ön formülasyon çalışmalarında sonikasyon gücü %35 amplitude ve sonikasyon süresi 10 dk olarak sabitlendi. Formülasyonlar Yöntem 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Tablo 3-8' de verilen formülasyon bileşen ve oranları kullanılarak çalışmalara başlandı.

Tablo 3-8: NLC ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon bileşenleri ve kullanılan miktar ve oranlar

Formülasyon bileşenleri	Kullanılan miktar ve oranlar
Katı lipit	
Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5	250 - 350 mg (a/a)
Sıvı Lipit	
Capryol 90, Labrafac TM Lipophile WL 1349, Labrafac TM PG, oleik asit, izopropil miristat	150 - 250 mg (a/a)
Sürfaktanlar	
Tween 80, Tween 20, Span 20, Span 80, Span 85, Kolliphor EL, Kolliphor RH40, Kolliphor HS15, Gelucire 44/14, Gelucire 48/16, Sodyum kolat hidrat	750 - 333 mg
Sürfaktan oranları	1:2, 2:1, 1:1
Katı Lipit: Sıvı Lipit oranları	70:30, 60:40, 50:50

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan etkin madde içermeyen formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-9’da gösterildi. İlk denenen NLC formülasyonları tek sürfaktan kullanıldı. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi.

Tablo 3-9: Etkin madde içermeyen ve tek sürfaktan ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipit (Compritol 888 ATO) (mg)	Sıvı Lipit (Capryol 90) (mg)	Sürfaktan	
			Tür	(mg)
NLC-CC90-KEL-7,5	250	250	Kolliphor EL	750
NLC-CC90-KEL-5	250	250	Kolliphor EL	500
NLC-CC90-KEL-3,33	250	250	Kolliphor EL	333
NLC-CC90-T20-7,5	250	250	Tween 20	750
NLC-CC90-T20-5	250	250	Tween 20	500
NLC-CC90-T20-3,33	250	250	Tween 20	333
NLC-CC90-T80-7,5	250	250	Tween 80	750
NLC-CC90-T80-5	250	250	Tween 80	500
NLC-CC90-T80-3,33	250	250	Tween 80	333
NLC-CC90-CA25-7,5	250	250	Cremophor A25	750
NLC-CC90-CA25-5	250	250	Cremophor A25	500
NLC-CC90-CA25-3,33	250	250	Cremophor A25	333
NLC-CC90-G44/14-7,5	250	250	Gelucire 44/14	750
NLC-CC90-G44/14-5	250	250	Gelucire 44/14	500
NLC-CC90-G44/14-3,33	250	250	Gelucire 44/14	333
NLC-CC90-KHS15-7,5	250	250	Kolliphor HS 15	750
NLC-CC90-KHS15-5	250	250	Kolliphor HS 15	500
NLC-CC90-KHS15-3,33	250	250	Kolliphor HS 15	333
NLC-CC90-KP188-5	250	250	Kolliphor P 188	500
NLC-CC90-KP188-3,33	250	250	Kolliphor P 188	333
NLC-CC90-KRH40-7,5	250	250	Kolliphor RH 40	750
NLC-CC90-KRH40-5	250	250	Kolliphor RH 40	500
NLC-CC90-KRH40-3,33	250	250	Kolliphor RH 40	333

Uygun olduğu düşünülen formülasyonların iyileştirilmesi için iki farklı sürfaktan ile çalışmalara devam edildi ve bu formülasyonlar ile bileşen ve oranları Tablo 3-10’de belirtildi. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi.

Tablo 3-10: Etkin madde içermeyen ve iki farklı sürfaktan ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipit (Compritol 888 ATO) (mg)	Sıvı Lipit (Capryol 90) (mg)	Sürfaktan 1		Sürfaktan 2	
			Tür	(mg)	Tür	(mg)
NLC-CC90-T80CA25-7,5	250	250	Tween 80	250	Cremophor A25	500
NLC-CC90-T80CA25-5	250	250	Tween 80	167	Cremophor A25	333
NLC-CC90-T80CA25-3,33	250	250	Tween 80	111	Cremophor A25	222
NLC-CC90-T20CA25-7,5	250	250	Tween 20	250	Cremophor A25	500
NLC-CC90-T20CA25-5	250	250	Tween 20	167	Cremophor A25	333
NLC-CC90-T20CA25-3,33	250	250	Tween 20	111	Cremophor A25	222
NLC-CC90-KELCA25-7,5	250	250	Kolliphor EL	250	Cremophor A25	500
NLC-CC90-KELCA25-5	250	250	Kolliphor EL	167	Cremophor A25	333
NLC-CC90-KELCA25-3,33	250	250	Kolliphor EL	111	Cremophor A25	222
NLC-CC90-T20KP188-7,5	250	250	Tween 20	250	Kolliphor P 188	500
NLC-CC90-T20KP188-5	250	250	Tween 20	167	Kolliphor P 188	333
NLC-CC90-T20KP188-3,33	250	250	Tween 20	111	Kolliphor P 188	222

Uygun olduğu düşünülen formülasyonlardan hareketle farklı katı yağlar ve sıvı yağların denendiği formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-11’de verildi.

Tablo 3-11: Etkin madde içermeyen ve farklı katı ve sıvı lipidler ile hazırlanan formülasyonların bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipid		Sıvı lipid		Sürfaktan 1 (Tween 20) (mg)	Sürfaktan 2 (Cremophor A25) (mg)
	Tür	(mg)	Tür	(mg)		
NLC-PC90-T20CA25-7,5	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	250	500
NLC-PC90-T20CA25-5	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	167	333
NLC-PC90-T20CA25-3,33	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	111	222
NLC-PC90-T80CA25-7,5	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	250	500
NLC-PC90-T80CA25-5	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	167	333
NLC-PC90-T80CA25-3,33	Precirol ATO 5	250	Capryol 90	250	111	222
NLC-CLFCC-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Lauroglycol FCC	250	167	333
NLC-CL90-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Lauroglycol 90	250	167	333
NLC-CPO-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Plurol Oleique CC 497	250	167	333
NLC-CLM-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Labrafil M 2125 CS	250	167	333
NLC-CLPG-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Labrafac PG	250	167	333
NLC-CLL-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Labrafac lipophile WL 1349	250	167	333
NLC-CIPM-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	İzopropil Miristat	250	167	333
NLC-COA-T20CA25-5	Compritol 888 ATO	250	Oleik asit	250	167	333

Hazırlanan bu yeni formülasyonlar da aynı şekilde görsel olarak ve partikül boyutu ve dağılımları açısından değerlendirildi. Yukarıda sırasıyla uygulanan tüm çalışmalar göz önünde bulundurularak uygun olduğu düşünülen formülasyonlar

belirlendi. Etkin madde yüklenerek tekrar hazırlandı ve değerlendirildi. Ön formülasyon çalışmaları ile formülasyon bileşen ve oranlarına karar verildi.

NLC formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında ise sırasıyla yüksek devirli homojenizatör kullanımının etkisi ve sonikasyon güç ve süresinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Uygun partikül boyutu ve boyut dağılımına sahip formülasyonlar elde edilebilmesi hedeflendi. Optimizasyon çalışmalarında Tablo 3-10'da bileşen ve oranları verilen NLC-CC90-T20CA25-5 kodlu NLC formülasyonu kullanıldı.

NLC formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ilk olarak yüksek devirli homojenizatör kullanımının etkisi incelendi. Formülasyonlar tek başına sonikasyon ile, tek başına yüksek devirli homojenizatör kullanılarak ve bu iki yöntem birlikte uygulanarak hazırlandı. Yüksek devirli homojenizatör 20.000 rpm'de 3 dk boyunca uygulandı. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak yanı sıra partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi.

NLC formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında ikincil olarak sonikasyon güç ve süresinin optimizasyonu gerçekleştirildi. Sonikasyon gücü olarak %35 ve %50 amplitude değerleri ve sonikasyon süresi olarak 5-20 dk çalışıldı. Sonikasyon 2,5'er dakikalık setler şeklinde uygulandı. Setler arası 30'ar saniyelik dinlenme süresi verildi. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak yanı sıra partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi.

3.2.6.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilite Çalışmaları

Ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak bileşen ve oranları belirlenen optimize fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının fizikokimyasal karakterizasyonları yapıldı. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH ölçümleri ve fizikokimyasal stabilite takipleri Yöntem 3.2.5.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Partikül boyutu ve boyut dağılımının incelendiği karakterizasyon çalışmalarında transetozomlardan farklı olarak NLC'ler 10 kat seyreltilerek ölçüm alındı.

3.2.6.4. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar ile diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla zeta potansiyel, iletkenlik, enkapsülasyon etkinliği ölçümleri gerçekleştirildi. Seçilen iki adet formülasyonun DSC ve ATR-FTIR cihazı kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi.

3.2.6.4.1. Zeta Potansiyel, İletkenlik, Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi ve ATR-FTIR Analizleri

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının Yöntem 3.2.5.4'de anlatıldığı şekilde çalışarak zeta potansiyel, iletkenlik, enkapsülasyon etkinliği değerlendirildi. Zeta potansiyel ve iletkenliğin incelendiği karakterizasyon çalışmalarında transetozomlardan farklı olarak NLC'ler 10 kat seyreltilerek ölçüm alındı. Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan katı lipit Compritol 888 ATO ile çalışma için seçilen NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonlarının ATR-FTIR spektrofotometre (PerkinElmer ZnSe Spectrum 100) cihazı kullanılarak yapı analizleri Yöntem 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

3.2.6.4.2. DSC Analizi

Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan katı lipit Compritol 888 ATO ile çalışma için seçilen NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonlarının DSC analizleri yapılarak termal davranışları değerlendirildi ve formülasyon karakterizasyonu gerçekleştirildi. Boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları ölçüm öncesi -35 °C'de 48 boyunca liyofilizatörde (Virtis, SP Industries, ABD) kurutuldu ve toz haline gelmesi sağlandı. Ölçümler TA Instruments-DSC 250 cihazı kullanılarak alüminyum plaklar üzerinde, 10-300 °C sıcaklık aralığında, 10 °C/dk sıcaklık artışı ve 20 ml/dk azot akış hızında ve referans olarak boş alüminyum plaklar kullanılarak alındı.

3.2.6.5. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Optimizasyonu

NLC formülasyonlarının dermal penetasyon çalışmaları ve deri lipitleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının

hazırlanması amaçlandı. Uygun boyut ve boyut dağılımına sahip formülasyonların elde edilebilmesi için öncelikle hazırlama parametreleri optimize edildi. Optimizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek üzere hazırlanan fluvastatin yüklü SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-12’de verildi. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül/damlacık boyutu ve dağılımları açısından değerlendirildi.

Tablo 3-12: Kontrol amaçlı hazırlanan model SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipit (Compritol 888 ATO) (mg)	Sıvı lipit (Capryol 90) (mg)	Sürfaktan 1 (Tür, mg)	Sürfaktan 2 (Cremophor A25) (mg)
SLN-C-T20CA25-5	500	-	Tween 20 167	333
SLN-C-T80CA25-5	500	-	Tween 80 167	333
NE-C90-T20CA25-5	-	500	Tween 20 167	333
NE-C90-T80CA25-5	-	500	Tween 80 167	333

SLN formülasyonları ilk olarak NLC’ler ile aynı şekilde hazırlanmış ve aynı sonikasyon güç ve süreleri uygulandı. Ancak uygun formülasyonlar elde edilememesi üzerine yüksek devirli homojenizatör kullanımının ve sonikasyon güç ve süresinin formülasyon karakterizasyonu üzerine etkileri Yöntem 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde çalışılarak değerlendirildi.

Kontrol amaçlı kullanılması planlanan bir diğer formülasyon olan nanoemülsiyon formülasyonları da NLC’ler ile aynı şekilde hazırlanmış ve aynı sonikasyon güç ve süreleri uygulanmıştır. Uygun boyut ve boyut dağılımları elde edildiği için yüksek devirli homojenizatör kullanımının ve sonikasyon güç ve süresinin etkisi nanoemülsiyonlar için ayrıca incelenmemiştir.

3.2.6.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyon formülasyonlarının Yöntem 3.2.5.3 ve Yöntem 3.2.5.4’te anlatıldığı şekilde çalışılarak

partikül boyutu, boyut dağılımı, pH, iletkenlik, zeta potansiyel ve yükleme etkinliği değerlendirildi. NLC'ler de olduğu gibi nanoemülsiyonlar için de partikül boyutu, boyut dağılımı, iletkenlik ve zeta potansiyel ölçümleri öncesi formülasyonlara 10 katlık bir seyreltme işlemi uygulandı.

3.2.6.7. *İn Vitro* Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini

Fluvastatin sodyum yüklü seçilen tüm NLC ve kontrol amaçlı hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları ve dermal tabakarda etkin madde miktar tayini analizleri Yöntem 3.2.5.6'de anlatıldığı şekilde çalışılarak incelendi. Transetozom formülasyonlarında olduğu gibi NLC formülasyonları için de oklüzif koşulların dermal penetrasyona etkisi etkin madde miktar tayini ve ATR-FTIR analizleri ile değerlendirildi.

3.2.6.8. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Fluvastatin sodyum yüklü seçilen tüm NLC ve kontrol amaçlı hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının ATR-FTIR analizi ile deri lipitleri üzerine etkileri Yöntem 3.2.5.7'de anlatıldığı şekilde çalışılarak değerlendirildi.

3.2.6.9. Floresan Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi

Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla Yöntem 3.2.5.8'da anlatıldığı şekilde CLSM analizleri gerçekleştirildi. NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu ile çalışıldı. Aynı formülasyonlar ile floresan mikroskop görüntüleme işlemi de yapıldı. Floresan görüntüleme için I3 floresan filtre küpü kullanıldı.

3.2.6.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında NLC-T20 (NLC-T20-1) ve NLC-T80 (NLC-T80-1) kodlu optimum NLC formülasyonları ile *in vitro* sitotoksikite çalışmaları ve devamında *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları ve hücre kültürü koşulları sırasıyla Yöntem 3.2.5.9.1'de ve Yöntem 3.2.5.9.2'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

3.2.6.10.1. *İn Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

NLC formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile Yöntem 3.2.5.9.3’de belirtildiği şekilde çalışılarak değerlendirildi. Ayrıca insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (AddexBio, USA) ile gerçekleştirilen çalışmalarda *in vitro* sitotoksik potansiyelin değerlendirilmesinin yanı sıra, *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amaçlandı.

3.2.6.10.2. *İn Vitro* Antipsoriyatik Aktivitenin Değerlendirilmesi

NLC formülasyonlarının *in vitro* antipsoriyatik etkinlikleri; Yöntem 3.2.5.9.4’de belirtildiği şekilde çalışılarak ve hücre kültürü ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarının ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile değerlendirildi. Antipsoriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında öncelikle; IL-17A, serbest haldeki fluvastatin sodyum ve boş ve etkin madde yüklü NLC’ler tek başına hücrelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Daha sonra ise IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücrelere serbest haldeki fluvastatin sodyum, boş ve etkin madde yüklü NLC’ler ayrı ayrı uygulanarak antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi.

3.2.7. Transetozom ve NLC’lerin Jel Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar

Transetozom ve NLC formülasyonlarından fluvastatin sodyumun *in vitro* deriye penetrasyonu çalışması sonrası dermal tabakalarda en yüksek birikimini sağlayan ikişer adet formülasyon seçilmiş ve bu iki farklı nanotaşıyıcı sistemi içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların önce karakterizasyon çalışmaları daha sonra da sırasıyla *in vitro* dermal penetrasyon ve ATR-FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu çalışmalar aşağıda başlıklar halinde anlatılmaktadır

3.2.7.1. Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Transetozom ve NLC formülasyonlarının jel sistemlerinin hazırlanabilmesi için farklı jelleştirme ajanları kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Transetozom ve NLC formülasyonlarının jel sistemlerinin hazırlanabilmesi için kullanılacak jelleştirici

ajanın hazırladığımız formülasyonların pH'sında (yaklaşık 3-3,5 arası değişen) stabil olması ve yine bu pH'da jel oluşturabilme özelliğine sahip olması durumları göz önüne alınarak seçilmesi gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında yapılan ön denemelerde çeşitli jelleştirici ajanlar (sodyum aljinat, HPMC, HPC, ksantan zmkı, pluronic vb.) incelenmiş ve ksantan zmkı ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonları hazırlanırken ilk olarak transetozom ve NLC dispersiyonları hesaplı miktarda tartıldı. Daha sonra üzerine jelleştirici ajan ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde düşük devirde karıştırılarak bir gece oda sıcaklığında şişmesi sağlandı. Farklı oranlarda jelleştirici ajan içeren sistemler hazırlandı. Hazırlanan jel sistemlerin uygunluğu görsel olarak değerlendirildi ve yüzde % 2,5 (a/h) oranında ksantan zmkı kullanılmasına karar verildi.

3.2.7.2. Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında pH ölçümleri yapıldı, reolojik özellikleri ve mekanik özellikleri incelendi. Yapılan çalışmalar aşağıda sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.7.2.1. pH Değerlerinin İncelenmesi

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının pH ölçümleri dijital pH metre yardımıyla Yöntem 3.2.5.3.2'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.7.2.2. Reolojik özelliklerinin değerlendirilmesi

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının reolojik özellikleri Haake RheoStress 1 reometre cihazı ile kullanılarak incelendi. Analizlerde 35 mm çap ve 1° açılı plaka sistemi (gap 0,053 mm) kullanıldı ve ölçümler $25 \pm 0,2$ °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.

3.2.7.2.2.1. Kayma Gerilimi ve Kayma Hızı Testleri

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının akış özelliklerinin incelenmesi kayma gerilimi ve kayma hızı testleri ile gerçekleştirildi. $0,00 \text{ s}^{-1}$ 'den 200 s^{-1} 'e kadar değişen kayma hızında ve $25 \pm 0,2$ °C sabit sıcaklıkta 120 saniye süre ile kayma gerilimi değerleri hesaplandı. Değişen kayma hızına (τ) karşı ölçülen kayma gerilimi (γ) ve viskozite (η) değerleri grafiğe geçirilerek farklı akış modelleri için hesaplama yapıldı. Formülasyonların hangi akış modeline uygun davrandığı tespit edildi. Ölçümler her örnek için en az 3 kez tekrarlandı.

3.2.7.2.2. Osilasyon Testleri

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının viskoelastik özelliklerinin incelenmesi kapsamında iki aşamalı osilasyon testleri gerçekleştirildi. İlk olarak genlik taraması yapılarak linear viskoelastik bölge belirlendi. Kayma gerilimi genliği testi $25 \pm 0,2$ °C’de, 0,1592 Hz sabit frekansta (5 rad/s) yapıldı. Linear viskoelastik bölgede seçilen bir genlik değeri kullanılarak çalışmanın ikinci kısmı olan frekans taraması testi aynı sıcaklık koşullarında 0.1-100 Hz aralığında gerçekleştirildi. G' (elastik modül), G'' (viskoz modül) ve $\tan \delta$ (G''/G') değerleri hesaplandı. Ölçümler her bir formülasyon için 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri ile verildi.

3.2.7.2.3. Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının mekanik özellikleri (adezyon, kohezyon, sertlik ve sıkıştırılabilirlik) Brookfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak incelendi. 12,7 mm çapında silindirik analitik prob (TA5), 10 g örneğe 15 saniye zaman aralığında iki kez, belirlenen derinliğe (10 mm), belirlenen hızda (2,0 mm/saniye) ve 0,01 N başlatıcı kuvvet ile daldırıldı. Ölçümler 25 °C’de 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Güç-zaman eğrisi yoluyla jellerin sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği ve kohezifliği hesaplandı.

3.2.7.2.4. Yayılabilirliğin Değerlendirilmesi

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının yayılabilirliği Brookfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak incelendi. Analizlerde alt ve üst koniden (TA-SF) oluşan sistem kullanıldı ve ölçümler $25 \pm 0,2$ °C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Numune alt koniye dolduruldu ve hava kalmayacak şekilde yüzeyi düzleştirildi. Üst koni örneğe 1 mm/s' lik test hızında 10 mm derinliğe kadar nüfuz etti. Belirlenen mesafeye ulaştığında prob 1 mm/s hızla örnekten geri çekildi. Güç-zaman eğrisi yoluyla jellerin yayılabilirliği hesaplandı. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.7.3. *In Vitro* Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayini

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları ve dermal tabakarda etkin madde miktar tayini analizleri Yöntem 3.2.5.6’de anlatıldığı şekilde çalışılarak incelendi. Çalışma transetozomlarda ve NLC’ler de olduğu gibi oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirildi.

3.2.7.4. ATR-FTIR Analizi ile Nanotaşıyıcı İçeren Jel Formülasyonlarının Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

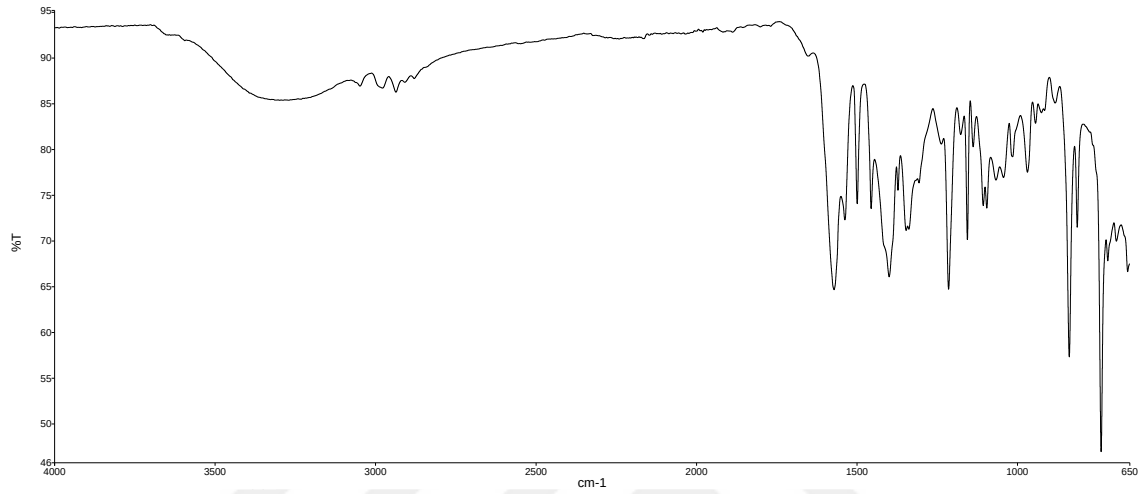
Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının ATR-FTIR analizi ile deri lipitleri üzerine etkileri Yöntem 3.2.5.7’de anlatıldığı şekilde çalışılarak değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Fluvastatin Sodyum'un Infrared (IR) spektrumu

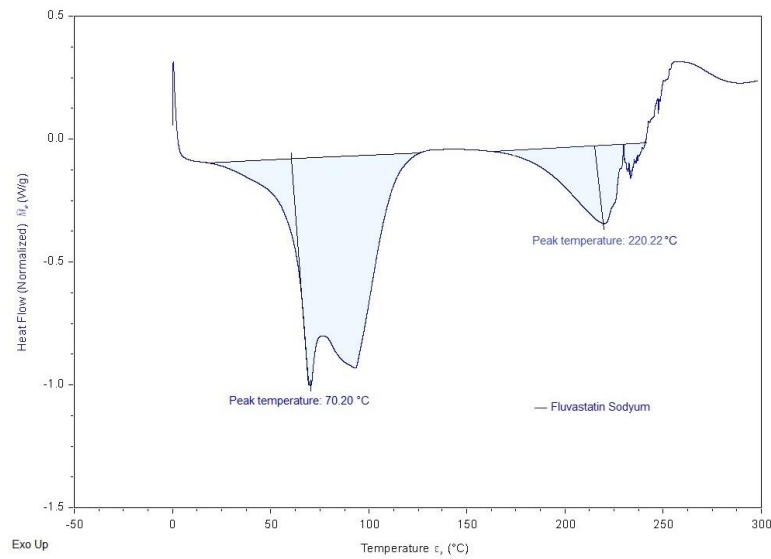
Yöntem 3.2.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen fluvastatin sodyum'a ait FT-IR spektrumu Şekil 4-1'de verildi.



Şekil 4-1: Fluvastatin Sodyum'a ait ATR-FTIR spektrumu

4.2. Fluvastatin Sodyum'un DSC Termogramı

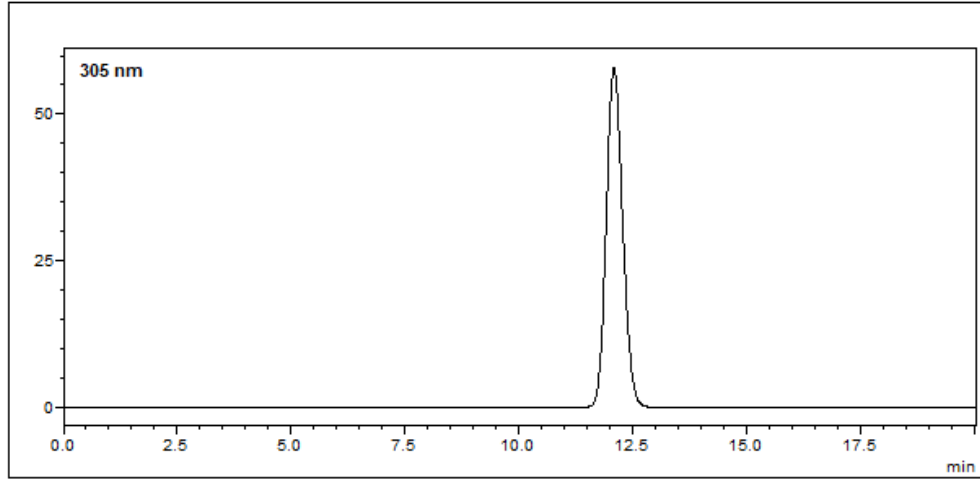
Yöntem 3.2.2'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen fluvastatin sodyum'a ait DSC termogramı Şekil 4-2'de verildi.



Şekil 4-2: Fluvastatin Sodyum'a ait DSC termogramı

4.3. Fluvastatin Sodyum'un HPLC Miktar Tayini Yöntemi

Yöntem 3.2.3'te belirtilen miktar tayini yöntemi kullanılarak elde edilen fluvastatin sodyuma ait HPLC kromatogramı Şekil 4-3'te verildi.

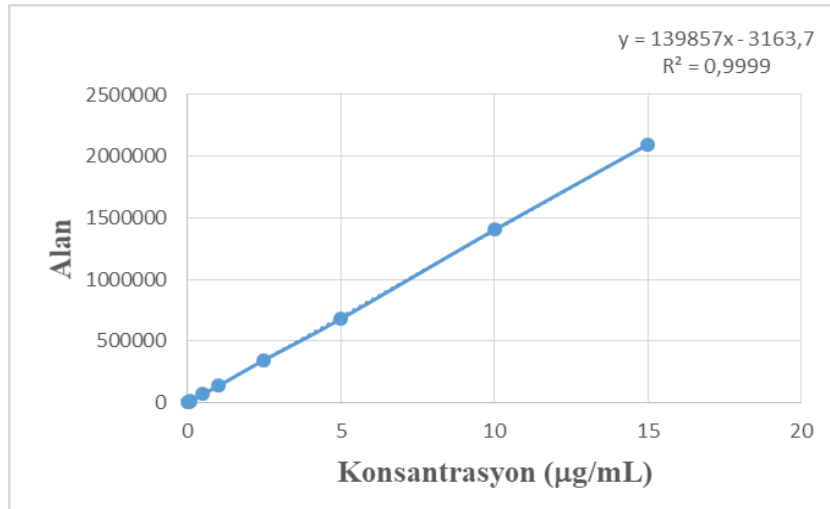


Şekil 4-3: Fluvastatin sodyum'a ait HPLC kromatogramı

4.4. Fluvastatin Sodyum'un HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

4.4.1. Doğrusallık

Yöntem 3.2.4.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen fluvastatin sodyum'a ait standart eğri grafiği Şekil 4-4'te, standart konsantrasyonlara karşı elde edilen ortalama pik alanları, SD ve % RSD değerleri Tablo 4-1'de, determinasyon katsayısı (R^2) ve doğru denklemi Tablo 4-2'de verildi.



Şekil 4-4: Fluvastatin sodyum'un doğrusallık çalışmasına ait standart eğri grafiği

Tablo 4-1: Fluvastatin sodyum'un doğrusallık çalışmasına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
0,025	3104	88,15	2,84
0,05	6721,33	83,98	1,25
0,1	13356	161,97	1,21
0,5	68895,33	883,20	1,28
1	134876	652,21	0,48
2,5	346048,33	252,49	0,07
5	680545	218,98	0,03
10	1402049,67	500,40	0,04
15	2095547,67	619,19	0,03

Tablo 4-2: Fluvastatin sodyum'un doğrusallık çalışmasına ait determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	$y=139857x-3163,7$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9999

y =Alan, x =Konsantrasyon (µg/mL)

4.4.2. Kesinlik

Yöntem 3.2.4.2'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen fluvastatin sodyum'a ait gün içi kesinlik bulguları Tablo 4-3'te, günler arası kesinlik bulguları Tablo 4-4' te verildi.

Tablo 4-3: Fluvastatin sodyum'un miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
0,5	69051	779,93	1,13
1	134564,33	282,94	0,21
2,5	347834	1597,21	0,46

Tablo 4-4: Fluvastatin sodyum'un miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	SD (±)	RSD (%)
0,5	69852	67452	69538	68947,33	1304,48	1,89
1	134814	132067	133487	133456	1373,76	1,03
2,5	346335	347134	348575	347348	1135,23	0,33

4.4.3. Doğruluk

Yöntem 3.2.4.3'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen doğruluk çalışmasına ait ortalama geri kazanma, SD ve % RSD değerleri sırasıyla plasebo 1 için Tablo 4-5, plasebo 2 için Tablo 4-6, plasebo 3 için Tablo 4-7, plasebo 4 için Tablo 4-8' de verildi.

Tablo 4-5: Plasebo 1 (TEZ-T20) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ort Geri Kazanma	Ort % Geri Kazanma	SD (±)	RSD (%)
0,5	0,4973	99,4621	1,6459	1,6548
1	1,0084	100,8437	1,4296	1,4176
2,5	2,4847	99,3875	0,2889	0,2907

Tablo 4-6: Plasebo 2 (TEZ-T80) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ort Geri Kazanma	Ort % Geri Kazanma	SD (±)	RSD (%)
0,5	0,4906	98,1188	1,3319	1,3574
1	0,9968	99,6830	0,3813	0,3825
2,5	2,4720	98,8782	0,8173	0,8265

Tablo 4-7: Plasebo 3 (NLC-T20) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ort Geri Kazanma	Ort % Geri Kazanma	SD (±)	RSD (%)
0,5	0,4948	98,9616	0,6385	0,6452
1	0,9918	99,1749	0,8361	0,8430
2,5	2,4407	97,6273	0,4847	0,4965

Tablo 4-8: Plasebo 4 (NLC-T80) formülasyonu için miktar tayini yöntemine ait doğruluk çalışması bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Ort Geri Kazanma	Ort % Geri Kazanma	SD (±)	RSD (%)
0,5	0,5094	101,8865	0,5828	0,5720
1	0,9812	98,1207	0,5865	0,5977
2,5	2,4302	97,2073	0,3308	0,3403

4.4.4. Seçicilik

Yöntem 3.2.4.4’de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen seçicilik çalışması sonucunda formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler, dermal penetrayon çalışmasında kullanılan deri, bant ile soyma işleminde kullanılan bant, tampon

sistemler, reseptör faz ve mobil faz bileşenleri ile fluvastatin sodyum'un pik alıkonma zamanında girişim olmadığı gösterildi.

4.4.5. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.4.5'te belirtildiği şekilde yapılan çalışmalar sonunda mobil faz ile hazırlanan standart çözeltiler için fluvastatin sodyum'un teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) değerleri hesaplandı. TL değeri 0,018 µg/mL ve MTL değeri 0,056 µg/mL olarak belirlendi.

4.4.6. Örneklerin Stabilitesi

Yöntem 3.2.4.6'de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanan fluvastatin sodyum örneklerinin stabilitesine ait bulgular Tablo 4-9' te verildi.

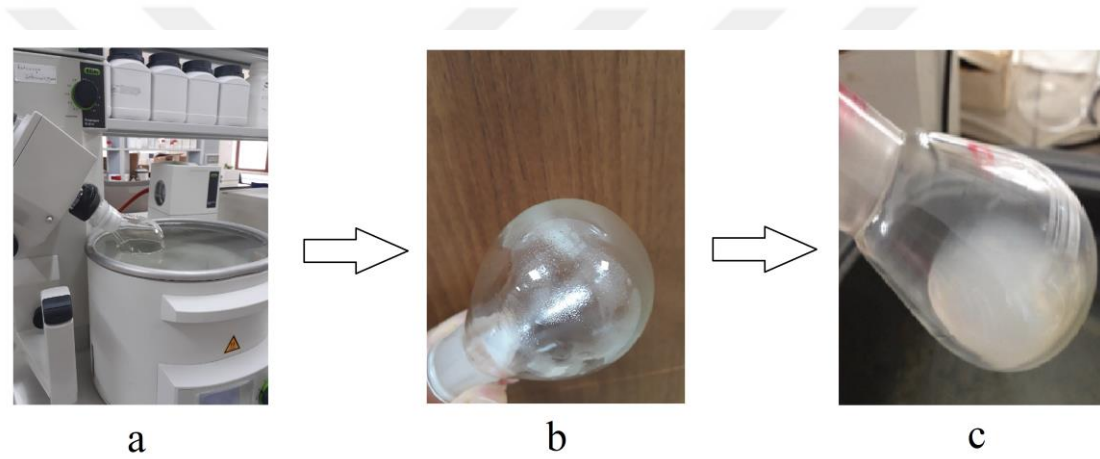
Tablo 4-9: Fluvastatin sodyum örneklerinin stabilitesine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman	Alan	Ortalama	SD (±)	RSD (%)
0,5	0 saat	69852	69392,50	461,68	0,67
	24 saat	69473			
	48 saat	69494			
	72. saat	68751			
1	0 saat	134814	134106,25	756,99	0,57
	24 saat	134075			
	48 saat	134471			
	72. saat	133065			
2,5	0 saat	346335	345031,25	2859,45	0,83
	24 saat	346418			
	48 saat	346626			
	72. saat	340746			

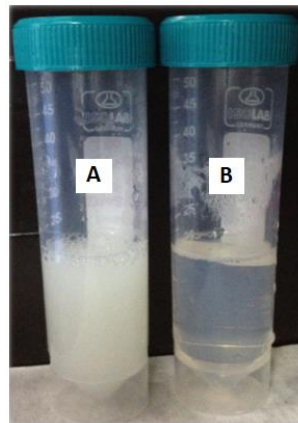
4.5. Transetozom Formülasyon Çalışmaları

4.5.1. Transetozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom tipi veziküler nanotaşıyıcıların Yöntem 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanmasına ait; organik çözücü karışımının rotaevaporatör kullanılarak uzaklaştırılması (a), oluşan ince lipid film tabakası (b) ve bu lipid film tabakasının dispersiyon ortamı ile hidratasyonu sonrası (c) görüntüleri sırasıyla Şekil 4-5’te gösterilmiştir. Hazırlanan veziküler dispersiyonların sırasıyla sonikasyon öncesi ve sonrası görüntüleri ise Şekil 4-6’te gösterilmiştir.



Şekil 4-5: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom tipi veziküler nanotaşıyıcıların hazırlanması



Şekil 4-6: Fluvastatin sodyum yüklü veziküler nanotaşıyıcıların sonikasyon öncesi (A) ve sonrası (B) fiziksel görünüşleri

4.5.2. Transetozom Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan etkin madde içermeyen Yöntem 3.2.5.2’de bileşen ve oranları verilen formülasyonların nano veziküler bir sistem oluşturup oluşturmadığı, boyutları ve boyut dağılımları incelenerek değerlendirildi. Formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-10’da verildi.

Tablo 4-10: Etkin madde içermeyen formülasyonlara ait ön formülasyon çalışması bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıkma	Sonuç
TEZ-T80-50-DS	89,36 ± 0,249	0,148 ± 0,009	Tek pik	Uygun
TEZ-T80-100-DS	124,34 ± 1,025	0,152 ± 0,012	Tek pik	Uygun
TEZ-T20-50-DS	81,84 ± 1,250	0,081 ± 0,040	Tek pik	Uygun
TEZ-T20-100-DS	115,9 ± 0,289	0,092 ± 0,018	Tek pik	Uygun
TEZ-G44/14-50-DS	109,8 ± 1,172	0,456 ± 0,020	3 pik	Uygun değil
TEZ-G44/14-100-DS	178,8 ± 0,833	0,370 ± 0,023	2 pik	Uygun değil
TEZ-G48/16-50-DS	77,86 ± 0,484	0,388 ± 0,013	2 pik	Uygun değil
TEZ-G48/16-100-DS	68,63 ± 0,281	0,330 ± 0,004	3 pik	Uygun değil
TEZ-KEL-50-DS	70,60 ± 0,664	0,135 ± 0,031	Tek pik	Uygun
TEZ-KRH40-50-DS	74,10 ± 0,637	0,224 ± 0,005	2 pik	Uygun değil
TEZ-KHS15-50-DS	78,97 ± 0,846	0,288 ± 0,021	2 pik	Uygun değil
TEZ-SKH-50-DS	63,47 ± 0,309	0,181 ± 0,008	Tek pik	Uygun
TEZ-S20-50-DS	329,2 ± 20,15	0,607 ± 0,051	3 pik	Uygun değil
TEZ-S80-50-DS	81,65 ± 24,64	0,637 ± 0,200	3 pik	Uygun değil
TEZ-S85-50-DS	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Bulanık, faz ayrımı	Uygun değil

TEZ: Transetozom, DS: Distile Su, T80: Tween 80, T20: Tween 20, KEL: Kolliphor EL, G44/14: Gelucire 44/14, G48/16: Gelucire 48/16, KRH40: Kolliphor RH40, KHS15: Kolliphor HS15, SKH: Sodyum kolat hidrat, S20: Span 20, S80: Span 80; S85: Span 85

Tablo 4-10’da verilen uygun partikül boyutu ve boyut dağılımı gösteren Yöntem 3.2.5.2’de bileşen ve oranları verilen formülasyonlar etkin madde yüklenerek tekrar hazırlandı ve ortalama partikül boyutu ve dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ölçümleri gerçekleştirildi. Fluvastatin sodyum yüklenen formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-11’da verildi.

Tablo 4-11: Fluvastatin sodyum yüklü formülasyonlara ait ön formülasyon çalışması bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıkma	Sonuç
TEZ-T80-50-DS-FVS	41,35 ± 1,306	0,920 ± 0,034	3 pik	Uygun değil
TEZ-T20-50-DS-FVS	27,20 ± 0,160	0,338 ± 0,003	2 pik	Uygun değil
TEZ-T20-100-DS-FVS	63,20 ± 1,221	0,360 ± 0,018	3 pik	Uygun değil
TEZ-KEL-50-DS-FVS	78,97 ± 0,690	0,297 ± 0,020	2 pik	Uygun değil
TEZ-SKH-50-DS-FVS	58,40 ± 0,661	0,231 ± 0,013	2 pik	Uygun değil

Formülasyonlara fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Tablo 4-11’de veriler incelendiğinde etkin madde yüklendikten sonra istenen partikül boyutu ve PDI değerleri elde edilemediği görüldü. Uygun partikül boyutu ve boyut dağılımına sahip etkin madde yüklü formülasyonlar elde edilebilmesi için etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri de göz önünde bulundurularak çalışmalara devam edildi. Hidratasyon ortamı pH’sı etkin maddenin non-iyonik olduğu aralığa çekildi. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri incelenerek uygun olup olmadığı değerlendirildi. Yöntem 3.2.5.2.1’de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanan etkin madde yüklü formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-12’te gösterilmiştir.

Tablo 4-12: Hidratasyon ortamının pH'sı 3 ayarlanarak hazırlanan formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama	pH	Sonuç
TEZ-T20-50-pH3-FVS	47,30 ± 0,80	0,678 ± 0,012	2 pik	6,98 ± 0,01	Uygun değil
TEZ-SKH-50-pH3-FVS	57,60 ± 0,75	0,247 ± 0,003	2 pik	7,85 ± 0,01	Uygun değil

Formülasyonlara fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Tablo 4-12'te verilen sonuçlar incelendiğinde hidratasyon ortamı pH'sı 3'e ayarlanarak hazırlanan formülasyonlar ile uygun sonuçlar elde edilemedi. Bunun üzerine hidratasyon ortamı olarak tampon sistem kullanılmasına karar verildi. Tampon sistem olarak pH 3 sitrat tamponu ve pH 3 fosfat tamponu kullanılabileceği düşünüldü ve uygun tampon sistemin seçilebilmesi için öncelikle etkin maddenin tampon sistemler içerisindeki çözünürlüğü yöntem 3.2.5.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak değerlendirildi. Fluvastatin sodyum'un çalışılan tampon sistemlerdeki çözünürlüğüne ait bulgular Tablo 4-13'te gösterilmiştir.

Tablo 4-13: Farklı çözünme ortamlarında fluvastatin sodyum' un çözünürlüğü (n=3)

Çözünme ortamı	Çözünürlük (µg/ml)
pH 3 sitrat tamponu	12,68 ± 0,057
pH 3 fosfat tamponu	549,07 ± 2,227

Kullanılacak tampon sistemin belirlenmesinde final ürünün pH'sının da ilacın pH bağımlı çözünürlüğü ve dolayısıyla taşıyıcı sisteme yüklenmesinde önemli olduğu düşünülerek yöntem 3.2.5.2.1'de belirtilen çalışma gerçekleştirildi. Kullanılan hidratasyon ortamı ve bu ortamlar ile hazırlanmış formülasyonların pH değerleri karşılaştırıldı ve tamponlama kapasitesi değerlendirildi. Çalışmaya ait bulgular tablo 4-14'te verilmiştir.

Tablo 4-14: Hidratasyon çözeltileri ve bu çözeltiler ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular

Çözelti ve Formülasyonların Kodları	pH
pH 3 ST + Etanol (70:30) çözeltisi	3,51 ± 0,02
pH 3 PBS + Etanol (70:30) çözeltisi	3,72 ± 0,03
TEZ-T20-50-ST-FVS	3,47 ± 0,02
TEZ-T20-50-PBS-FVS	4,24 ± 0,04

Formülasyonlara fluvastatin sodyum %0,1 oranında yüklenmiştir.

Yöntem 3.2.5.2.1’de belirtilen hem çözünürlük çalışması hem de tamponlama kapasitesi sonuçları değerlendirildiğinde etkin maddeinin çözünürlüğün daha düşük, pH değerindeki değişimin ise ilk ölçülen pH değerlerine göre mümkün olduğunca az olduğu pH 3 sitrat tamponu ile çalışılmasına karar verildi. Hidratasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan etkin madde yüklü formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-15’te gösterilmiştir.

Tablo 4-15: Hidratasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıkma	Sonuç
TEZ-T80-50-ST-FVS	86,45 ± 2,449	0,083 ± 0,006	Tek pik	Uygun
TEZ-T80-71-ST-FVS	103,6 ± 1,040	0,19 ± 0,03	Tek pik	Uygun
TEZ-T80-100-ST-FVS	133,33 ± 1,501	0,188 ± 0,025	Tek pik	Uygun
TEZ-T20-50-ST-FVS	82,72 ± 1,031	0,076 ± 0,026	Tek pik	Uygun
TEZ-T20-70-ST-FVS	105,70 ± 0,86	0,09 ± 0,01	Tek pik	Uygun
TEZ-T20-100-ST-FVS	133,57 ± 2,28	0,131 ± 0,006	Tek pik	Uygun
TEZ-KEL-50-ST-FVS	83,69 ± 1,943	0,216 ± 0,015	2 pik	Uygun değil
TEZ-KEL-100-ST-FVS	79,79 ± 0,452	0,199 ± 0,009	2 pik	Uygun değil
TEZ-SKH-50-ST-FVS	466,9 ± 30,92	0,769 ± 0,139	3 pik	Uygun değil

ST: pH 3 Sitrat Tamponu, Fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Transetozom formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ikinci basamak olarak sonikasyon süresinin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Sonikasyon süresinin optimizasyonu kapsamında Yöntem 3.2.5.2.2’de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanan model transetozom formülasyonlarına ait bulgular Tablo 4-16’da gösterilmiştir.

Tablo 4-16: Sonikasyon süresi optimizasyonuna ait bulgular

Formülasyon Kodu	Sonikasyon gücü (%)	Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI
TEZ-T20-ST-30	35	5	105,10 ± 1,80	0,09 ± 0,01
		10	99,12 ± 0,23	0,10 ± 0,01
TEZ-T20-ST-20	35	5	106,5 ± 0,50	0,38 ± 0,01
		10	74,73 ± 0,61	0,24 ± 0,01
		20	55,49 ± 1,07	0,07 ± 0,02
		30	54,95 ± 0,19	0,13 ± 0,01
TEZ-T20-ST-10	35	20	64,52 ± 0,35	0,37 ± 0,01
		30	46,01 ± 0,46	0,23 ± 0,01
		40	41,02 ± 0,34	0,29 ± 0,02

Formülasyonlara fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Bu çalışma sonucunda sonikasyon süresi transetozom formülasyonlarının etanol içeriklerine dayalı olarak ve aynı şekilde partikül boyutu ve boyut dağılımı verileri dikkate alınarak optimize edildi. Sonikasyon süresi %10, %20, %30 etanol içeren formülasyonlar için sırasıyla 30, 20 ve 5 dk olarak optimize edildi. Kontrol transferzom formülasyonları için ise 40 dakika olarak belirlendi.

4.5.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Belirlenmesi

Ön formülasyon ve optimizasyon verileri değerlendirilmiş ve daha ileri çalışmalarda kullanılacak istenilen partikül boyutu, PDI, pH ve stabilizeye sahip formülasyonların belirlenmesi amacıyla hazırlanan ve değerlendirilen transetozom

formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-17 ve Tablo 4-18’de verilmiştir. Tablo 4-17 ve Tablo 4-18’deki miktarlar toplam 10 mL optimize formülasyonların içeriğini temsil etmektedir.

Tablo 4-17: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Phospholipon 90G (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Tween 20 (mg)	Hidratasyon	
				Etanol (%)	Sitrat Tamponu (%)
TEZ-T20-1	400	70:30	171	30	70
TEZ-T20-2		75:25	133		
TEZ-T20-3		80:20	100		
TEZ-T20-4		85:15	71		
TEZ-T20-5	400	70:30	171	20	80
TEZ-T20-6		75:25	133		
TEZ-T20-7		80:20	100		
TEZ-T20-8		85:15	71		
TEZ-T20-9	400	70:30	171	10	90
TEZ-T20-10		75:25	133		
TEZ-T20-11		80:20	100		
TEZ-T20-12		85:15	71		

Formülasyonlara fluvastatin sodyum %0,1 oranında yüklenmiştir.

Tablo 4-18: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Phospholipon 90G (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Tween 80 (mg)	Hidratasyon	
				Etanol (%)	Sitrat Tamponu (%)
TEZ-T80-1	400	70:30	171	30	70
TEZ-T80-2		75:25	133		
TEZ-T80-3		80:20	100		
TEZ-T80-4		85:15	71		
TEZ-T80-5	400	70:30	171	20	80
TEZ-T80-6		75:25	133		
TEZ-T80-7		80:20	100		
TEZ-T80-8		85:15	71		
TEZ-T80-9	400	70:30	171	10	90
TEZ-T80-10		75:25	133		
TEZ-T80-11		80:20	100		
TEZ-T80-12		85:15	71		

Formülasyonlara fluvastatin sodyum %0,1 oranında yüklenmiştir.

4.5.4. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilitelerine Ait Bulgular

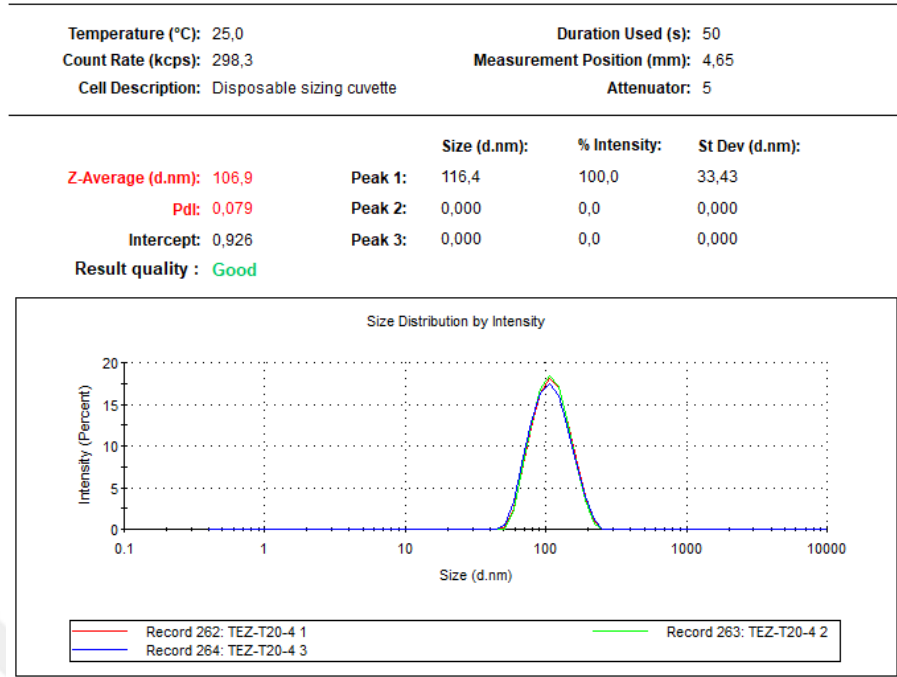
Yöntem 3.2.5.3'te belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarına ait partikül boyutu, boyut dağılımı, pH bulguları Tablo 4-19 ve Tablo 4-20 'te gösterilmiştir. TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarına ait partikül boyutu ve boyut dağılımını gösteren grafik Şekil 4-7 ve Şekil 4-8'da gösterilmiştir. İki yıl süre ile takip edilen stabilite çalışmalarına ait bulgular ise Tablo 4-21 ile Tablo 4-26 aralığında sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4-19: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların karakterizasyon bulguları

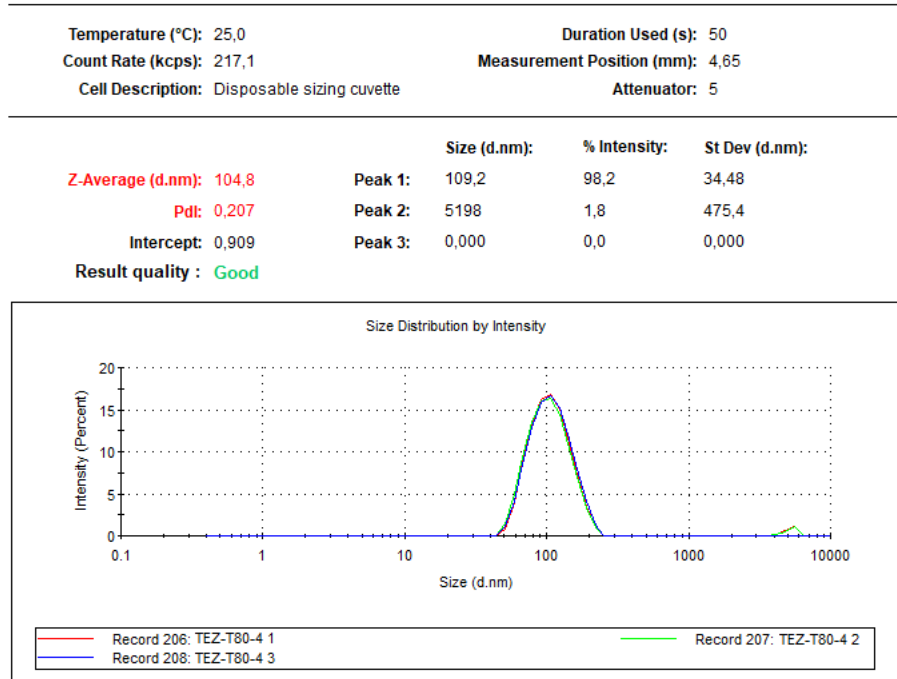
Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T20-1	187,90 ± 3,40	0,13 ± 0,02	3,46 ± 0,01
TEZ-T20-2	155,00 ± 0,95	0,13 ± 0,02	3,45 ± 0,01
TEZ-T20-3	133,57 ± 2,28	0,13 ± 0,01	3,44 ± 0,01
TEZ-T20-4	105,10 ± 1,80	0,09 ± 0,01	3,47 ± 0,01
TEZ-T20-5	105,70 ± 0,86	0,12 ± 0,02	3,29 ± 0,01
TEZ-T20-6	89,19 ± 0,34	0,07 ± 0,01	3,25 ± 0,01
TEZ-T20-7	81,72 ± 2,20	0,06 ± 0,01	3,33 ± 0,01
TEZ-T20-8	55,49 ± 1,07	0,07 ± 0,02	3,30 ± 0,01
TEZ-T20-9	74,08 ± 0,77	0,12 ± 0,01	3,17 ± 0,01
TEZ-T20-10	66,14 ± 0,52	0,13 ± 0,02	3,19 ± 0,01
TEZ-T20-11	49,24 ± 0,65	0,12 ± 0,01	3,16 ± 0,01
TEZ-T20-12	46,01 ± 0,46	0,23 ± 0,01	3,15 ± 0,01

Tablo 4-20: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların karakterizasyon bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T80-1	169,17 ± 1,78	0,13 ± 0,01	3,49 ± 0,01
TEZ-T80-2	137,60 ± 0,82	0,16 ± 0,02	3,47 ± 0,01
TEZ-T80-3	133,33 ± 1,50	0,19 ± 0,03	3,51 ± 0,01
TEZ-T80-4	103,6 ± 1,04	0,19 ± 0,03	3,51 ± 0,01
TEZ-T80-5	100,11 ± 1,48	0,10 ± 0,01	3,32 ± 0,01
TEZ-T80-6	86,32 ± 1,00	0,09 ± 0,01	3,32 ± 0,01
TEZ-T80-7	79,30 ± 2,59	0,09 ± 0,14	3,37 ± 0,01
TEZ-T80-8	64,87 ± 1,30	0,11 ± 0,02	3,27 ± 0,01
TEZ-T80-9	72,47 ± 0,99	0,14 ± 0,01	3,14 ± 0,01
TEZ-T80-10	67,27 ± 0,86	0,16 ± 0,01	3,17 ± 0,01
TEZ-T80-11	57,38 ± 0,38	0,26 ± 0,01	3,15 ± 0,01
TEZ-T80-12	51,77 ± 0,17	0,25 ± 0,01	3,19 ± 0,01



Şekil 4-7: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği



Şekil 4-8: TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği

Tablo 4-21: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-1

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T20-1	0.gün	187,90 ± 3,40	0,13 ± 0,02	3,46 ± 0,01
	15.gün	253,50 ± 10,10	0,17 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	262,63 ± 3,91	0,18 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	330,53 ± 9,78	0,27 ± 0,03	3,49 ± 0,01
	6.ay	335,2 ± 1,06	0,26 ± 0,01	3,52 ± 0,01
	12.ay	340,20 ± 4,30	0,29 ± 0,01	3,53 ± 0,01
	24.ay	374,00 ± 15,52	0,31 ± 0,01	3,50 ± 0,01
TEZ-T20-2	0.gün	155,00 ± 0,95	0,13 ± 0,02	3,45 ± 0,01
	15.gün	193,20 ± 2,10	0,18 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	201,33 ± 2,10	0,18 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	256,8 ± 4,73	0,26 ± 0,04	3,48 ± 0,01
	6.ay	259,57 ± 5,03	0,24 ± 0,01	3,52 ± 0,01
	12.ay	276,83 ± 10,34	0,27 ± 0,02	3,51 ± 0,01
	24.ay	300,70 ± 6,22	0,29 ± 0,01	3,51 ± 0,01
TEZ-T20-3	0.gün	133,57 ± 2,28	0,13 ± 0,01	3,44 ± 0,01
	15.gün	174,97 ± 2,77	0,16 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	190,43 ± 1,70	0,20 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	224,7 ± 4,03	0,21 ± 0,01	3,48 ± 0
	6.ay	237,93 ± 5,08	0,24 ± 0,01	3,53 ± 0,01
	12.ay	260,47 ± 3,56	0,25 ± 0,01	3,52 ± 0,01
	24.ay	268,67 ± 5,97	0,29 ± 0,04	3,52 ± 0,01
TEZ-T20-4	0.gün	105,10 ± 1,80	0,09 ± 0,01	3,47 ± 0,01
	15.gün	136,63 ± 2,06	0,10 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	142,17 ± 0,50	0,12 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	174,57 ± 4,63	0,17 ± 0,02	3,49 ± 0
	6.ay	181,63 ± 0,59	0,21 ± 0,01	3,53 ± 0,01
	12.ay	196,93 ± 6,21	0,22 ± 0,01	3,50 ± 0,01
	24.ay	204,00 ± 2,12	0,22 ± 0,01	3,56 ± 0,01

Tablo 4-22: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-2

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T20-5	0.gün	105,70 ± 0,86	0,12 ± 0,02	3,29 ± 0,01
	15.gün	105,10 ± 1,02	0,10 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	103,00 ± 0,69	0,08 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	110,9 ± 0,87	0,15 ± 0,02	3,35 ± 0
	6.ay	112,43 ± 1,82	0,14 ± 0,01	3,34 ± 0,01
	12.ay	114,73 ± 3,27	0,17 ± 0,03	3,33 ± 0,01
	24.ay	115,03 ± 5,38	0,15 ± 0,04	3,35 ± 0,01
TEZ-T20-6	0.gün	89,19 ± 0,34	0,07 ± 0,01	3,25 ± 0,01
	15.gün	91,92 ± 0,85	0,07 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	90,83 ± 0,08	0,08 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	96,32 ± 0,32	0,11 ± 0,02	3,26 ± 0,01
	6.ay	98,66 ± 1,27	0,15 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	12.ay	101,63 ± 2,35	0,17 ± 0,02	3,31 ± 0,01
	24.ay	103,69 ± 4,81	0,17 ± 0,02	3,36 ± 0,01
TEZ-T20-7	0.gün	81,72 ± 2,20	0,06 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	15.gün	82,75 ± 0,24	0,12 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	83,38 ± 0,87	0,13 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	94,01 ± 0,78	0,22 ± 0,02	3,32 ± 0,01
	6.ay	88,65 ± 1,24	0,15 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	12.ay	91,97 ± 1,92	0,20 ± 0,01	3,32 ± 0,01
	24.ay	95,83 ± 3,55	0,21 ± 0,02	3,31 ± 0,01
TEZ-T20-8	0.gün	55,49 ± 1,07	0,07 ± 0,02	3,30 ± 0,01
	15.gün	55,53 ± 0,17	0,07 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	55,75 ± 0,66	0,07 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	60,61 ± 0,42	0,14 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	6.ay	60,43 ± 0,63	0,12 ± 0,02	3,32 ± 0,01
	12.ay	72,03 ± 3,31	0,28 ± 0,02	3,31 ± 0,01
	24.ay	77,92 ± 3,90	0,28 ± 0,01	3,31 ± 0,01

Tablo 4-23: Sürfaktan olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-3

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T20-9	0.gün	74,08 ± 0,77	0,12 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	15.gün	73,06 ± 0,21	0,11 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	72,13 ± 0,84	0,09 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	77,23 ± 0,51	0,17 ± 0,01	3,12 ± 0
	6.ay	75,13 ± 0,46	0,13 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	86,54 ± 0,04	0,28 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	24.ay	101,44 ± 4,01	0,39 ± 0,03	3,15 ± 0,01
TEZ-T20-10	0.gün	66,14 ± 0,52	0,13 ± 0,02	3,19 ± 0,01
	15.gün	64,43 ± 0,33	0,08 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	63,56 ± 0,38	0,08 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	71,99 ± 2,94	0,17 ± 0,01	3,17 ± 0
	6.ay	66,54 ± 0,32	0,13 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	12.ay	69,27 ± 1,61	0,15 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	24.ay	71,27 ± 0,38	0,29 ± 0,01	3,15 ± 0,01
TEZ-T20-11	0.gün	49,24 ± 0,65	0,12 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	15.gün	49,92 ± 0,19	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	48,50 ± 0,47	0,12 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	55,12 ± 1,95	0,21 ± 0,01	3,14 ± 0
	6.ay	54,44 ± 0,25	0,24 ± 0,02	3,17 ± 0,01
	12.ay	58,74 ± 1,20	0,28 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	24.ay	75,83 ± 2,39	0,44 ± 0,01	3,16 ± 0,01
TEZ-T20-12	0.gün	46,01 ± 0,46	0,23 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	15.gün	44,24 ± 0,09	0,21 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	47,66 ± 0,54	0,30 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	48,96 ± 1,07	0,25 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	6.ay	50,38 ± 0,50	0,31 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	12.ay	55,44 ± 1,32	0,33 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	24.ay	109,88 ± 53,34	0,36 ± 0,09	3,15 ± 0,01

Tablo 4-24: Sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-1

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T80-1	0.gün	169,17 ± 1,78	0,13 ± 0,01	3,49 ± 0,01
	15.gün	269,13 ± 2,29	0,22 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	301,00 ± 2,52	0,27 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	346,77 ± 3,37	0,29 ± 0,01	3,57 ± 0,01
	6.ay	366,87 ± 2,06	0,31 ± 0,01	3,55 ± 0,01
	12.ay	393,73 ± 13,96	0,31 ± 0,02	3,55 ± 0,01
	24.ay	385,10 ± 16,12	0,38 ± 0,07	3,57 ± 0,01
TEZ-T80-2	0.gün	137,60 ± 0,82	0,16 ± 0,02	3,47 ± 0,01
	15.gün	170,73 ± 1,89	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	184,20 ± 1,04	0,19 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	206,43 ± 6,63	0,21 ± 0,01	3,46 ± 0,01
	6.ay	208,6 ± 1,15	0,22 ± 0,02	3,53 ± 0,02
	12.ay	237,57 ± 7,91	0,26 ± 0,01	3,53 ± 0,01
	24.ay	258,50 ± 16,12	0,26 ± 0,02	3,58 ± 0,01
TEZ-T80-3	0.gün	133,33 ± 1,50	0,19 ± 0,03	3,51 ± 0,01
	15.gün	173,90 ± 2,65	0,20 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	188,83 ± 2,37	0,20 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	218,73 ± 3,28	0,24 ± 0,01	3,56 ± 0,01
	6.ay	219,57 ± 0,55	0,25 ± 0,02	3,53 ± 0,01
	12.ay	245,43 ± 2,06	0,27 ± 0,01	3,53 ± 0,01
	24.ay	259,03 ± 3,76	0,29 ± 0,01	3,58 ± 0,02
TEZ-T80-4	0.gün	103,6 ± 1,04	0,19 ± 0,03	3,51 ± 0,01
	15.gün	122,10 ± 0,70	0,13 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	129,10 ± 1,42	0,15 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	155,63 ± 1,91	0,24 ± 0,02	3,54 ± 0,01
	6.ay	142,4 ± 1,66	0,20 ± 0,01	3,52 ± 0,01
	12.ay	153,6 ± 0,20	0,25 ± 0,01	3,54 ± 0,01
	24.ay	139,90 ± 3,76	0,24 ± 0,01	3,58 ± 0,01

Tablo 4-25: Sürfactan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-2

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T80-5	0.gün	100,11 ± 1,48	0,10 ± 0,01	3,32 ± 0,01
	15.gün	103,53 ± 1,99	0,10 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	101,33 ± 1,19	0,11 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	110,80 ± 4,00	0,16 ± 0,02	3,30 ± 0,01
	6.ay	108,20 ± 1,74	0,16 ± 0,01	3,35 ± 0,01
	12.ay	109,90 ± 2,96	0,13 ± 0,01	3,34 ± 0,01
	24.ay	108,55 ± 2,19	0,149 ± 0,01	3,38 ± 0,01
TEZ-T80-6	0.gün	86,32 ± 1,00	0,09 ± 0,01	3,32 ± 0,01
	15.gün	91,37 ± 1,53	0,11 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	90,10 ± 0,54	0,10 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	100,57 ± 1,07	0,20 ± 0,01	3,33 ± 0,01
	6.ay	98,11 ± 0,65	0,24 ± 0,01	3,34 ± 0,01
	12.ay	100,58 ± 3,18	0,19 ± 0,01	3,35 ± 0,01
	24.ay	104,63 ± 2,95	0,20 ± 0,01	3,37 ± 0,01
TEZ-T80-7	0.gün	79,30 ± 2,59	0,09 ± 0,14	3,37 ± 0,01
	15.gün	83,65 ± 0,91	0,15 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	82,94 ± 1,75	0,12 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	89,28 ± 0,89	0,20 ± 0,01	3,37 ± 0,00
	6.ay	83,99 ± 1,82	0,18 ± 0,01	3,34 ± 0,01
	12.ay	96,23 ± 2,69	0,26 ± 0,02	3,36 ± 0,01
	24.ay	96,67 ± 1,33	0,25 ± 0,01	3,37 ± 0,01
TEZ-T80-8	0.gün	64,87 ± 1,30	0,11 ± 0,02	3,27 ± 0,01
	15.gün	71,72 ± 1,14	0,19 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	70,59 ± 0,54	0,17 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	81,24 ± 4,87	0,23 ± 0,04	3,27 ± 0,00
	6.ay	74,97 ± 0,89	0,19 ± 0,01	3,32 ± 0,01
	12.ay	81,76 ± 2,95	0,21 ± 0,01	3,32 ± 0,01
	24.ay	95,67 ± 6,55	0,31 ± 0,01	3,36 ± 0,01

Tablo 4-26: Sürfactan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların stabilite bulguları-3

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TEZ-T80-9	0.gün	72,47 ± 0,99	0,14 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	15.gün	76,48 ± 1,10	0,14 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	75,86 ± 0,45	0,14 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	78,78 ± 0,69	0,17 ± 0,01	3,12 ± 0,00
	6.ay	78,44 ± 0,31	0,17 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	83,09 ± 1,80	0,19 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	24.ay	108,19 ± 8,46	0,39 ± 0,07	3,22 ± 0,01
TEZ-T80-10	0.gün	67,27 ± 0,86	0,16 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	15.gün	67,13 ± 0,52	0,12 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	68,74 ± 0,19	0,17 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	71,1 ± 1,00	0,18 ± 0,01	3,23 ± 0,00
	6.ay	70,81 ± 0,55	0,19 ± 0,01	3,26 ± 0,01
	12.ay	74,50 ± 2,34	0,20 ± 0,01	3,26 ± 0,01
	24.ay	82,26 ± 1,99	0,32 ± 0,02	3,23 ± 0,01
TEZ-T80-11	0.gün	57,38 ± 0,38	0,26 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	15.gün	57,61 ± 0,25	0,23 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	57,66 ± 0,14	0,24 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	65,44 ± 1,13	0,35 ± 0,02	3,13 ± 0,00
	6.ay	59,25 ± 0,21	0,24 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	65,93 ± 2,11	0,29 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	24.ay	173,00 ± 63,78	0,37 ± 0,06	3,21 ± 0,01
TEZ-T80-12	0.gün	51,77 ± 0,17	0,25 ± 0,01	3,19 ± 0,01
	15.gün	52,45 ± 0,09	0,28 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	55,51 ± 0,30	0,33 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	55,42 ± 0,15	0,30 ± 0,01	3,22 ± 0,01
	6.ay	57,28 ± 0,39	0,32 ± 0,01	3,24 ± 0,01
	12.ay	65,12 ± 1,42	0,30 ± 0,02	3,25 ± 0,01
	24.ay	204,35 ± 63,57	0,31 ± 0,01	3,23 ± 0,01

4.5.5. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar ile diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarına Yöntem 3.2.5.4’de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları Tablo 4-27 ’de, enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-28’de, Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri Şekil 4-9 ve Şekil 4-10’de ve ATR-FTIR spektroskopi analizlerine ait bulgular Şekil 4-11 ile Şekil 4-15 aralığında sırasıyla verilmiştir.

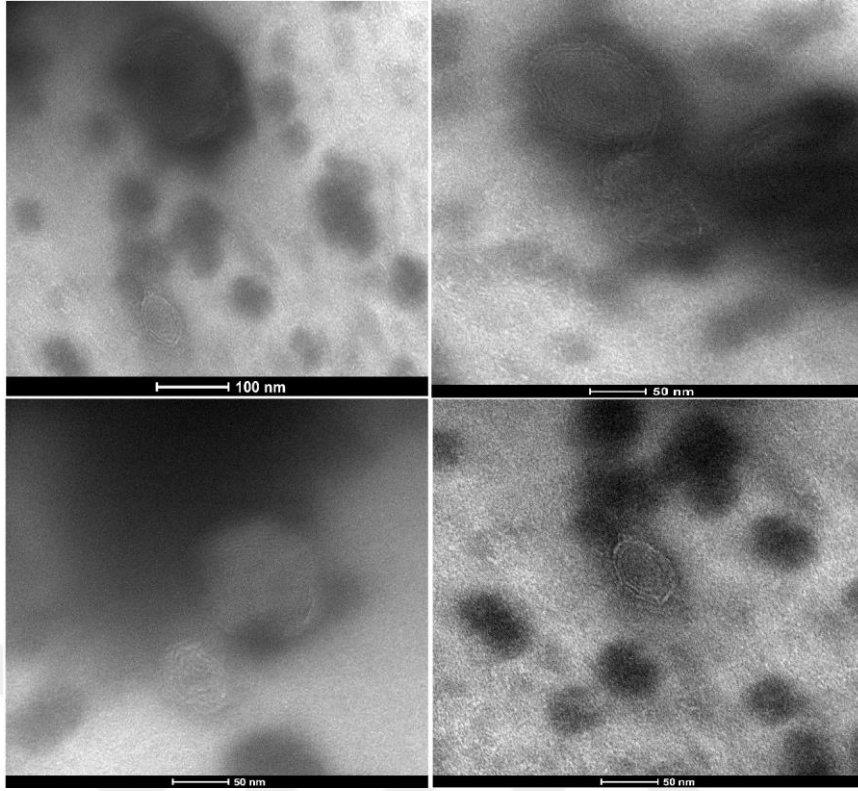
Tablo 4-27: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozomların zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları

Formülasyon Kodu	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik ($\mu\text{S/cm}$)
TEZ-T20-4	$0,15 \pm 0,28$	$609,67 \pm 16,62$
TEZ-T20-6	$0,23 \pm 0,42$	$873 \pm 31,19$
TEZ-T20-8	$0,36 \pm 0,08$	$917 \pm 34,18$
TEZ-T20-11	$0,44 \pm 0,36$	$1250 \pm 55,68$
TEZ-T80-4	$0,45 \pm 0,15$	$639 \pm 17,69$
TEZ-T80-5	$0,07 \pm 0,29$	$815,33 \pm 29,28$
TEZ-T80-6	$0,29 \pm 0,18$	$866,67 \pm 29,14$
TEZ-T80-10	$0,29 \pm 0,05$	$1173,30 \pm 50,33$

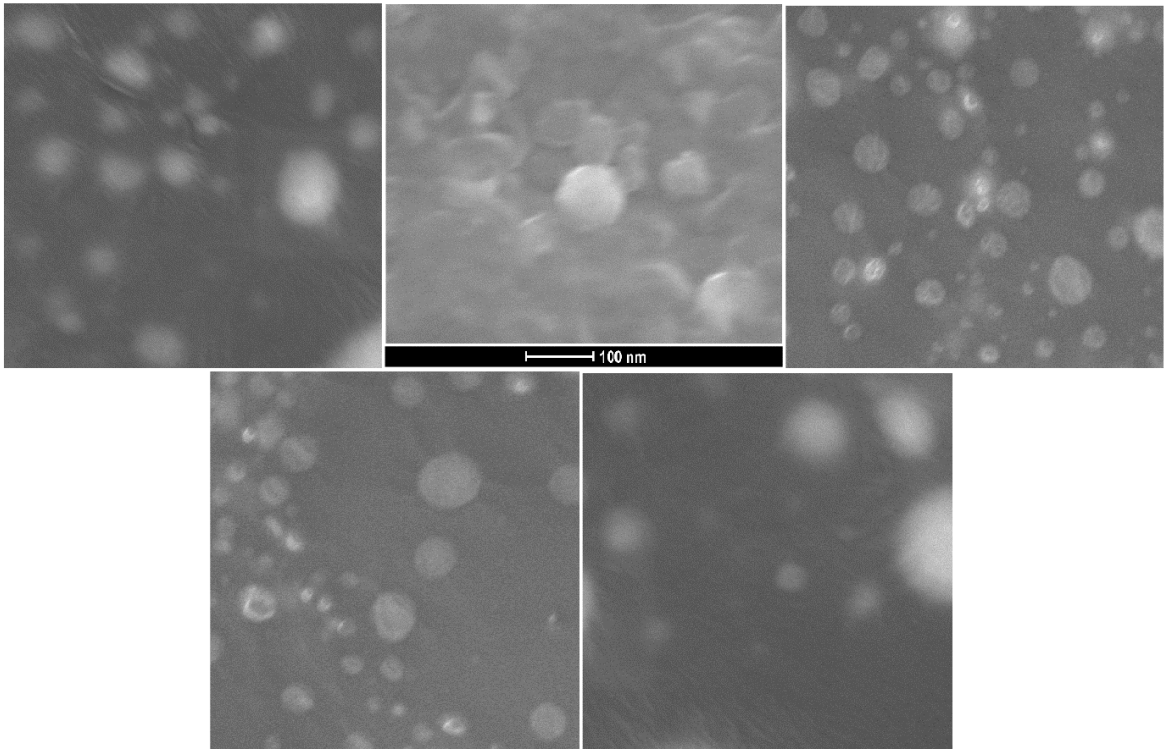
Tablo 4-28: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozomların enkapsülasyon etkinliği bulguları

Formülasyon Kodu	Diyaliz yöntemi EE(%)	Ultrafiltrasyon yöntemi EE(%)
TEZ-T20-4	83,80 ± 0,79	99,84 ± 0,06
TEZ-T20-6	96,02 ± 2,82	99,43 ± 0,08
TEZ-T20-8	84,46 ± 4,81	99,92 ± 0,02
TEZ-T20-11	88,67 ± 1,58	99,99*
TEZ-T80-4	85,40 ± 1,99	99,83 ± 0,06
TEZ-T80-5	80,83 ± 1,56	99,78 ± 0,08
TEZ-T80-6	83,96 ± 1,11	99,89 ± 0,05
TEZ-T80-10	91,42 ± 1,64	99,99*

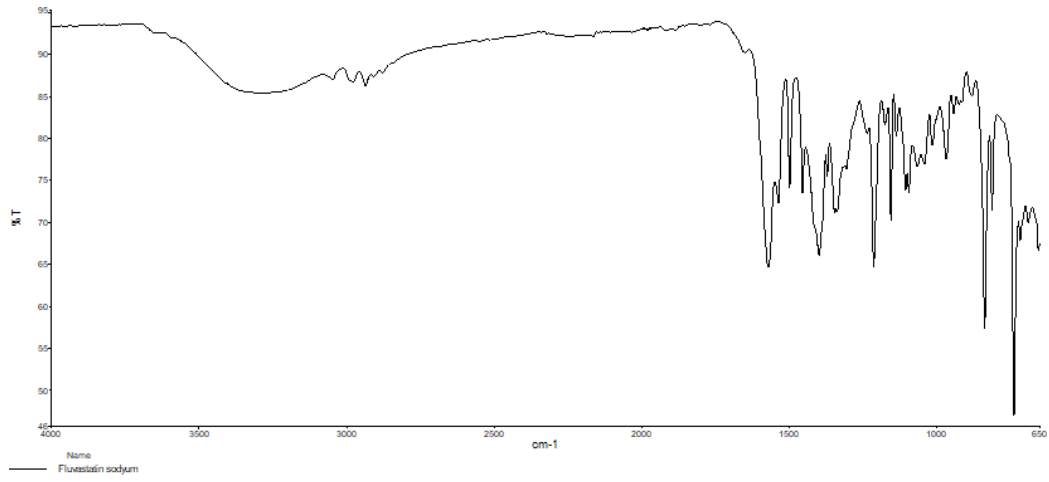
*HPLC ile süzöntüde analiz edilen fluvastatin sodyum miktarı LOQ değerinin altında kalmıştır.



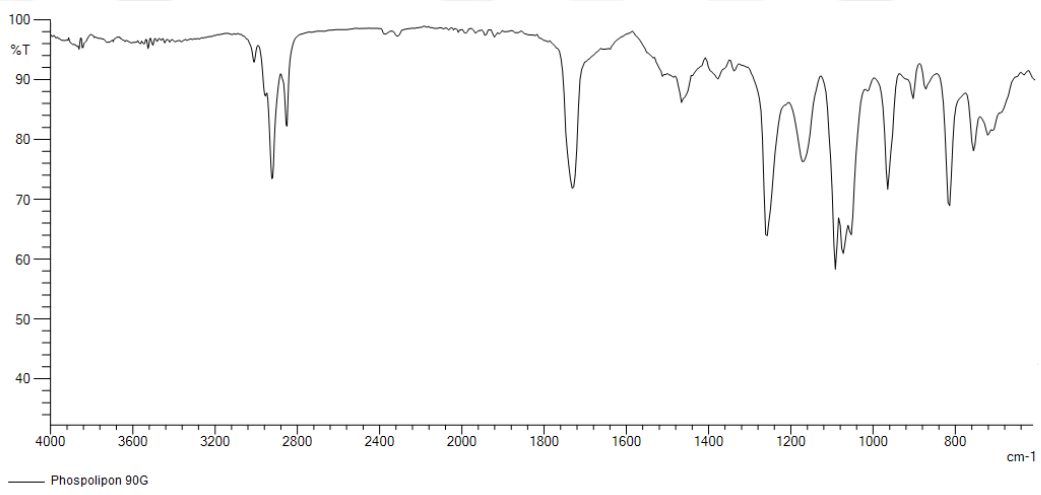
Şekil 4-9: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait TEM görüntüleri



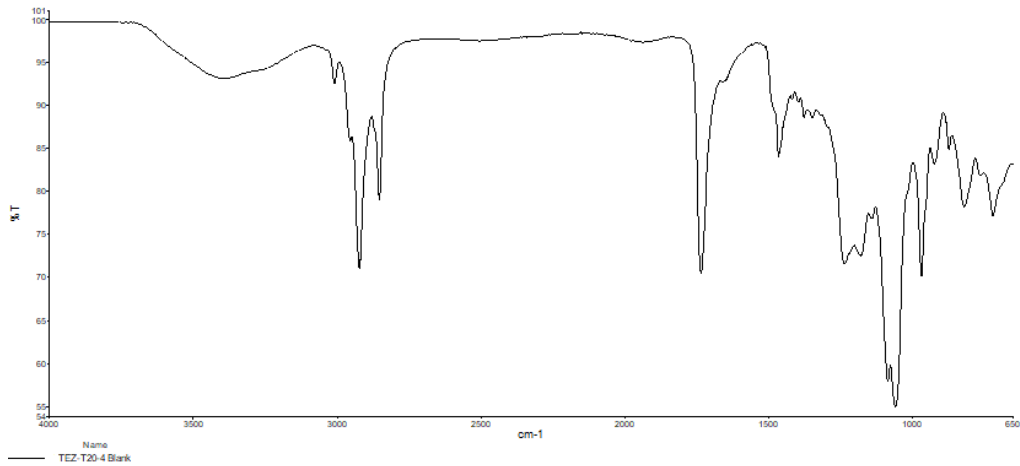
Şekil 4-10: TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonuna ait SEM görüntüleri



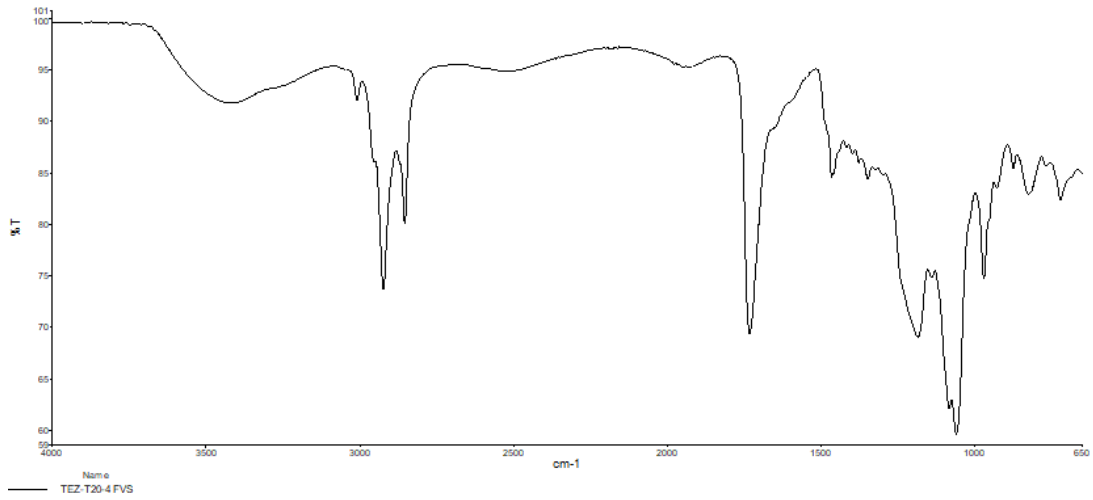
Şekil 4-11: Fluvastatin sodyum'a ait ATR-FTIR spektrumu



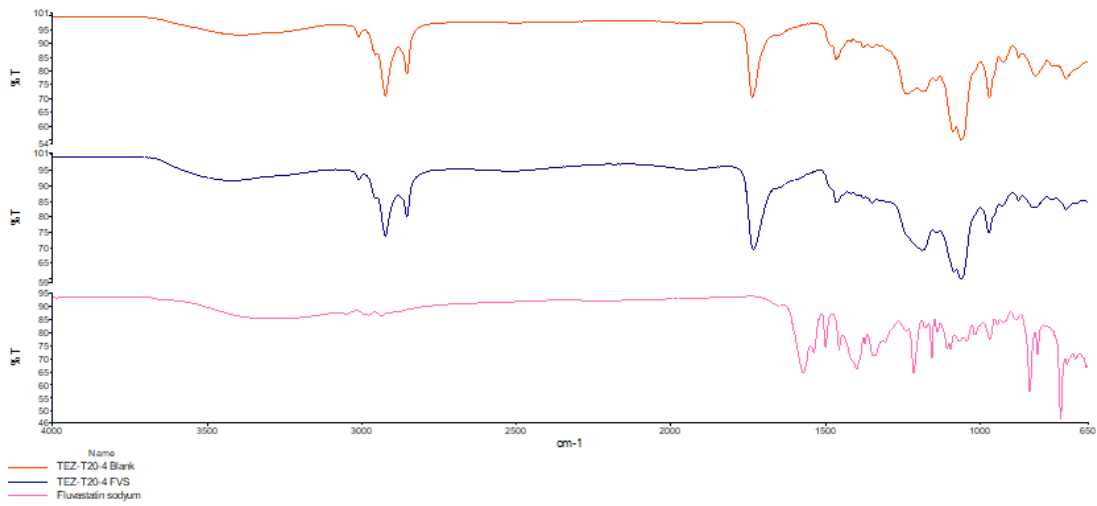
Şekil 4-12: Phospholipon 90 G' ye ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-13: Etkin madde içermeyen TEZ-T20-4 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-14: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-15: Etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonları ile etkin maddeye ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu

4.5.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Belirlenmesi

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar belirlenmiştir. Bu seçilen formülasyonların dermal penetrasyon çalışmaları ve deri lipidleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-29’de verilmiştir.

Tablo 4-29: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Phospholipon 90G (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Sürfaktan (mg)	Hidratasyon	
				Etanol (%)	Sitrat Tamponu (%)
TFZ-T20-2		75:25	133		
TFZ-T20-3	400	80:20	Tween 20 100	-	100
TFZ-T20-4		85:15	71		
TFZ-T80-1		70:30	171		
TFZ-T80-2	400	75:25	Tween 80 133	-	100
TFZ-T80-4		85:15	71		

4.5.7. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Transferzom Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular

Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzom formülasyonlarının Yöntem 3.2.5.3 ve Yöntem 3.2.5.4’de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH bulguları Tablo 4-30’te, zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları Tablo 4-31’te, enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-32’te sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4-30: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
TFZ-T20-2	59,96 ± 1,83	0,25 ± 0,01	3,20 ± 0
TFZ-T20-3	60,34 ± 0,75	0,34 ± 0,01	3,21 ± 0,01
TFZ-T20-4	67,19 ± 1,52	0,30 ± 0,02	3,21 ± 0,01
TFZ-T80-1	63,21 ± 1,97	0,23 ± 0,01	3,23 ± 0,01
TFZ-T80-2	60,32 ± 1,47	0,28 ± 0,04	3,22 ± 0,01
TFZ-T80-4	70,64 ± 2,04	0,28 ± 0,01	3,22 ± 0,01

Tablo 4-31: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları

Formülasyon Kodu	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
TFZ-T20-2	$0,78 \pm 0,20$	$1620,00 \pm 90,00$
TFZ-T20-3	$0,96 \pm 0,17$	$1706,67 \pm 90,73$
TFZ-T20-4	$1,34 \pm 0,34$	$1733,33 \pm 90,73$
TFZ-T80-1	$-0,05 \pm 0,11$	$1466,67 \pm 116,76$
TFZ-T80-2	$0,43 \pm 0,11$	$1576,67 \pm 90,74$
TFZ-T80-4	$0,83 \pm 0,44$	$1606,67 \pm 100,66$

Tablo 4-32: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzomların enkapsülasyon etkinliği bulguları

Formülasyon Kodu	Diyaliz yöntemi EE(%)	Ultrafiltrasyon yöntemi EE(%)
TFZ-T20-2	$93,45 \pm 1,65$	99,99*
TFZ-T20-3	$93,27 \pm 2,11$	99,99*
TFZ-T20-4	$92,24 \pm 1,64$	99,99*
TFZ-T80-1	$93,96 \pm 2,63$	99,99*
TFZ-T80-2	$94,75 \pm 3,34$	99,99*
TFZ-T80-4	$92,66 \pm 4,40$	99,99*

*HPLC ile süzöntüde analiz edilen fluvastatin sodyum miktarı LOQ değerinin altında kalmıştır.

4.5.8. İn Vitro Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular

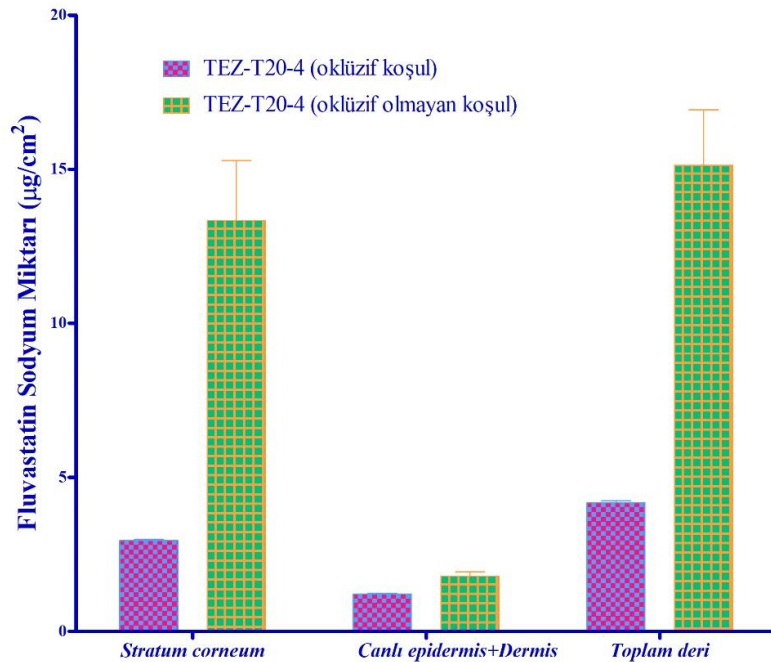
4.5.8.1. İn vitro Dermal Penetrasyon Çalışması Optimizasyonu

İn vitro dermal penetrasyon çalışması sırasında uygulanan oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların dermal penetrasyon ve derinin yapısı üzerine etkileri incelendi.

TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu kullanılarak Yöntem 3.2.5.6.3’de belirtildiği şekilde çalışıldı. Oklüzif ve oklüzif olmayan koşullar altında dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-33’de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafiği Şekil 4-16’da gösterildi.

Tablo 4-33: Seçilmiş TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarları

Formülasyon Kodu	<i>Stratum corneum</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Canlı Epidermis + Dermis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Derideki toplam miktar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
TEZ-T20-4 Oklüzif koşul	2.961 ± 0.032	1.213 ± 0.034	4.174 ± 0.066
TEZ-T20-4 Oklüzif olmayan koşul	13.338 ± 1.941	1.791 ± 0.143	15.129 ± 1.802



Şekil 4-16: Seçilmiş TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarında oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların fluvastatin sodyum penetrasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması

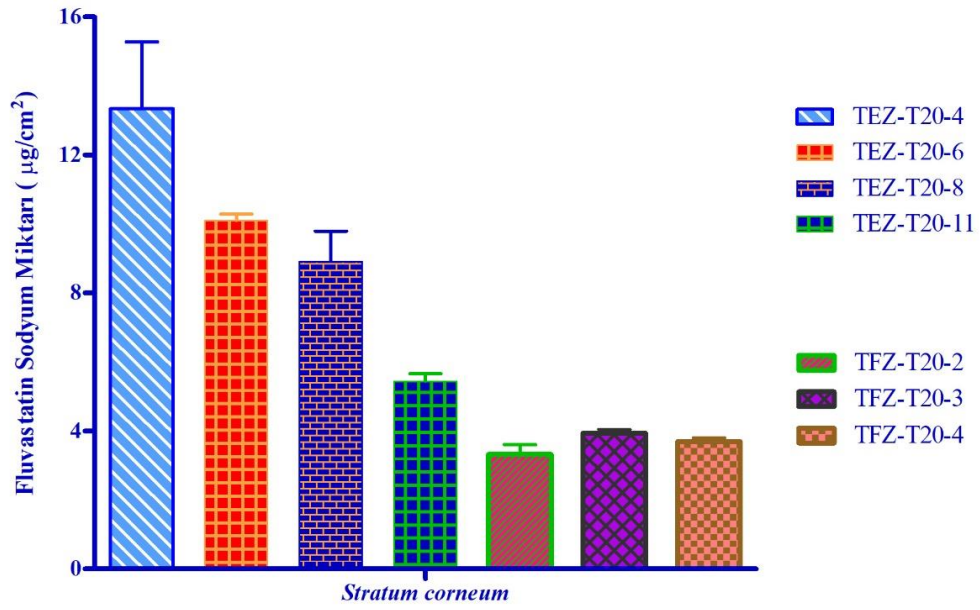
4.5.8.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları ve kontrol transferzom formülasyonlarının *in vitro* dermal penetrasyon çalışmaları Yöntem 3.2.5.6.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu için gerçekleştirilen Yöntem 3.2.5.6.3'de belirtilen dermal penetrasyon çalışması optimizasyonu verileri dikkate alınarak tüm formülasyonlar için penetrasyon çalışmalarının oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilmesine karar verildi. Dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-34'de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4-17 ile Şekil 4-22 aralığında gösterildi.

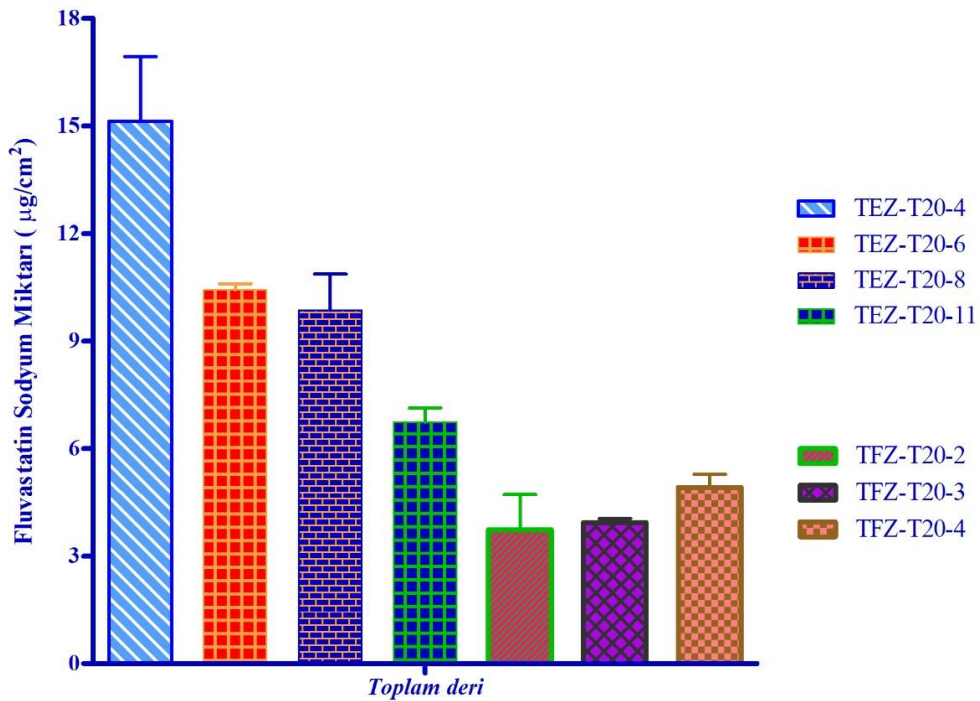
Tablo 4-34: Transetozom ve transferzom formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarları

Formülasyon Kodu	<i>Stratum corneum</i> (µg/cm ²)	Canlı Epidermis + Dermis (µg/cm ²)	Derideki toplam miktar (µg/cm ²)
TEZ-T20-4	13.338 ± 1.941	1.791 ± 0.143	15.129 ± 1.802
TEZ-T20-6	10.102 ± 0,182	0.324 ± 0.007	10.426 ± 0.175
TEZ-T20-8	8.912 ± 0.881	0.945 ± 0.152	9.857 ± 1.011
TEZ-T20-11	5.442 ± 0.223	1.292 ± 0.178	6.735 ± 0.401
TEZ-T80-4	13.098 ± 1.079	0.972 ± 0.140	14.069 ± 1.010
TEZ-T80-5	5.433 ± 0.679	0.796 ± 0.066	6.229 ± 0.657
TEZ-T80-6	9.783 ± 0.894	0.961 ± 0.143	10.744 ± 1.037
TEZ-T80-10	3.572 ± 1.546	0.769 ± 0.049	4.341 ± 1.548
TFZ-T20-2	3.327 ± 0.277	0.410 ± 0.710	3.737 ± 0.974
TFZ-T20-3	3.940 ± 0.108	*	3.940 ± 0.108
TFZ-T20-4	3.695 ± 0.111	1.230 ± 0.240	4.925 ± 0.350
TFZ-T80-1	2.132 ± 0.367	0.177 ± 0.053	2.309 ± 0.386
TFZ-T80-2	2.831 ± 0.444	0.207 ± 0.189	3.038 ± 0.308
TFZ-T80-4	3.846 ± 0.012	0.443 ± 0.118	4.289 ± 0.106

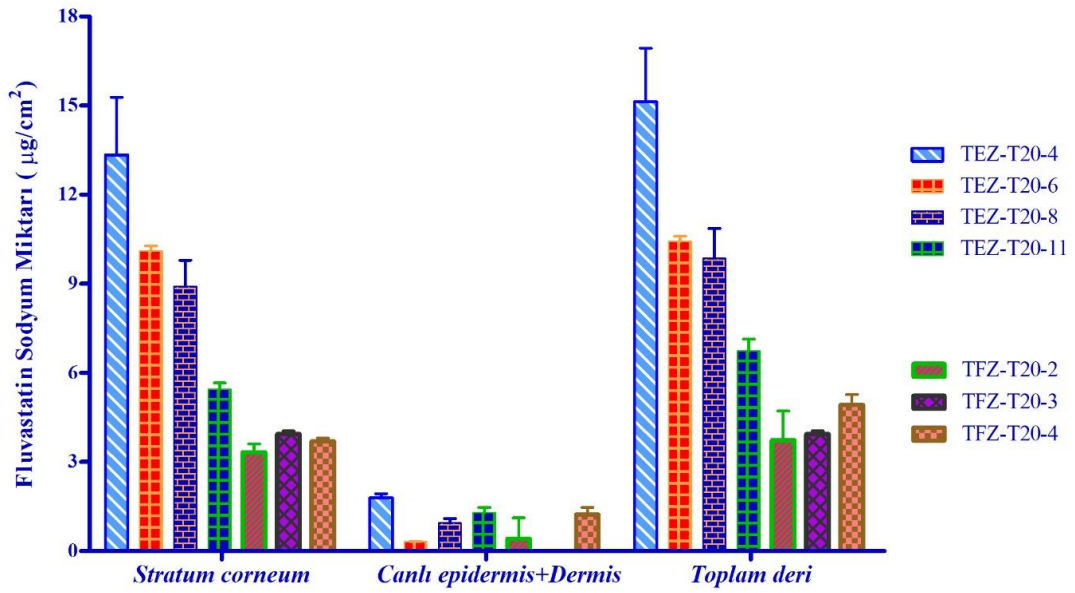
*HPLC ile analiz edilen fluvastatin sodyum miktarı LOQ değerinin altında kalmıştır.



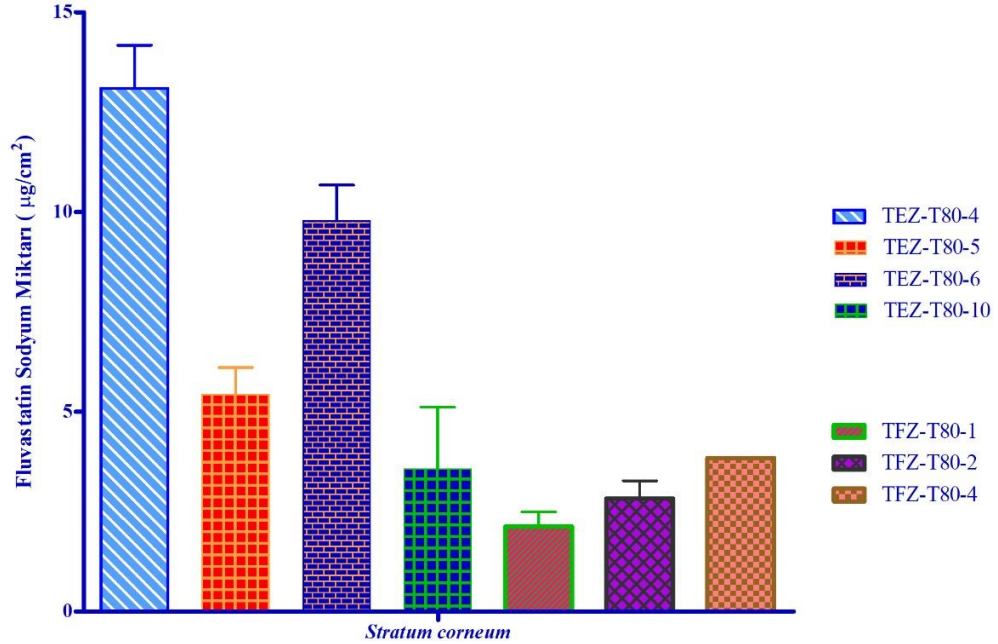
Şekil 4-17: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



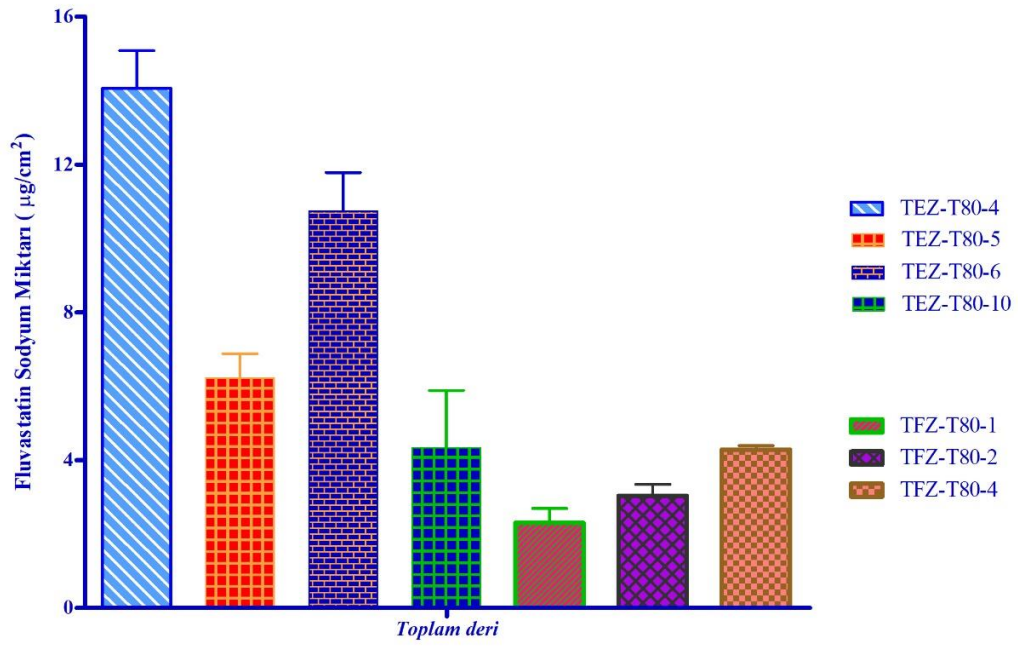
Şekil 4-18: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



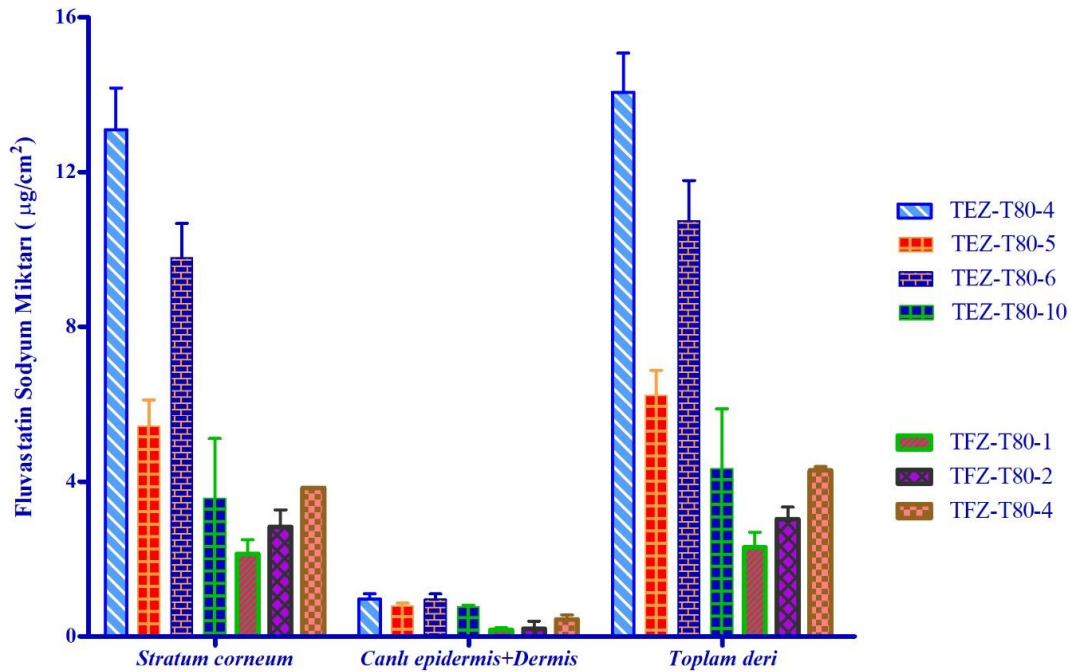
Şekil 4-19: T20 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



Şekil 4-20: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



Şekil 4-21: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



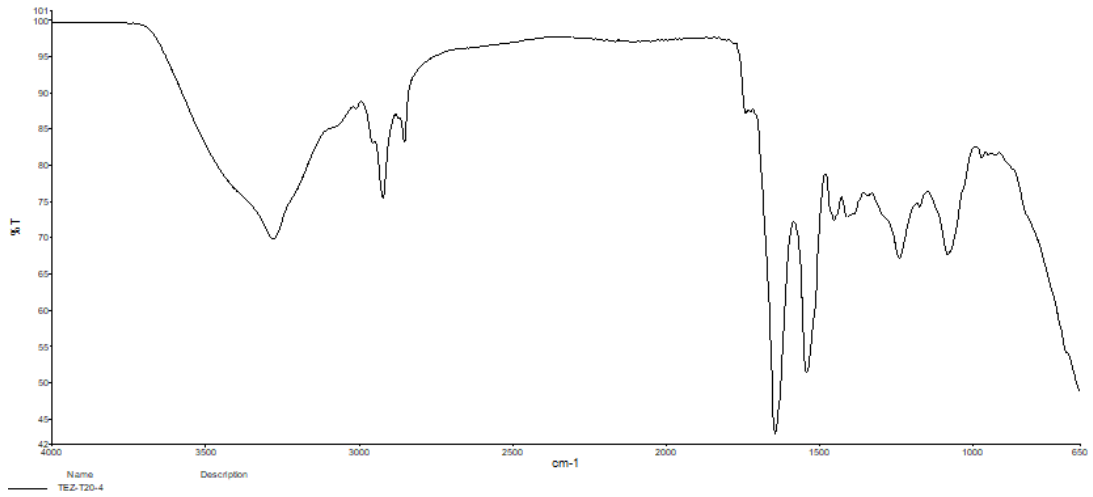
Şekil 4-22: T80 içeren transetozom ve transferzom formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması

4.5.9. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

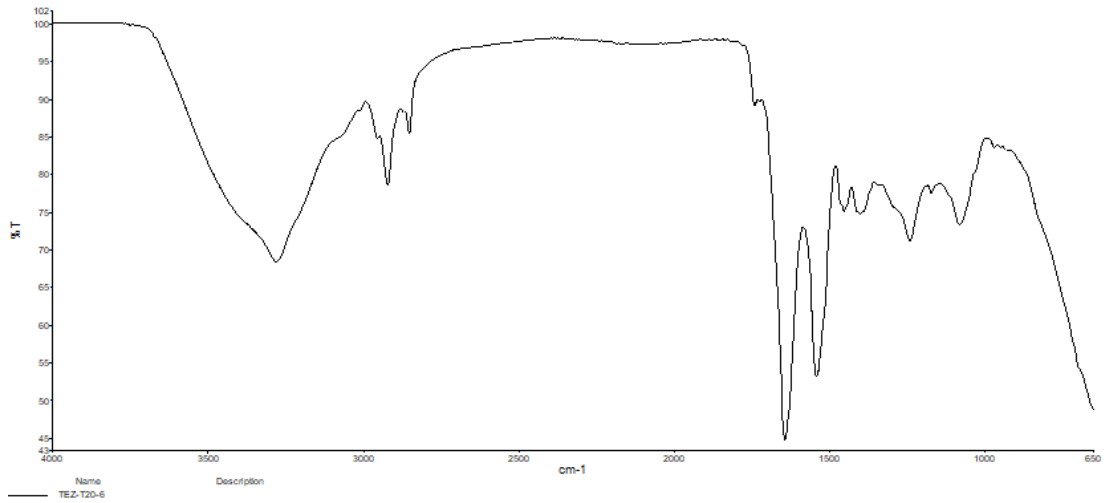
Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları ve kontrol transferzom formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları sonrası Yöntem 3.2.5.7’de belirtildiği şekilde çalışılarak ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-35’de, her bir formülasyon için alınan ATR-FTR spektrumları Şekil 4-23 ile Şekil 4-36 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum ise Şekil 4-37’de verildi.

Tablo 4-35: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları

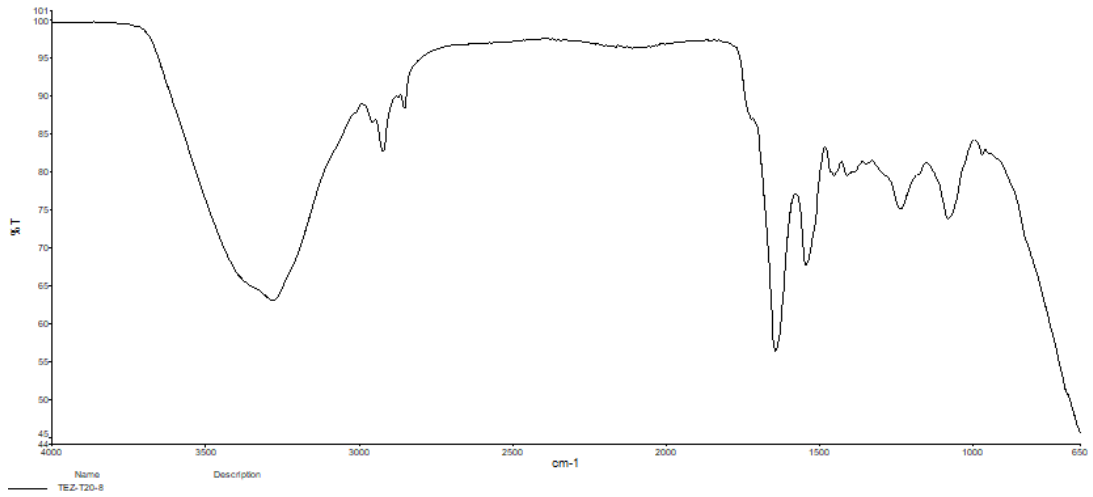
Formülasyon Kodu	Asimetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)	Simetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)
Kontrol Deri	2919.50 ± 0.01	2851.22 ± 0.02
TEZ-T20-4	2923.68 ± 0.32	2853.56 ± 0.26
TEZ-T20-6	2923.36 ± 0.16	2853.78 ± 0.43
TEZ-T20-8	2923.20 ± 0.21	2853.20 ± 0.26
TEZ-T20-11	2922.89 ± 0.27	2853.02 ± 0.03
TEZ-T80-4	2924.09 ± 0.01	2854.65 ± 0.19
TEZ-T80-5	2922.64 ± 0.34	2852.78 ± 0.45
TEZ-T80-6	2919.74 ± 0.49	2850.82 ± 0.27
TEZ-T80-10	2921.94 ± 0.02	2852.28 ± 0.05
TFZ-T20-2	2923.06 ± 0.09	2853.10 ± 0.08
TFZ-T20-3	2922.93 ± 0.23	2853.11 ± 0.06
TFZ-T20-4	2922.89 ± 0.48	2853.07 ± 0.02
TFZ-T80-1	2924.09 ± 0.23	2854.65 ± 0.45
TFZ-T80-2	2922.57 ± 0.07	2852.53 ± 0.05
TFZ-T80-4	2922.16 ± 0.16	2852.72 ± 0.09



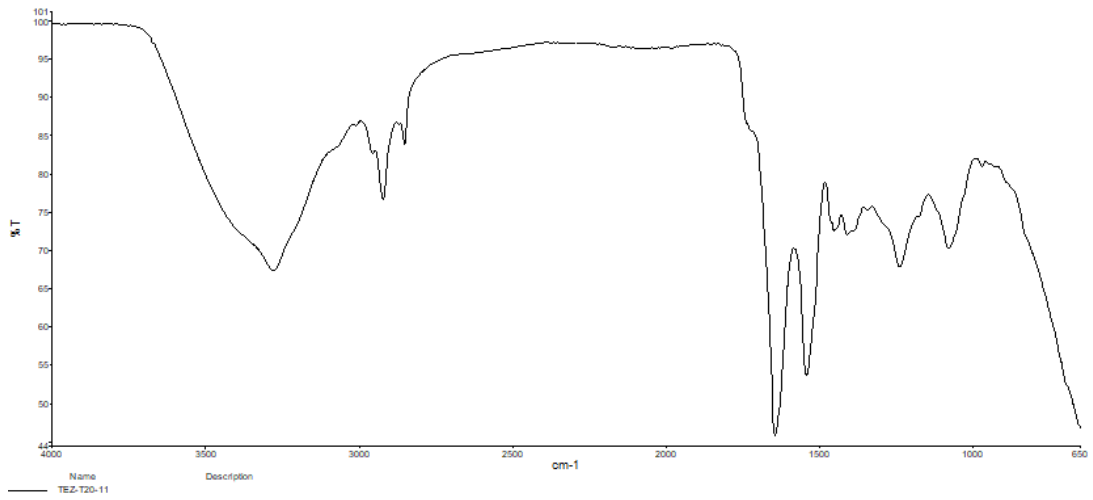
Şekil 4-23: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



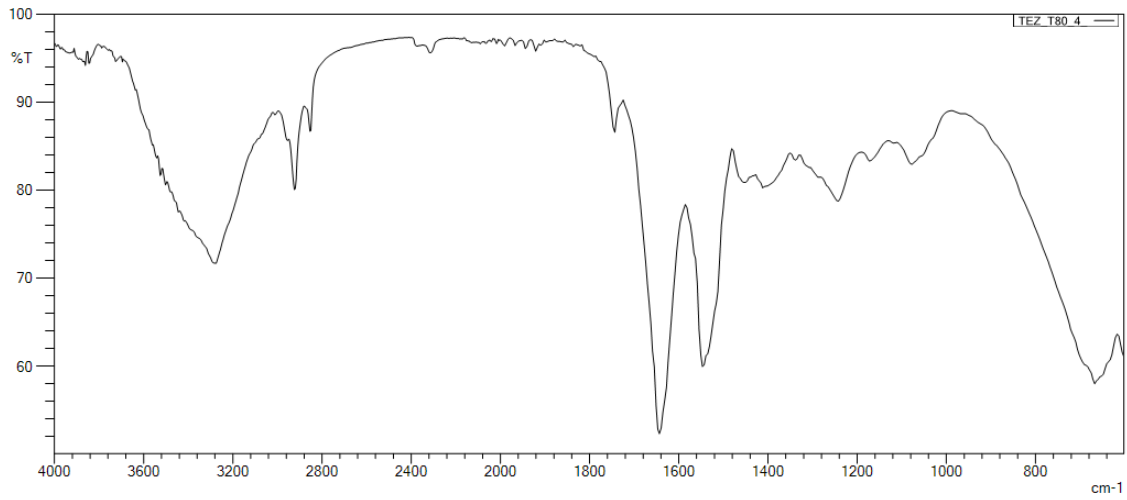
Şekil 4-24: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-6 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



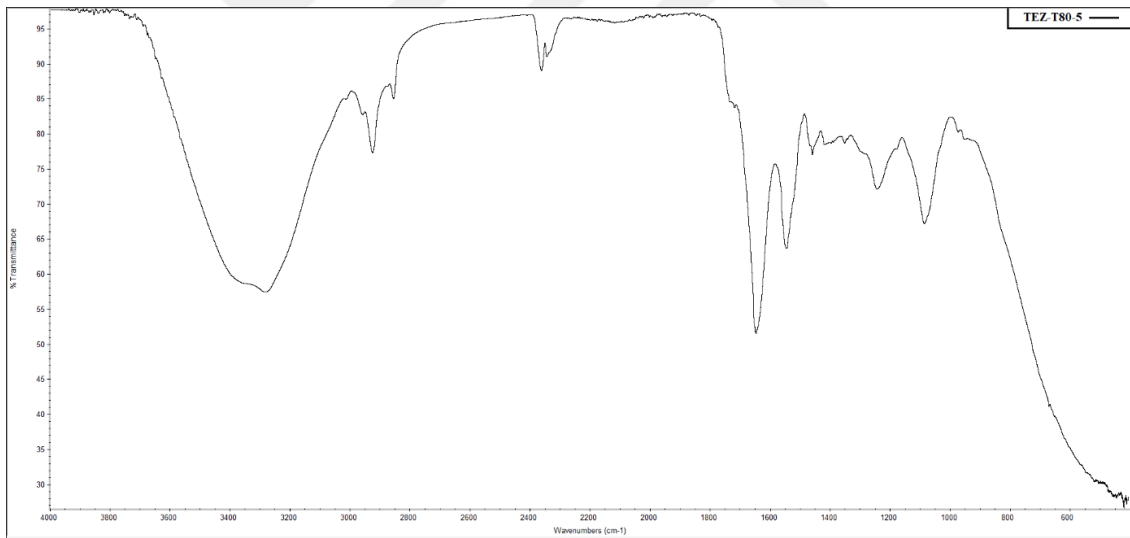
Şekil 4-25: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-8 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



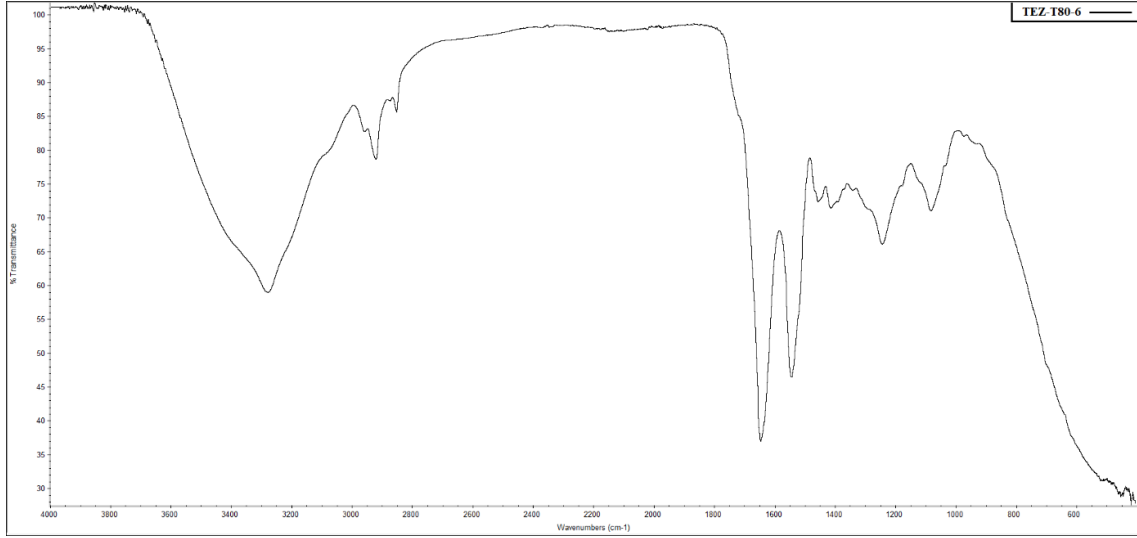
Şekil 4-26: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-11 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



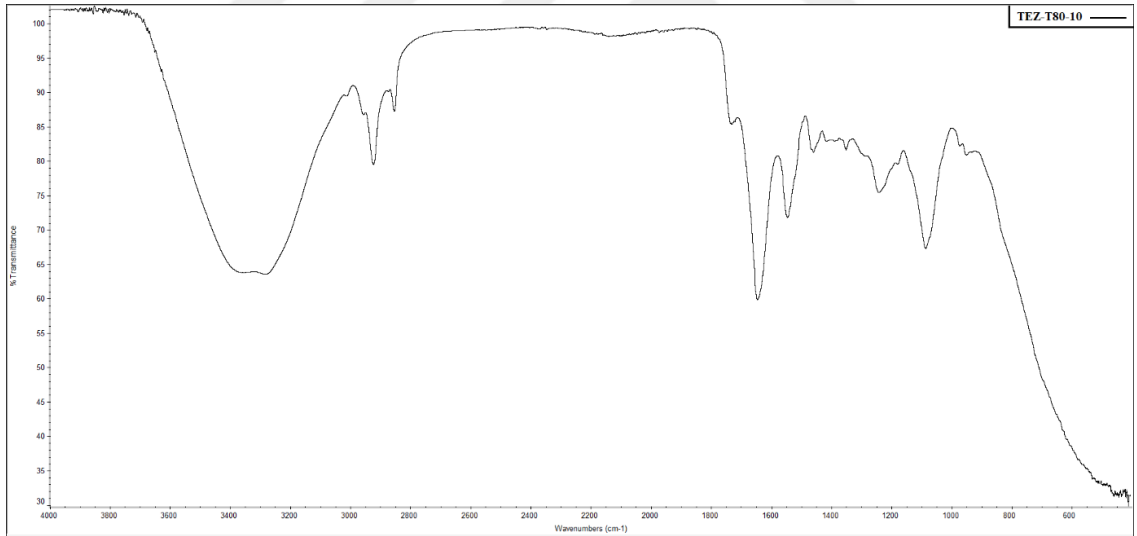
Şekil 4-27: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



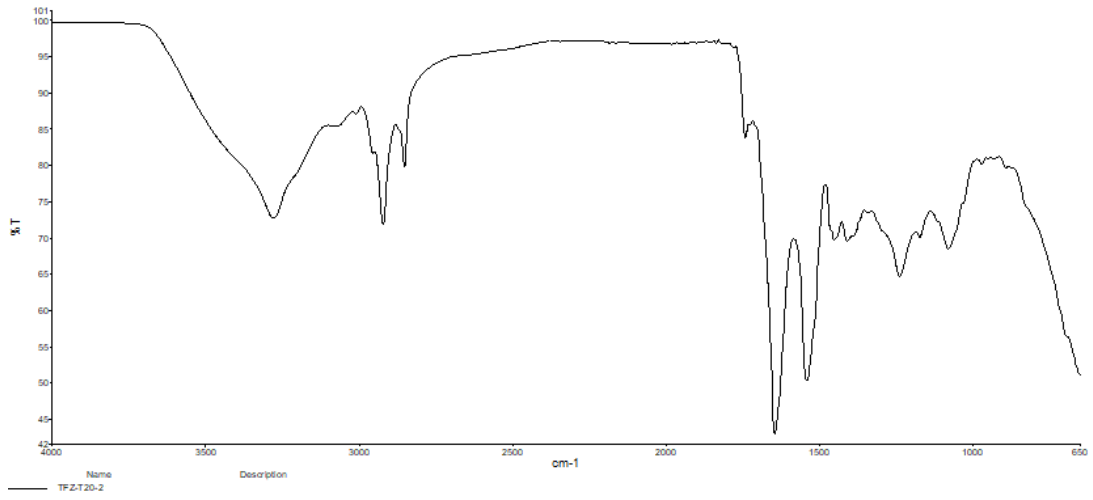
Şekil 4-28: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-5 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



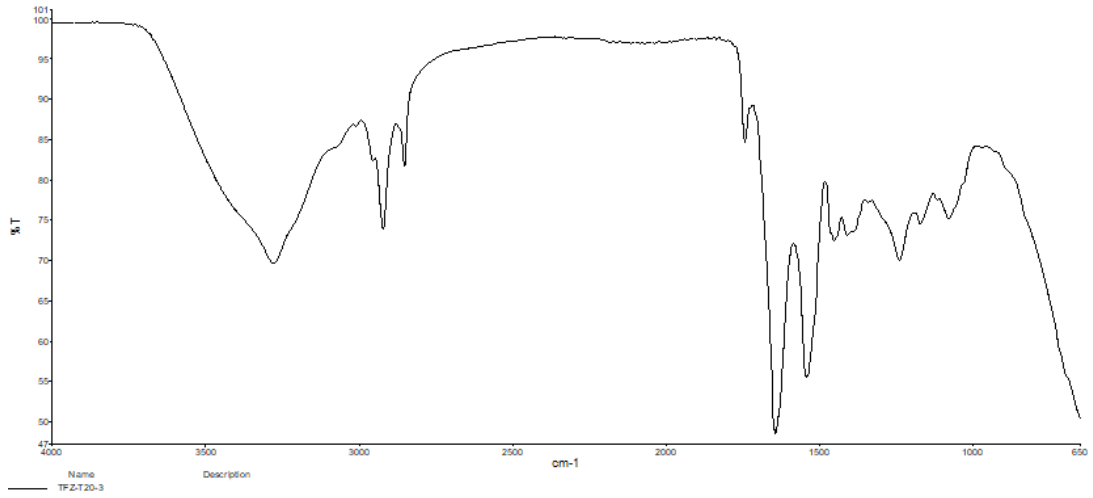
Şekil 4-29: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-6 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



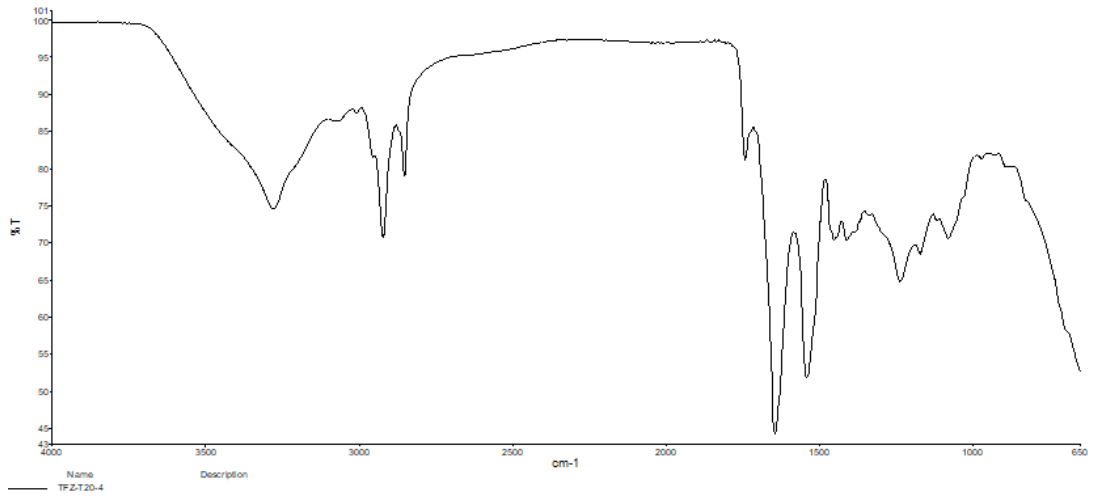
Şekil 4-30: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-10 kodlu transetozom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



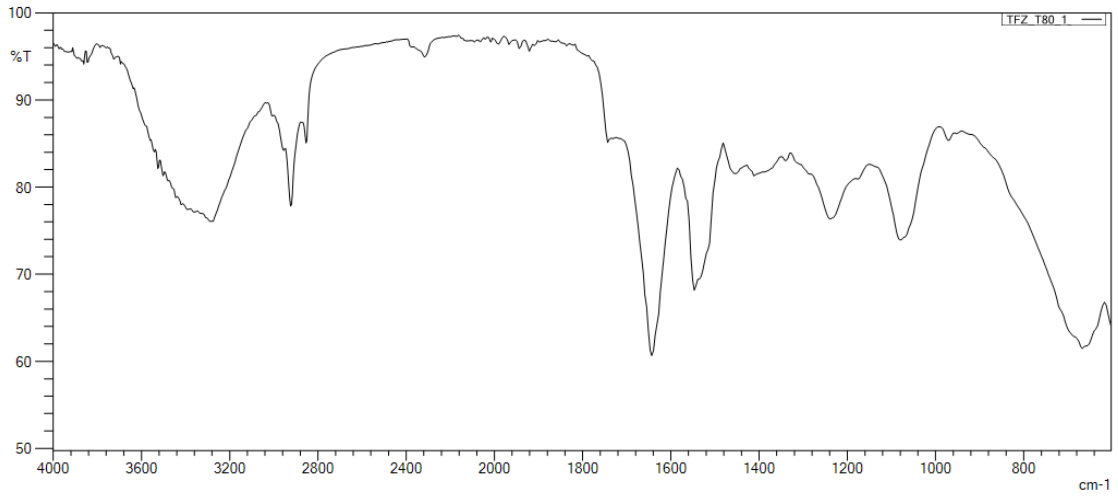
Şekil 4-31: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-2 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



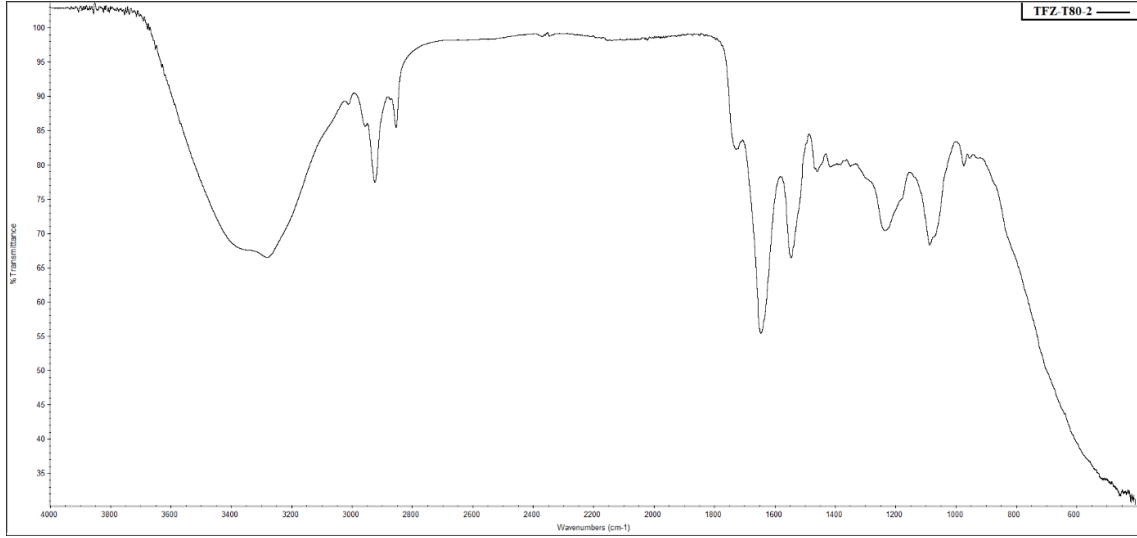
Şekil 4-32: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-3 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



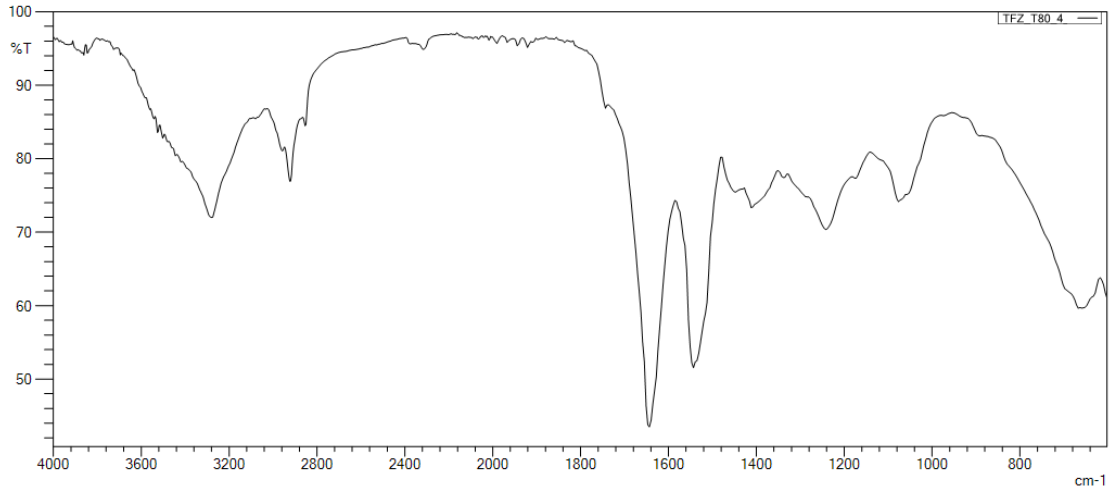
Şekil 4-33: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T20-4 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



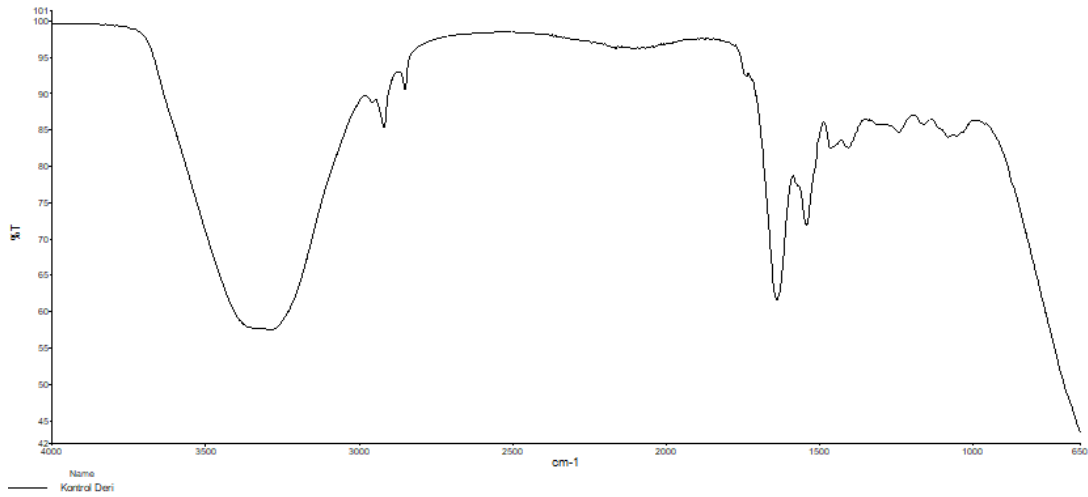
Şekil 4-34: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-1 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-35: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-2 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



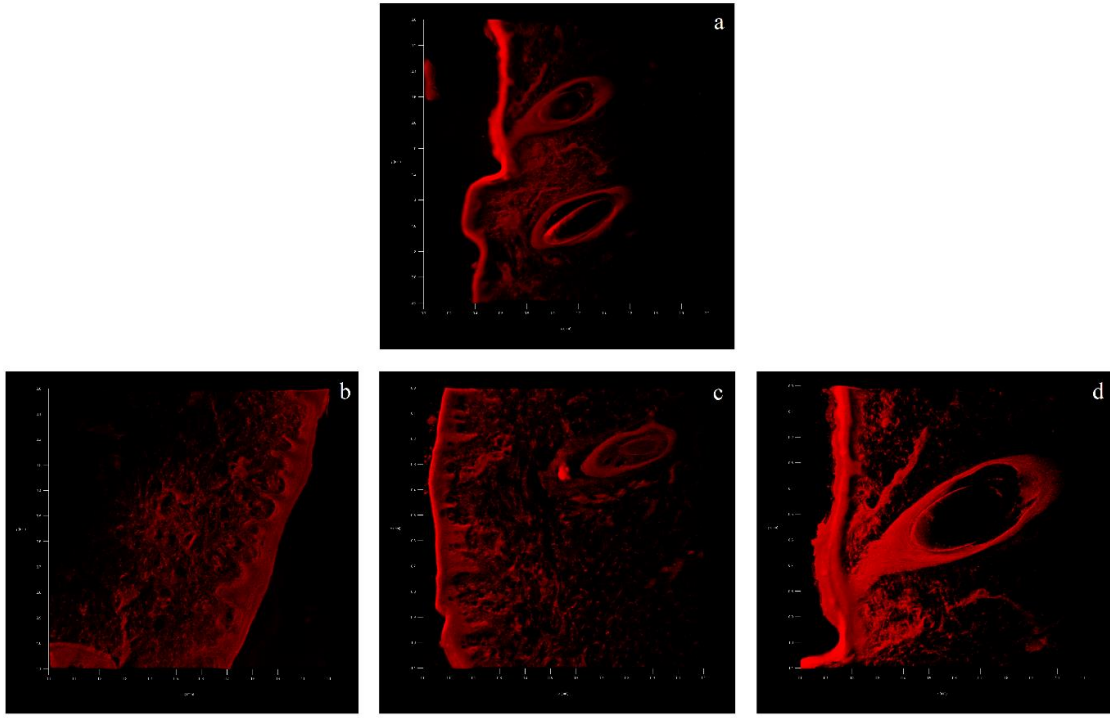
Şekil 4-36: Fluvastatin sodyum yüklü TFZ-T80-4 kodlu transferzom formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



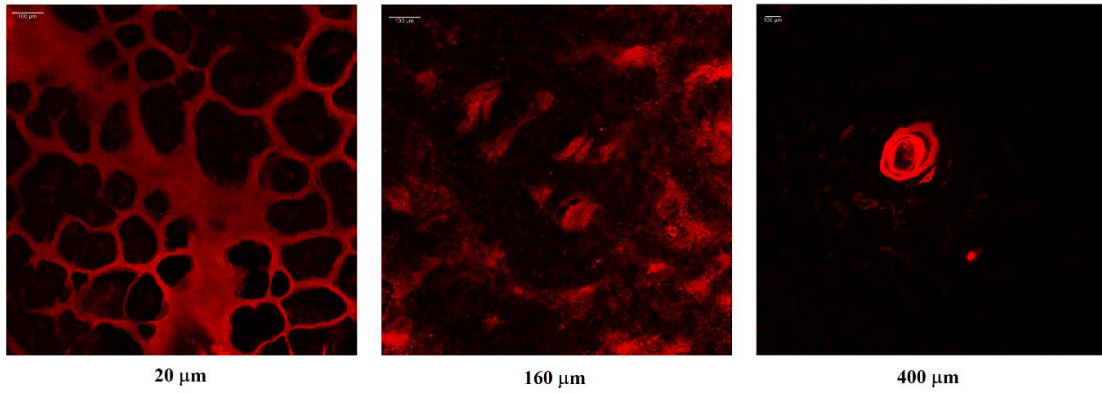
Şekil 4-37: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu

4.5.10. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular

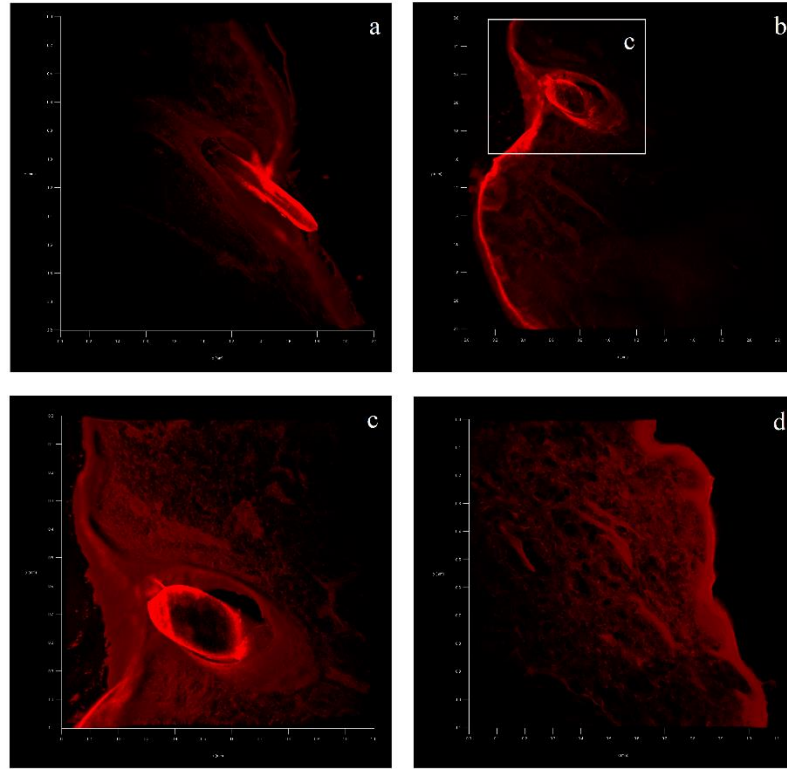
Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla Yöntem 3.2.5.8’de anlatıldığı şekilde CLSM analizleri gerçekleştirildi. TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu olarak nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu ile gerçekleştirilen CLSM analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4-38 ile Şekil 4-43’de sırasıyla verilmiştir.



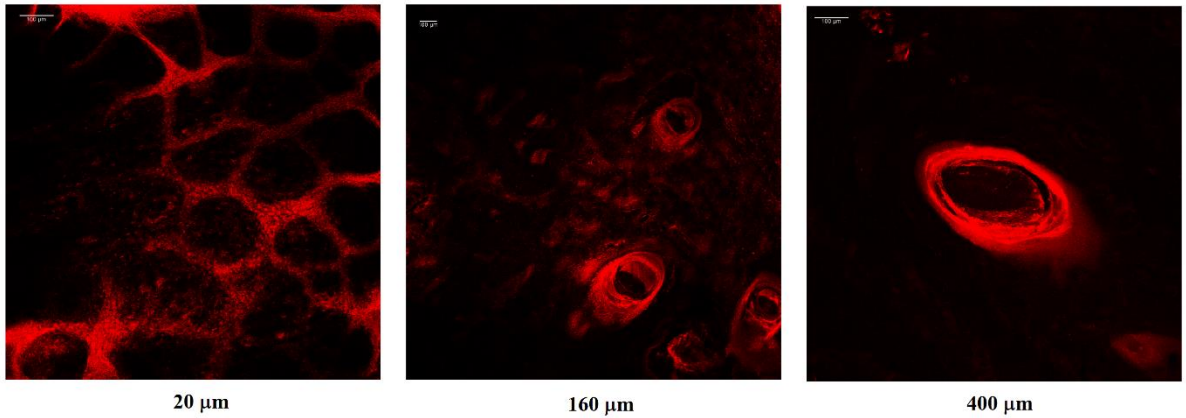
Şekil 4-38: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta 4X büyütme (a) ve 10X büyütme (b, c, d) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



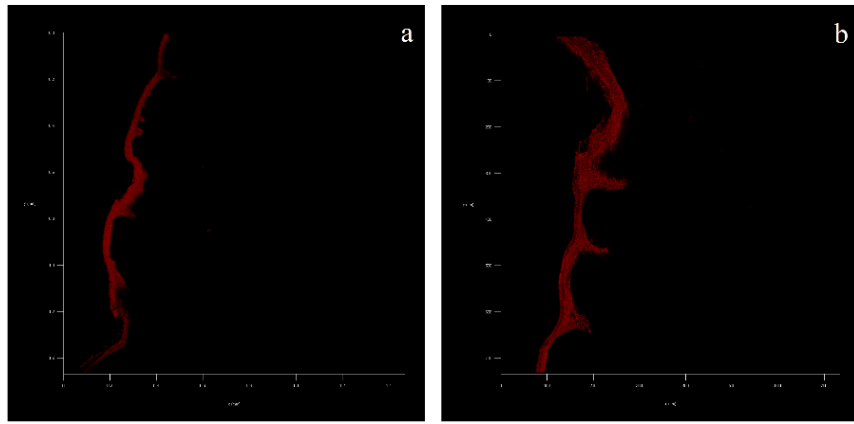
Şekil 4-39: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 μm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)



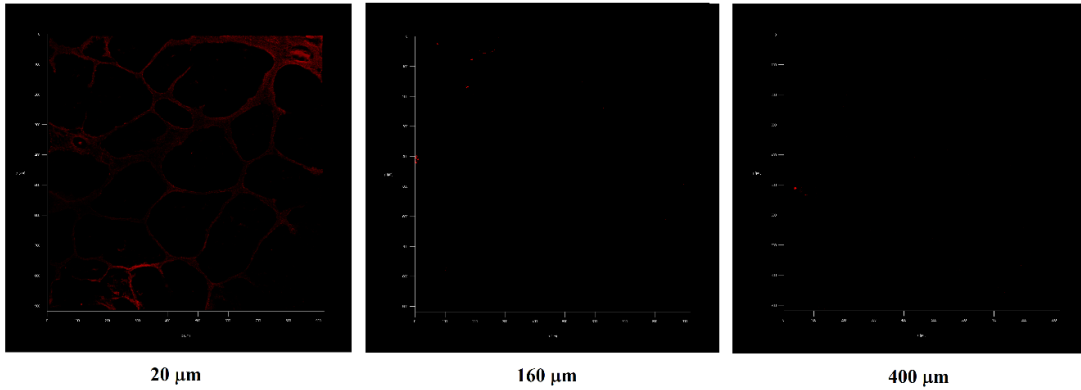
Şekil 4-40: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta 4X büyütme (a ve b) ve 10X büyütme (c ve d) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



Şekil 4-41: Nil kırmızısı yüklü TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 μm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)



Şekil 4-42: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 μ m kalınlıkta alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri a) 4X büyütme, b) 10X büyütme



Şekil 4-43: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 μ m kalınlıkta alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)

4.5.11. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

4.5.11.1. *İn Vitro* Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular

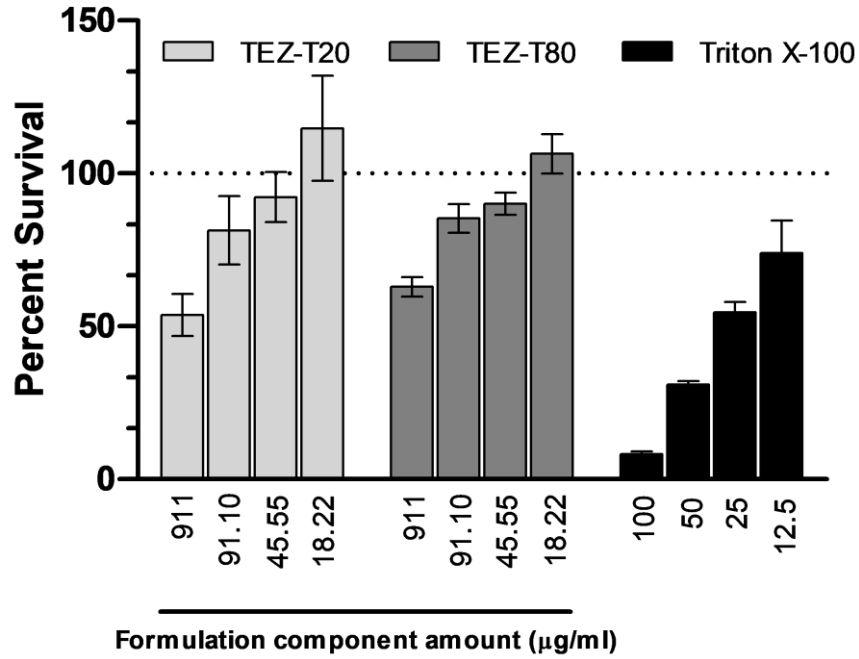
Transetozom formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile Yöntem 3.2.5.9.3’de belirtildiği şekilde çalışılarak değerlendirildi. Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonlarının konsantrasyonları içerdikleri toplam sıvı ve katı bileşenlerin miktarı

üzerinden, etkin madde yüklü transetozomların konsantrasyonları ise içerdikleri etkin madde miktarı üzerinden hesaplanmıştır.

Normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucunda transetozom formülasyonları ve kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-36'da, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafik Şekil 4-44'de verilmiştir.

Tablo 4-36: Transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri

	Konsantrasyon (µg/mL)	Canlılık (%)
TEZ-T20	911	53.68 ± 6.89
	91.10	81.37 ± 11.14
	45.55	92.21 ± 8.17
	18.22	114.72 ± 17.19
TEZ-T80	911	62.91 ± 3.17
	91.10	85.30 ± 4.68
	45.55	90.02 ± 3.62
	18.22	106.38 ± 6.49
Triton X-100	100	8.17 ± 0.94
	50	30.89 ± 1.13
	25	54.52 ± 3.47
	12.5	73.93 ± 10.58



Şekil 4-44: Transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği

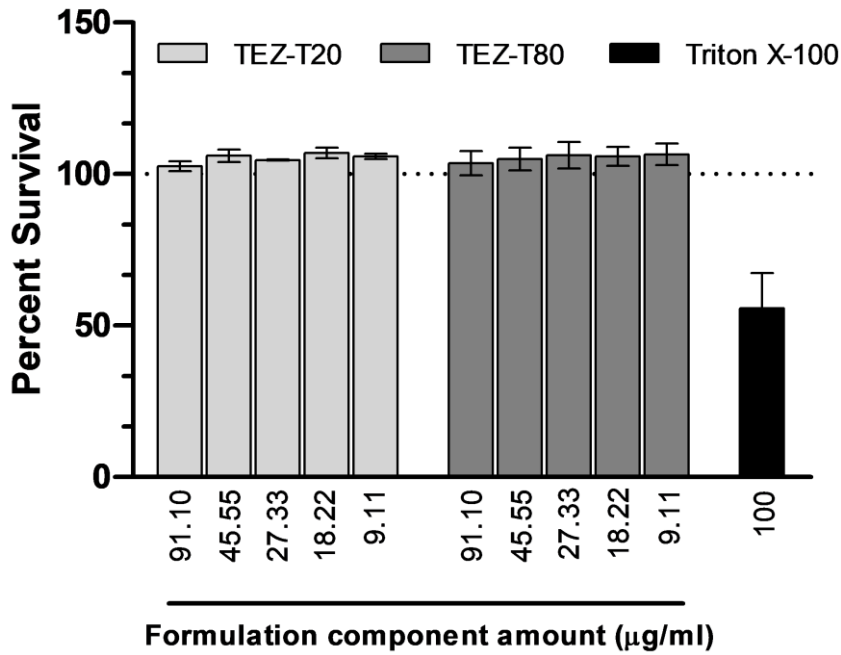
İnsan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucunda boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları, kontrol olarak kullanılan Triton X-100, serbest fluvastatin sodyum ve IL-17A'nın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-37 ve Tablo 4-38'de, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-45 ve Şekil 4-47 aralığında verilmiştir.

Tablo 4-37: Boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile yapılan *in vitro* sitotoksisite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri

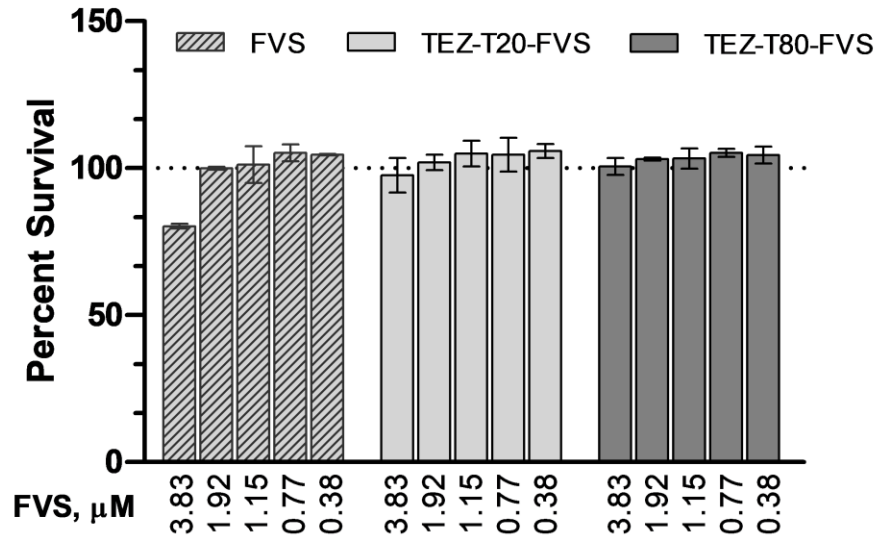
	Konsantrasyon	Canlılık (%)
TEZ-T20	91.10 µg/mL	102.59 ± 1.63
	45.55 µg/mL	106.01 ± 2.09
	27.33 µg/mL	104.59 ± 0.20
	18.22 µg/mL	106.92 ± 1.73
	9.11 µg/mL	105.84 ± 0.88
TEZ-T80	91.10 µg/mL	103.51 ± 4.00
	45.55 µg/mL	104.95 ± 3.76
	27.33 µg/mL	106.21 ± 4.36
	18.22 µg/mL	105.86 ± 3.12
	9.11 µg/mL	106.49 ± 3.56
TEZ-T20-FVS	3.83 µM	97.57 ± 5.87
	1.92 µM	101.97 ± 2.62
	1.15 µM	104.95 ± 4.40
	0.77 µM	104.54 ± 5.74
	0.38 µM	105.81 ± 2.43
TEZ-T80-FVS	3.83 µM	100.51 ± 2.88
	1.92 µM	103.06 ± 0.55
	1.15 µM	103.26 ± 3.42
	0.77 µM	105.17 ± 1.36
	0.38 µM	104.41 ± 2.89

Tablo 4-38: Kontrol Triton X-100, serbest fluvastatin sodyum ve IL-17A çözeltileri ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri

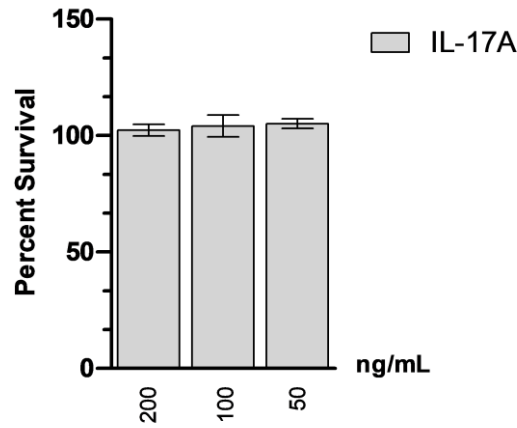
	Konsantrasyon	Canlılık (%)
Fluvastatin Sodyum	3.83 μ M	80.21 $\pm$ 0.83
	1.92 μ M	99.98 $\pm$ 0.49
	1.15 μ M	101.18 $\pm$ 6.21
	0.77 μ M	105.16 $\pm$ 2.88
	0.38 μ M	104.51 $\pm$ 0.25
	0.1 μ M	106.53 $\pm$ 1.47
IL-17A	200 ng/mL	102.33 $\pm$ 2.48
	100 ng/mL	104.09 $\pm$ 4.69
	50 ng/mL	105.11 $\pm$ 2.06
Triton X-100	100 μ g/mL	55.73 $\pm$ 11.62



Şekil 4-45: Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 4-46: Etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ve serbest fluvastatin sodyum çözeltileri ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 4-47: Farklı konsantrasyonlardaki IL-17A çözeltileri ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırılması

Bu çalışmalar sonuncunda *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmalarında kullanılacak etkin madde yüklü transetozom formülasyonunun konsantrasyonu 1 μM olarak belirlendi. Boş formülasyonlar da etkin madde yüklü formülasyonlar ile aynı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilti. Serbest fluvastatin sodyum miktarı 1 μM ve IL-17A miktarı 200 ng/mL olarak belirlendi.

4.5.11.2. *İn Vitro* Antipsoriyatik Aktivitenin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

İn vitro antipsoriyatik aktivite çalışmaları psöriyatik epidermal keratinositlerin hiperproliferatif ve bozulmuş farklılaşmasını taklit eden bir hücre hattı olan insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (Breitkreutz ve ark. 1991) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem 3.2.5.9.4'te belirtildiği şekilde çalışılarak ve hücre kültür ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarları ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

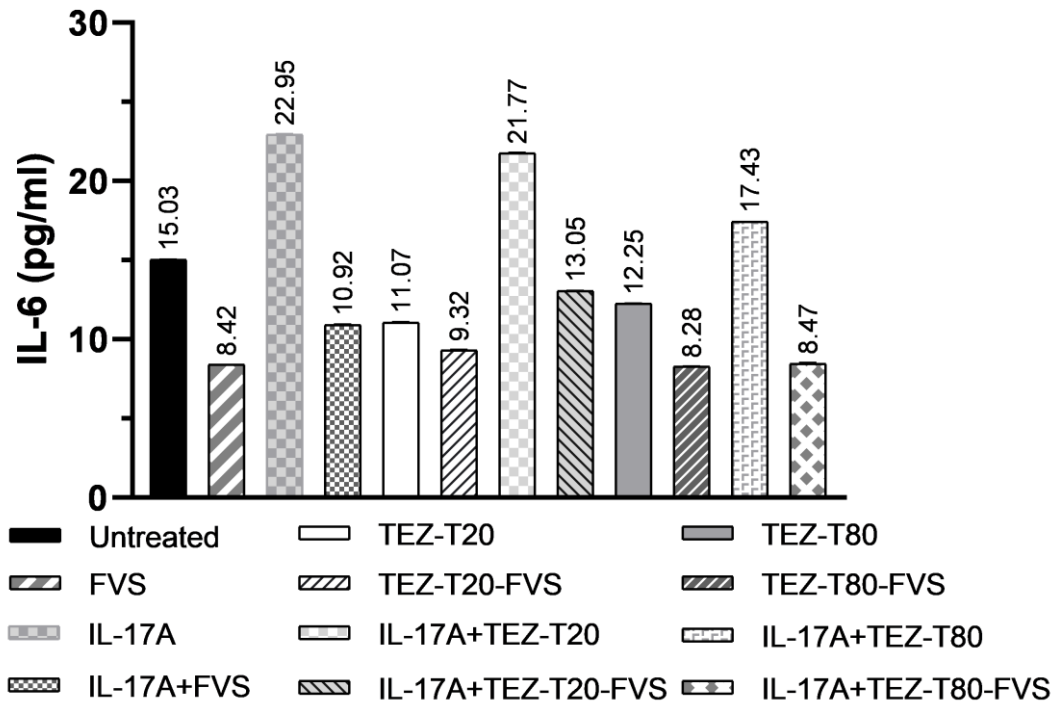
Antipsoriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında; IL-17A, serbest haldeki fluvastatin sodyum ve boş ve etkin madde yüklü transetozomlar tek başına hücrelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Aynı zamanda IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücrelere serbest haldeki fluvastatin sodyum, boş ve etkin madde yüklü transetozomlar ayrı ayrı uygulanarak antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi. Hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarları sırasıyla Tablo 4-39'te ve Tablo 4-40'te, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-48 ile Şekil 4-51 aralığında verilmiştir.

Tablo 4-39: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 miktarları

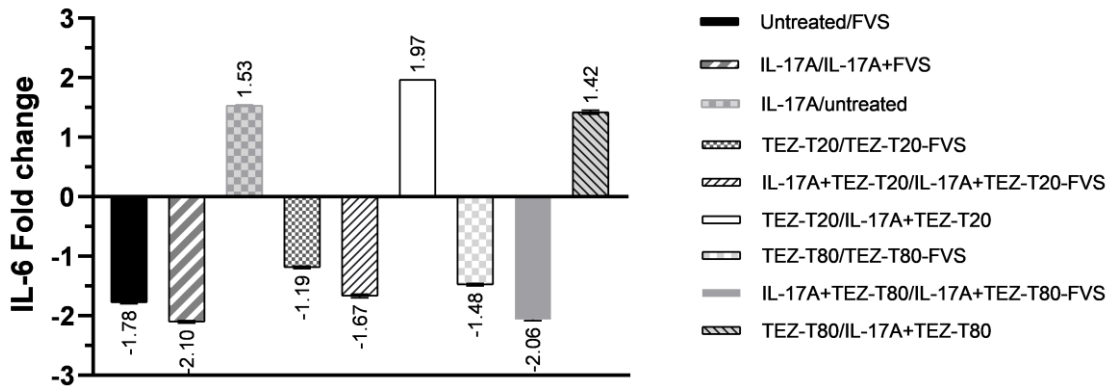
	IL-6 (pg/mL)
Untreated	15.03 ± 0.02
FVS	8.42 ± 0.003
IL-17A	22.95 ± 0.02
IL-17A + FVS	10.92 ± 0.01
TEZ-T20	11.07 ± 0.01
TEZ-T20-FVS	9.32 ± 0.02
IL-17A + TEZ-T20	21.77 ± 0.02
IL-17A + TEZ-T20-FVS	13.05 ± 0.01
TEZ-T80	12.25 ± 0.02
TEZ-T80-FVS	8.28 ± 0.02
IL-17A + TEZ-T80	17.43 ± 0.004
IL-17A + TEZ-T80-FVS	8.47 ± 0.03

Tablo 4-40: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları

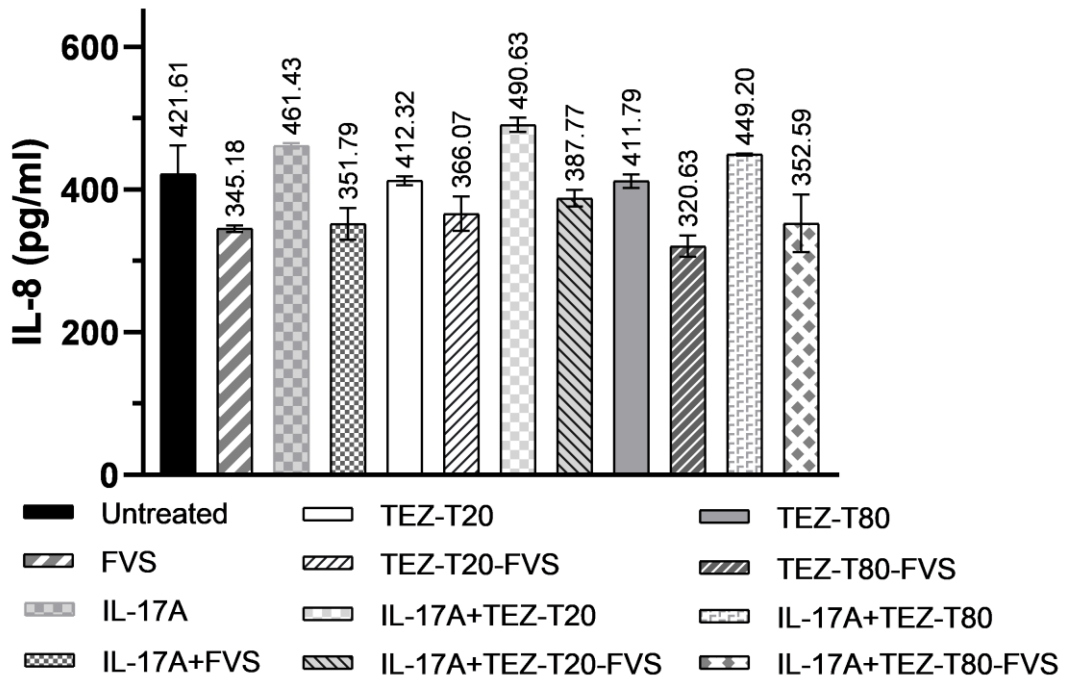
	IL-8 (pg/mL)
Untreated	421.61 ± 39.90
FVS	345.18 ± 4.55
IL-17A	461.43 ± 3.79
IL-17A + FVS	351.79 ± 21.97
TEZ-T20	421.32 ± 6.31
TEZ-T20-FVS	366.07 ± 24.24
IL-17A + TEZ-T20	490.63 ± 9.98
IL-17A + TEZ-T20-FVS	387.77 ± 11.74
TEZ-T80	411.79 ± 9.34
TEZ-T80-FVS	320.63 ± 14.77
IL-17A + TEZ-T80	449.20 ± 1.39
IL-17A + TEZ-T80-FVS	352.59 ± 40.28



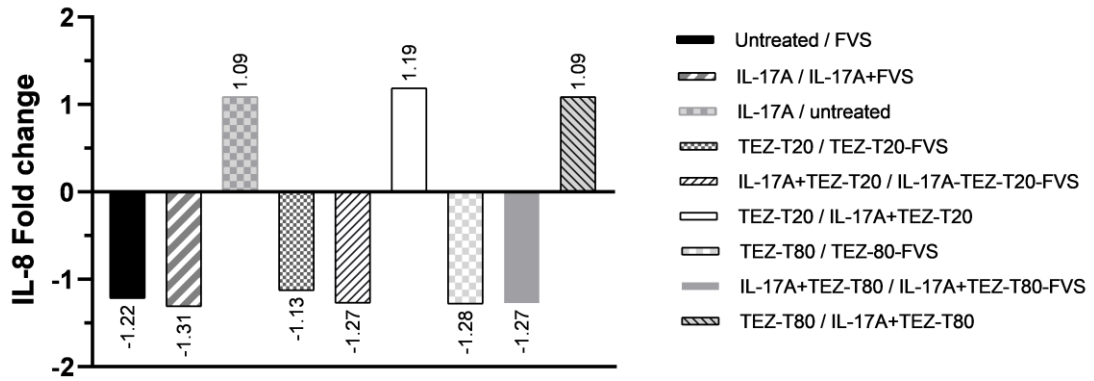
Şekil 4-48: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik



Şekil 4-49: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren kat değişim grafiği



Şekil 4-50: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik

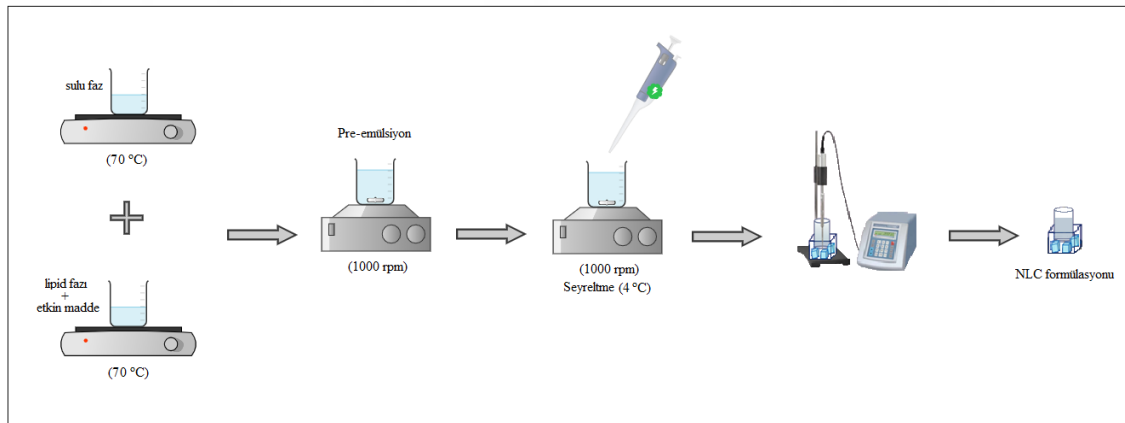


Şekil 4-51: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren kat değişim grafiği

4.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistem (NLC) Formülasyon Çalışmaları

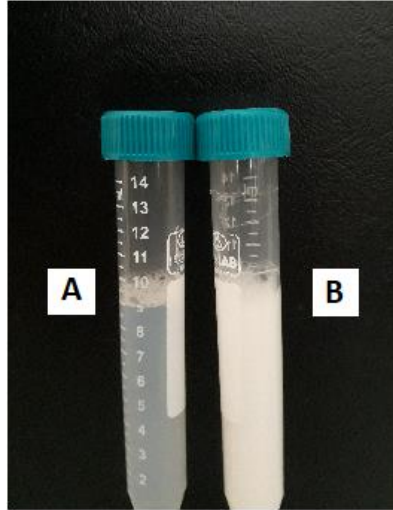
4.6.1. NLC Formülasyonlarının Hazırlanması

Fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının Yöntem 3.2.6.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanması Şekil 4-52’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-52: Fluvastatin sodyum yüklü NLC tipi nanotaşıyıcıların hazırlanması

Hazırlanan NLC formülasyonlarının sırasıyla sonikasyon öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4-53’de gösterilmiştir.



Şekil 4-53: Fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının sonikasyon öncesi (A) ve sonrası (B) fiziksel görünüşleri

4.6.2. NLC Ön Formülasyon ve Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan etkin madde içermeyen ve tek sürfaktan ile denenen Yöntem 3.2.6.2’de bileşen ve oranları verilen formülasyonların lipit bazlı nanopartiküler sistem oluşturup oluşturmadığı, boyutları ve boyut dağılımları incelenerek değerlendirildi. Formülasyonlara ait bulgular Tablo 4-41’de verilmiştir.

Tablo 4-41: Etkin madde içermeyen ve tek sürfaktan ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI
NLC-CC90-KEL-7,5	2498 ± 98,84	0,433 ± 0,111
NLC-CC90-KEL-5	2462 ± 10,01	0,627 ± 0,077
NLC-CC90-KEL-3,33	1552,33 ± 278,16	0,884 ± 0,200
NLC-CC90-T20-7,5	658,97 ± 15,45	0,575 ± 0,001
NLC-CC90-T20-5	407,27 ± 12,36	0,555 ± 0,020
NLC-CC90-T20-3,33	320,2 ± 2	0,378 ± 0,045
NLC-CC90-T80-7,5	936,07 ± 24,79	0,273 ± 0,223
NLC-CC90-T80-5	694,13 ± 12,44	0,280 ± 0,006
NLC-CC90-T80-3,33	445,97 ± 13,82	0,263 ± 0,012
NLC-CC90-CA25-7,5	135,5 ± 3,724	1 ± 0
NLC-CC90-CA25-5	121,23 ± 0,702	0,702 ± 0,010
NLC-CC90-CA25-3,33	183,1 ± 1,9	0,221 ± 0,007
NLC-CC90-G44/14-7,5	351,7 ± 7,797	0,472 ± 0,006
NLC-CC90-G44/14-5	326,5 ± 4,694	0,292 ± 0,009
NLC-CC90-G44/14-3,33	327,9 ± 5,139	0,287 ± 0,030
NLC-CC90-KHS15-7,5	1126,83 ± 164,56	1 ± 0
NLC-CC90-KHS15-5	877,1 ± 208,83	0,990 ± 0,017
NLC-CC90-KHS15-3,33	885 ± 161,254	0,91 ± 0,095
NLC-CC90-KP188-5	187,12 ± 7,453	0,372 ± 0,021
NLC-CC90-KP188-3,33	150,23 ± 9,302	0,252 ± 0,032
NLC-CC90-KRH40-7,5	373,2 ± 2,425	0,337 ± 0,037
NLC-CC90-KRH40-5	495,6 ± 2,427	0,275 ± 0,013
NLC-CC90-KRH40-3,33	951,67 ± 9,113	0,375 ± 0,005

Tablo 4-41’de verilen uygun partikül boyutu ve boyut dağılımı gösteren formülasyonların iyileştirilmesi amacıyla iki farklı sürfaktan kullanılarak ile çalışmalara devam edildi. Yöntem 3.2.6.2’de bileşen ve oranları verilen yeni hazırlanan formülasyonların ortalama partikül boyutu ve dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ölçümleri gerçekleştirildi ve bu formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-42’da gösterildi.

Tablo 4-42: Etkin madde içermeyen ve iki farklı sürfaktan ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Sonuç
NLC-CC90-T80CA25-7,5	107,7 ± 0,100	0,192 ± 0,008	Uygun
NLC-CC90-T80CA25-5	122,17 ± 1,301	0,191 ± 0,005	Uygun
NLC-CC90-T80CA25-3,33	128,93 ± 1,079	0,194 ± 0,009	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-7,5	109,90 ± 1,552	0,179 ± 0,014	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-5	130,47 ± 1,320	0,193 ± 0,009	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-3,33	146,17 ± 1,222	0,184 ± 0,015	Uygun
NLC-CC90-KELCA25-7,5	93,83 ± 3,244	0,303 ± 0,010	Uygun değil
NLC-CC90-KELCA25-5	98,31 ± 3,021	0,240 ± 0,002	Uygun değil
NLC-CC90-KELCA25-3,33	114,33 ± 2,138	0,229 ± 0,014	Uygun değil
NLC-CC90-T20KP188-7,5	216,37 ± 9,506	0,457 ± 0,003	Uygun değil
NLC-CC90-T20KP188-5	236,33 ± 5,066	0,664 ± 0,125	Uygun değil
NLC-CC90-T20KP188-3,33	213,83 ± 2,761	0,474 ± 0,060	Uygun değil

Tablo 4-42’de verilen uygun olduğu düşünülen formülasyonlardan hareketle farklı katı yağlar ve sıvı yağların denendiği yeni formülasyonlar ile çalışmalar devam edildi. Yöntem 3.2.6.2’de bileşen ve oranları verilen yeni hazırlanan bu formülasyonlar da aynı şekilde görsel olarak ve partikül boyutu ve dağılımları açısından değerlendirildi. Hazırlanan formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-43’de gösterilmiştir.

Tablo 4-43: Etkin madde içermeyen ve farklı katı ve sıvı lipitler ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Sonuç
NLC-PC90-T20CA25-7,5	26,49 ± 0,241	0,385 ± 0,006	Uygun değil
NLC-PC90-T20CA25-5	49,72 ± 0,344	0,251 ± 0,006	Uygun değil
NLC-PC90-T20CA25-3,33	71,87 ± 0,570	0,351 ± 0,007	Uygun değil
NLC-PC90-T80CA25-7,5	29,75 ± 0,196	0,363 ± 0,010	Uygun değil
NLC-PC90-T80CA25-5	90,31 ± 1,848	0,273 ± 0,002	Uygun değil
NLC-PC90-T80CA25-3,33	106,47 ± 3,060	0,256 ± 0,004	Uygun değil
NLC-CLFCC-T20CA25-5	259,7 ± 11,36	0,518 ± 0,074	Uygun değil
NLC-CL90-T20CA25-5	259 ± 5,941	0,423 ± 0,040	Uygun değil
NLC-CPO-T20CA25-5	305,3 ± 14,039	0,480 ± 0,003	Uygun değil
NLC-CLM-T20CA25-5	318,67 ± 8,409	0,511 ± 0,082	Uygun değil
NLC-CLPG-T20CA25-5	260,93 ± 8,830	0,478 ± 0,019	Uygun değil
NLC-CLL-T20CA25-5	367,93 ± 48,25	0,598 ± 0,132	Uygun değil
NLC-CIPM-T20CA25-5	237 ± 5,411	0,327 ± 0,018	Uygun değil
NLC-COA-T20CA25-5	233,7 ± 4,681	0,498 ± 0,026	Uygun değil

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen ve yukarıdaki tablolarda sırasıyla verilen tüm formülasyonlara ait bulgular göz önünde bulundurularak uygun olduğu düşünülen formülasyonlar etkin madde yüklenerek tekrar hazırlandı ve değerlendirildi. Yöntem 3.2.6.2’de bileşen ve oranları verilen etkin madde yüklü yeni hazırlanan formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-44’da gösterilmiştir.

Tablo 4-44: Etkin madde yüklü NLC formülasyonlarına ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Sonuç
NLC-CC90-T80CA25-7,5	148,13 ± 1,250	0,188 ± 0,005	Uygun
NLC-CC90-T80CA25-5	143,30 ± 6,10	0,13 ± 0,01	Uygun
NLC-CC90-T80CA25-3,33	129,53 ± 3,86	0,19 ± 0,01	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-7,5	134,87 ± 0,603	0,169 ± 0,003	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-5	145,33 ± 2,5	0,13 ± 0,02	Uygun
NLC-CC90-T20CA25-3,33	159,67 ± 1,85	0,14 ± 0,01	Uygun

Formülasyona fluvastatin sodyum %0,1 oranında yüklenmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları ile formülasyon bileşen ve oranlarına karar verildi. Nihai formülasyonların belirlenmesinde ikinci basamak olan NLC formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ilk olarak Yöntem 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen ve yüksek devirli homejenizatör kullanımının lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-45’de gösterilmiştir.

Tablo 4-45: Optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan NLC formülasyonları üzerine hazırlama yönteminin etkisini gösteren bulgular

Formülasyon Kodu	Hazırlama yöntemi		Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama
	YDH	Sonikasyon			
	+	-	99,21 ± 1,016	0,397 ± 0,01	Homojen görünüm
NLC-CC90-T20CA25-5	-	+	145,33 ± 2,500	0,13 ± 0,02	Homojen görünüm
	+	+	130,30 ± 1,082	0,194 ± 0,01	Homojen görünüm

YDH: Yüksek devirli homojenizasyon

Yöntem 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanan NLC formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ikincil olarak gerçekleştirilen ve sonikasyon güç ve süresinin lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-46’de gösterilmiştir.

Tablo 4-46: NLC formülasyonuna uygulanan sonikasyon güç ve süresinin etkisini inceleyen çalışmaya ait bulgular

Formülasyon Kodu	Sonikasyon gücü (%)	Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama
NLC-CC90-T20CA25-5	35	10	145,33 ± 2,500	0,13 ± 0,02	Homojen görünüm
		15	155,43 ± 0,757	0,156 ± 0,010	Homojen görünüm
		20	163,27 ± 1,721	0,213 ± 0,008	Homojen görünüm
	50	5	151 ± 1,873	0,171 ± 0,023	Homojen görünüm
		10	245,37 ± 0,666	0,432 ± 0,005	Homojen görünüm
		15	228,87 ± 1,211	0,294 ± 0,019	Homojen görünüm
		20	184,23 ± 2,146	0,232 ± 0,008	Homojen görünüm
	75	5	151 ± 1,873	0,171 ± 0,023	Homojen görünüm
		10	245,37 ± 0,666	0,432 ± 0,005	Homojen görünüm
		15	228,87 ± 1,211	0,294 ± 0,019	Homojen görünüm

Bu çalışma sonucunda NLC formülasyonları için yüksek devirli homojenizatör kullanmanın taşıyıcı sistemin oluşumu ve karakterizasyonu üzerinde önemli olumlu bir etkisi olmadığı görülmüş ve kullanımından vazgeçilmiştir. Sonikasyon güç ve süresi optimizasyonu kapsamında yapılan çalışma sonucunda NLC formülasyonları için sonikasyon gücü %35 ve süresi 10 dk olarak belirlenmiştir.

4.6.3. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Belirlenmesi

Ön formülasyon ve optimizasyon verileri değerlendirilmiş ve daha ileri çalışmalarda kullanılacak istenilen partikül boyutu, PDI, pH ve stabiliteye sahip formülasyonların belirlenmesi amacıyla hazırlanan ve değerlendirilen NLC formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-47 ve Tablo 4-48’de verilmiştir. Tablo 4-47 ve Tablo 4-48’deki miktarlar toplam 10 mL optimize formülasyonların içeriğini temsil etmektedir.

Tablo 4-47: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipit: sıvı lipit oranı	Compritol 888 ATO (mg)	Capryol 90 (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Tween 20 (mg)	Cremophor A25 (mg)
NLC-T20-1	50:50	250	250	45:55	204	407
NLC-T20-2				50:50	167	333
NLC-T20-3				55:45	136	273
NLC-T20-4				60:40	111	222
NLC-T20-5	60:40	300	200	45:55	204	407
NLC-T20-6				50:50	167	333
NLC-T20-7				55:45	136	273
NLC-T20-8				60:40	111	222
NLC-T20-9	70:30	350	150	45:55	204	407
NLC-T20-10				50:50	167	333
NLC-T20-11				55:45	136	273
NLC-T20-12				60:40	111	222

Formülasyona fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

Tablo 4-48: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoyapılı lipid taşıyıcı sistemlerin bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Katı lipid: sıvı lipid oranı	Compritol 888 ATO (mg)	Capryol 90 (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Tween 80 (mg)	Cremophor A25 (mg)
NLC-T80-1	50:50	250	250	45:55	204	407
NLC-T80-2				50:50	167	333
NLC-T80-3				55:45	136	273
NLC-T80-4				60:40	111	222
NLC-T80-5	60:40	300	200	45:55	204	407
NLC-T80-6				50:50	167	333
NLC-T80-7				55:45	136	273
NLC-T80-8				60:40	111	222
NLC-T80-9	70:30	350	150	45:55	204	407
NLC-T80-10				50:50	167	333
NLC-T80-11				55:45	136	273
NLC-T80-12				60:40	111	222

Formülasyona fluvastatin sodyum % 0,1 oranında yüklenmiştir.

4.6.4. Optimize Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonları ve Stabilitelerine Ait Bulgular

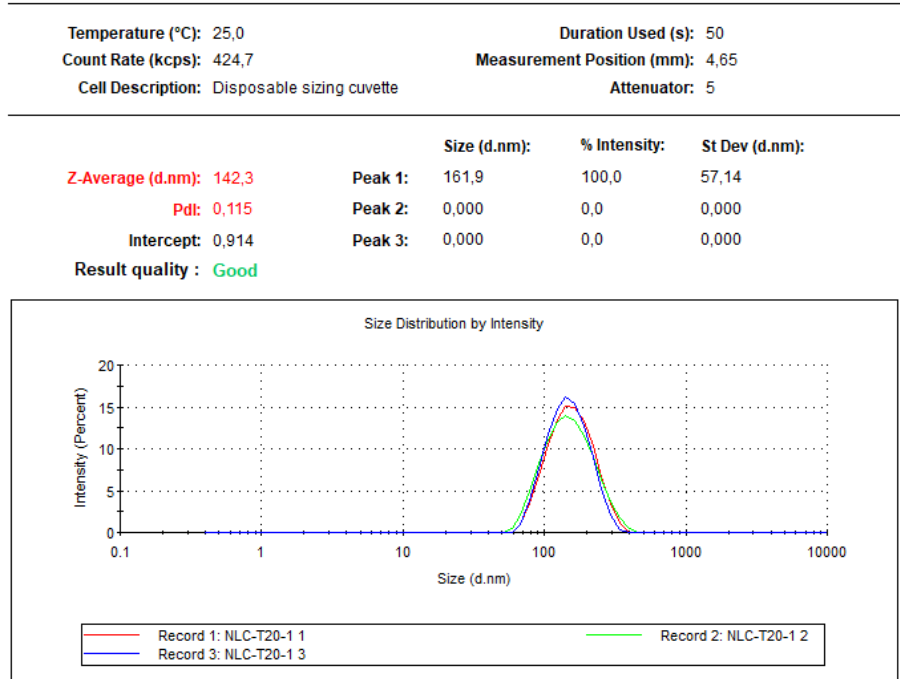
Yöntem 3.2.6.3'te belirtildiği şekilde çalışılan optimize fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarına ait partikül boyutu, boyut dağılımı, pH bulguları Tablo 4-49 ve Tablo 4-50 'de gösterilmiştir. NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarına ait partikül boyutu ve boyut dağılımını gösteren grafik Şekil 4-54 ve Şekil 4-55'de gösterilmiştir. İki yıl süre ile takip edilen stabilite çalışmalarına ait bulgular ise Tablo 4-51 ile Tablo 4-56 aralığında sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4-49: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin karakterizasyon bulguları

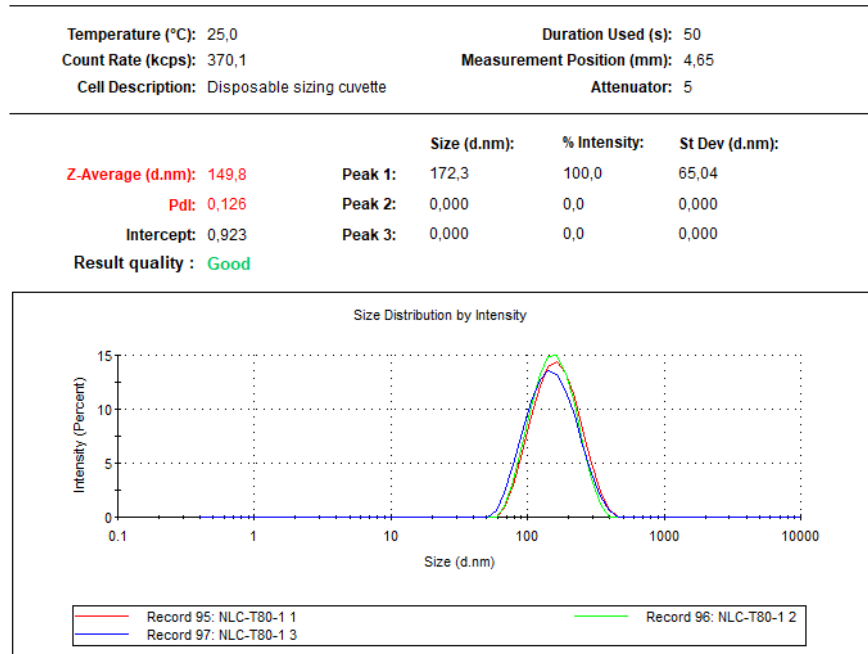
Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T20-1	139,23 ± 2,66	0,12 ± 0,01	3,17 ± 0,02
NLC-T20-2	145,33 ± 2,50	0,13 ± 0,02	3,16 ± 0,01
NLC-T20-3	150,17 ± 1,46	0,17 ± 0,01	3,14 ± 0,01
NLC-T20-4	159,67 ± 1,85	0,14 ± 0,01	3,15 ± 0,01
NLC-T20-5	119,00 ± 1,08	0,15 ± 0,01	3,2 ± 0,01
NLC-T20-6	151,73 ± 1,69	0,189 ± 0,02	3,14 ± 0,01
NLC-T20-7	137,87 ± 1,16	0,22 ± 0,01	3,12 ± 0,01
NLC-T20-8	136,43 ± 1,55	0,20 ± 0,01	3,15 ± 0,01
NLC-T20-9	100,60 ± 1,16	0,24 ± 0,01	3,17 ± 0,01
NLC-T20-10	155,77 ± 4,14	0,36 ± 0,04	3,18 ± 0,01
NLC-T20-11	142,57 ± 1,45	0,31 ± 0,02	3,25 ± 0,01
NLC-T20-12	193,40 ± 1,51	0,42 ± 0,04	3,2 ± 0,01

Tablo 4-50: Sürfactan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin karakterizasyon bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T80-1	157,23 ± 10,31	0,13 ± 0,01	3,13 ± 0,01
NLC-T80-2	143,30 ± 6,10	0,13 ± 0,01	3,12 ± 0,01
NLC-T80-3	136,23 ± 2,55	0,13 ± 0,02	3,12 ± 0,01
NLC-T80-4	129,53 ± 3,86	0,19 ± 0,01	3,17 ± 0,01
NLC-T80-5	120,97 ± 3,65	0,12 ± 0,02	3,19 ± 0,01
NLC-T80-6	122,33 ± 0,47	0,14 ± 0,01	3,20 ± 0,01
NLC-T80-7	111,47 ± 0,49	0,21 ± 0,01	3,13 ± 0,01
NLC-T80-8	204,50 ± 3,28	0,35 ± 0,01	3,12 ± 0,01
NLC-T80-9	101,10 ± 1,50	0,19 ± 0,01	3,18 ± 0,01
NLC-T80-10	137,13 ± 1,62	0,36 ± 0,01	3,16 ± 0,01
NLC-T80-11	170,10 ± 2,25	0,36 ± 0,03	3,15 ± 0,01
NLC-T80-12	308,80 ± 18,58	0,54 ± 0,04	3,16 ± 0,01



Şekil 4-54: NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği



Şekil 4-55: NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonuna ait partikül boyutu ve boyut dağılım grafiği

Tablo 4-51: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-1

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T20-1	0.gün	139,23 ± 2,66	0,12 ± 0,01	3,17 ± 0,02
	15.gün	144,77 ± 4,86	0,13 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	146,40 ± 6,06	0,13 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	138,9 ± 0,7	0,13 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	6.ay	138,47 ± 2,89	0,14 ± 0,03	3,18 ± 0,01
	12.ay	140,07 ± 3,10	0,13 ± 0,02	3,18 ± 0,01
	24.ay	136,93 ± 2,32	0,12 ± 0,03	3,16 ± 0,01
NLC-T20-2	0.gün	145,33 ± 2,5	0,13 ± 0,02	3,16 ± 0,01
	15.gün	152,30 ± 4,00	0,13 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	156,60 ± 4,40	0,15 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	155,67 ± 2,43	0,16 ± 0,02	3,14 ± 0,01
	6.ay	153,33 ± 4,02	0,14 ± 0,02	3,14 ± 0,01
	12.ay	155,40 ± 1,75	0,15 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	24.ay	158,27 ± 4,37	0,16 ± 0,01	3,14 ± 0,01
NLC-T20-3	0.gün	150,17 ± 1,46	0,17 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	15.gün	159,20 ± 3,80	0,17 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	158,63 ± 3,23	0,18 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	157,23 ± 1,71	0,19 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	6.ay	153,4 ± 1,35	0,16 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	12.ay	159,30 ± 4,43	0,15 ± 0,01	3,10 ± 0,01
	24.ay	158,27 ± 4,37	0,16 ± 0,01	3,10 ± 0,01
NLC-T20-4	0.gün	159,67 ± 1,85	0,14 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	15.gün	171,57 ± 3,40	0,25 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	156,73 ± 1,78	0,22 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	149,1 ± 0,82	0,19 ± 0,01	3,11 ± 0,01
	6.ay	144,7 ± 1,77	0,18 ± 0,02	3,13 ± 0,01
	12.ay	150,23 ± 3,71	0,17 ± 0,03	3,12 ± 0,01
	24.ay	151,67 ± 3,55	0,21 ± 0,01	3,11 ± 0,01

Tablo 4-52: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-2

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T20-5	0.gün	119 ± 1,08	0,15 ± 0,01	3,20 ± 0,01
	15.gün	120,97 ± 1,96	0,17 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	121,57 ± 1,55	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	119,27 ± 1,21	0,15 ± 0,02	3,19 ± 0,01
	6.ay	118,37 ± 0,55	0,14 ± 0,02	3,13 ± 0,01
	12.ay	126,80 ± 2,00	0,17 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	24.ay	125,40 ± 1,95	0,16 ± 0,02	3,14 ± 0,01
NLC-T20-6	0.gün	151,73 ± 1,69	0,19 ± 0,02	3,14 ± 0,01
	15.gün	153,33 ± 2,80	0,15 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	161,97 ± 6,31	0,15 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	154,9 ± 1,74	0,16 ± 0,02	3,18 ± 0,01
	6.ay	151,43 ± 2,04	0,16 ± 0,01	3,19 ± 0,01
	12.ay	156,30 ± 2,54	0,16 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	24.ay	158,00 ± 3,36	0,14 ± 0,01	3,12 ± 0,01
NLC-T20-7	0.gün	137,87 ± 1,16	0,22 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	15.gün	134,00 ± 1,97	0,19 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	141,23 ± 6,65	0,18 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	133,13 ± 0,83	0,19 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	6.ay	129,93 ± 0,49	0,18 ± 0,02	3,11 ± 0,01
	12.ay	133,30 ± 1,71	0,18 ± 0,03	3,12 ± 0,01
	24.ay	133,90 ± 2,77	0,16 ± 0,02	3,12 ± 0,01
NLC-T20-8	0.gün	136,43 ± 1,55	0,20 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	15.gün	135,33 ± 0,60	0,19 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	143,70 ± 4,52	0,21 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	139,17 ± 0,78	0,24 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	6.ay	132,8 ± 0,99	0,19 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	12.ay	138,20 ± 3,33	0,21 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	24.ay	133,93 ± 2,25	0,19 ± 0,01	3,12 ± 0,01

Tablo 4-53: Sürfaktan olarak Tween 20 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-3

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T20-9	0.gün	100,60 ± 1,16	0,24 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	15.gün	100,14 ± 0,56	0,26 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	101,25 ± 2,64	0,24 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	96,13 ± 0,27	0,22 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	6.ay	96,49 ± 0,52	0,23 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	108,67 ± 2,37	0,31 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	24.ay	104,23 ± 0,81	0,27 ± 0,01	3,15 ± 0,01
NLC-T20-10	0.gün	155,77 ± 4,14	0,36 ± 0,04	3,18 ± 0,01
	15.gün	151,75 ± 0,92	0,27 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	154,43 ± 3,57	0,30 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	151,63 ± 4,19	0,31 ± 0,04	3,18 ± 0,01
	6.ay	144,93 ± 1,02	0,26 ± 0,03	3,18 ± 0,01
	12.ay	147,27 ± 1,86	0,25 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	24.ay	152,60 ± 3,05	0,27 ± 0,02	3,13 ± 0,01
NLC-T20-11	0.gün	142,57 ± 1,45	0,31 ± 0,02	3,25 ± 0,01
	15.gün	137,63 ± 3,17	0,27 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	157,47 ± 0,47	0,36 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	139,83 ± 0,65	0,30 ± 0,01	3,21 ± 0,01
	6.ay	135,90 ± 1,14	0,27 ± 0,02	3,18 ± 0,01
	12.ay	145,77 ± 1,70	0,32 ± 0,01	3,19 ± 0,01
	24.ay	138,37 ± 1,21	0,29 ± 0,01	3,14 ± 0,02
NLC-T20-12	0.gün	193,40 ± 1,51	0,42 ± 0,04	3,20 ± 0,01
	15.gün	180,53 ± 1,53	0,35 ± 0,03	Ölçülmedi
	1.ay	183,87 ± 1,16	0,35 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	194,00 ± 4,33	0,47 ± 0,02	3,15 ± 0,01
	6.ay	185,97 ± 2,99	0,40 ± 0,04	3,18 ± 0,01
	12.ay	172,17 ± 4,50	0,28 ± 0,02	3,16 ± 0,01
	24.ay	173,47 ± 2,21	0,29 ± 0,03	3,10 ± 0,02

Tablo 4-54: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-1

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T80-1	0.gün	157,23 ± 10,31	0,13 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	15.gün	149,43 ± 4,84	0,15 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	143,73 ± 0,55	0,12 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	145,4 ± 1,02	0,12 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	6.ay	140,77 ± 0,21	0,13 ± 0,01	3,08 ± 0,01
	12.ay	148,87 ± 4,94	0,14 ± 0,01	3,11 ± 0,01
	24.ay	149,77 ± 5,40	0,13 ± 0,02	3,08 ± 0,01
NLC-T80-2	0.gün	143,30 ± 6,10	0,13 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	15.gün	136,23 ± 1,31	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	140,43 ± 4,97	0,15 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	136,43 ± 2,72	0,13 ± 0,02	3,08 ± 0,01
	6.ay	135,83 ± 3,12	0,11 ± 0,01	3,06 ± 0,01
	12.ay	137,23 ± 1,37	0,15 ± 0,01	3,08 ± 0,01
	24.ay	137,50 ± 2,26	0,12 ± 0,02	3,08 ± 0,01
NLC-T80-3	0.gün	136,23 ± 2,55	0,13 ± 0,02	3,12 ± 0,01
	15.gün	133,93 ± 2,02	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	135,00 ± 4,00	0,14 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	134,3 ± 1,4	0,15 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	6.ay	133,03 ± 1,12	0,16 ± 0,02	3,15 ± 0,01
	12.ay	135,30 ± 1,95	0,17 ± 0,01	3,11 ± 0,01
	24.ay	137,50 ± 2,26	0,16 ± 0,02	3,11 ± 0,02
NLC-T80-4	0.gün	129,53 ± 3,86	0,19 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	15.gün	125,30 ± 2,62	0,18 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	121,73 ± 1,42	0,17 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	122,17 ± 2,90	0,16 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	6.ay	119,83 ± 1,17	0,15 ± 0,02	3,15 ± 0,01
	12.ay	124,70 ± 2,05	0,18 ± 0,03	3,18 ± 0,02
	24.ay	125,13 ± 2,78	0,17 ± 0,02	3,10 ± 0,01

Tablo 4-55: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-2

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T80-5	0.gün	120,97 ± 3,65	0,12 ± 0,02	3,19 ± 0,01
	15.gün	119,93 ± 1,07	0,15 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	115,10 ± 0,99	0,11 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	116,87 ± 2,60	0,11 ± 0,02	3,18 ± 0,01
	6.ay	114,7 ± 0,3	0,12 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	118,50 ± 2,7	0,14 ± 0,04	3,20 ± 0,01
	24.ay	121,40 ± 4,58	0,12 ± 0,01	3,15 ± 0,01
NLC-T80-6	0.gün	122,33 ± 0,47	0,14 ± 0,01	3,20 ± 0,01
	15.gün	122,27 ± 0,35	0,16 ± 0,03	Ölçülmedi
	1.ay	122,33 ± 1,23	0,14 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	120,60 ± 1,75	0,14 ± 0,02	3,16 ± 0,01
	6.ay	118,63 ± 0,35	0,15 ± 0,03	3,17 ± 0,02
	12.ay	-	-	3,19 ± 0,01
	24.ay	-	-	3,13 ± 0,01
NLC-T80-7	0.gün	111,47 ± 0,49	0,21 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	15.gün	109,07 ± 0,70	0,19 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	108,30 ± 1,20	0,19 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	106,9 ± 1,28	0,16 ± 0,01	3,14 ± 0,01
	6.ay	103,63 ± 0,23	0,18 ± 0,01	3,15 ± 0,01
	12.ay	107,23 ± 2,60	0,18 ± 0,01	3,18 ± 0,02
	24.ay	107,50 ± 2,78	0,17 ± 0,01	3,11 ± 0,01
NLC-T80-8	0.gün	204,5 ± 3,28	0,35 ± 0,01	3,12 ± 0,01
	15.gün	176,53 ± 0,93	0,28 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	176,83 ± 1,90	0,25 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	189,9 ± 3,37	0,34 ± 0,03	3,13 ± 0,01
	6.ay	168,63 ± 0,68	0,24 ± 0,02	3,13 ± 0,02
	12.ay	168,5 ± 3,18	0,22 ± 0,01	3,06 ± 0,01
	24.ay	171,50 ± 4,29	0,22 ± 0,01	3,08 ± 0,01

Tablo 4-56: Sürfaktan olarak Tween 80 ve Cremophor A25 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının stabilite bulguları-3

Formülasyon Kodu	Zaman (gün)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NLC-T80-9	0.gün	101,10 ± 1,50	0,19 ± 0,01	3,18 ± 0,01
	15.gün	96,28 ± 0,99	0,17 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	94,90 ± 0,36	0,18 ± 0,01	Ölçülmedi
	3.ay	95,60 ± 0,57	0,17 ± 0,01	3,13 ± 0,01
	6.ay	94,49 ± 0,76	0,16 ± 0,02	3,16 ± 0,02
	12.ay	98,98 ± 1,93	0,18 ± 0,01	3,11 ± 0,01
	24.ay	99,43 ± 3,27	0,17 ± 0,01	3,15 ± 0,01
NLC-T80-10	0.gün	137,13 ± 1,62	0,36 ± 0,01	3,16 ± 0,01
	15.gün	125,00 ± 2,25	0,31 ± 0,01	Ölçülmedi
	1.ay	125,77 ± 1,29	0,33 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	119,57 ± 0,32	0,26 ± 0,01	3,18 ± 0,01
	6.ay	118,33 ± 0,49	0,25 ± 0,01	3,17 ± 0,01
	12.ay	128,20 ± 0,40	0,32 ± 0,01	3,09 ± 0,01
	24.ay	118,77 ± 1,07	0,26 ± 0,01	3,10 ± 0,01
NLC-T80-11	0.gün	170,10 ± 2,25	0,36 ± 0,03	3,15 ± 0,01
	15.gün	163,60 ± 1,50	0,34 ± 0,02	Ölçülmedi
	1.ay	161,17 ± 3,44	0,34 ± 0,02	Ölçülmedi
	3.ay	175,57 ± 0,82	0,45 ± 0,04	3,19 ± 0,01
	6.ay	159,87 ± 2,55	0,33 ± 0,02	3,15 ± 0,01
	12.ay	-	-	3,07 ± 0,01
	24.ay	-	-	3,06 ± 0,01
NLC-T80-12	0.gün	308,80 ± 18,58	0,54 ± 0,04	3,16 ± 0,01
	15.gün	274,37 ± 58,12	0,46 ± 0,09	Ölçülmedi
	1.ay	189,37 ± 8,87	0,37 ± 0,03	Ölçülmedi
	3.ay	190,5 ± 7,93	0,43 ± 0,03	3,18 ± 0,01
	6.ay	199,3 ± 12,11	0,43 ± 0,02	3,14 ± 0,02
	12.ay	210,4 ± 8,42	0,48 ± 0,03	3,05 ± 0,01
	24.ay	223,43 ± 12,34	0,39 ± 0,07	3,07 ± 0,01

4.6.5. Seçilen Fluvastatin Sodyum Yüklü NLC Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar ile Yöntem 3.2.6.4'de belirtildiği şekilde diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

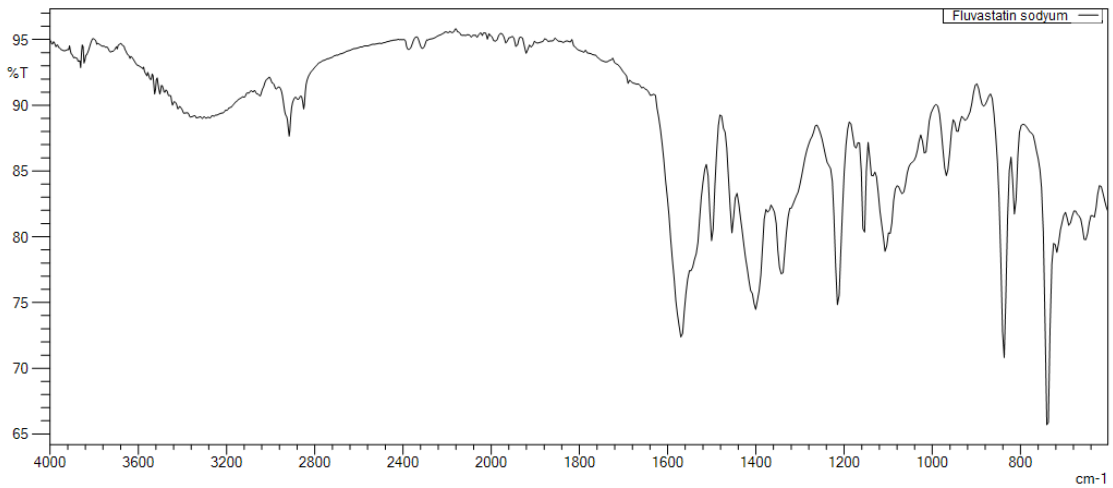
Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarına ait zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları Tablo 4-57'de, enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-58'da, ATR-FTIR spektroskopi analizlerine ait bulgular Şekil 4-56 ile Şekil 4-63 aralığında, DSC analizlerine ait bulgular Şekil 4-64 ile Şekil 4-70 aralığında sırasıyla verilmiştir.

Tablo 4-57: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları

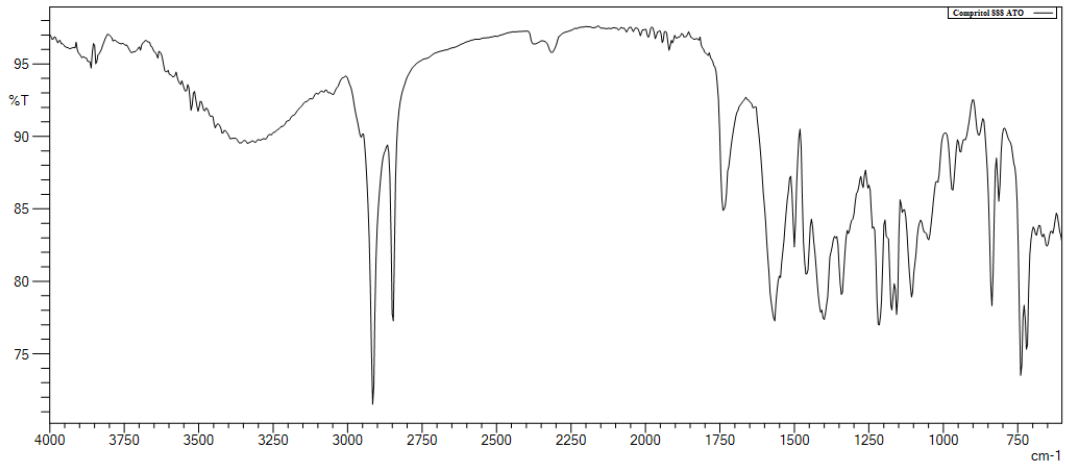
Formülasyon Kodu	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik ($\mu\text{S/cm}$)
NLC-T20-1	$-0,16 \pm 0,27$	$1933,33 \pm 115,90$
NLC-T20-3	$-0,69 \pm 0,42$	$1990 \pm 111,36$
NLC-T20-5	$-0,53 \pm 0,08$	$2010 \pm 111,36$
NLC-T20-9	$3,17 \pm 0,01$	$1906,67 \pm 116,76$
NLC-T80-1	$-0,55 \pm 0,39$	$1770 \pm 111,36$
NLC-T80-3	$-0,62 \pm 0,19$	$1870 \pm 111,36$
NLC-T80-5	$-0,37 \pm 0,24$	$1820 \pm 111,36$
NLC-T80-9	$-0,45 \pm 0,16$	$1836,67 \pm 110,60$

Tablo 4-58: Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği bulguları

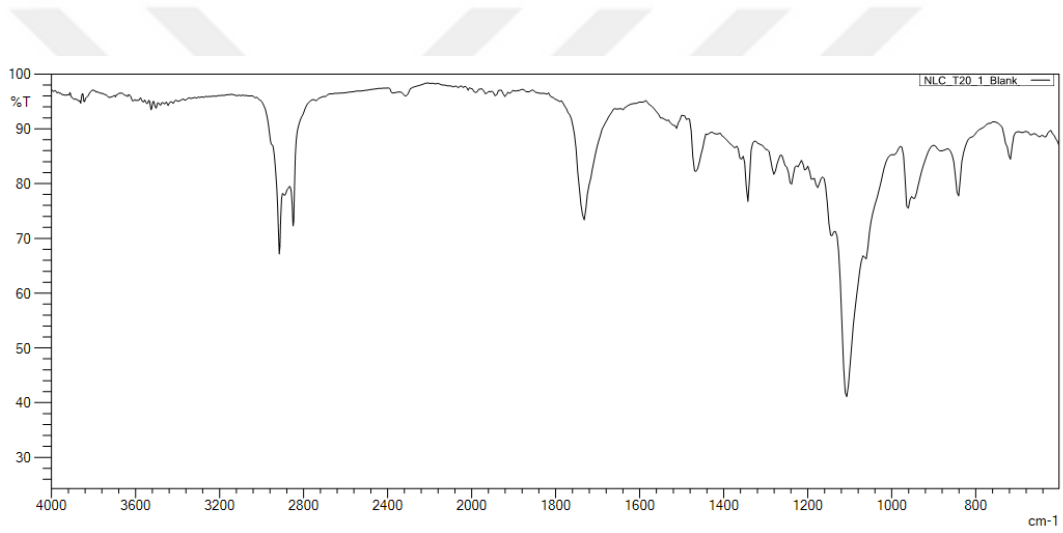
Formülasyon Kodu	Diyaliz yöntemi EE (%)	Ultrafiltrasyon yöntemi EE(%)
NLC-T20-1	81,95 ± 0,71	82,29 ± 0,35
NLC-T20-3	84,17 ± 4,08	84,29 ± 0,27
NLC-T20-5	78,79 ± 4,35	93,34 ± 0,02
NLC-T20-9	73,56 ± 0,31	97,22 ± 0,07
NLC-T80-1	80,10 ± 2,55	93,69 ± 0,07
NLC-T80-3	88,96 ± 1,54	92,48 ± 1,18
NLC-T80-5	82,73 ± 4,21	94,57 ± 0,02
NLC-T80-9	80,47 ± 11,51	98,93 ± 0,03



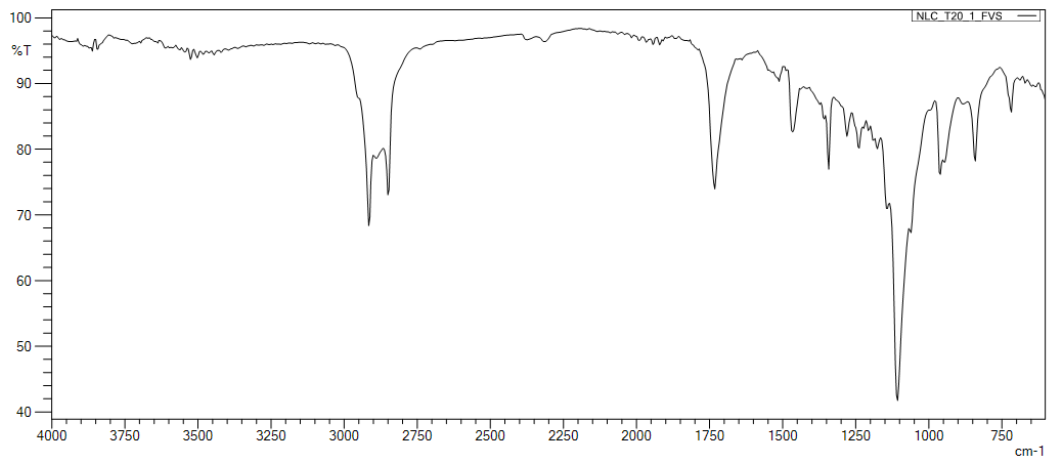
Şekil 4-56: Fluvastatin sodyum'a ait ATR-FTIR spektrumu



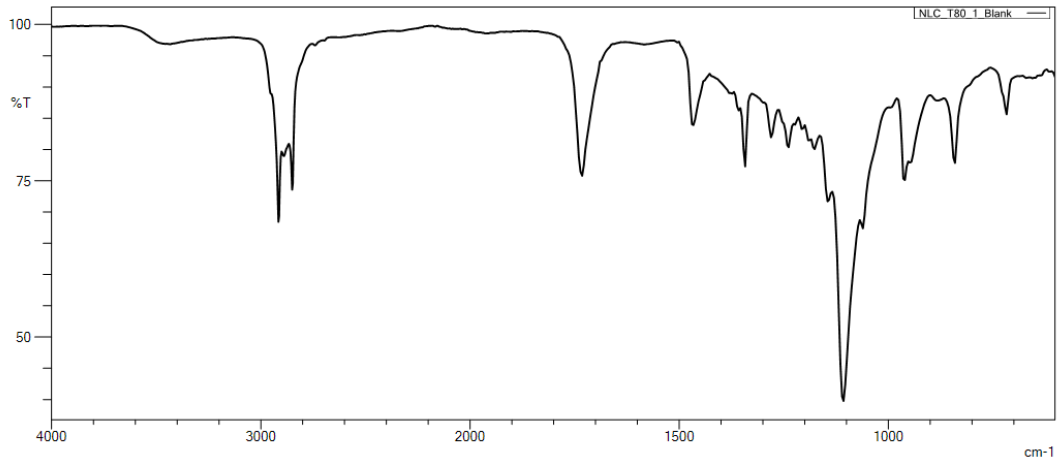
Şekil 4-57: Compritol 888 ATO'ya ait ATR-FTIR spektrumu



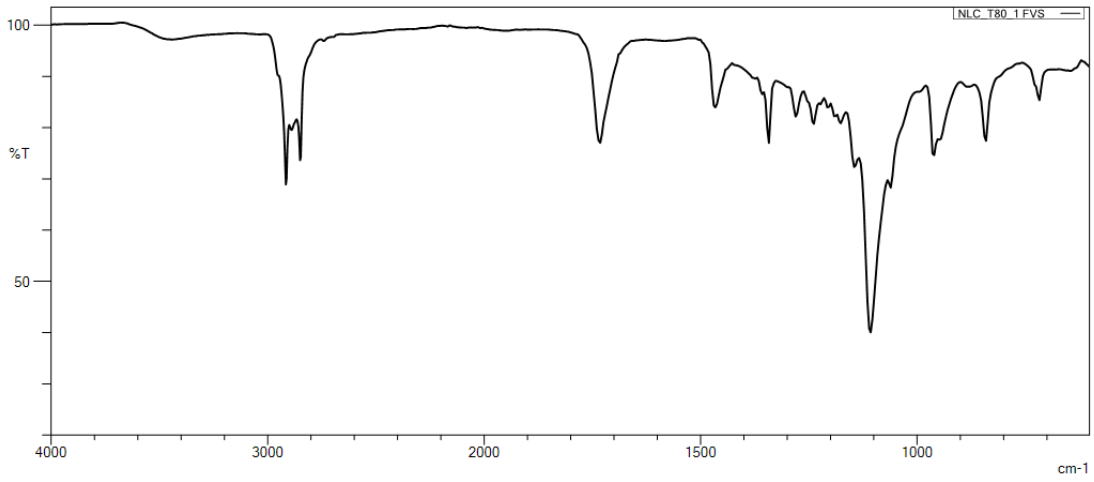
Şekil 4-58: Etkin madde içermeyen NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



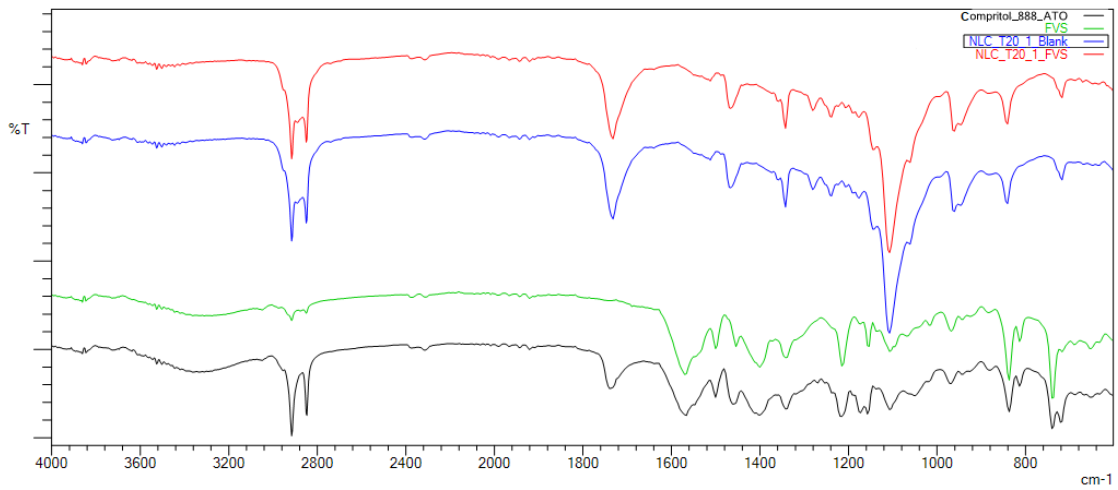
Şekil 4-59: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



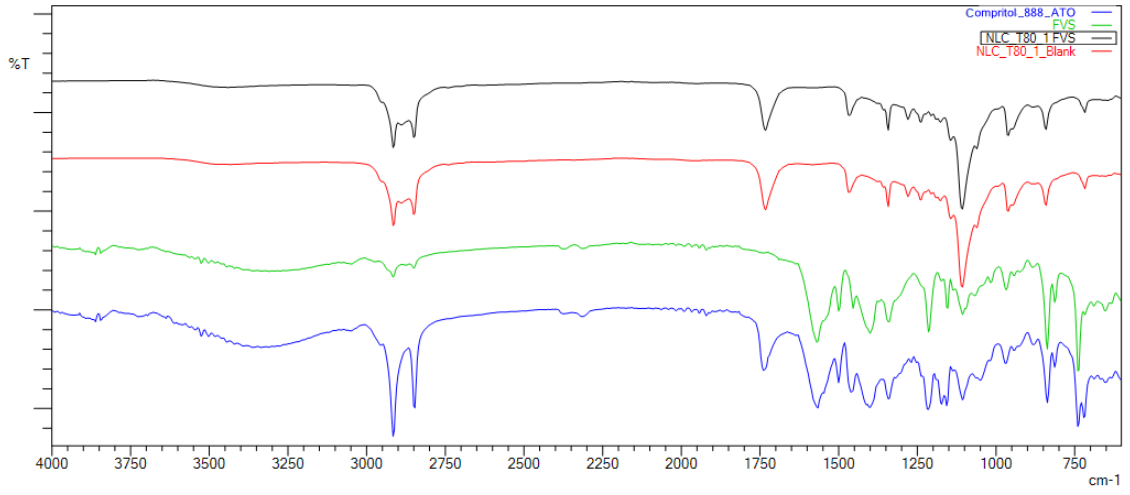
Şekil 4-60: Etkin madde içermeyen NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



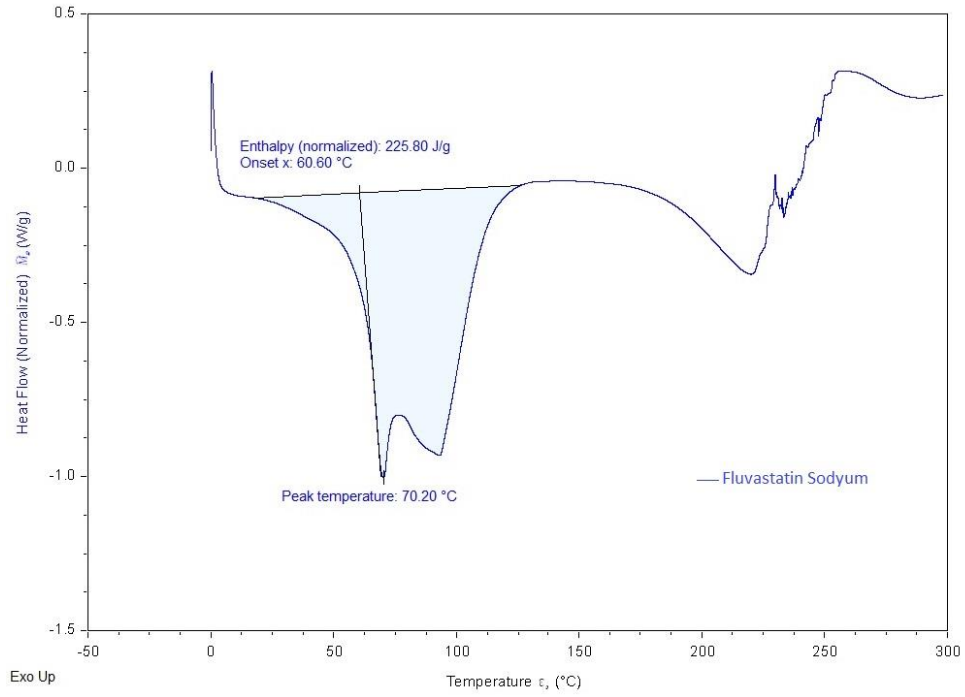
Şekil 4-61: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait ATR-FTIR spektrumu



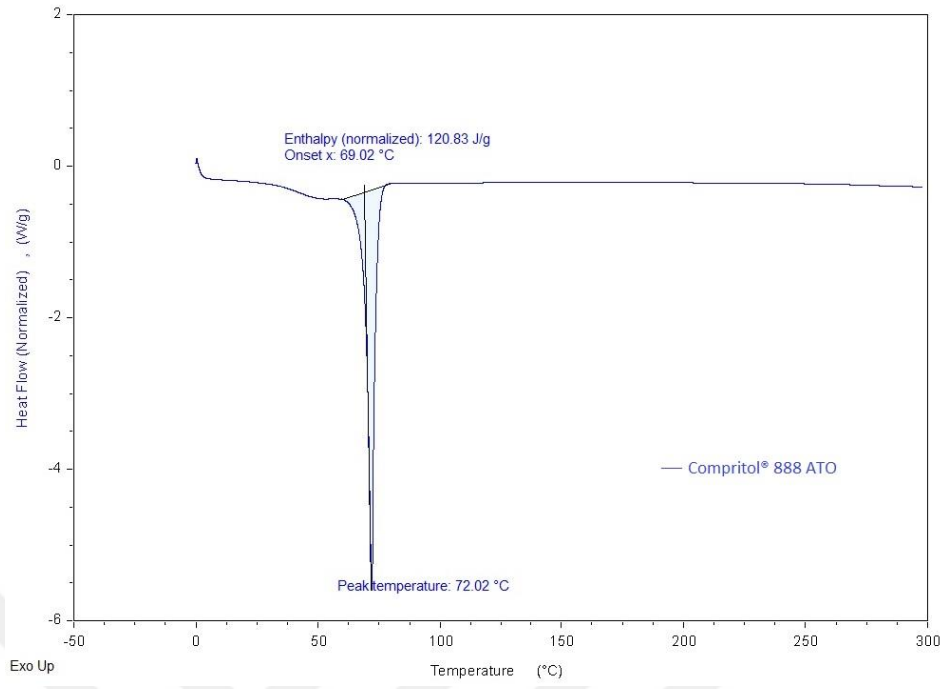
Şekil 4-62: Compritol 888 ATO ve Fluvastatin sodyum ile etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonlarına ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu



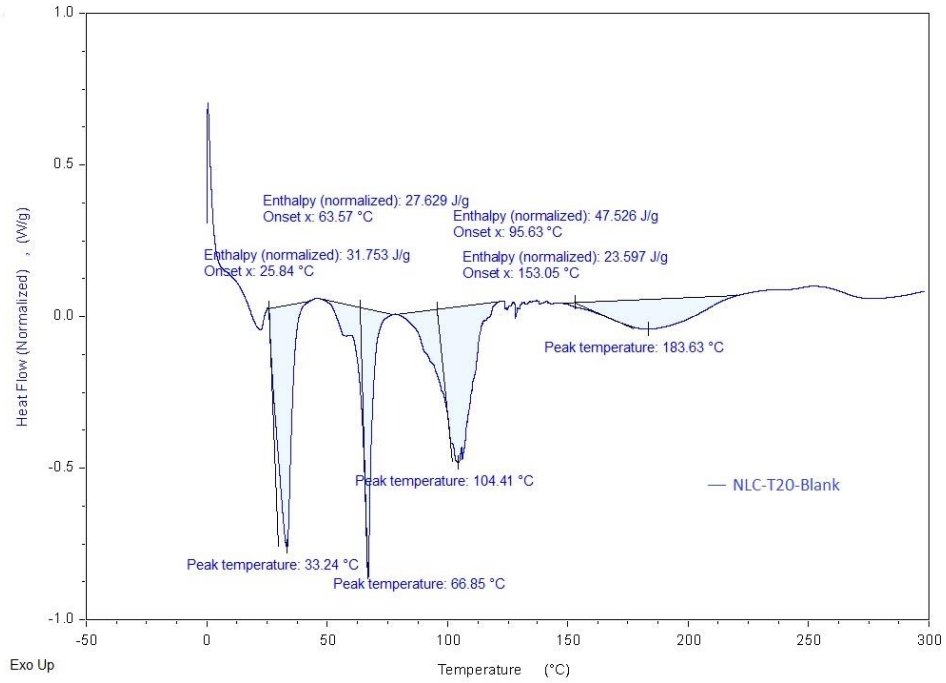
Şekil 4-63: Compritol 888 ATO ve Fluvastatin sodyum ile etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonlarına ait (sırasıyla) karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu



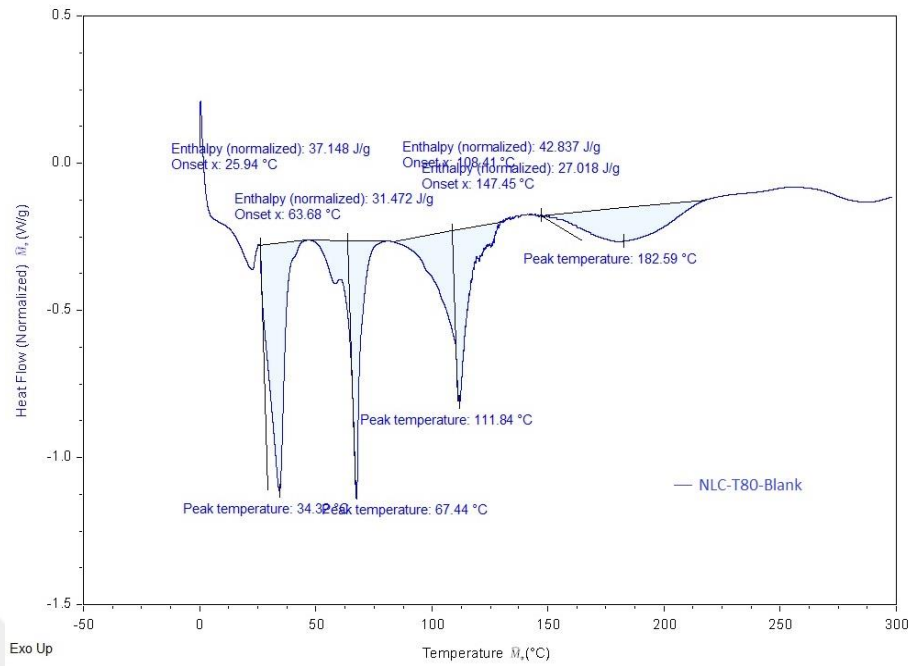
Şekil 4-64: Fluvastatin sodyum'a ait DSC termogramı



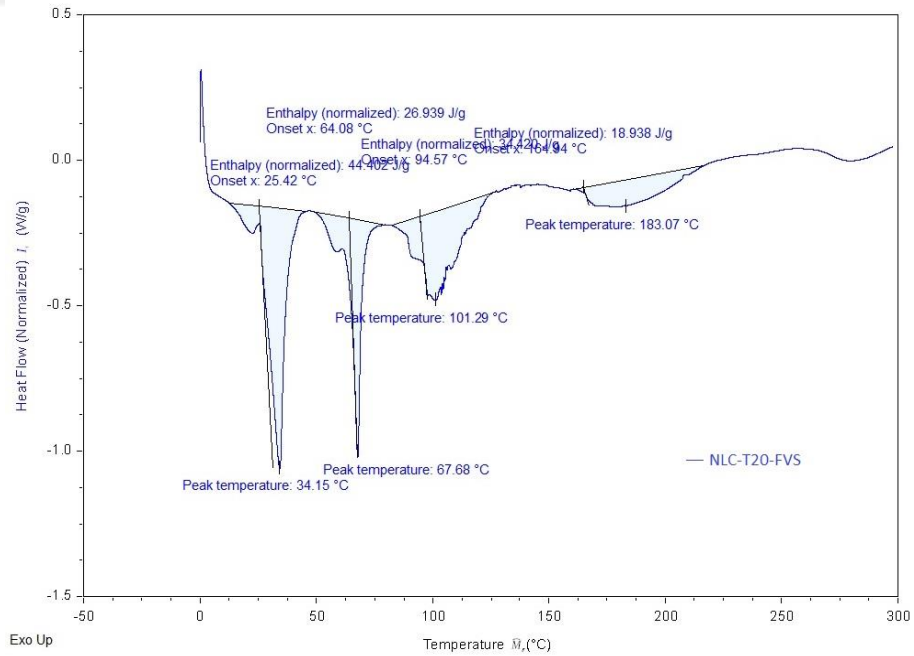
Şekil 4-65: Compritol® 888 ATO' ya ait DSC termogramı



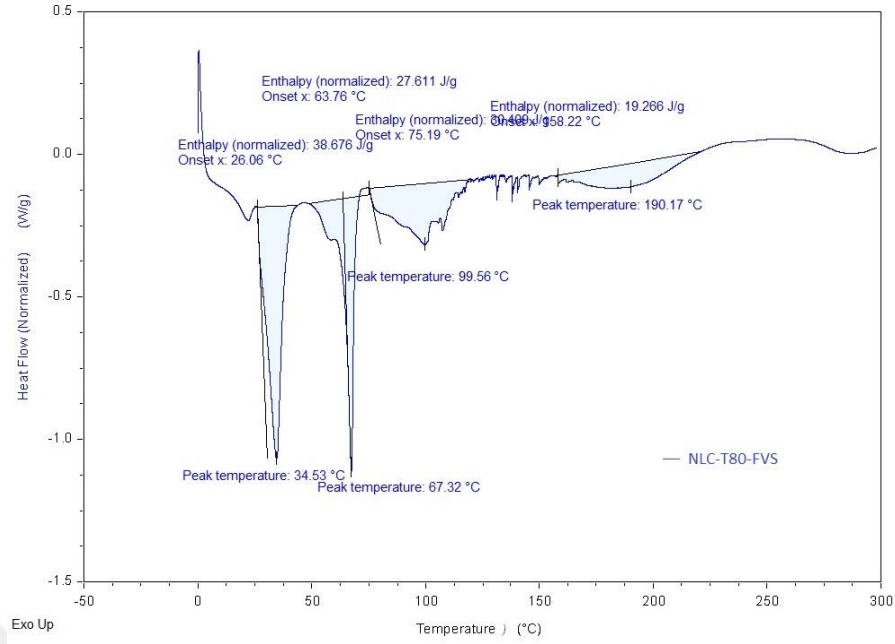
Şekil 4-66: Etkin madde içermeyen NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı



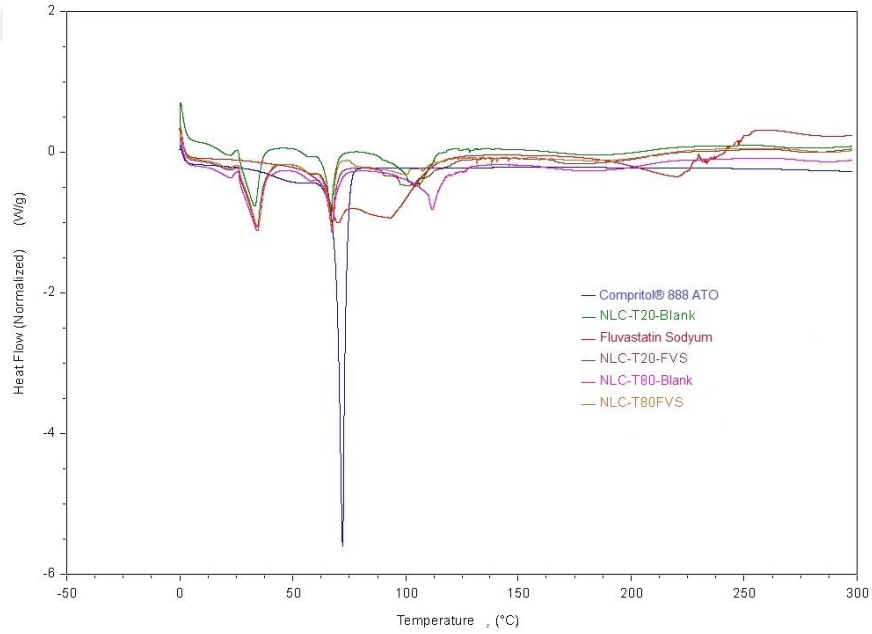
Şekil 4-67: Etkin madde içermeyen NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı



Şekil 4-68: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı



Şekil 4-69: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu formülasyona ait DSC termogramı



Şekil 4-70: Etkin madde içermeyen ve fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonları ile katı lipit ve etkin maddeye ait karşılaştırmalı DSC termogramı

4.6.6. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Optimizasyonuna Ait Bulgular

NLC formülasyonlarının dermal penetasyon çalışmaları ve deri lipitleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı SLN ve nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmesi amaçlandı. Yöntem 3.2.6.5’de bileşen ve oranları verilen fluvastatin sodyum yüklü model SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

NLC’ler ile aynı yöntemle hazırlanan ve aynı sonikasyon güç ve süresi uygulanan SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarına ait bulgular ve değerlendirmeler Tablo 4-59’da gösterildi.

Tablo 4-59: Kontrol amaçlı hazırlanan model SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarına ait bulgular

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama
SLN-C-T20CA25-5	259,57 ± 1,665	0,502 ± 0,008	Sedimentasyon, Faz ayrımı
SLN-C-T80CA25-5	315,97 ± 21,08	0,741 ± 0,171	Sedimentasyon, faz ayrımı
NE-C90-T20CA25-5	216,03 ± 1,625	0,062 ± 0,021	Uygun
NE-C90-T80CA25-5	223,03 ± 0,067	0,067 ± 0,017	Uygun

Tablo 4-59’da verilen bulgular değerlendirildiğinde uygun görünüş, boyut ve boyut dağılımına sahip nanoemülsiyon formülasyonları elde edilirken, uygun özelliklere sahip SLN formülasyonlarının elde edilemediği görüldü. Bunun üzerine SLN formülasyonları için optimizasyon çalışmalarına devam edildi ve yüksek devirli homojenizatör kullanımının ve sonikasyon güç ve süresinin formülasyon karakterizasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. SLN formülasyonları için Yöntem 3.2.6.5’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen ve yüksek devirli homejenizatör kullanımının lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-60’de gösterildi.

Tablo 4-60: SLN formülasyonları üzerine hazırlama yönteminin etkisini gösteren bulgular

Formülasyon Kodu	Hazırlama yöntemi		Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama
	YDH	Sonikasyon			
SLN-C-T20CA25-5	+	-	1392,67 ± 338,91	0,871 ± 0,03	Sedimentasyon, faz ayrımı
	-	+	259,57 ± 1,67	0,502 ± 0,01	Sedimentasyon, faz ayrımı
	+	+	188,13 ± 4,97	0,417 ± 0,02	Sedimentasyon, faz ayrımı

YDH: Yüksek devirli homojenizasyon

Yöntem 3.2.6.5’de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlanan SLN formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ikincil olarak gerçekleştirilen ve sonikasyon güç ve süresinin lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-61’de gösterilmiştir.

Tablo 4-61: SLN formülasyonlarına uygulanan sonikasyon güç ve süresinin etkisini inceleyen çalışmaya ait bulgular

Formülasyon Kodu	Sonikasyon gücü (%)	Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Açıklama
SLN-C-T20CA25-5	35	10	259,57 ± 1,665	0,502 ± 0,008	Sedimentasyon, faz ayrımı
		15	248,42 ± 2,457	0,472 ± 0,143	Sedimentasyon, faz ayrımı
	50	5	327,47 ± 10,15	0,664 ± 0,101	Sedimentasyon, faz ayrımı
		10	412,83 ± 34,49	0,747 ± 0,069	Sedimentasyon, faz ayrımı

Bu çalışmalar sonucunda uygun görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılıma sahip stabil SLN formülasyonları elde edilememiştir. Bu nedenle NLC formülasyonları için kontrol formülasyonları olarak SLN sistemlerinin kullanımından vazgeçilmiştir. NLC formülasyonlarının kontrol formülasyonları olarak nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir.

4.6.7. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonlarının Belirlenmesi

Optimize formülasyonların karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için seçilen formülasyonlar belirlenmiştir. Bu seçilen formülasyonların dermal penetrasyon çalışmaları ve deri lipidleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyon formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-62’de verilmiştir.

Tablo 4-62: Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların bileşen ve oranları

Formülasyon Kodu	Compritol 888 ATO (mg)	Capryol 90 (mg)	Lipit: sürfaktan oranı	Sürfaktan 1 (Tür, mg)		Sürfaktan 2 Cremophor A25 (mg)
NE-T20-1	-	500	45:55	Tween 20	204	407
NE-T20-3			60:40	Tween 20	136	273
NE-T80-1	-	500	45:55	Tween 80	204	407
NE-T80-3			60:40	Tween 80	136	273

4.6.8. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Fluvastatin Sodyum Yüklü Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Karakterizasyonlarına Ait Bulgular

Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyon formülasyonlarının Yöntem 3.2.6.3 ve Yöntem 3.2.6.4’de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH bulguları Tablo 4-63’te, zeta potansiyel ve iletkenlik bulguları Tablo 4-64’te, yükleme etkinliği bulguları Tablo 4-65’te verilmiştir.

Tablo 4-63: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların partikül boyutu, PDI ve pH bulguları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	pH
NE-T20-1	231,63 ± 2,67	0,07 ± 0,04	3,24 ± 0,01
NE-T20-3	234,43 ± 5,62	0,04 ± 0,03	3,20 ± 0,01
NE-T80-1	234,53 ± 4,51	0,07 ± 0,02	3,21 ± 0,01
NE-T80-3	177,90 ± 4,41	0,05 ± 0,01	3,20 ± 0,01

Tablo 4-64: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin yüklü nanoemülsiyonların zeta potansiyeli ve iletkenlik bulguları

Formülasyon Kodu	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik (µS/cm)
NE-T20-1	-0,43 ± 0,20	1713,33 ± 125,83
NE-T20-3	-0,68 ± 0,13	1780,00 ± 123,24
NE-T80-1	-0,59 ± 0,21	1726,67 ± 126,62
NE-T80-3	-0,69 ± 0,14	1780,00 ± 121,24

Tablo 4-65: Kontrol olarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü nanoemülsiyonların yükleme etkinliği bulguları

Formülasyon Kodu	Diyaliz yöntemi EE(%)	Ultrafiltrasyon yöntemi EE (%)
NE-T20-1	68,15 ± 0,76	71,80 ± 0,66
NE-T20-3	83,39 ± 1,91	77,28 ± 0,51
NE-T80-1	76,10 ± 3,20	72,67 ± 2,03
NE-T80-3	84,89 ± 2,34	81,99 ± 0,32

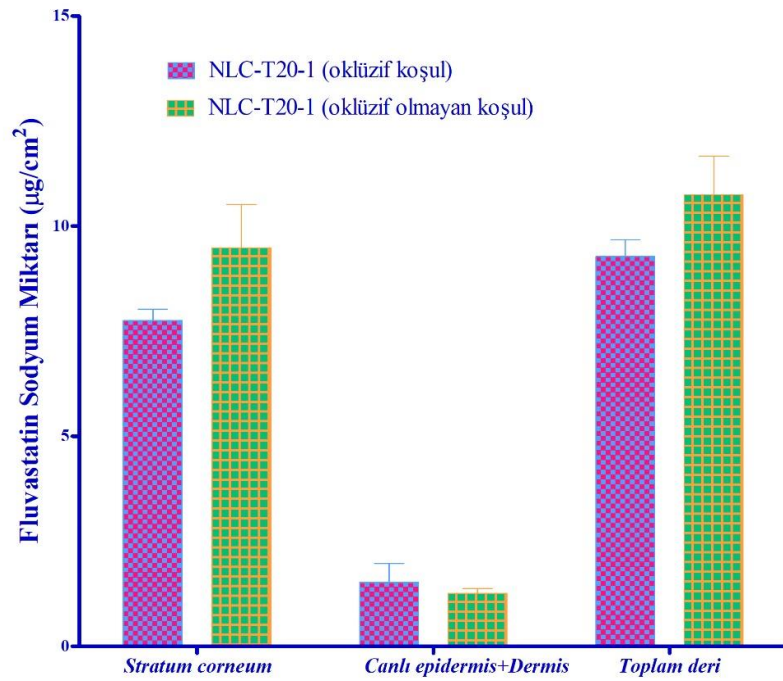
4.6.9. İn Vitro Penetrasyon Çalışmaları ve Dermal Tabakalarda Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular

4.6.9.1. İn vitro Dermal Penetrasyon Çalışması Prosedür Optimizasyonu

İn vitro dermal penetrasyon çalışması sırasında uygulanan oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların dermal penetrasyon üzerine etkileri incelendi. NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu kullanılarak Yöntem 3.2.6.7’de belirtildiği şekilde çalışıldı. Oklüzif ve oklüzif olmayan koşullar altında dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-66’de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4-71’de gösterildi.

Tablo 4-66: Seçilmiş NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları

Formülasyon Kodu	<i>Stratum corneum</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Canlı Epidermis + Dermis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Derideki toplam miktar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
NLC-T20-1 Oklüzif koşul	7.754 ± 0.268	1.524 ± 0.448	9.278 ± 0.399
NLC-T20-1 Oklüzif olmayan koşul	9.479 ± 1.032	1.263 ± 0.114	10.742 ± 0.917



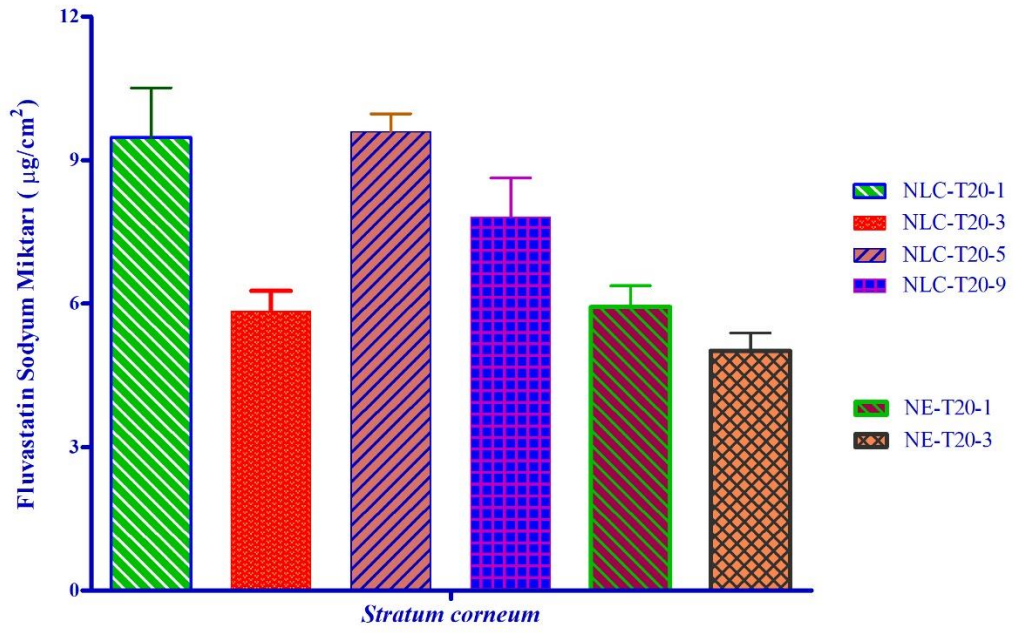
Şekil 4-71: Seçilmiş NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarında oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların fluvastatin sodyum penetrasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması

4.6.9.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular

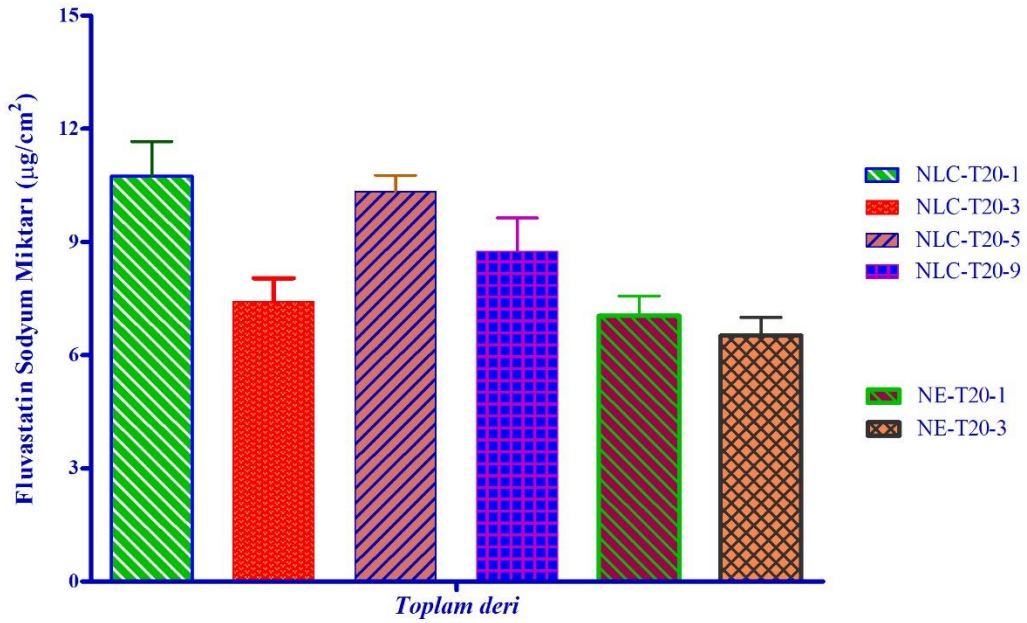
Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonları ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* dermal penetrasyon çalışmaları Yöntem 3.2.6.7.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu için gerçekleştirilen Yöntem 3.2.6.7.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen dermal penetrasyon çalışması optimizasyonu verileri dikkate alınarak penetrasyon çalışmalarının oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilmesine karar verildi. Dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-67'de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4-72 ile Şekil 4-77 aralığında gösterildi.

Tablo 4-67: NLC ve nanoemülsiyon (NE) formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları

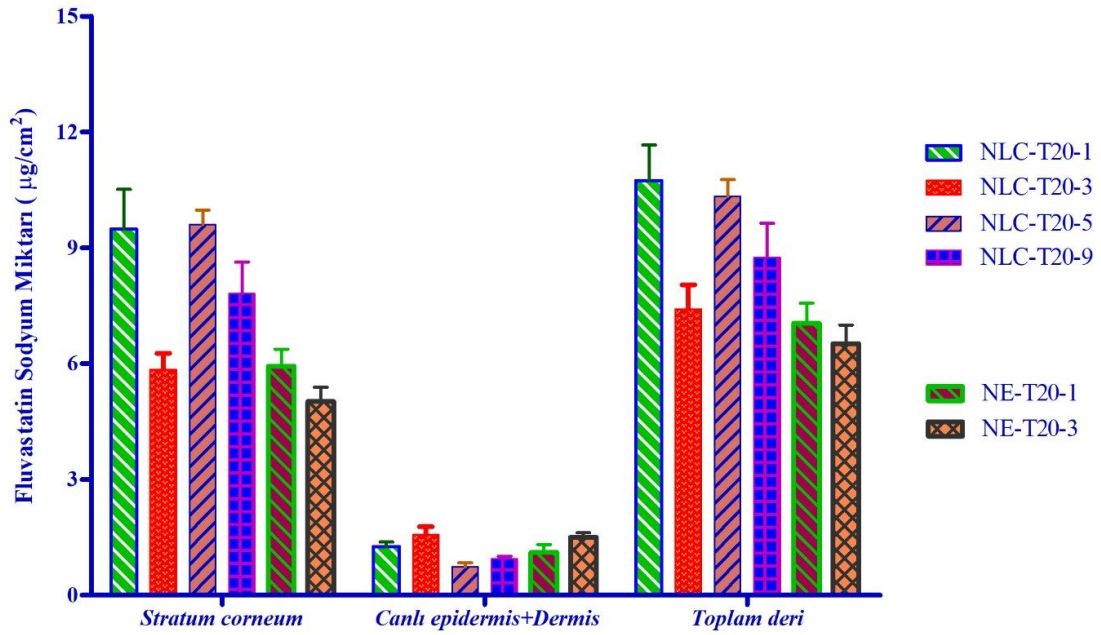
Formülasyon Kodu	<i>Stratum corneum</i> (µg/cm²)	Canlı Epidermis + Dermis (µg/cm²)	Derideki toplam miktar (µg/cm²)
NLC-T20-1	9.479 ± 1.032	1.263 ± 0.114	10.742 ± 0.917
NLC-T20-3	5.845 ± 0.421	1.570 ± 0.205	7.415 ± 0.625
NLC-T20-5	9.597 ± 0.375	0.736 ± 0.105	10.334 ± 0.428
NLC-T20-9	7.808 ± 0.823	0.941 ± 0.068	8.749 ± 0.886
NLC-T80-1	8.645 ± 0.209	1.227 ± 0.031	9.871 ± 0.178
NLC-T80-3	7.643 ± 0.096	1.094 ± 0.274	8.737 ± 0.178
NLC-T80-5	8.791 ± 0.867	0.739 ± 0.045	9.529 ± 0.866
NLC-T80-9	7.173 ± 0.878	0.749 ± 0.178	7.923 ± 0.787
NE-T20-1	5.933 ± 0.440	1.111 ± 0.203	7.044 ± 0.522
NE-T20-3	5.014 ± 0.372	1.507 ± 0.111	6.521 ± 0.479
NE-T80-1	3.719 ± 0.370	0.953 ± 0.160	4.671 ± 0.368
NE-T80-3	3.516 ± 0.346	1.138 ± 0.016	4.654 ± 0.354



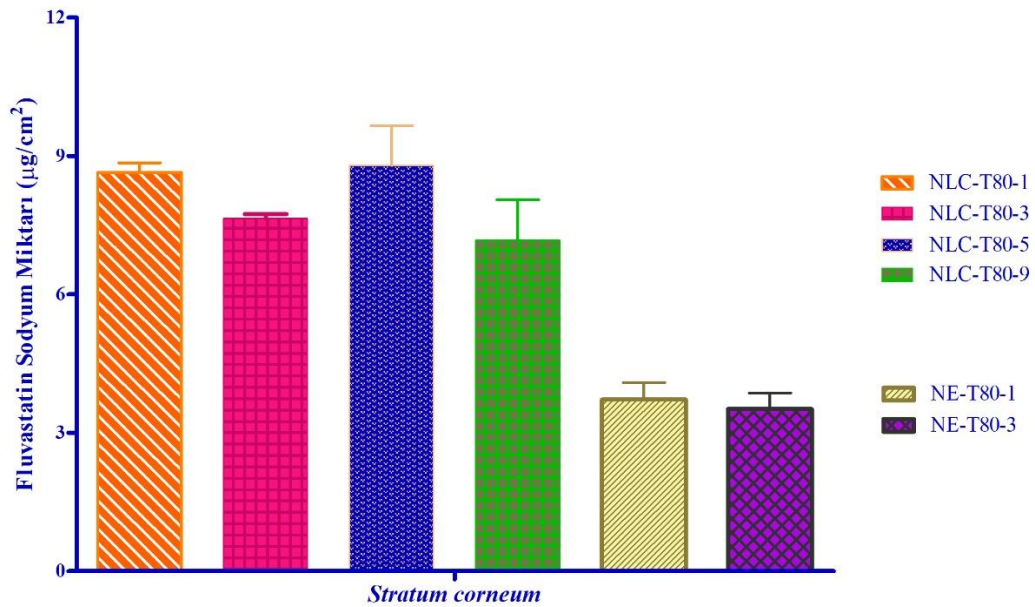
Şekil 4-72: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



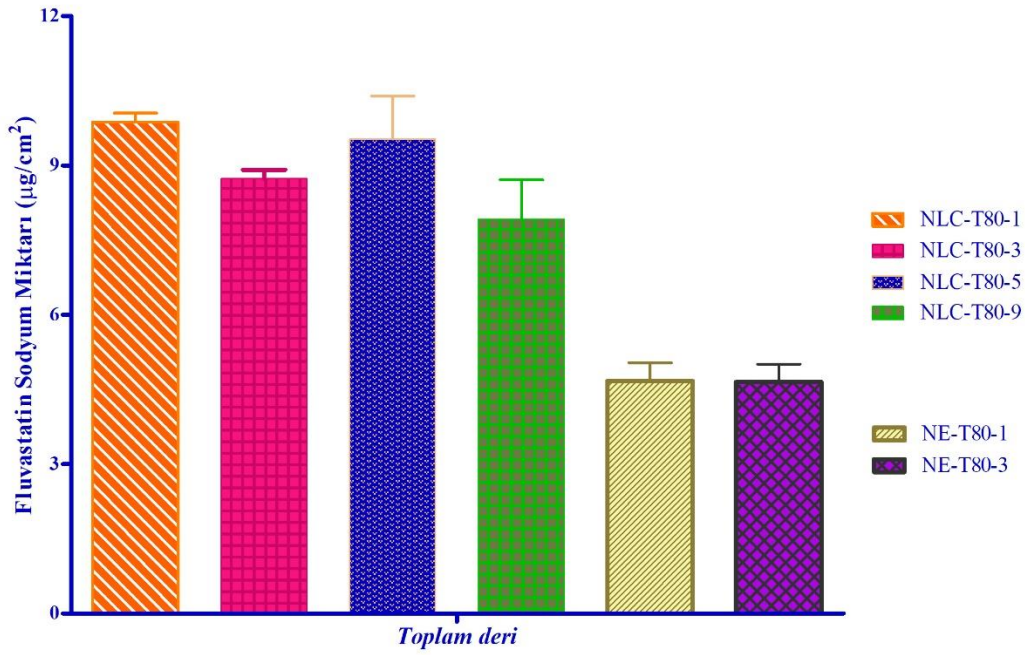
Şekil 4-73: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



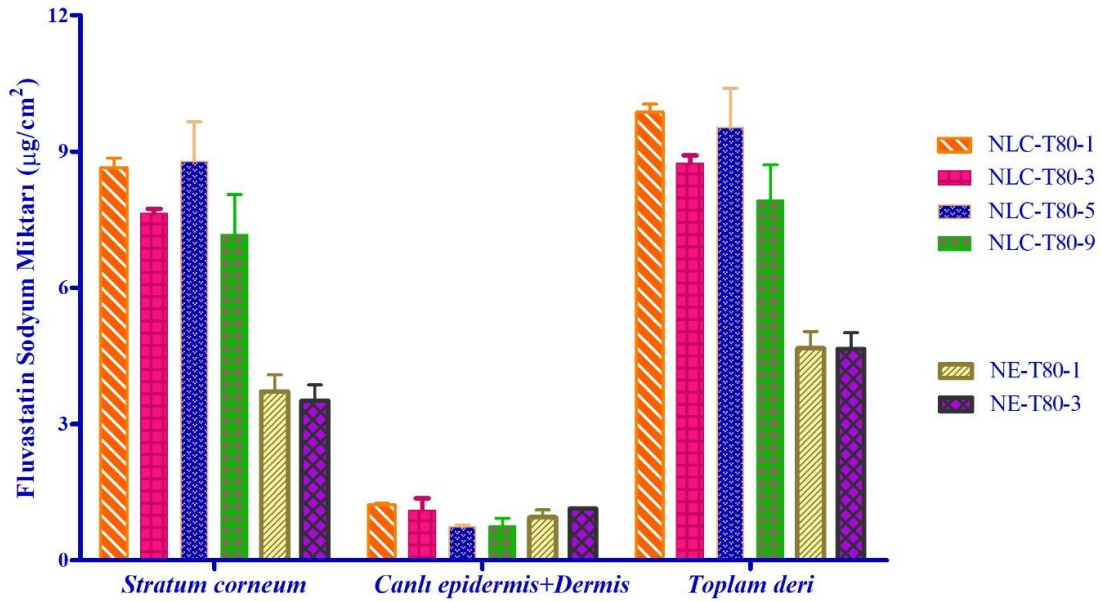
Şekil 4-74: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



Şekil 4-75: T80 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* da biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



Şekil 4-76: T20 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deride biriken toplam fluvestatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması



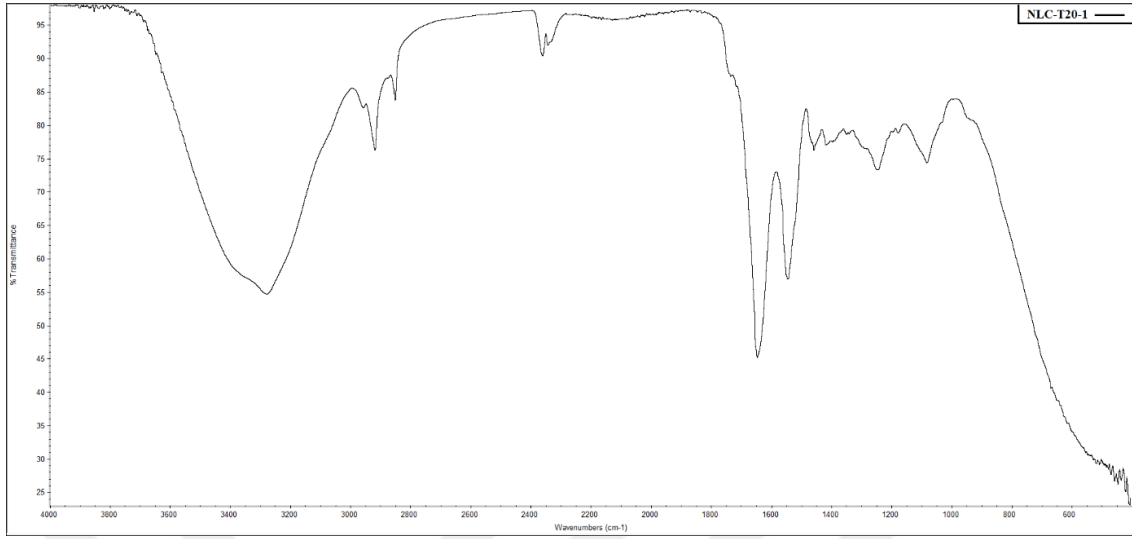
Şekil 4-77: T80 içeren NLC ve nanoemülsiyon formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvestatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması

4.6.10. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

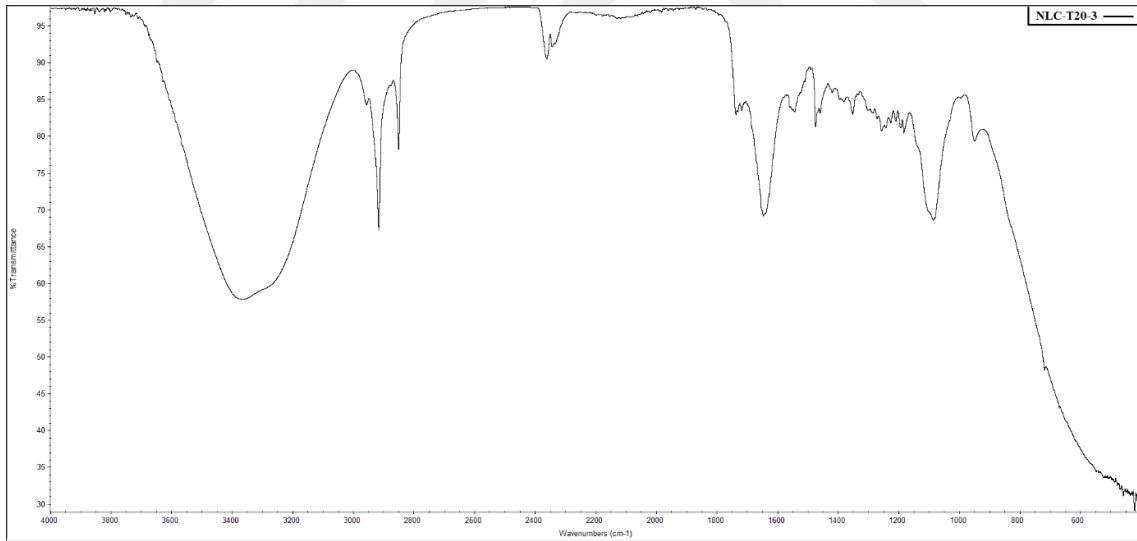
Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonları ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları sonrası Yöntem 3.2.6.8’de belirtildiği şekilde çalışılarak ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-68’de, her bir formülasyon için alınan ATR-FTR spektrumları Şekil 4-78 ile Şekil 4-89 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum ise Şekil 4-90’da verildi.

Tablo 4-68: Fluvastatin sodyum yüklü NLC ve nanoemülsiyon formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları

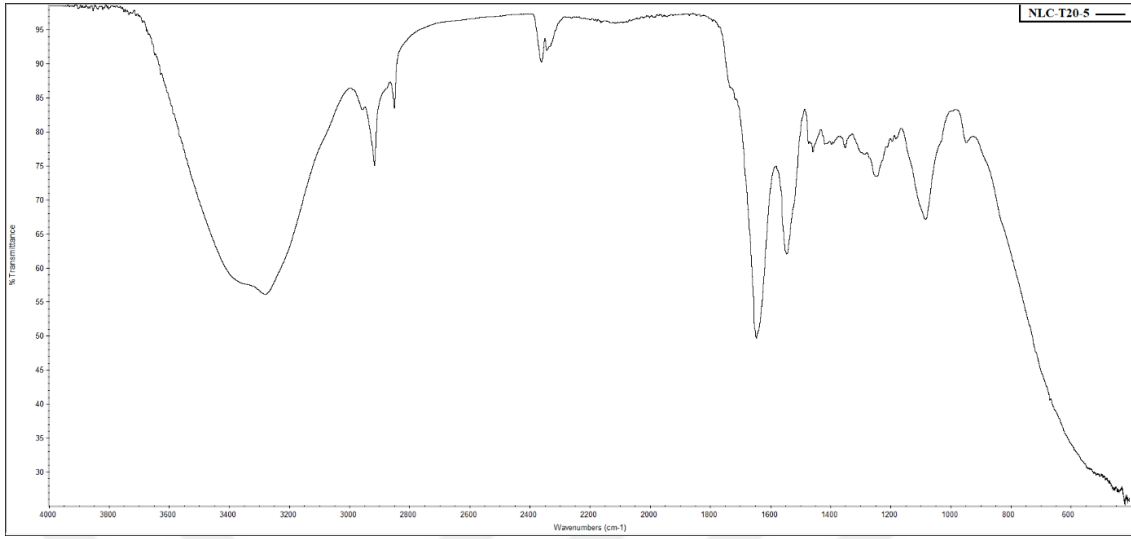
Formülasyon Kodu	Asimetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)	Simetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)
Kontrol Deri	2919.50 ± 0.01	2851.22 ± 0.02
NLC-T20-1	2918.30 ± 0.37	2850.79 ± 0.77
NLC-T20-3	2914.72 ± 0.14	2848.97 ± 0.35
NLC-T20-5	2915.25 ± 0.26	2849.45 ± 0.52
NLC-T20-9	2914.14 ± 0.09	2848.89 ± 0.46
NLC-T80-1	2915.19 ± 0.53	2849.47 ± 0.37
NLC-T80-3	2914.57 ± 0.12	2849.07 ± 0.32
NLC-T80-5	2914.95 ± 0.07	2849.18 ± 0.09
NLC-T80-9	2915.19 ± 0.15	2849.41 ± 0.07
NE-T20-1	2922.70 ± 0.36	2852.60 ± 0.12
NE-T20-3	2923.04 ± 0.21	2852.79 ± 0.01
NE-T80-1	2923.41 ± 0.24	2852.79 ± 0.01
NE-T80-3	2922.61 ± 0.34	2852.43 ± 0.21



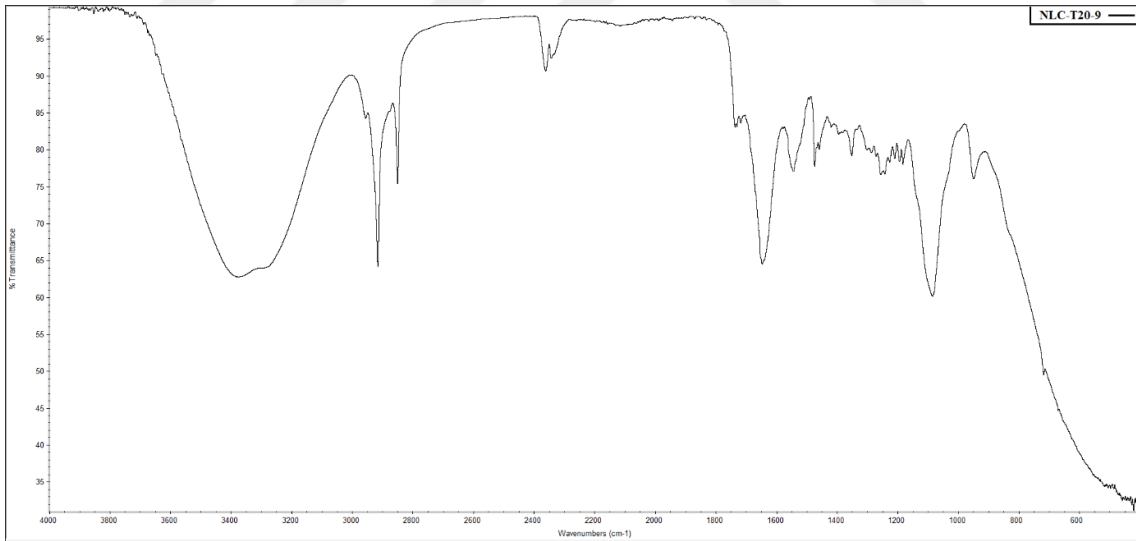
Şekil 4-78: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



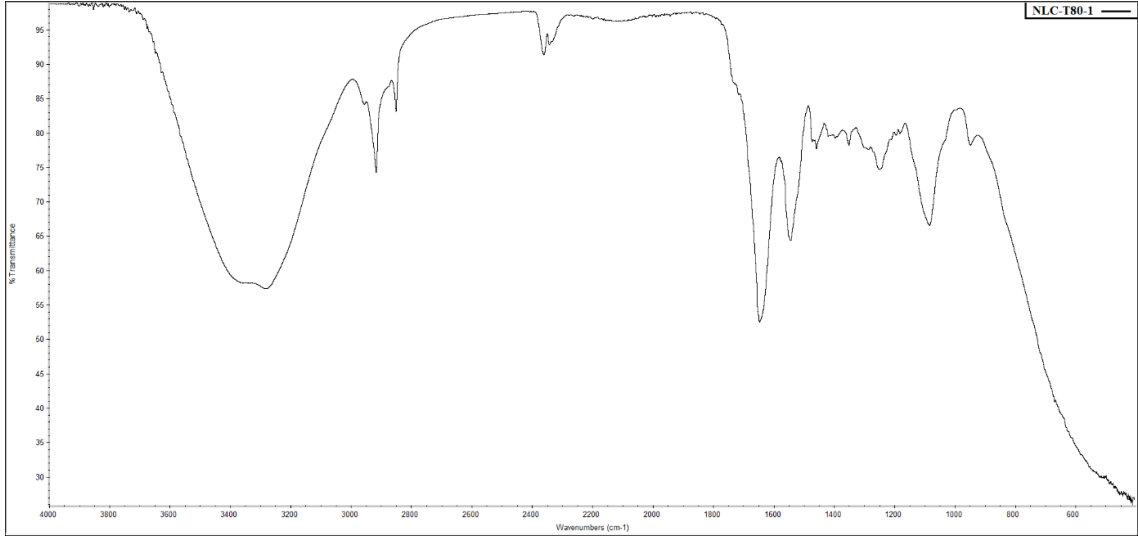
Şekil 4-79: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-3 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



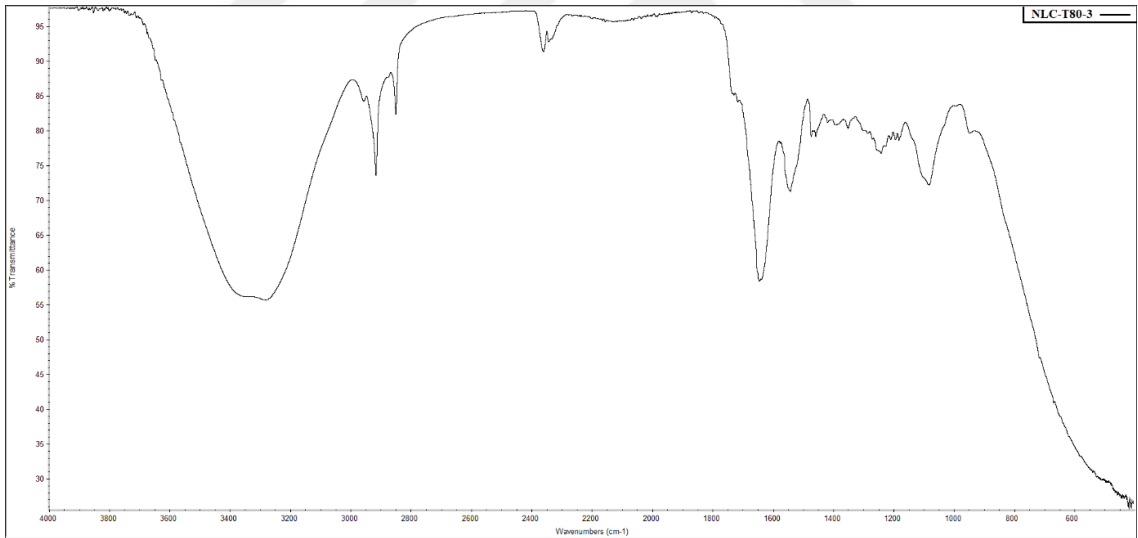
Şekil 4-80: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-5 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



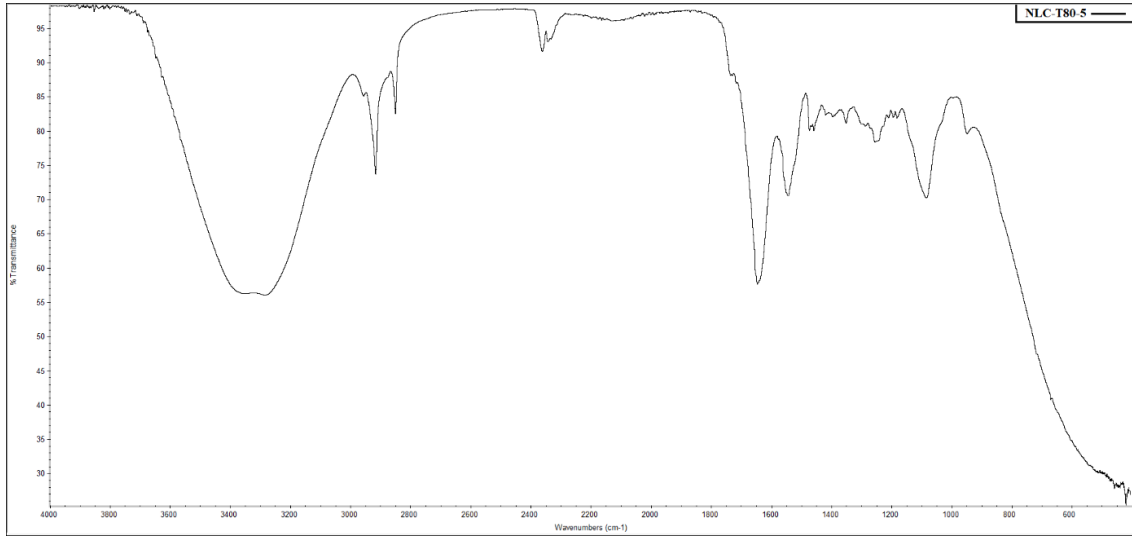
Şekil 4-81: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-9 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



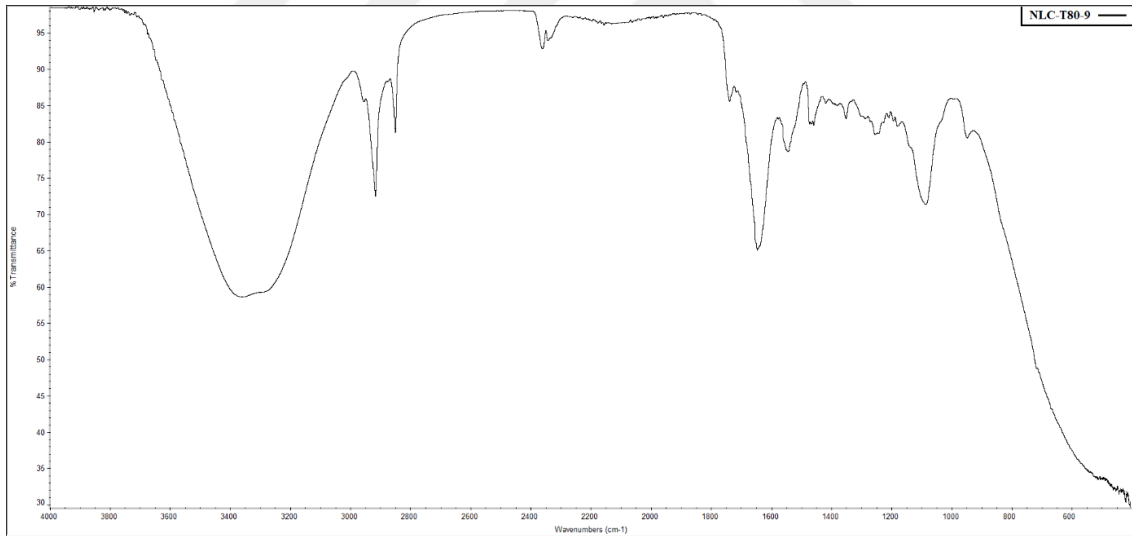
Şekil 4-82: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



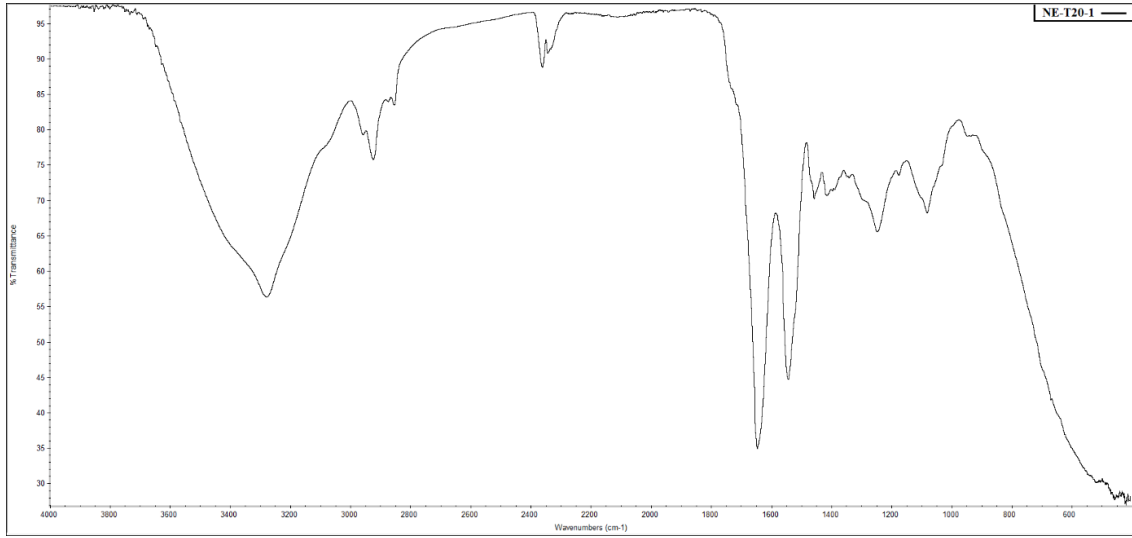
Şekil 4-83: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-3 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



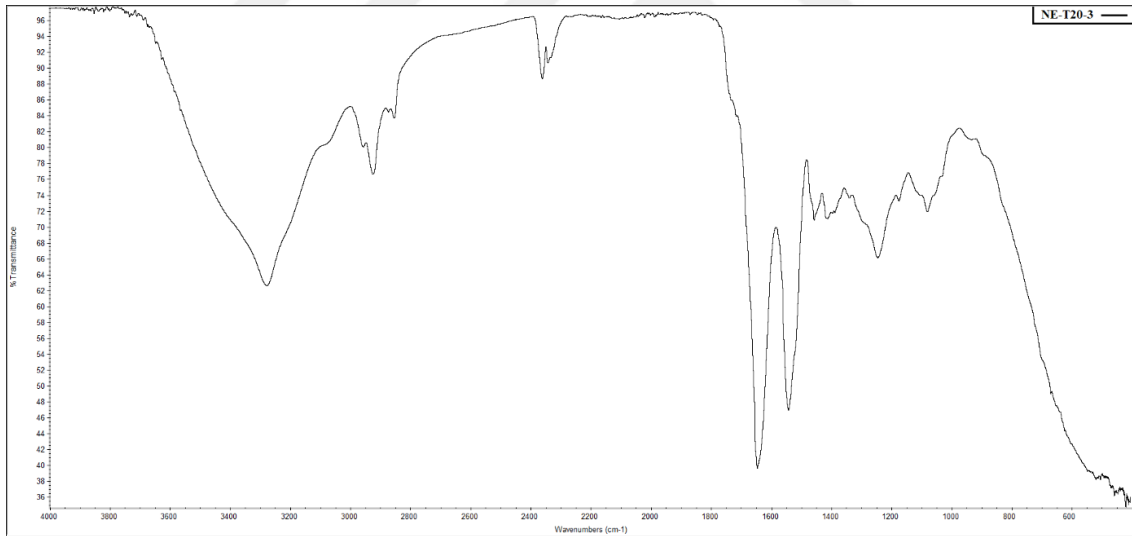
Şekil 4-84: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-5 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



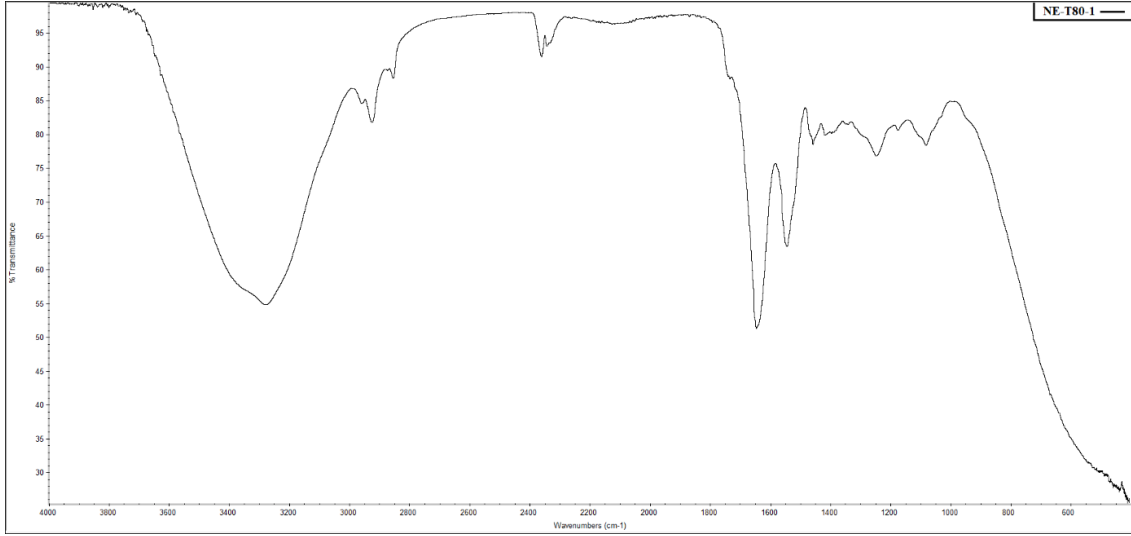
Şekil 4-85: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-9 kodlu NLC formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



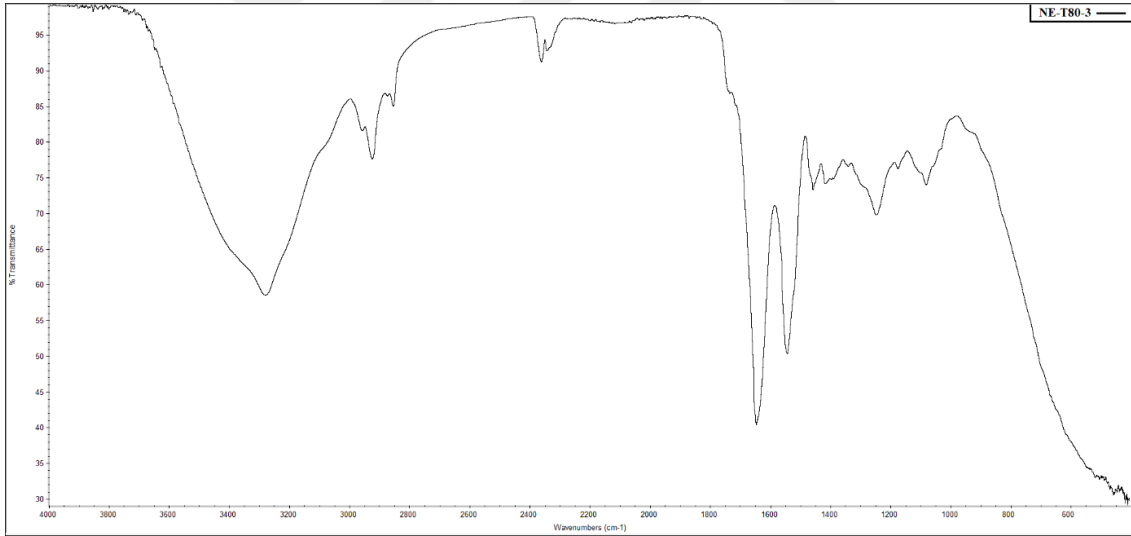
Şekil 4-86: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T20-1 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



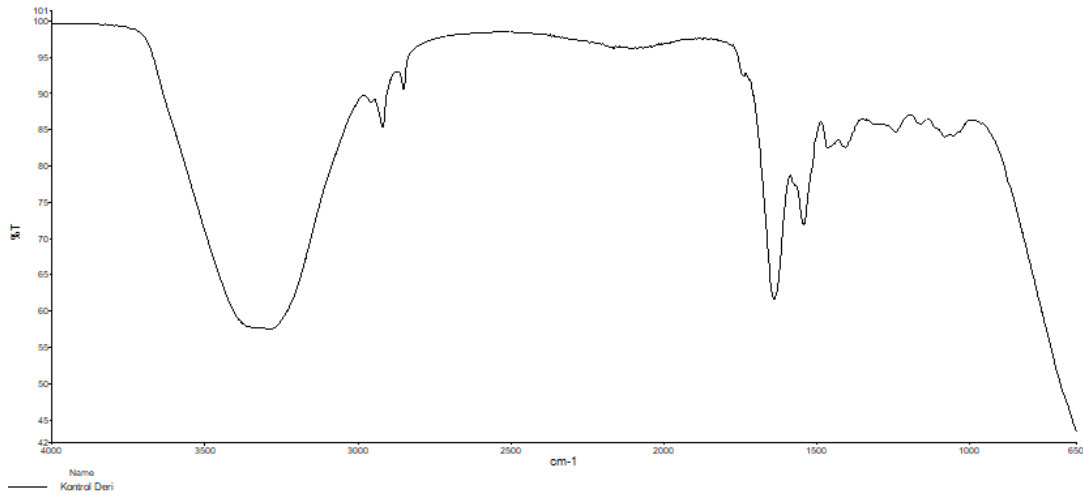
Şekil 4-87: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T20-3 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-88: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T80-1 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



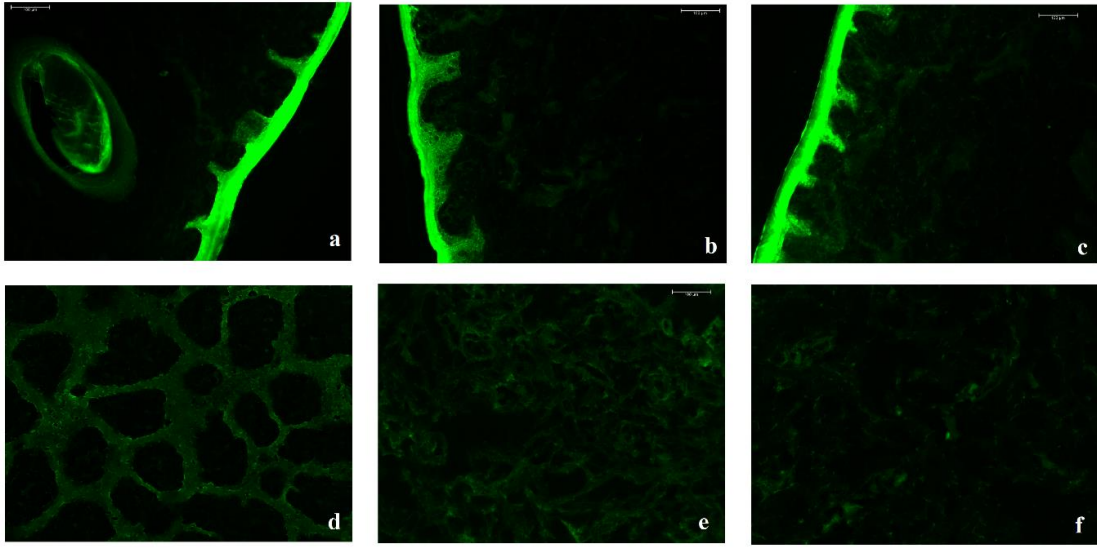
Şekil 4-89: Fluvastatin sodyum yüklü NE-T80-3 kodlu nanoemülsiyon formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



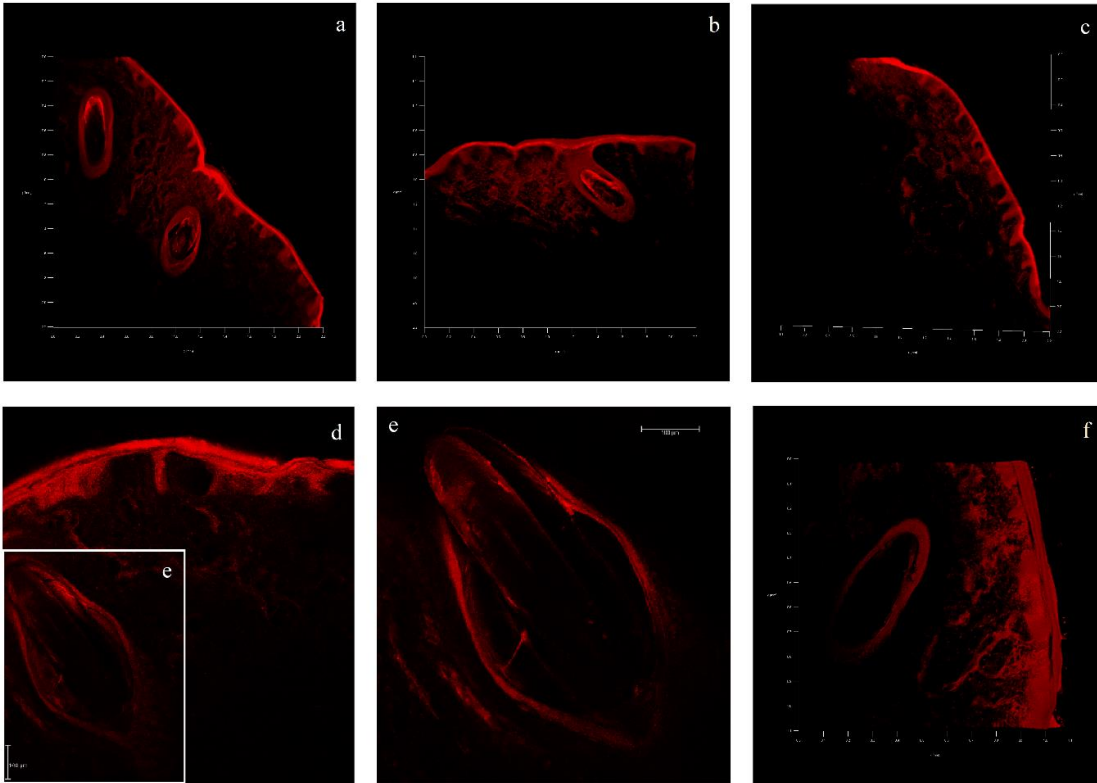
Şekil 4-90: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu

4.6.11. Floresan Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) Analizi ile Formülasyonların Dermal Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular

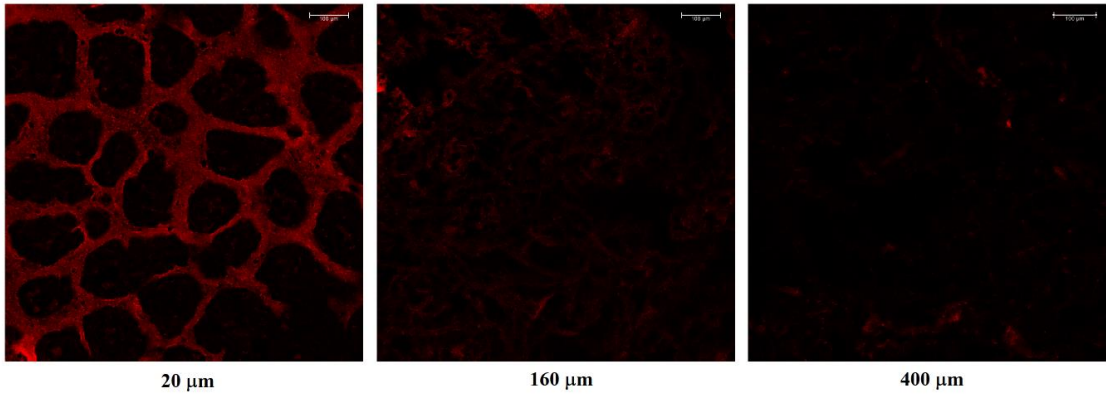
Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu ve penetrayon yolağı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla Yöntem 3.2.6.9’da anlatıldığı şekilde floresan mikroskop ve CLSM analizleri gerçekleştirildi. NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu olarak nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu ile gerçekleştirilen floresan mikroskop ve CLSM analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4-91 ile Şekil 4-99 aralığında sırasıyla verilmiştir.



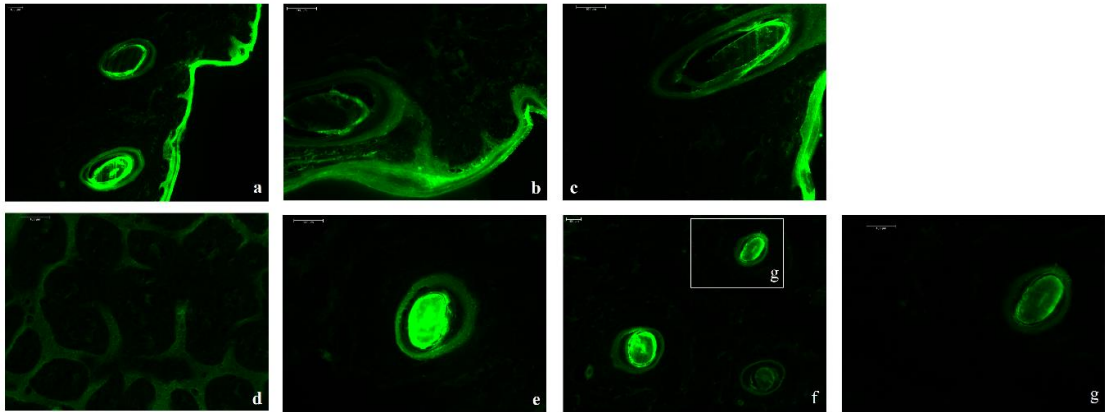
Şekil 4-91: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μ m kalınlıkta alınan dikey kesit (a, b ve c) (10X) ve yatay kesit örnekleri d) 20 μ m derinlik (10X), e) 160 μ m derinlik (10X) ve f) 400 μ m derinlik (10X)' e ait floresan mikroskop görüntüleri



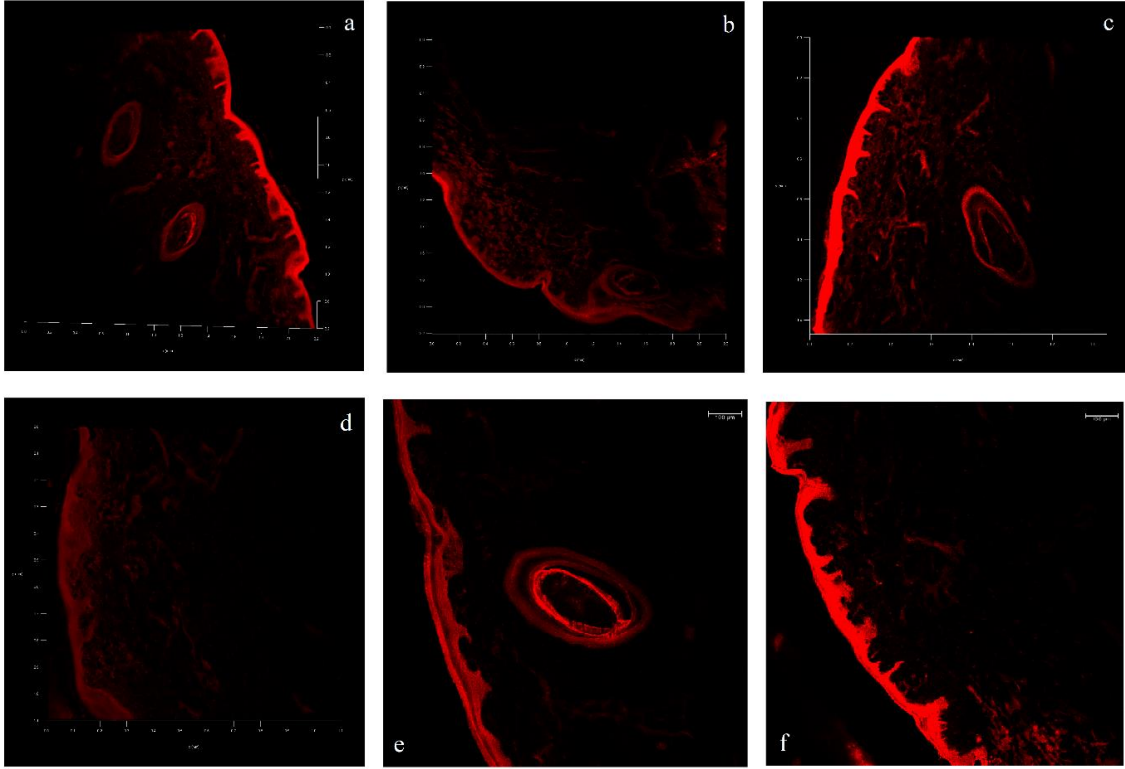
Şekil 4-92: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μ m kalınlıkta 4X büyütme (a, b, c ve d) ve 10X büyütme (e ve f) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



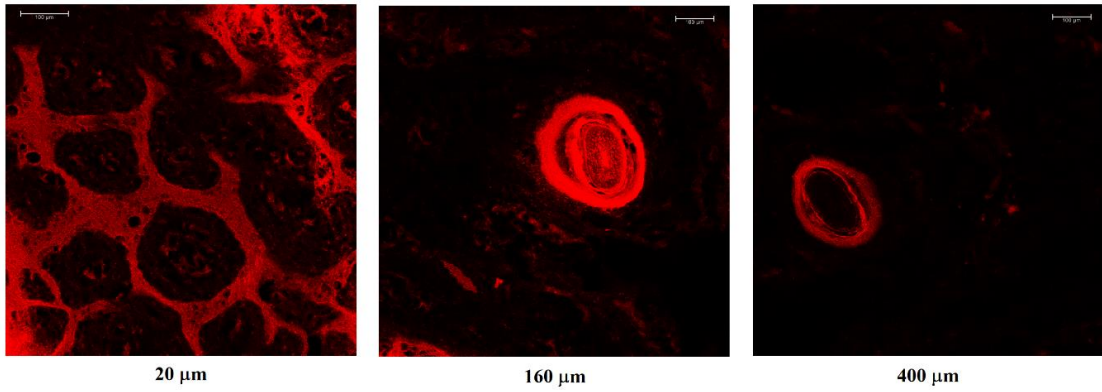
Şekil 4-93: Nil kırmızısı yüklü NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 μm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



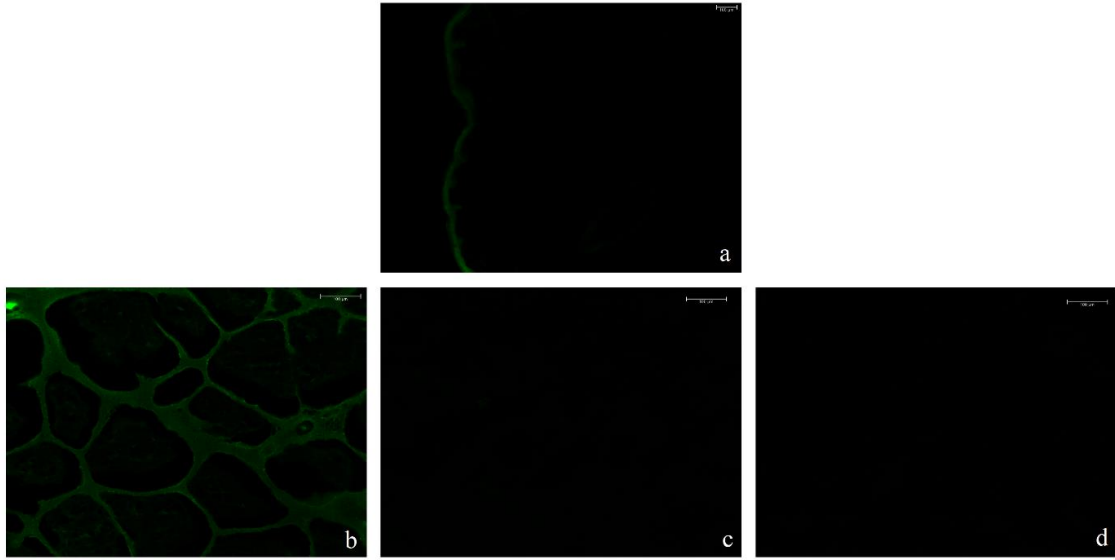
Şekil 4-94: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta 4X büyütme (a) ve 10X büyütme (b ve c) uygulanarak alınan dikey kesit örnekleri ile yatay kesit örnekleri d) 20 μm derinlik (10X), e) 160 μm derinlik (10X), f) 400 μm derinlik (4X) ve g) 400 μm derinlik (10X)'e ait floresan mikroskop görüntüleri



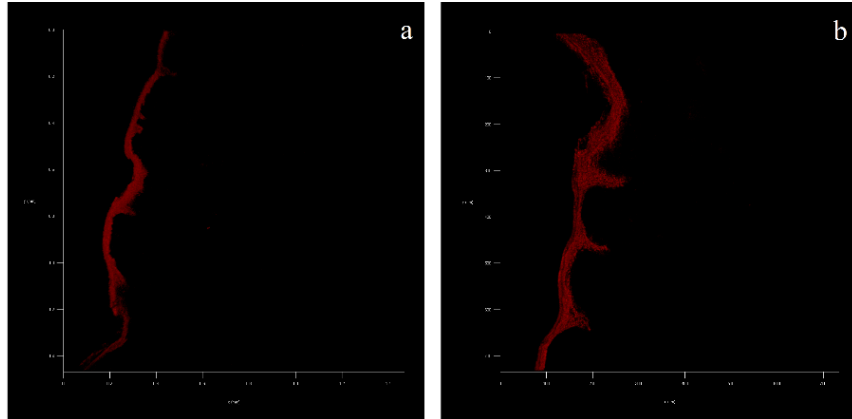
Şekil 4-95: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta 4X büyütme (a ve b) ve 10X büyütme (c, d, e ve f) uygulanarak alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



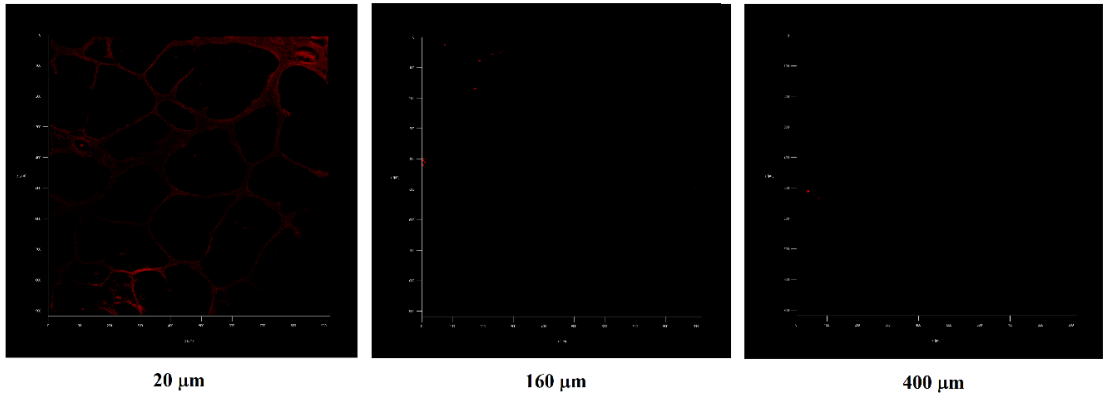
Şekil 4-96: Nil kırmızısı yüklü NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonunun 24 deriye uygulanması sonrası deriden 20, 160 ve 400 μm derinliklerde alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri



Şekil 4-97: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta alınan a) dikey kesit örneği (4X büyütme) ve yatay kesit örnekleri b) 20 μm derinlik (10X), c) 160 μm derinlik (10X) ve d) 400 μm derinlik (10X)' e ait floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 4-98: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 μm kalınlıkta alınan dikey kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri a) 4X büyütme, b) 10X büyütme



Şekil 4-99: Kontrol olarak kullanılan PBS tamponu içindeki Nil kırmızısı süspansiyonunun 24 saat deriye uygulanması sonrası deriden 20 µm kalınlıkta alınan yatay kesit örneklerine ait CLMS görüntüleri (10X)

4.6.12. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

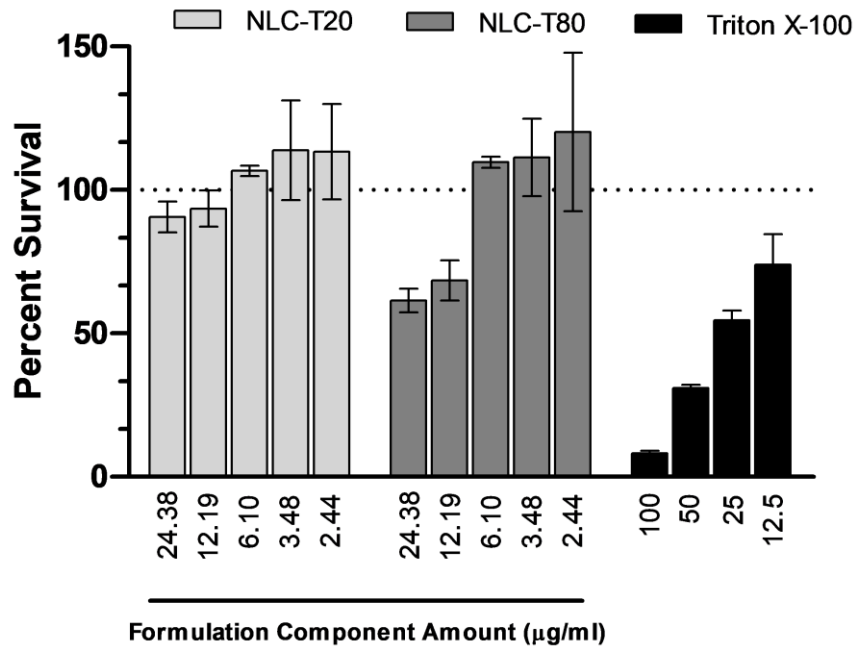
4.6.12.1. *İn Vitro* Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular

NLC formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile Yöntem 3.2.6.10.3’de belirtildiği şekilde çalışılarak değerlendirildi.

Normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite çalışması sonucunda NLC formülasyonları ve kontrol olarak kullanılan Triton X-100’ün farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-69’da, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafik Şekil 4-100’de verilmiştir.

Tablo 4-69: NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri

	Konsantrasyon (µg/mL)	Canlılık (%)
NLC-T20	24.38	90.58 ± 5.36
	12.19	93.49 ± 6.31
	6.10	106.66 ± 1.81
	3.48	113.84 ± 17.36
	2.44	113.33 ± 16.64
NLC-T80	24.38	61.45 ± 4.15
	12.19	68.43 ± 6.98
	6.10	109.65 ± 1.93
	3.48	111.31 ± 13.46
	2.44	120.18 ± 27.59
Triton X-100	100	8.17 ± 0.94
	50	30.89 ± 1.13
	25	54.52 ± 3.47
	12.5	73.93 ± 10.58

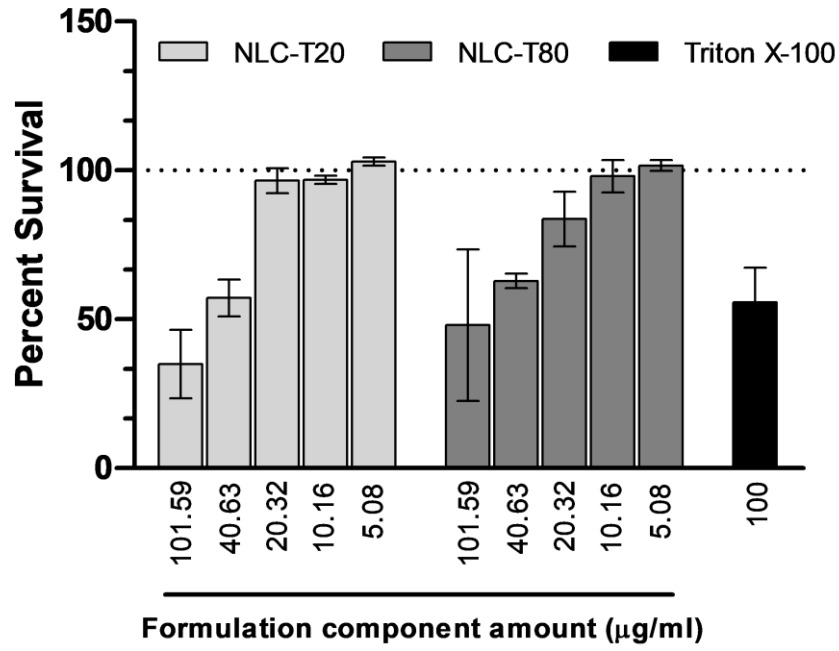


Şekil 4-100: NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu normal insan fibroblast hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği

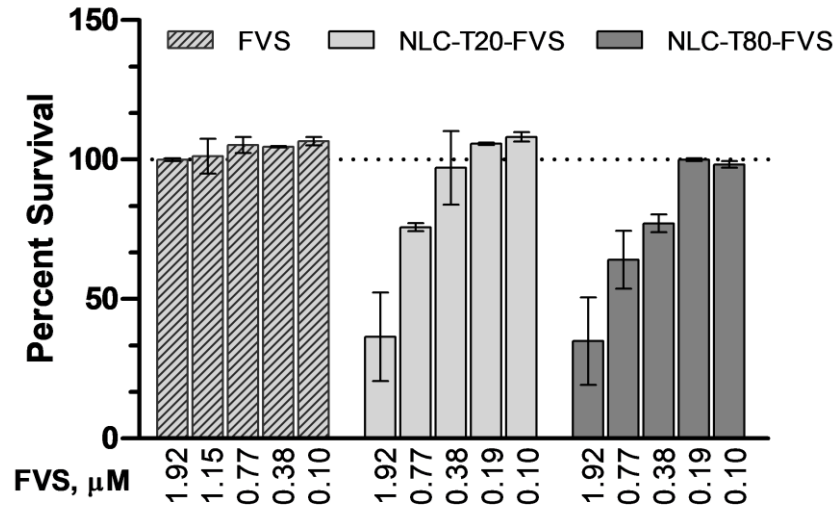
İnsan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucunda boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları, kontrol olarak kullanılan Triton X-100 ve serbest fluvastatin sodyumun farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-70’da, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler Şekil 4-101 ve Şekil 4-102’te verilmiştir.

Tablo 4-70: Boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları, fluvastatin sodyum ve Triton X-100 ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerleri

	Konsantrasyon	Canlılık (%)
NLC-T20	101.59 µg/mL	34.94 ± 11.51
	40.63 µg/mL	57.15 ± 6.17
	20.32 µg/mL	96.54 ± 4.20
	10.16 µg/mL	96.81 ± 1.32
	5.08 µg/mL	102.91 ± 1.38
NLC-T80	101.59 µg/mL	48.01 ± 25.42
	40.63 µg/mL	62.86 ± 2.43
	20.32 µg/mL	83.64 ± 9.21
	10.16 µg/mL	98.04 ± 5.45
	5.08 µg/mL	101.59 ± 1.79
NLC-T20-FVS	1.92 µM	36.43 ± 15.88
	0.77 µM	75.72 ± 1.43
	0.38 µM	97.01 ± 13.21
	0.19 µM	105.63 ± 0.49
	0.10 µM	108.10 ± 1.70
NLC-T80-FVS	1.92 µM	34.88 ± 15.71
	0.77 µM	64.06 ± 10.43
	0.38 µM	77.11 ± 3.16
	0.19 µM	99.91 ± 0.51
	0.10 µM	98.24 ± 1.22
Fluvastatin sodyum	1.92 µM	99.98 ± 0.49
	1.15 µM	101.18 ± 6.21
	0.77 µM	105.16 ± 2.88
	0.38 µM	104.51 ± 0.25
	0.1 µM	106.53 ± 1.47
Triton X-100	100 µg/mL	55.73 ± 11.62



Şekil 4-101: Etkin madde içermeyen NLC formülasyonları ve kontrol Triton X-100 çözeltisi ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 4-102: Etkin madde yüklü NLC formülasyonları ve serbest fluvastatin sodyum çözeltileri ile yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucu HaCaT hücrelerine ait konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırmalı grafiği

Bu çalışmalar sonuncunda *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmalarında kullanılacak etkin madde yüklü NLC formülasyonunun konsantrasyonu 0.2 μ M olarak belirlendi. Boş formülasyonlar da etkin madde yüklü formülasyonlar ile aynı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltildi. Serbest fluvastatin sodyum miktarı 0.2 μ M ve IL-17A miktarı 200 ng/mL olarak belirlendi.

4.6.12.2. *İn Vitro* Antipsoriyatik Aktivitenin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

İn vitro antipsoriyatik aktivite çalışmaları psöriyatik epidermal keratinositlerin hiperproliferatif ve bozulmuş farklılaşmasını taklit eden bir hücre hattı olan insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (Breitkreutz ve ark. 1991) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem 3.2.6.10.4'te belirtildiği şekilde çalışılarak ve hücre kültür ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarları ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

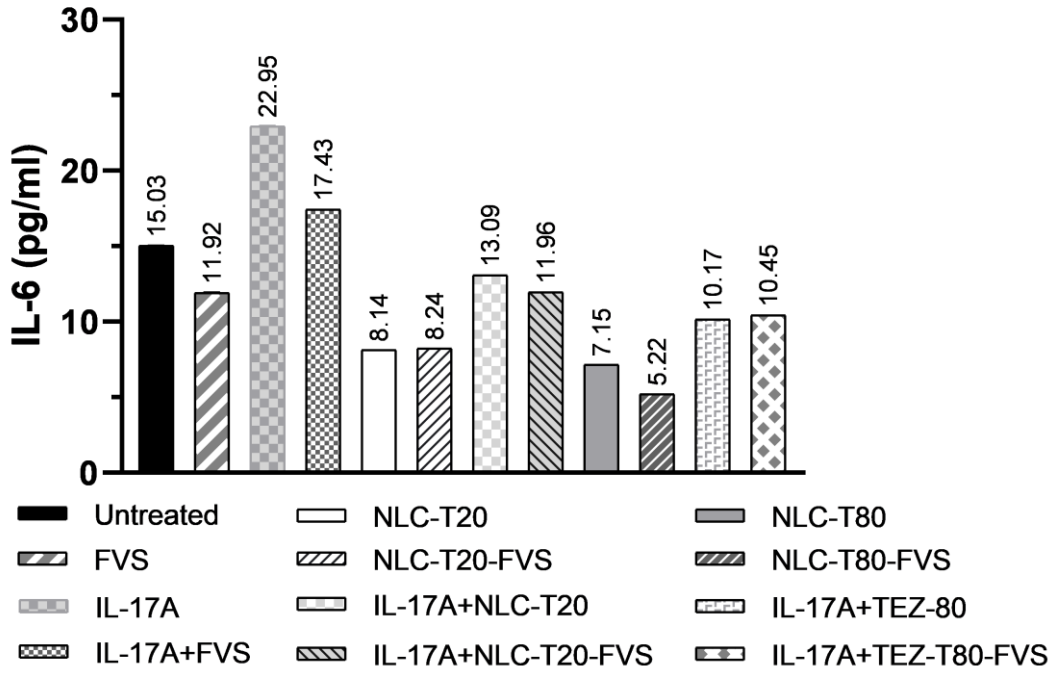
Antipsoriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında; IL-17A, serbest haldeki fluvastatin sodyum ve boş ve etkin madde yüklü NLC'ler tek başına hücrelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Aynı zamanda IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücrelere serbest haldeki fluvastatin sodyum, boş ve etkin madde yüklü NLC'ler ayrı ayrı uygulanarak antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi. Hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarları sırasıyla Tablo 4-71'te ve Tablo 4-72'te, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler Şekil 4-103 ve Şekil 4-103 aralığında verilmiştir.

Tablo 4-71: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 miktarları

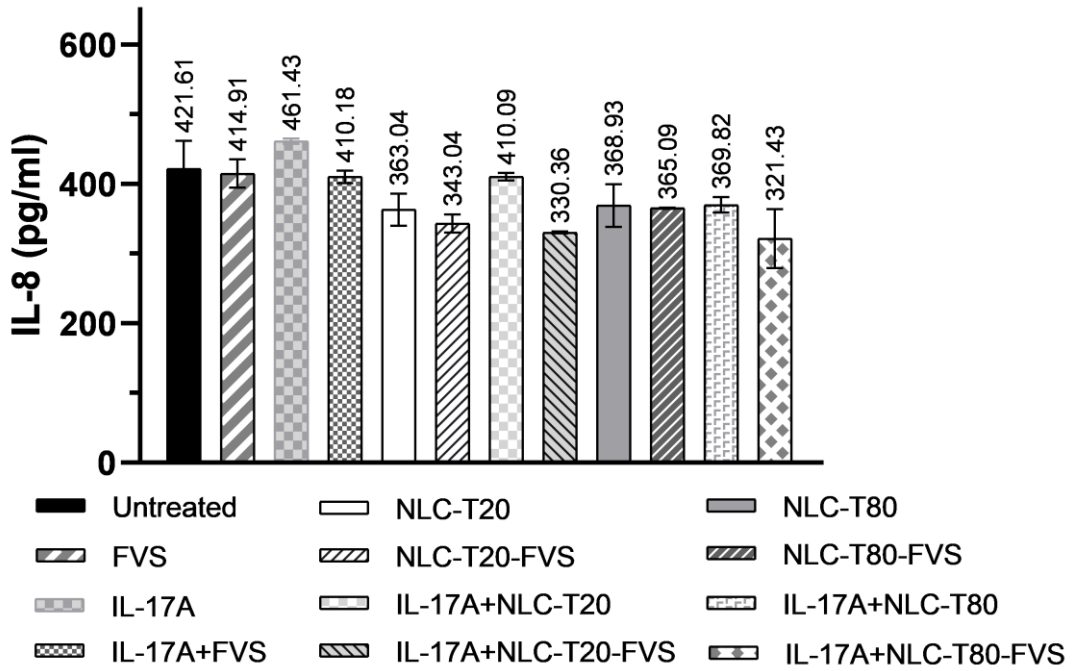
	IL-6 (pg/mL)
Untreated	15.03 ± 0.02
FVS	11.92 ± 0.01
IL-17A	22.95 ± 0.02
IL-17A + FVS	10.92 ± 0.01
NLC-T20	8.14 ± 0.03
NLC-T20-FVS	8.24 ± 0.01
IL-17A + NLC-T20	13.09 ± 0.01
IL-17A + NLC-T20-FVS	11.96 ± 0.07
NLC-T80	7.15 ± 0.01
NLC-T80-FVS	5.22 ± 0.01
IL-17A + NLC-T80	10.17 ± 0.02
IL-17A + NLC-T80-FVS	10.45 ± 0.02

Tablo 4-72: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları

	IL-8 (pg/mL)
Untreated	421.61 ± 39.90
FVS	414.91 ± 20.08
IL-17A	461.43 ± 3.79
IL-17A + FVS	410.18 ± 8.84
NLC-T20	363.04 ± 22.98
NLC-T20-FVS	343.04 ± 13.13
IL-17A + NLC-T20	410.09 ± 5.43
IL-17A + NLC-T20-FVS	330.36 ± 1.52
NLC-T80	368.93 ± 30.81
NLC-T80-FVS	365.09 ± 0.88
IL-17A + NLC-T80	369.82 ± 11.11
IL-17A + NLC-T80-FVS	321.43 ± 42.17



Şekil 4-103: Hücre kültür ortamına salınan IL-6 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik



Şekil 4-104: Hücre kültür ortamına salınan IL-8 değerlerini içeren karşılaştırmalı grafik

4.7. Transetozom ve NLC'lerin Jel Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar

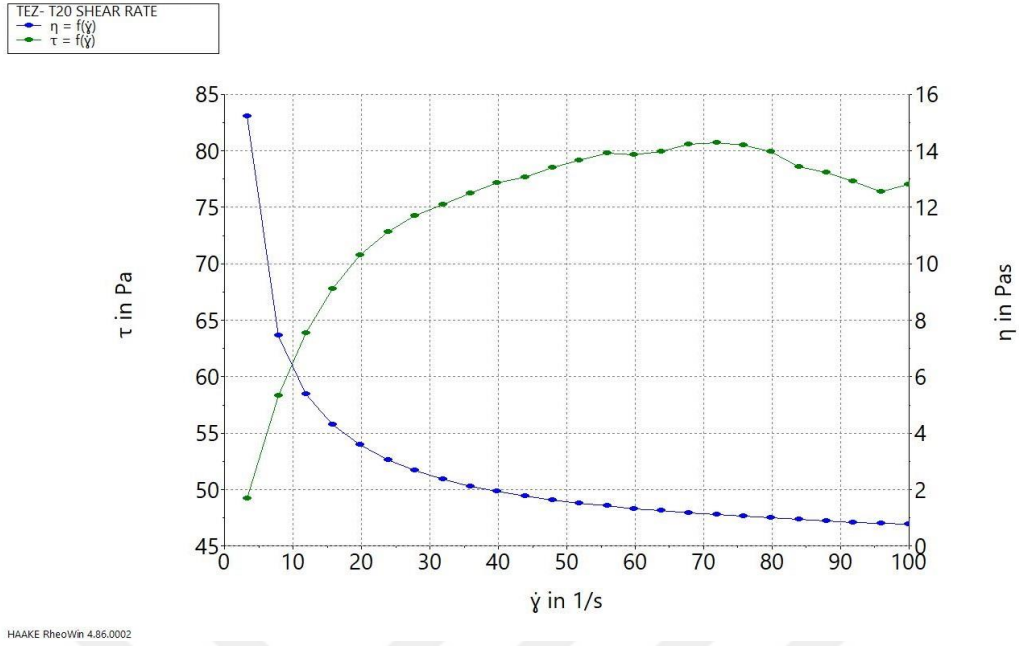
4.7.1. Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Yöntem 3.2.7.2.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak ölçülen fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının pH değerlerine ait bulgular Tablo 4-73'da gösterildi.

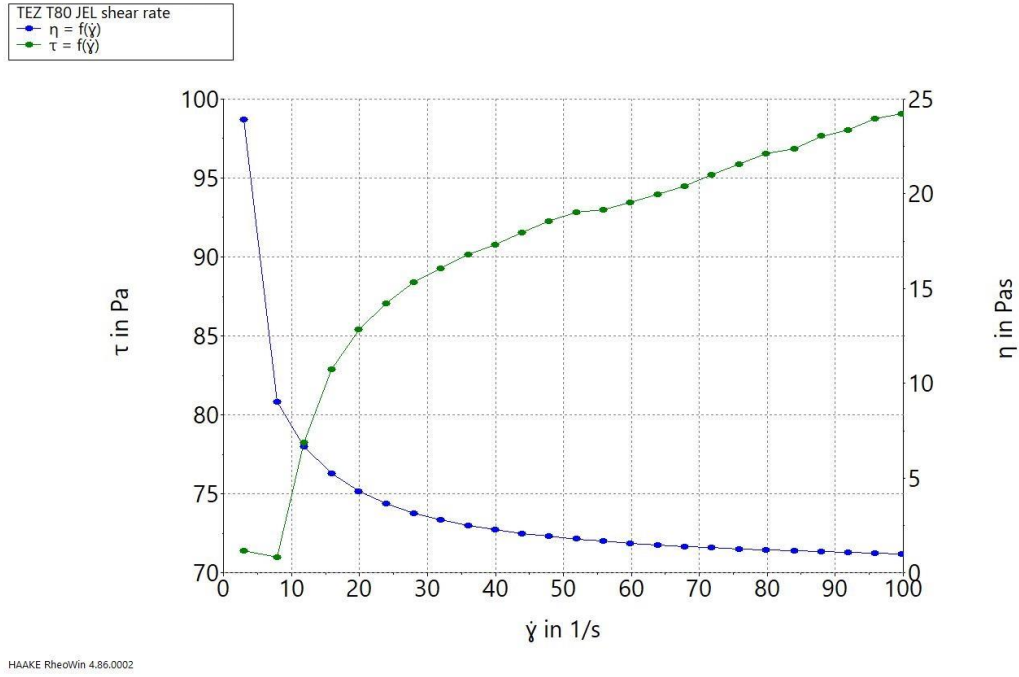
Tablo 4-73: Jel sistemlerin pH değerlerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	pH
TEZ-T20-4 jel	4,10 ± 0,01
TEZ-T80-4 jel	4,11 ± 0,01
NLC-T20-1 jel	3,60 ± 0,01
NLC-T80-1 jel	3,55 ± 0,02

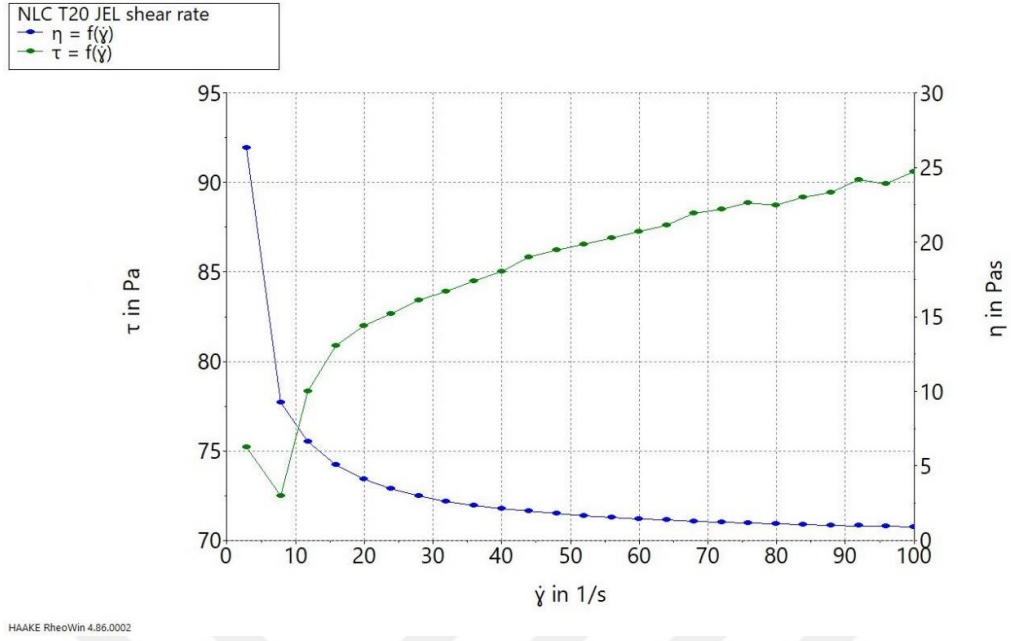
Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının akış özellikleri kayma gerilimi ve kayma hızı testleri ile Yöntem 3.2.7.2.2.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak incelenlendi. Değişen kayma hızına (τ) karşı ölçülen kayma gerilimi ($\dot{\gamma}$) ve viskozite (η) değerlerine ait grafikler Şekil 4-105 ile Şekil 4-108 aralığında, formülasyonlara ait farklı akış modelleri için hesaplanan değerler Tablo 4-74'de verildi.



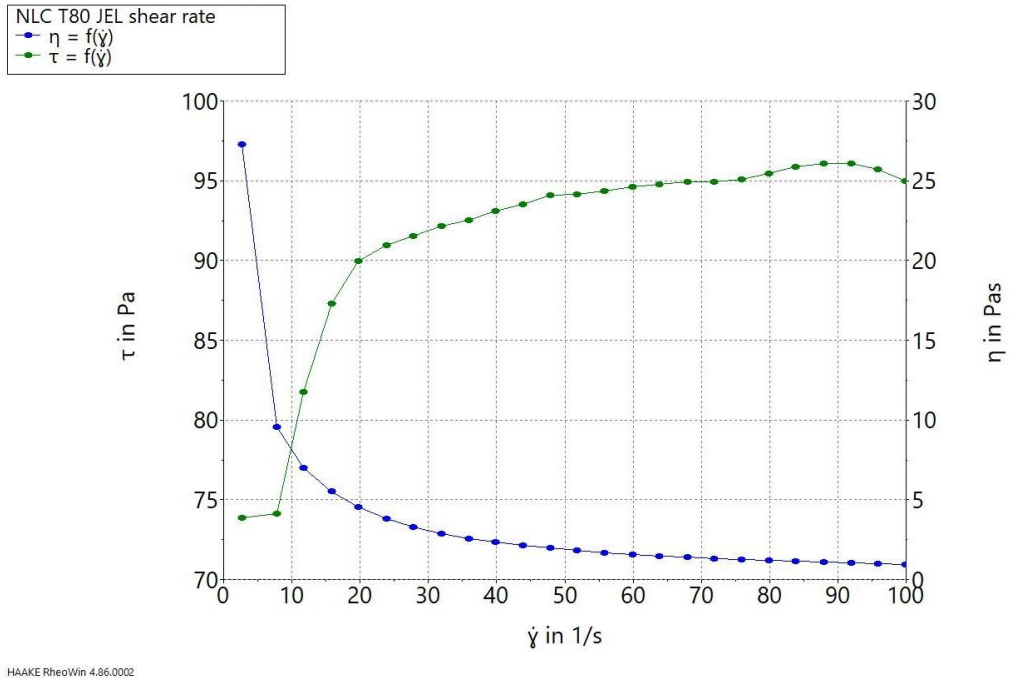
Şekil 4-105: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi



Şekil 4-106: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi



Şekil 4-107: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi

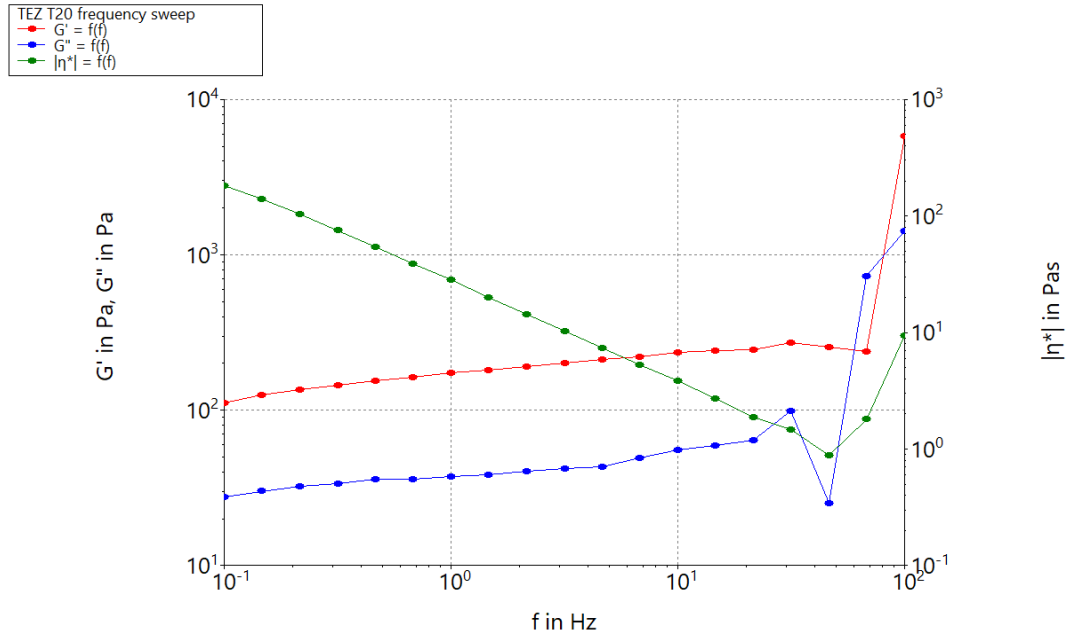


Şekil 4-108: NLC-T80-1 jel kodlu formülasyonun değişen kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite eğrisi

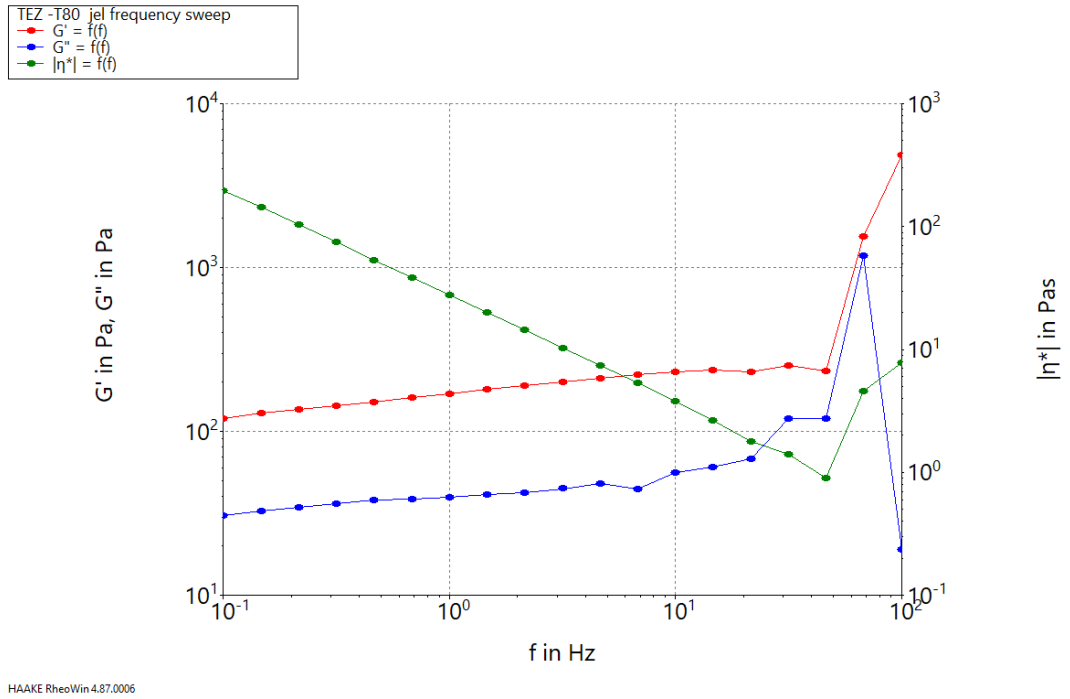
Tablo 4-74: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonları için hesaplanan farklı akış modellerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	Akış Modeli	τ_0	K	N	η_e	R
TEZ-T20-4 jel	Herschel-Bulkley	$-697,85 \pm 6,72$	$743,45 \pm 5,59$	$0,01 \pm 0$	-	$0,930 \pm 0,01$
	Ostwald de Waele	-	$50,01 \pm 1,1$	$0,11 \pm 0$	-	$0,907 \pm 0,01$
	Casson	$58,28 \pm 1,20$	-	-	$0,02 \pm 0$	$0,813 \pm 0,01$
TEZ-T80-4 jel	Herschel-Bulkley	$-636,50 \pm 5,66$	$687,2 \pm 2,4$	$0,01 \pm 0$	-	$0,757 \pm 0,13$
	Ostwald de Waele	-	$54,04 \pm 2,73$	$0,08 \pm 0,01$	-	$0,734 \pm 0,13$
	Casson	$47,33 \pm 18,05$			$0,02 \pm 0$	$0,656 \pm 0,07$
NLC-T20-1 jel	Herschel-Bulkley	$53,98 \pm 3,77$	$16,29 \pm 4,07$	$0,19 \pm 0,01$	-	$0,973 \pm 0$
	Ostwald de Waele	-	$67,64 \pm 0,16$	$0,07 \pm 0,01$	-	$0,971 \pm 0$
	Casson	$73,32 \pm 1,09$	-	-	$0,01 \pm 0$	$0,961 \pm 0$
NLC-T80-1 jel	Herschel-Bulkley	$-385,35 \pm 27,08$	$454,7 \pm 24,75$	$0,90 \pm 0,06$	-	$0,897 \pm 0,06$
	Ostwald de Waele	-	$70,92 \pm 1,78$	$0,06 \pm 0,01$	-	$0,890 \pm 0,06$
	Casson	$77,35 \pm 0,99$	-	-	$0,01 \pm 0$	$0,799 \pm 0,09$

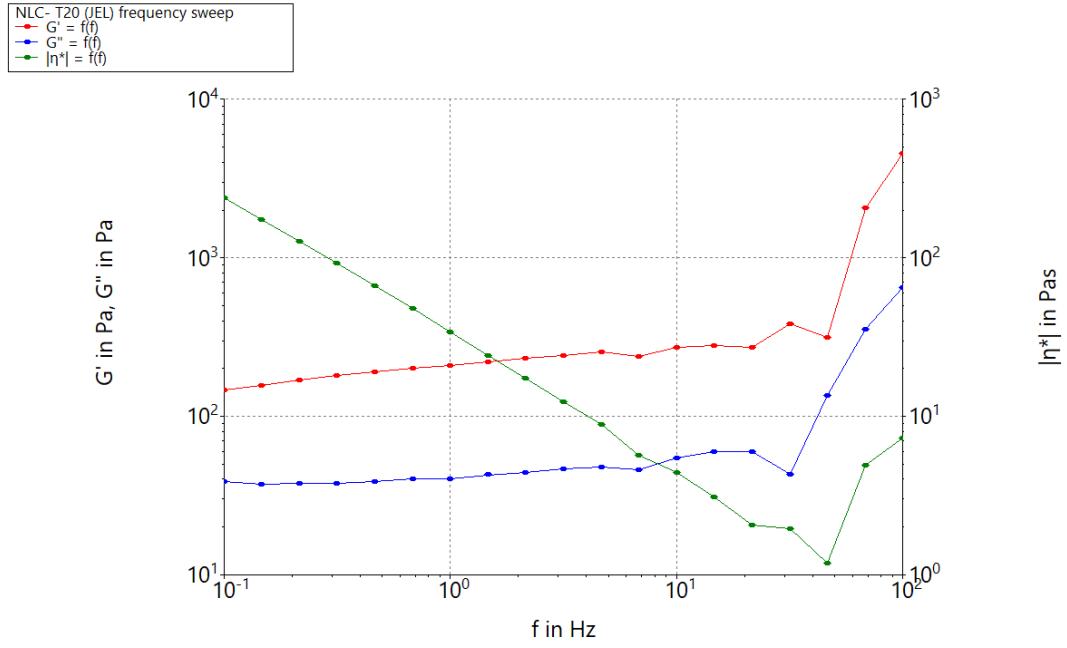
Viskoelastik özelliklerinin incelenmesi kapsamında osilasyon testleri Yöntem 3.2.7.2.2.2’de belirtildiği şekilde çalışılarak gerçekleştirildi. Osilasyon testine ait grafikler Şekil 4-109 ile Şekil 4-112 aralığında, formülasyonlar için hesaplanan G' (elastik modül), G'' (viskoz modül) ve $\tan\delta$ (G''/G') değerleri Tablo 4-75’de gösterildi.



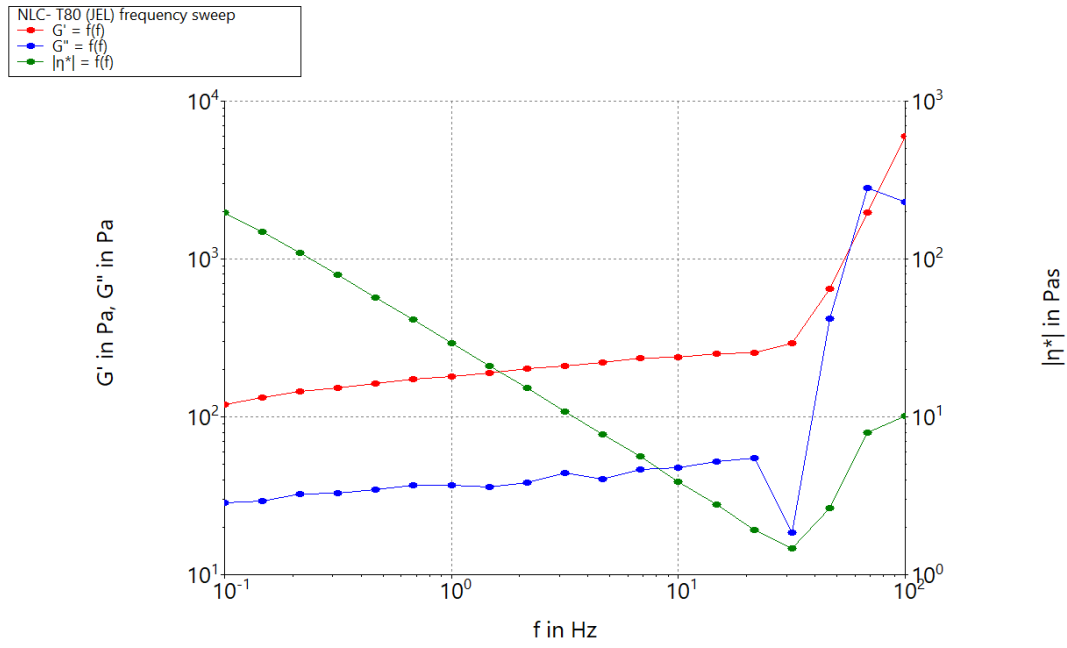
Şekil 4-109: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi



Şekil 4-110: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi



Şekil 4-111: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi



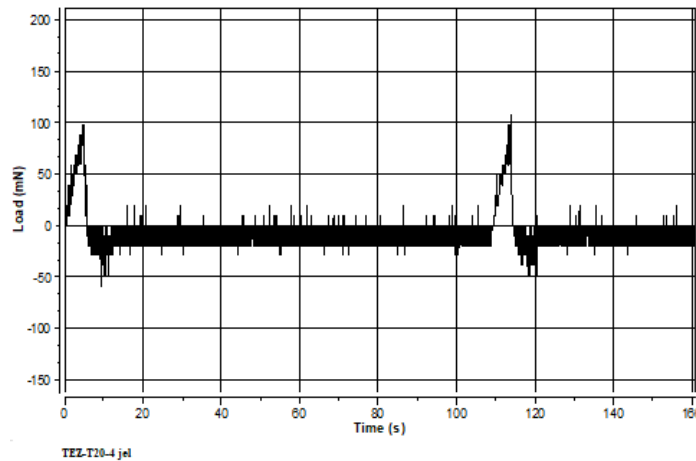
Şekil 4-112: NLC-T80-1 jel kodlu formülasyonun elastik ve viskoz modül eğrisi

Tablo 4-75: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının osilasyon testine ait bulgular

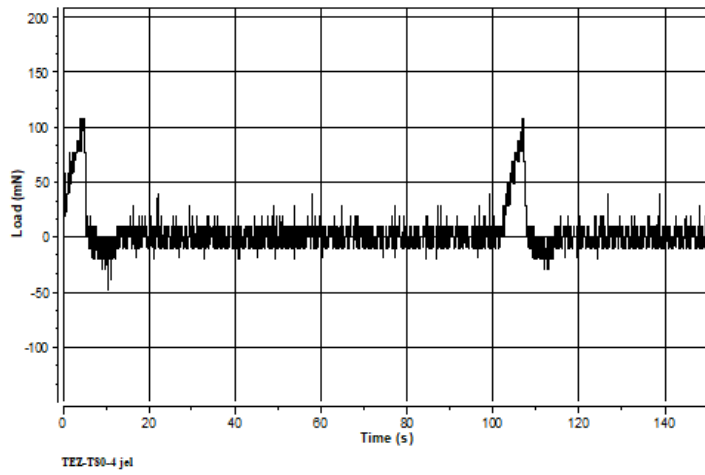
Formülasyon Kodu	G'	G''	Tanδ
TEZ-T20-4 jel	195,63 ± 3,56	44,34 ± 1,03	0,23 ± 0,01
TEZ-T80-4 jel	187,93 ± 7,86	46,62 ± 2,89	0,24 ± 0,01
NLC-T20-1 jel	228,32 ± 2,96	45,59 ± 0,85	0,20 ± 0,01
NLC-T80-1 jel	206,96 ± 1,29	42,54 ± 1,44	0,21 ± 0,01

*G' - viskoz modül, G'' - elastik modül, Tanδ=G''/G'

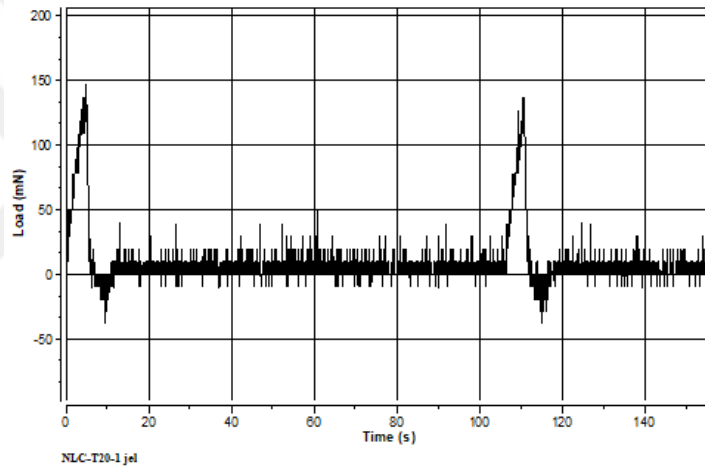
Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının mekanik özellikleri (adezyon, kohezyon, sertlik ve sıkıştırılabilirlik) Brokfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak Yöntem 3.2.7.2.3'te belirtildiği şekilde çalışılarak incelendi. Formülasyonlara ait TPA grafikleri Şekil 4-113 ile Şekil 4-116 aralığında, güç-zaman eğrisi yoluyla hesaplanan jellerin sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği ve kohezifliğine ait değerler Tablo 4-76'de gösterilmiştir.



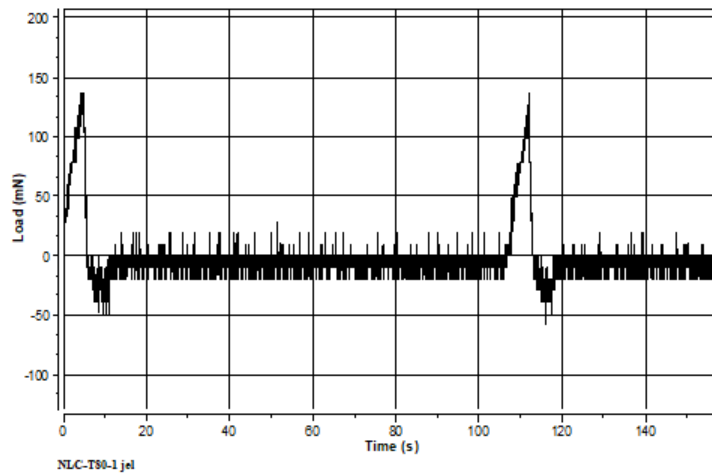
Şekil 4-113: TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği



Şekil 4-114: TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği



Şekil 4-115: NLC-T20-1 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği



Şekil 4-115: NLC-T80-1 jel kodlu formülasyona ait TPA grafiği

Tablo 4-76: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	Sertlik (N)	Adeziflik (mJ)	Koheziflik	Sıkıştırılabilirlik
TEZ-T20-4 jel	0,11 ± 0,00	0,60 ± 0,42	1,34 ± 0,51	0,53 ± 0,06
TEZ-T80-4 jel	0,11 ± 0,00	0,50 ± 0,42	1,25 ± 0,37	0,53 ± 0,06
NLC-T20-1 jel	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,14	1,36 ± 0,15	0,77 ± 0,06
NLC-T80-1 jel	0,12 ± 0,02	0,50 ± 0,15	1,19 ± 0,12	0,73 ± 0,11

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının yayılabilirliği Brokfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak Yöntem 3.2.7.2.4’te anlatıldığı şekilde çalışılarak ölçüldü. Yayılabilirlik değerlerine ait bulgular Tablo 4-77’te verilmiştir.

Tablo 4-77: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının yayılabilirlik testine ait bulgular

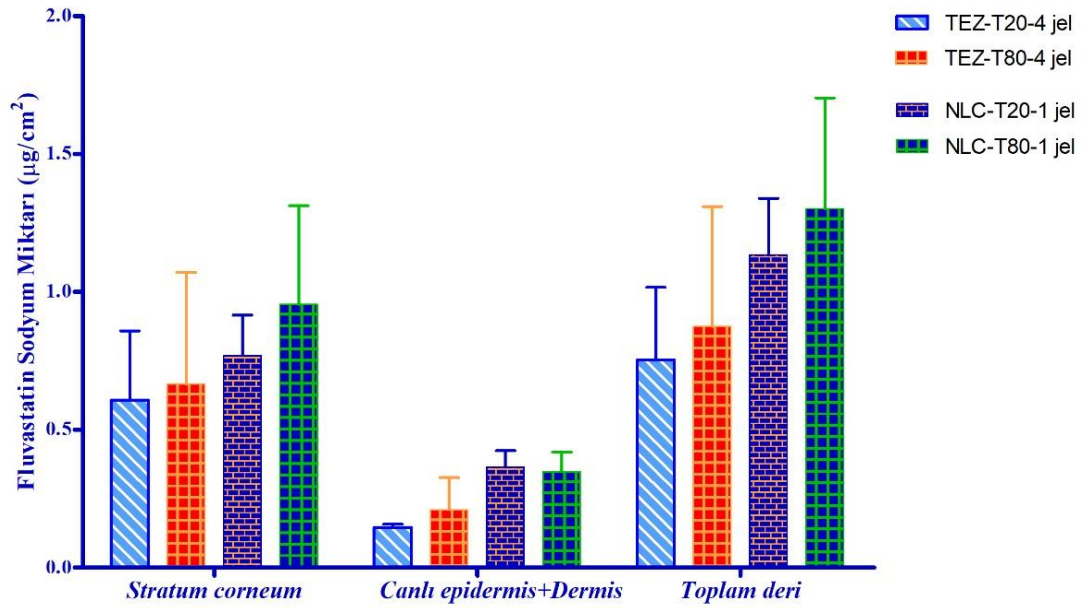
Formülasyon Kodu	Yayılabilirlik (mJ)
TEZ-T20-4 jel	1,60 ± 0,40
TEZ-T80-4 jel	1,60 ± 0,28
NLC-T20-1 jel	1,65 ± 0,35
NLC-T80-1 jel	1,63 ± 0,80

4.7.2. Dermal Tabakalarda Biriken Fluvastatin Sodyum Miktar Tayinine Ait Bulgular

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları ve dermal tabakarda etkin madde miktar tayini analizleri Yöntem 3.2.5.6’da anlatıldığı şekilde çalışılarak oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-78’de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafik Şekil 4-116’te gösterildi.

Tablo 4-78: Transetozom jel ve NLC jel formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda hesaplanan (biriken/belirlenen) fluvastatin sodyum miktarları

Formülasyon Kodu	<i>Stratum corneum</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Canlı Epidermis + Dermis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Derideki toplam miktar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
TEZ-T20-4 jel	0.607 ± 0.252	0.146 ± 0.012	0.753 ± 0.264
TEZ-T80-4 jel	0.665 ± 0.406	0.209 ± 0.117	0.875 ± 0.435
NLC-T20-1 jel	0.768 ± 0.147	0.365 ± 0.059	1.134 ± 0.206
NLC-T80-1 jel	0.954 ± 0.358	0.348 ± 0.071	1.302 ± 0.402



Şekil 4-116: Seçilmiş fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonları ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarlarının karşılaştırılması

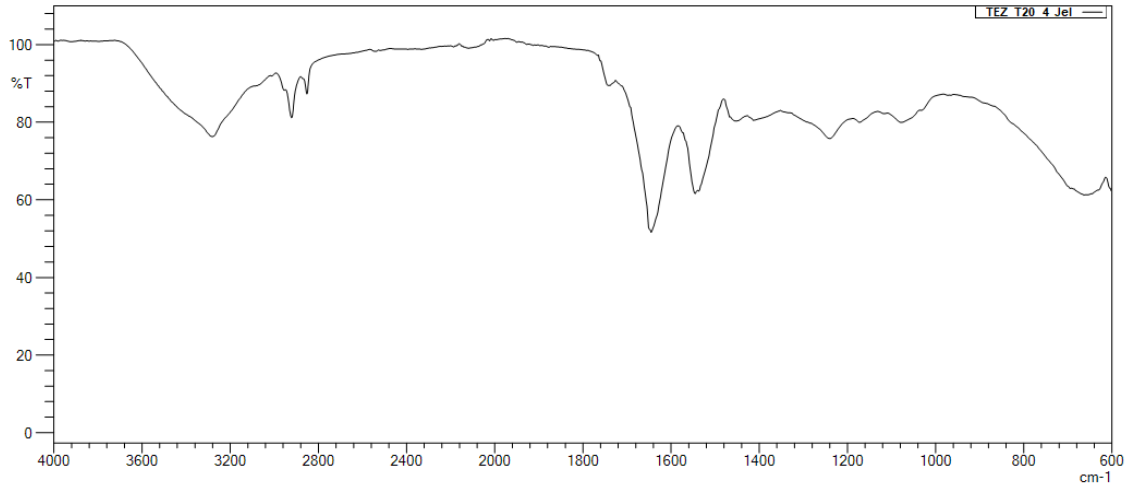
4.7.3. ATR-FTIR Analizi ile Fluvastatin Sodyum Yüklü Formülasyonların Deri Lipitleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının ATR-FTIR analizi ile deri lipitleri üzerine etkileri Yöntem 3.2.5.7’de anlatıldığı şekilde çalışılarak oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirildi.

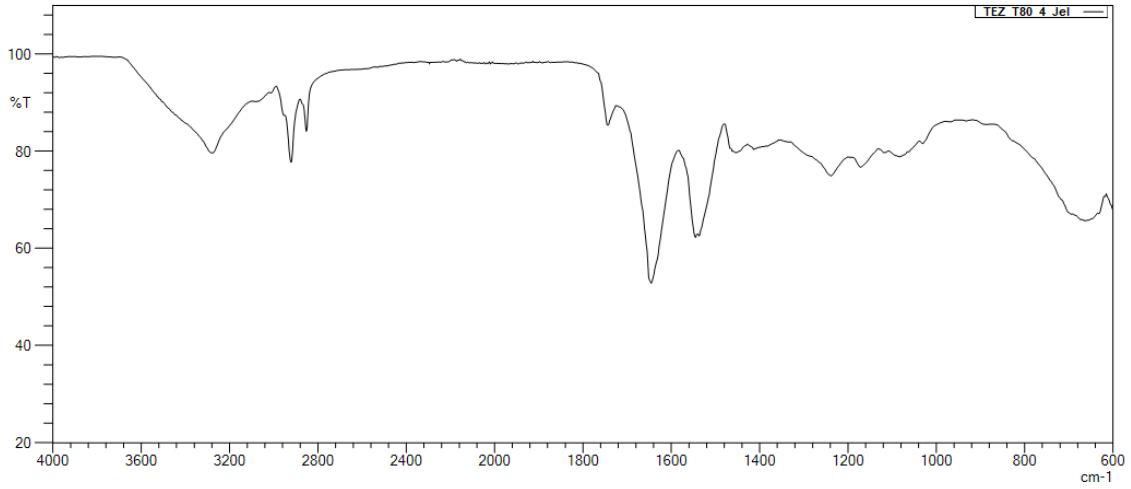
Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-79’de, her bir formülasyon için alınan ATR-FTIR spektrumları Şekil 4-117 ile Şekil 4-120 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum Şekil 4-121’de ve plasebo jel formülasyonu uygulanan deriden alınan spektrum ise Şekil 4-122’de verildi.

Tablo 4-79: Fluvastatin sodyum yüklü transetozom jel ve NLC jel formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası deriye ait C-H simetrik ve asimetrik gerilme bantları

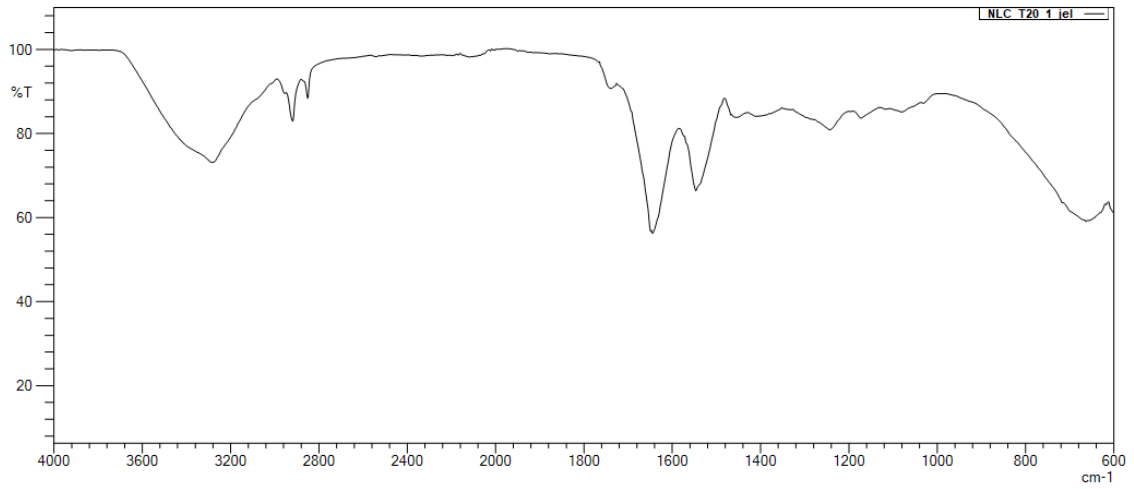
Formülasyon Kodu	Asimetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)	Simetrik Gerilme Bantları (cm ⁻¹)
Kontrol Deri	2919.50 ± 0.01	2851.22 ± 0.02
TEZ-T20-4 jel	2922.57 ± 0.36	2852.72 ± 0.02
TEZ-T80-4 jel	2922.16 ± 0.07	2852.72 ± 0.02
NLC-T20-1 jel	2918.30 ± 0.03	2850.79 ± 0.01
NLC-T80-1 jel	2920.23 ± 0.07	2850.79 ± 0.01
Plasebo jel	2920.23 ± 0.68	2850.79 ± 0.57



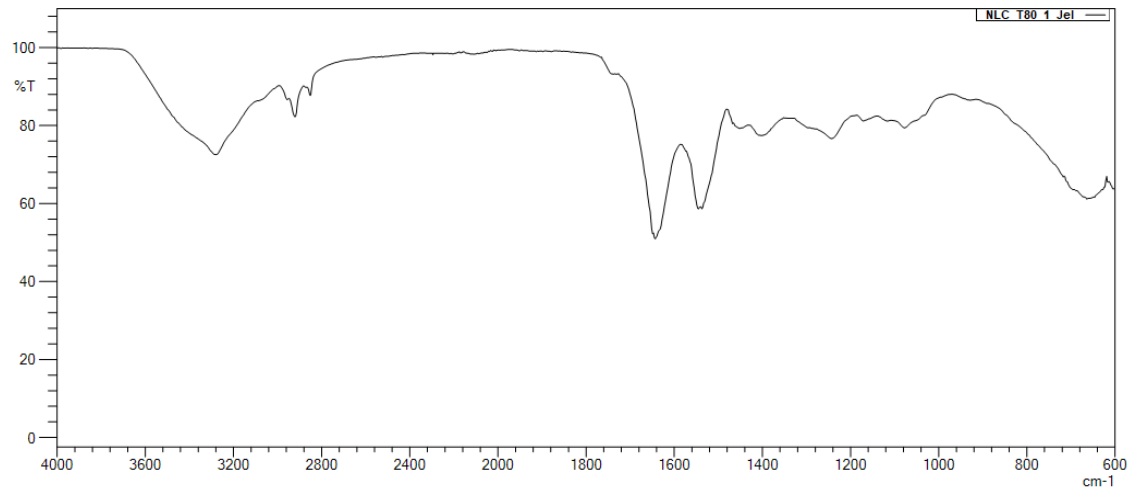
Şekil 4-117: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4 jel kodlu formülasyon ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



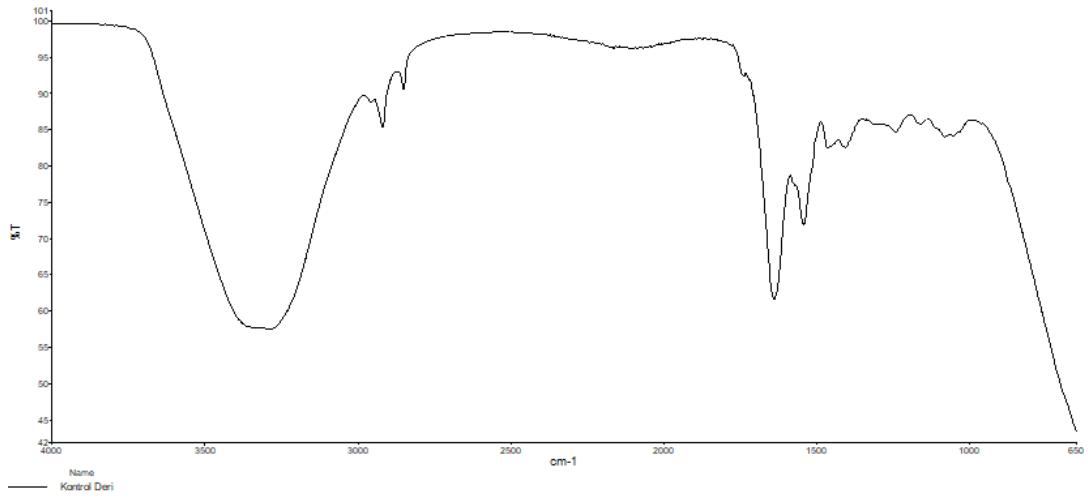
Şekil 4-118: Fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-4 jel kodlu formülasyon ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



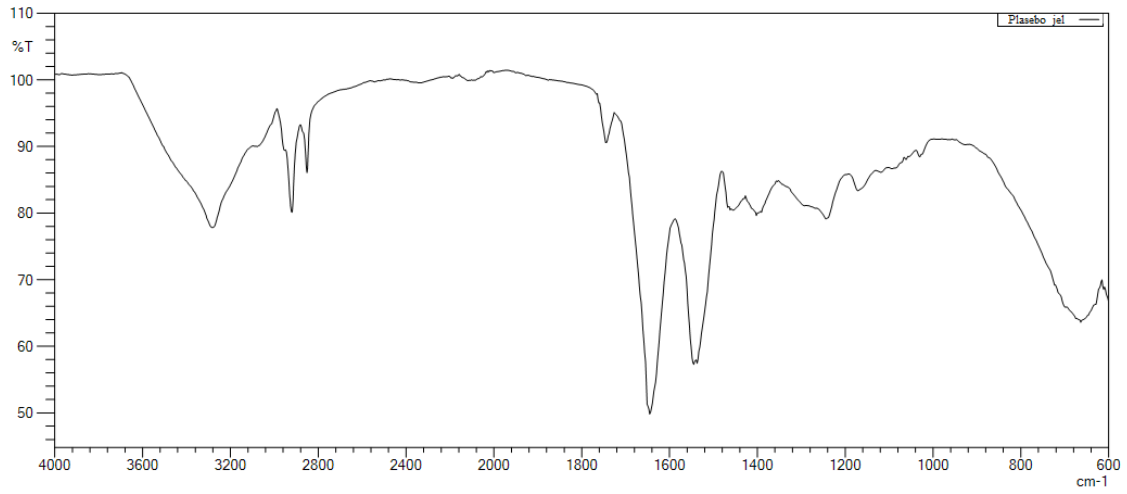
Şekil 4-119: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T20-1 jel kodlu formülasyon ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-120: Fluvastatin sodyum yüklü NLC-T80-1 jel kodlu formülasyon ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-121: Kontrol olarak kullanılan (uygulama yapılmamış) deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu



Şekil 4-122: Plasebo jel formülasyonu ile *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri yüzeyine ait ATR-FTIR spektrumu

5. TARTIŞMA

5.1. Giriş

Psoriasis dünya nüfusunun %2-5'ini etkileyen, genellikle dirsek, diz, kafa derisi ve tırnaklarda lokalize olan, eritemli, skuamöz, kronik enflamatuvar bir deri hastalığıdır (Schön ve Boehncke 2005; Pradhan ve ark. 2013; Sala ve ark. 2016). Psoriasisın en sık görülen fiziksel semptomlarından biri kaşıntıdır ve hastaların % 67-95'inde ortaya çıkmaktadır. Diğer semptomlar ise deride yanma, şişlik, eklem ağrısı, pullanma ve deri dökülmesi olarak özetlenebilir (Richards ve ark. 2006; Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017). Psoriasisın hastaların yaşam kalitesi üzerinde hem fiziksel hem de psikolojik olumsuz etkileri bulunmaktadır. Hastalarda metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve depresyon gelişme riski artmıştır. Ayrıca psoriasis hastalarının yaklaşık %30'unda artrit gelişir (Samarasekera ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Prosperi ve ark. 2017).

Psoriasis keratinositlerin çoğalması ve anormal farklılaşması, vasküler değişiklikler, deriye enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve sitokin üretimi ile karakterizedir (Sala ve ark. 2016). Hastalığın sebebi henüz tam olarak anlaşılamasa da, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Sun ve Zhang 2014; Palmer ve DeLouise 2016; Lowes ve ark. 2014).

Klinik özelliklerine bakıldığında Psoriasis; değişken morfoloji, dağılım, şiddet ve seyir gösteren papüloskuamöz bir hastalıktır (Langley ve ark. 2005). Lezyonlar genellikle birkaç farklı özelliğe sahiptir. İlk olarak, belirgin sınırlarla iyi bir şekilde sınırlandırılmıştır. İkincisi, lezyonların yüzeyi uyumsuz, gümüşü pullara sahiptir. Son olarak ciltte parlak bir eritem vardır (Myers ve ark. 2006; Weinstein ve Menter, 2003). Psoriasis'in çeşitli formları vardır. Bunlar; plak psoriasis, püstüler psoriasis, eritrodermik psoriasis, guttat psoriasis, ters psoriasis ve psoriasis vulgaris olarak sınıflandırılır (Jean ve Pouliot 2010; Boehncke ve Schön 2015; Rajguru ve ark. 2020). Psoriasis şiddetine göre ise hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılabilir (Vincent ve ark. 2014). Psoriasis için günümüzde tanımlanan tedavi seçenekleri hastalığın tipine ve şiddetine göre topikal tedavi, fototerapi ve sistemik tedavi olarak üç grupta incelenebilmektedir (Sala ve ark. 2016; Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017).

Hafif ve orta şiddette psoriasisli hastalarda topikal ajanlar tedavide ilk seçenek olarak yer alırken, topikal tedavinin etkisiz olduğu durumlarda fototerapi ve üçüncü seçenek olarak da sistemik tedavi önerilmektedir. Dirençli lezyonlarda bu üç tedavi seçeneğinin kombinasyonu da kullanılabilir (Menter ve ark. 2009). Fototerapi ve sistemik ajanlar doza bağlı olarak hepatotoksisite, renal toksisite, hipertansiyon, hiperlipidemi ve deri kanseri gibi yan etkilere sebep olmakta ve uzun süreli kullanımda azalmış güvenlik profili ile ilişkilendirilmektedir (Pradhan ve ark. 2013).

Psoriasis hastalarının yaklaşık %80'i hafif-orta şiddette hastalığa sahiptir (Menter ve ark. 2009). Ayrıca psoriasis'in fizyopatogenezi ağırlıklı olarak cilt dokusunda lokalizedir ve deri lezyonları vücut yüzey alanının %5'inden azında yerleşmiştir. Hedef bölgeye doğrudan yapılan uygulama daha hızlı ve daha etkili terapötik cevap elde edilmesini sağlayacaktır (Sala ve ark. 2016; Menter ve ark. 2009). Terapötik etki elde edebilmek için daha düşük miktarda ilaç uygulaması gerektirmesi ise toksisite riskini azaltacaktır (Zhang ve ark. 2013). Bu nedenle, psoriasis hastalarında, doğrudan derideki lezyonları hedefleyen, etkili ve güvenilir bir tedavi seçeneği olan topikal tedaviye her zaman ihtiyaç bulunmaktadır (Carrascosa ve ark. 2009).

Topikal uygulanan ilaçların derinin hedef bölgesinde birikimi açısından *stratum corneum* önemli bir bariyerdir (Agrawal ve ark. 2015). Normal koşullar altında ilaçlar *stratum corneum*u geçip canlı epidermise penetre olursa keratinositlere ve immünolojik olarak aktif hücrelere ulaşabilir. Epidermis kan damarları içermez ve difüzyon ile madde geçişi söz konusudur. Dermis ise kan ve lenf damarları içerir ve dermise geçen ilaç sistemik dolaşıma geçebilir (Palmer ve DeLouise 2016).

Birçok deri hastalığının topikal tedavisinde amaç, formülasyondaki maddeyi derinin epidermal veya derin dermal bölgelerine hedeflerken, sistemik dolaşıma geçişini en aza indirmektir (Patravale ve Date 2009 p. 268). Normal koşullar altında ilaçlar *stratum corneum*u geçip canlı epidermise penetre olursa keratinositlere ve immünolojik olarak aktif hücrelere ulaşabilir (Palmer ve DeLouise 2016).

Psoriasis derinin bariyer fonksiyonun azalması ile karakterize inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Segre 2006). Psoriasis tedavisinde kullanılacak topikal taşıyıcı sistemler psoriatik derinin lipid düzeni bozulmuş, iritanlara duyarlı, aşırı dehidrate ve kalınlaşmış yapısı göz önünde bulundurularak uygun şekilde tasarlanmalı ve

geliştirilmelidir (Katare ve ark. 2010; Herman ve Herman 2016). Jel, krem, merhem, losyon gibi konvansiyonel formülasyonlar antipsoriatik ajanların topikal taşınmasında sıklıkla kullanılır (Katare ve ark. 2010). Ancak bu konvansiyonel topikal formülasyonlar yoluyla ilacın derinin hedef bölgesine taşınması perkütan penetrasyonlarının zayıf olması nedeniyle zordur (Güngör ve Rezigue 2017).

Psoriasis tedavisinde non-irritan komponentler ile formüle edilmiş ve psoriasisi etkili bir şekilde tedavi edebilecek yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır (Fang ve ark. 2008). Nanotaşıyıcı sistemler bu tip deri hastalıklarının tedavisinde ilacın dermal penetrasyonunu ve mevcut tedavilerin etkinliğini arttırmak için ideal adaylardır (Palmer ve DeLouise 2016). Lipozom, niozom, etozom, transferzom, transetozom gibi veziküler sistemler; mikroemülsiyon, nanoemülsiyon, nanosüspansiyon, nanoyapılı lipit taşıyıcılar, katı lipit nanopartiküller gibi kolloidal sistemler ile nanolifler ve nanosüngerler deriye uygulanmak üzere geliştirilen nanotaşıyıcı sistemlerdir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017).

Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler 1-500 nm boyut aralığında, partiküler veya veziküler yapılardır. Konvansiyonel sistemler ile karşılaştırıldıklarında, etkin maddenin stabilitesinin iyileştirilmesi, biyoyararlanımın artması, hedef bölgede ilaç birikiminin sağlanması ve hasta uyuncunun iyileşmesi gibi üstünlüklere sahiptirler. Topikal tedavide konvansiyonel dozaj şekilleri ile karşılaşılan problemlerin (özellikle lipofilik etkin maddelerin deriden penetrasyon sorunu) üstesinden gelmek ve antipsoriatik ilaçların etkin ve güvenli bir şekilde derideki hedef bölgelere taşınmasını sağlamak için nano-kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yapılan araştırmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır (Güngör ve Rezigue, 2017; Pradhan ve ark. 2013).

Psöriazisin kontrolü ve önlenmesi için yapılan çalışmalarda lipozom, transferzom, niozom, etozom ve transetozom gibi kolloidal taşıyıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır (Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017; Ascenso ve ark. 2015). Ayrıca SLN ve NLC'lerin perkütanöz uygulanmasının derinin epidermis ve dermis tabakasının hedeflendiği psoriasis yanı sıra birçok deri hastalığının tedavisinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Montoto ve ark. 2020).

Lipozomlar, farklı yapıdaki lipitler ile hazırlanan, bir veya iç içe geçmiş lipit çift tabakalardan oluşan, iç kompartmanlarında sulu faz bulunan küresel veziküllerdir.

Lipozomların ana bileşenleri genellikle fosfolipitlerdir. Veziküllerin sertliğinin arttırmak, veziküler membranı stabilize etmek ve çift tabakalı yapısını modifiye etmek için kolesterol de sisteme dahil edilir (El Maghrabay ve ark. 2006; El Maghraby ve ark. 2008; Akhtar 2014). Lipozomların en biyouyumlu, biyobozunur, non toksik, non immunoljenik, ilacı enkapsüle ederek stabilitesini arttırmak gibi avantajları bulunmaktadır (Garg, Singh, Bimbrawht ve ark. 2017).

Konvansiyonel lipozomların en önemli dezavantajı ise deri yüzeyine uygulandığında *stratum corneum*'un üst tabakalarında sınırlı kalması ve daha derin tabakalara penetre olamamasıdır (Akhtar 2014; Palmer ve Delouise 2016). Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için veziküler sistemlerin bileşiminde modifikasyonlar yapılmış ve deforme olabilen veya elastik veziküller olarak bilinen transferzom, etozom, transetozom gibi yeni lipit veziküller geliştirilmiştir (Akhtar 2014; Ascenso ve ark. 2015; Menezes ve ark. 2016). Bu elastik veziküllerin hazırlanmasında fosfolipitler, etanol, safra tuzları ve birçok sürfaktan kullanılmaktadır (Ascenso ve ark. 2015).

Transferzomlar fosfolipitler ve köşe aktivatörlerinden oluşan ultradeforme olabilen veziküler sistemlerdir. Kenar aktivatörü olarak kullanılan bileşenler veziküllerin lipit çift tabakasını destabilize edebilen tek zincirli sürfaktanlardır (Cosco ve ark. 2008). Bu veziküllerin bileşimi fizikokimyasal özelliklerini ve dermal penetrasyon davranışını etkiler (Hussain ve ark. 2017). Kenar aktivatörü olarak Tween 80, Tween 60, Tween 20, Span 80, span 65 span 60, sodium deoksikolat, sodyum kolat, dipotasyum glisirizinat gibi sürfaktanlar kullanılır (Iqbal ve ark. 2018; Sala ve ark. 2018). Bu sistemlerin psoriasis gibi deri hastalıklarında konvansiyonel formülasyonlara oranla daha çok tavsiye edildiği bildirilmiştir (Pradhan ve ark. 2013).

Etozom ve transferzomlar, *in vitro* ve *in vivo* topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak haklı bir ilgi görmektedirler. Konvansiyonel lipozomlarla kıyaslandıklarında en önemli üstünlükleri *stratum corneum* u bütünlüklerini koruyarak geçebilmeleri ve bu şekilde gerek hidrofilik gerekse hidrofobik etkin maddelerin lokal ve sistemik taşınmalarını etkili kılmaları ve topikal tedavide hedef doku olan derideki ilaç lokalizasyonunu iyileştirmeleridir (Celia ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Verma ve Pathak 2010). Etozomlar, fosfolipitler, su ve etanolden oluşurken, transferzomlar genel anlamda fosfolipit matriks içinde kenar (edge) aktivatörleri taşıyan elastik yapılardır.

Deri yüzeyine uygulandıklarında bu elastik veziküller *stratum corneum* un hücrelerarası lipit tabakaları arasından transepidermal su-aktivite değişimi sayesinde bozulmadan geçebilmektedir (Cevc ve Blume 2001; El Zaafarany ve ark. 2010; Verma ve Pathak 2010).

Transetozomlar, transferzom ve etozom sistemlerin özelliklerini bir arada içeren lipit yapıları veziküllerdir. Bu yeni ultra-deforme olabilen veziküller, ilk defa Song ve ark tarafından 2012'de tanımlanmıştır. Transetozomlar bir kenar aktivatörü ile birlikte yüksek oranda etanol ile karakterize edilir (Song ve ark. 2012). Transetozomlar hem transferzomlarının hem de etozomların avantajlarını sağlamaktadır (Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Mevcut koloidal taşıyıcı sistemlerde görülen sınırlı fiziksel stabilite, agregasyon, saklama sırasında ilacın formülasyondan sızması, üretimden kaynaklı solvent kalıntısı ve polimer sitotoksitesi gibi dezavantajları önlemek ya da azaltmak için araştırmacılar suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların taşınmasında biyoyumlu lipitlere odaklanmıştır (Das ve Chaudhury 2011). Lipit nanopartiküler sistemler lipozom, ultraderme olabilen lipozom ve etozomlar gibi veziküler sistemlere ve polimerik nanopartiküllere alternatif olarak son yıllarda popülerlik kazanmıştır (Das ve Chaudhury 2011; Jain ve ark. 2017).

Katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) sürfaktan tabakası ile stabilize edilmiş trigliserit veya yağ asitleri içeren katı lipit çekirdekten oluşan lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerdir (Müller ve ark. 2002a). SLN'ler birinci nesil nanopartiküller olarak ilişkilendirilirken NLC'ler SLN'lerdeki eksikliklerin üstesinden gelebilmek için geliştirilmiş ikinci nesil lipit nanopartiküllerdir (Jain ve ark. 2017). SLN'ler ile karşılaştırıldığında NLC'ler, bir dizi aktif bileşen için daha yüksek etkin madde yükleme kapasitesi, daha düşük su içeriğine sahip dipersiyonlarının hazırlanabilmesi, saklama sırasında meydana gelebilecek polimerik geçişler sebebiyle etkin maddenin formülasyondan sızmasının önlenmesi veya en az indirilmesi gibi üstünlüklere sahiptir (Müller ve ark. 2002a; Pardeike ve ark. 2009; Weber ve ark. 2014).

Lipit bazlı koloidal taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında kullanılan lipitler biyoyumlu olmalarının yanı sıra epidermisi ve özellikle *stratum corneum*u oluşturan lipitlerle yapısal benzerlik göstermektedir (Sala ve ark. 2018). Bu sistemler deri yüzeyine tutunur ve böylece *stratum corneum*un en dıştaki tabakaları arasında lipit değişimine izin verirler (Bikkad ve ark. 2014). Bu sistemler deri ile etkileşime girerek

derinin bariyer özelliklerini değiştirirler (Arora ve ark. 2017). Ayrıca nanoyapılı lipit taşıyıcılar oklüzif özellikleri nedeniyle derinin hidrasyonunu arttırırlar (Montenegro ve ark. 2016). Bu özellik psoriasisin aşırı dehidrate yapısı dikkate alındığında (Katare ve ark. 2010) deriden su kaybının azalması ve hidrasyonun artması açısından önemlidir (Montenegro ve ark. 2016).

Nanoemülsiyonlar, karışmayan iki fazın, birinin diğeri içerisinde dağıtılması ile hazırlanan ve iç fazı oluşturan damalacıkların nanometre büyüklüğünde olduğu heterojen sistemlerdir. Nanoemülsiyonlar, miniemülsiyon ya da mikron altı emülsiyonlar olarak da isimlendirilir (Fast ve ark. 2009; Tırnaksız 2014). Nanoemülsiyonlar derinin daha derin tabakalarına penetre olabilme yeteneğine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Pawar ve Babu 2014). Aktif bileşenin derinin istenen tabakalarına dağılması ve kontrollü ilaç taşınması gibi avantajları sebebiyle son yıllarda özellikle kozmetik alanda nanoemülsiyon sistemlere artan bir talep söz konusudur (Marzuki ve ark. 2019).

Psoriasis TNF- α /IL-23/IL-17A–aracılı inflamaüvar bir deri hastalığıdır. Psoriasis hastalarında dolaşımda nötrofil seviyeleri yükselir, özelleşmiş makrofajlar ve dentritik hücreler cilt lezyonlarında erken ortaya çıkar. Bunu, belirgin Th1 ve Th17 aracılı patolojiye sahip bir döngüyü sürdüren aktive edilmiş doğal öldürücü hücreler ve T hücreleri takip eder. Tümör nekroz faktörü- (TNF)- α ve interferon- γ (IFN- γ), interlökin- (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler ve CXCL9, CXCL10, CXCL11 gibi kemokinler, ve siklooksijenaz-2 (COX-2) psoriatik lezyonların başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol oynar. Th17 hücreleri ve imza sitokini IL-17 ile IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 gibi sitokinler ve inflamatuvar biyobelirteçler psoriasis patolojisinde yer almaktadır (Furie ve ark. 2019; Mavropoulos ve ark. 2013).

IL-17A dermal ve mukozal immüniteyi düzenler ve psoriasisli hastalarda artarak plak histopatolojisinde rol oynar. Keratinosit stresi, dendritik hücre (DC) aktivasyonu ve katelisidin gibi antimikrobiyal peptitlere karşı otoreaktif deriye yerleşen T hücrelerinin koordineli olarak plak oluşumunu başlattığı varsayılmaktadır. Mevcut modellerde yerleşik deri hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler IFN- α IFN- γ , ve TNF- α üretilir, ve bunlar miyeloid dendritik hücreleri aktive ederek IL-12 ve IL-23 üretilmesini sağlar. IL-12 proinflamatuvar Th1 yolaklarını tetikler. IL-23 ise Th17 hücreleri ve diğ er lökositleri aktive ederek IL-17A ve IL-17F ve IL-26 yı da

içeren diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar. IL-17A, farklı hücre tiplerinde farklı etkileri olan IL-17 reseptörleri aracılığıyla etki gösterir (Krauger ve ark. 2019).

IL-17A, T hücrelerinde kendi sentezini otomatik olarak aktive eder, dermiste proinflatuar IL-6 ve IL-8/CXCL8'i indükler ve mitojenik faktörlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve antimikrobiyal proteinlerin sentezini teşvik ederek keratinosit hiperplazisine yol açar (Krauger ve ark. 2019).

Dermal dentritik hücreler büyük miktarlarda TNF- α ve IL-23 üretir ve IL-17A üreten yardımcı T (Th17) hücrelerinin farklılaşmasını indükler. IL-17A keratinosit proliferasyonunu indüklerken farklılaşmasını inhibe eder. IL-17A keratinositlerin nötrofil çeken sitokin/kemokinler olan IL-36, CXCL1, CXCL2 ve CXCL8 (IL-8) üretimini artırır. IL-17A keratinosit proliferasyonunu artırır ve CCL20 üretimi için keratinositleri uyarır. Th17 hücreleri de ayrıca CCL20 üretebilir. Ayrıca Th17 hücreleri yüksek miktarda TNF-a üretir. Böylece TNF- α /IL-23/IL-17A eksenini bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve sonunda tam teşekküllü psoriasis gelişmesine neden olur. CCL20/CCR6 kemotaktik sistemi TNF- α /IL-23/IL-17A ekseninin sürdürülmesinde ve psoriasis patogeneğinde kritik rol oynar (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). CCL20/CCR6 eksenini psoriasis tedavisi için umut verici bir hedef olabilir (Getschman ve ark. 2017; Furue ve ark. 2019). IL-17 sinyal yolağı inhibitörleri ile orta-şiddetli psoriasis olan hasta grubunda gerçekleştirilen erken klinik deneylerde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Kirkham ve ark. 2014).

Son çalışmalar, CCR6'nın psoriasis patogeneğindeki rolüne dikkat çekmektedir. CCR6 ilk olarak T hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler üzerinde keşfedilmiştir. CCR6'nın Th17 sinyal yolunda ve psoriasis gelişiminde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Hedrick ve ark. 2010). CCL20, normal insan derisinde epidermal keratinositler ve endotelial hücreler tarafından yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, keratinositlerde ve endotel hücrelerinde CCL20 üretimi, TNF- α , IL1, IL17 ve INF- γ gibi proinflatuar sitokinler tarafından kuvvetle artırılır. Psoriatik cilt lezyonlarında, CCL20 epidermin suprabazal tabakasında yüksek oranda eksprese edilir. CCL20, CCR6'yı tetikleyen tek kemokindir ve bilinen diğer kemokin reseptörleri aracılığıyla biyolojik bir cevap ortaya çıkaramaz (Mabuchi ve ark. 2012).

Psoriasis, akut koroner sendrom, arteriyel hipertansiyon ve miyokard enfarktüsü dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalık riskinin artması ile ilişkili metabolik bir sendrom olarak kabul edilir (Chen ve ark. 2021). Oksidatif strese ek olarak, ateroskleroz, hiperlipidemi veya insülin direnci gibi metabolik risk faktörleri psoriasisli hastalarda yaygındır (Pietrzak ve ark. 2018). Psoriasisli hastaların sıklıkla kolesterol ve trigliserit değerlerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle anormal lipit metabolizması hastalığı olan hiperkolesterolemi tedavisinde sıklıkla kullanılan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (CoA) redüktaz inhibitörü statin grubu ilaçların psoriasis tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmüştür (Chen ve ark. 2021).

Statinler anti-inflamatuvar ve immünmodülatör etkileri nedeniyle 1990'larda psoriasis için potansiyel bir deneysel tedavi seçeneği olarak öne sürülmüştür. Kolesterol düşürücü tedavinin psoriasis üzerine yararlı etkileri çeşitli mekanizmalar ile açıklanmıştır. Bunlar sırasıyla lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1'in down-regülasyonu, lökositlerin endotel adezyonunun, ekstrasvazasyonun ve doğal öldürücü hücre aktivitesinin inhibisyonu, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, C-reaktif proteinin düşürülmesi, promotion of a Th1 to Th2 cells, T hücreleri üzerindeki Th1 sitokin reseptörlerinin inhibisyonu şeklindedir. Yukarıda bahsedilen patomekanizmalar lenfosit aktivasyonunun sınırlandırılmasına ve sonuç olarak inflamasyon bölgelerine infiltrasyonun bozulmasına sebep olur (Mosiewicz ve ark. 2013).

Fluvastatin, kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktazın güçlü bir inhibitörüdür (Yamamoto ve ark. 1998). Piyasada sodyum tuzu halinde bulunur ve iyonizasyon sabiti (pKa) 5.5'tir. (Asberg ve Holdaas 2004). Fluvastatin'in bilinen kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra "pleiotropik etki" olarak adlandırılan lipit dışı mekanizmalar ile etkili olduğuna dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Corsini 2000).

Kim ve arkadaşları tarafından statinlerin psoriasisde önemli rol oynayan CCL20/CCR6 etkileşimi üzerindeki inhibitör etkilerini araştırılmıştır. Statin grubunda yer alan fluvastatin ve simvastatinin CCR6 kemotaktik etkileşime müdahale ederek psoriasisin hafifletilmesine faydalı olabileceği gösterilmiştir (Kim ve ark. 2011).

Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada psoriasisli hastaların deri lezyonlarında galektin-7 ekspresyonunun azaldığı ve keratinositlerde galektin-7

ekspresyonunun, psoriasis gelişiminden sorumlu sitokinler tarafından baskılandığı bildirilmiştir. Galektin-7 indükleyicisi olduğu tanımlanan fluvastatin'in bu etkisi, IL-17A tarafından indüklenen keratinositlerde IL-6 ve IL-8 üretimini azalttığı gösterilerek kanıtlanmıştır. Bu çalışmada hem epidermal hiperplazi hem de keratinosit aracılı inflamatuvar yanıtlarda psoriasis patogeneğinde galektin-7'nin rolünü doğrulanmış ve psoriasis tedavisinde statin (fluvastatin) kullanımının yararlı olabileceği yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Chen ve ark. 2021).

Bu doktora tez çalışması kapsamında, psoriasis tedavisinde kullanılması amacıyla fluvastatin sodyum yüklü yenilikçi topikal transetozom ve NLC tipi ilaç taşıyıcı sistemlerin sistemlerin geliştirilmesi ve *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

Bu kapsamda, ilk olarak fluvastatin sodyum'un miktar tayini analizleri için kullanılacak HPLC yönteminin validasyon çalışmaları yürütüldü. Fluvastatin sodyum'un transetozom ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ve optimizasyonları gerçekleştirildi. Partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, pH'sı, iletkenliği, stabilitesi ve ATR-FTIR ve DSC ile yapı analizleri, TEM ve SEM analizleri ile morfolojik özellikleri değerlendirilerek fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Seçilen formülasyonlarla gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki birikimi bant ile soyma yöntemi ile incelendi. Taşıyıcı sistemlerin deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spektroskopisi ile değerlendirildi. Konfokal lazer mikroskopi (CLSM) çalışmaları ile etkin maddenin derinin farklı tabakalarındaki birikimi, lokalizasyonu ve penetrasyonun gerçekleştiği yollar incelendi. Dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan fluvastatin sodyum yüklü taşıyıcı sistemlerin *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksiteleri ve antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi. Son olarak ise seçilen transetozom ve nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemlerin topikal uygulamaya yönelik jel formülasyonları hazırlanarak karakterizasyonları gerçekleştirildi. Aynı şekilde dermal penetrasyon çalışmaları ile fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki birikimi ve ATR-FTIR analizleri ile taşıyıcı sistemlerin deri lipitleri üzerine etkileri incelendi. Sonuç olarak psoriasis tedavisinde kullanılabilecek, deri ile uyumlu, stabil ve etkin maddenin derideki hedef bölgede

lokalizasyonunu sağlayarak etkinliğini arttıran yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirildi.

5.2. Fluvastatin Sodyum Karakterizasyonu ve Miktar Tayini Yöntemi Validasyonunun Değerlendirilmesi

Doktora tez çalışmamızda ilk olarak fluvastatin sodyum'un IR spektrumu alındı. Şekil 4-1'de verilen fluvastatin sodyuma ait IR spektrumundan elde edilen karakteristik piklerin literatür ile uyumlu olduğu görüldü (Borgmann ve ark. 2013). Ayrıca fluvastatin sodyumun diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizleri gerçekleştirildi. DSC analizi sonucu elde edilen Şekil 4-2'de verilen termogramda elde edilen endodermik piklerin literatür ile uyumlu olduğu belirlendi (Borgmann ve ark. 2013; Desu ve ark. 2020).

Nanotaşıyıcıların enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarında hazırlanan numunelerdeki fluvastatin sodyum miktar tayini analizleri için HPLC yöntemi kullanıldı. Uygulanan HPLC yöntemi ingiliz farmakopesinde fluvastatin sodyum için geliştirilen yöntemden modifiye edildi ve validasyon çalışmaları gerçekleştirildi (BP 2017). Fluvastatin sodyuma ait HPLC kromatogramı Şekil 4-3'te gösterildi. Analitik yöntem validasyonu, seçilen analitik yöntemin belirlenen amaçlar doğrultusunda belirli koşullardaki uygunluğunun kanıtlanması amacıyla yapılan çalışmaların tamamıdır. Analitik yöntemin validasyonunun değerlendirilmesi için gerekli parametreler; doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk (accuracy), seçilicilik (sepcificity), stabilite (stability) analizleri gerçekleştirildi, teşhis limiti (LOD) ve miktar tayin limiti (LOQ) hesaplandı (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2017). Doğrusallık çalışmasından elde edilen fluvastatin sodyuma ait Şekil 4-3'de gösterilen standart eğriye ait determinasyon katsayısının ($R^2 = 0,9999$) yüksek olması nedeniyle doğru denkleminin miktar tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Gün içi (Tablo 4-3) ve günler arası (Tablo 4-4) kesinlik çalışmaları sonucu hesaplanan %RSD değerleri %2'den düşük olduğu bulundu. Doğruluk çalışması etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Geri kazanma değerleri Plasebo 1 için (%99.46, %100.84 ve %99.39), Plasebo 2 için (%98.12, %99.68, ve %98.88), Plasebo 3 için (%98.96, %99.18 ve 97.63) ve Plasebo 4 için (%101.89, %98.12 ve %97.21) hesaplandı. Doğruluk çalışması sonucu %RSD değerlerinin %2'den küçük olduğu bulundu. Seçicilik çalışması sonucunda formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler,

dermal penetrayon çalışmasında kullanılan deri, bant ile soyma işleminde kullanılan bant, tampon sistemler, reseptör faz ve mobil faz bileşenleri ile fluvastatin sodyum'un pik alıkonma zamanında girişim olmadığı gösterildi. Yöntemin fluvastatin sodyum için teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) değerleri hesaplandı. TL değeri 0,018 µg/mL ve MTL değeri 0,056 µg/mL olarak belirlendi. Son olarak fluvastatin sodyumun mobil faz ile hazırlanan çözeltilerinin 72 saat süre ile stabilitesini koruduğu saptandı (Tablo 4-9). Bu bulgulara dayanarak ICH kılavuzuna göre fluvastatin sodyum için kullanılan analitik yöntemin valide edildi ve yapılan çalışmalarda fluvastatin sodyum miktar tayini amacıyla kullanılabileceğine karar verildi.

5.3. Transetozom Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Fluvastatin sodyumun transetozom ve kontrol formülasyonları olarak transferzom tipi veziküler taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Fluvastatin sodyum yüklü optimum transetozom formülasyonlarının hazırlanabilmesi için ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ön formülasyon çalışmalarında öncelikli olarak formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesi hedeflendi. Optimum formülasyonların belirlenmesinde formülasyon bileşenleri dışında hazırlama parametrelerinin de etkili olduğu göz önünde bulundurularak ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. Çalışmalara etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlanması ile başlandı. Uygun olduğu düşünülen formülasyonlara etkin madde yüklenerek görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisi değerlendirildi.

Transetozomlar fosfolipitler ve köşe aktivatörleri ve etanol içeren ultradeforme olabilen veziküler sistemlerdir (Ascenso ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016). Transetozomların hazırlanmasında, literatürde kayıtlı olan "ince film hidrasyon" yöntemi kullanıldı (Song ve ark. 2012; Garg, Singh, Singh ve ark. 2017). Bu amaçla öncelikle fosfolipit, sürfaktan ve etkin madde, klorofom: metanol (2:1, h/h) karışımında yuvarlak tabanlı bir balonda çözündürüldü. Organik çözücü karışımı, rotaevaporatörde (Büchi R-210) lipid geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta (45 °C), 120 rpm dönüş hızı ve 100 milibar (yaklaşık 0,1 atm) basınç altında uzaklaştırıldı. Geriye kalan ince lipid film tabakasından organik çözücü artıklarının tamamen uzaklaştırılabilmesi için balon bir gece çeker ocakta vakum altında bırakıldı. Daha sonra bu kuru lipid film tabakası, farklı konsantrasyonlarda etanol içeren sulu dispersiyon ortamları ile 2 saat boyunca

hidrate edildi. Hazırlanan transetozom süspansiyonu, oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek veziküllerin şişmeleri sağlandı. Ardından, transetozom süspansiyonunun partikül büyüklüğünü küçültmek ve düşük polidispersite indeksine sahip homojen bir sistem elde edebilmek için prob sonikatör kullanılarak buz banyosunda 2 buçuk dakikalık setler halinde sonikasyon işlemi uygulandı. Her bir formülasyona uygulanması gereken sonikasyonun süresi optimizasyon çalışmaları ile belirlendi. Transetozom formülasyonlarının etkinliğini karşılaştırmak için kontrol amaçlı olarak transferzom tipi taşıyıcı sistemler de geliştirildi. Bu sistemler de aynı yöntemle hazırlandı. Transferzomlar etanol içermeyen dispersiyon ortamı kullanılarak hidrate edildi.

Fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve transferzom tipi veziküler nanotaşıyıcıların hazırlanmasına ait; organik çözücü karışımının rotaevaporatör kullanılarak uzaklaştırılması (a), oluşan ince lipit film tabakası (b) ve bu lipit film tabakasının dispersiyon ortamı ile hidratasyonu sonrası (c) görüntüleri sırasıyla Şekil 4-5'te gösterildi. Hazırlanan veziküler dispersiyonların sırasıyla sonikasyon öncesi ve sonrası görüntüleri ise Şekil 4-6'te gösterildi.

Transetozom formülasyonları geliştirilirken Tablo 3-1'de verilen fosfolipit, sürfaktanlar ve etanol ve bu bileşenlerin farklı oranlardaki karışımları kullanılarak çalışmaya başlandı. Fosfolipit olarak Phospholipon 90 G kullanıldı ve konsantrasyonu %4 (a/h) olarak sabit tutuldu. Transetozomların oluşturulmasında ilk aşamada sürfaktan olarak Tween 20, Tween 80, Gelucire 44/14, Gelucire 48/16, Kolliphor EL, Kolliphor RH 40, Kolliphor HS15, sodyum kolat hidrat, span 20, span 80 ve span 85 kullanıldı. Tablo 3-2'de bileşen ve oranları verilen etkin madde içermeyen transetozom formülasyonları hazırlanarak lipit film oluşumu, nanoboyutta veziküler sistem oluşumu açısından değerlendirildi. Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonlarına ait bulgular ile değerlendirilmeler Tablo 4-10'da verildi. Span 20, Span 80 ve Span 85 ile transetozomlar oluşturulamadı. Bu sürfaktanlar kullanıldığında sonikasyon sonrasında bile süt görünümlü olan süspansiyonlar elde edildi. Diğer sürfaktanlar kullanılarak hazırlanan formülasyonlar değerlendirildi. Gelucire 44/14, Gelucire 48/16, Kolliphor RH 40 ve Kolliphor HS15 ile hazırlanan formülasyonların PDI değerlerinin yüksek olduğu görüldü ve bu sürfaktanların da kullanılmasından vazgeçildi. PDI değeri 0.2'den küçük olan formülasyonlar seçildi. Tween 80, Tween 20, Kolliphor EL ve sodyum kolat

hidrat kullanılarak hazırlanan formülasyonların istediğimiz özelliklere sahip olduğuna karar verildi. Uygun olan formülasyonlar etkin madde yüklenerek tekrar hazırlandı ve bu formülasyonların bileşen ve oranları Tablo 3-3’de verildi. Ortalama partikül boyutu ve dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ölçümleri gerçekleştirildi. Fluvastatin sodyum yüklenen formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-11’da verildi. Hazırlanan transetozom süspansiyonlarına sonuçlar değerlendirildiğinde istenen partikül boyutu ve PDI değerleri elde edilemediği ve fluvastatin sodyum’un formülasyonlara yüklenemediği görüldü. Bunun üzerine fluvastatin sodyumun hazırladığımız taşıyıcı sistemlere yüklenebilmesi için etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri de göz önüne alınarak çalışmalara devam edildi.

Asidik veya bazik ilaçların tuz formları pH bağımlı çözünürlük özelliğine sahiptir. Henderson–Hasselbalch eşitliğine dayanarak zayıf asidik ilaçlar pKa değerinden daha düşük pH değerlerinde çalışıldığında noniyonik forma geçerken, zayıf bazik ilaçlar pKa değerinden daha yüksek pH değerlerinde çalışıldığında noniyonik forma geçer (Po ve Senozan 2001; Kalepu ve Nekkanti 2015). Fluvastatin sodyumun sudaki çözünürlüğü yüksek olduğundan veziküler sistemlere etkin bir biçimde yüklenebilmesi için maddenin non-iyonik olduğu bir pH değerinde çalışıldı. Böylece etkin maddenin taşıyıcı sistemlerin hazırlanması sırasında formülasyonun iç fazına yüklendiği, yüklenmeyen kısmın ise dış fazda çözünmek yerine çökerek ayrıldığı bir dispersiyon ortamı kullanılarak formülasyonların hazırlanması hedeflendi.

Bu amaçla ilk olarak hidratasyon ortamı olarak kullanılacak etanol-su (30:70) karışımının pH’sı fosforik asit çözeltisi ile 3’e ayarlandı. Sürfaktan türünün de etkili olabileceği düşünülerek biri non-iyonik sürfaktan ve diğeri anyonik sürfaktan içeren iki formülasyon ile çalışma gerçekleştirildi. Hazırlanan transetozom formülasyonlarının bileşenleri Tablo 3-4’te verildi. Hazırlanan transetozomların partikül boyutu, PDI değerleri incelendi. Aynı zamanda nihai ürünün pH’sı ölçülerek etkin maddenin noniyonik olduğu pH aralığında olup olmadığı saptandı. Etkin madde yüklü formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-12’te gösterildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde PDI değerlerinin yüksek olduğu ($0,678 \pm 0,012$ ve $0,247 \pm 0,003$), pH değerlerinin ise arttığı ($6,98 \pm 0,01$ ve $7,85 \pm 0,01$) saptandı. Dispersiyon ortamı pH’sını ayarlamanın tek başına yeterli olmadığı görüldü. Nihai ürün pH’sının istediğimiz pH aralığında kalmasını sağlamak için hidratasyon ortamı olarak tampon

sistem kullanılmasına karar verildi. Tampon sistem olarak pH 3 sitrat tamponu ve pH 3 fosfat tamponu kullanılabileceği düşünüldü ve uygun tampon sistemin seçilebilmesi için öncelikle etkin maddenin tampon sistemler içerisindeki çözünürlüğü değerlendirildi. Fluvastatin sodyum'un çalışılan tampon sistemlerdeki çözünürlüğüne ait bulgular Tablo 4-13'te gösterildi. Sonuçlar incelendiğinde fluvastatin sodyumun pH 3 sitrat tamponu içindeki çözünürlüğünün ($12,68 \pm 0,057 \mu\text{g/mL}$) pH içindeki çözünürlüğünden ($549,07 \pm 2,227 \mu\text{g/mL}$) daha düşük olduğu belirlendi. Kullanılacak tampon sistemin belirlenmesinde final ürünün pH'sının da ilacın pH bağımlı çözünürlüğü ve dolayısıyla taşıyıcı sisteme yüklenmesinde önemli olduğu düşünülerek ikinci bir çalışma olan tamponlama kapasitesi analizi gerçekleştirildi. Bu çalışmada hidrasyon ortamı olarak pH 3 sitrat ve pH 3 fosfat tamponlarının (70:30) etanol karışımları kullanıldı. Tablo 3-5'da bileşen ve oranları verilen hidrasyon ortamları ve bu ortamlar ile hazırlanmış formülasyonların pH değerleri karşılaştırıldı. Sonuç olarak formülasyon pH değerindeki değişimin ilk ölçülen pH değerlerine göre mümkün olduğunca az olması hedeflendi. Çalışmaya ait bulgular tablo 4-14'te verildi. pH 3 ST+etanol çözeltisi pH'sı $3,51 \pm 0,02$ ve bu çözelti ile hazırlanan formülasyonun pH'sı $3,47 \pm 0,02$ olarak, pH 3 PBS + etanol çözeltisi pH'sı $3,72 \pm 0,03$ ve bu çözelti ile hazırlanan formülasyonun pH'sı $4,24 \pm 0,04$ olarak tespit edildi. Sonuçlar incelendiğinde pH 3 sitrat tamponu+etanol karışımı ile hazırlanan formülasyon pH'sının neredeyse değişmediği, pH 3 PBS+ etanol karışımı ile hazırlanan formülasyonun pH'sında ise artış olduğu belirlendi. Hem çözünürlük çalışması hem de tamponlama kapasitesi sonuçları değerlendirildiğinde etkin maddeinin çözünürlüğün daha düşük, pH değerindeki değişimin ise ilk ölçülen pH değerlerine göre mümkün olduğunca az olduğu pH 3 sitrat tamponu ile çalışılmasına karar verildi.

Noniyonik bir sürfaktan olan Tween 20 içeren transetozomlar ile elde edilen başarılı sonuçlara dayanarak diğer sürfaktanlar ve farklı oranlarını içeren formülasyonlar hazırlandı. Hidrasyon ortamı olarak pH 3 sitrat tamponu ve etanol karışımı kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transetozomların kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-6'te gösterildi. Bu formülasyonlar non-iyonik sürfaktanlar; Tween 20, Tween 80, Kolliphor EL ve iyonik sürfaktan sodyum kolat hidrat kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. Bu çalışmaya ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-15'te gösterildi. Kolliphor EL ile hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.216 ± 0.015 (bimodal; iki pik) ve 0.199 ± 0.009 (bimodal; iki pik) ve

sodyum kolat hidrat ile hazırlanan transetozomun PDI değeri 0.769 ± 0.139 (trimodal; 3 pik) olarak bulundu. Yüksek PDI değeri elde edilmesi sebebiyle bu formülasyonlardan vazgeçildi. Tween 20 ile hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.076 ± 0.026 (unimodal; tek pik) ve 0.131 ± 0.006 (unimodal; tek pik) ve Tween 80 ile hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.083 ± 0.006 (unimodal; tek pik) ve 0.188 ± 0.025 (unimodal; tek pik) olarak bulundu. Tween 20 ve Tween 80 ile hazırlanan transetozomlar ile uygun PDI değerleri elde edilmesi üzerine bu sürfaktanlar seçilerek çalışmalara devam edildi.

Ultrason aracılı boyut küçültme uygulaması ile homojen boyut dağılımı ve yüksek stabiliteye sahip formülasyonlar üretilebilmektedir (Iurian ve ark. 2015). İnce film hidrasyon yöntemi ile üretilen formülasyonlara istenen partikül boyutu ve boyut dağılımının elde edilebilmesi için (Khadke ve ark. 2018) transetozom formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ikinci basamak olarak sonikasyon süresinin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Ön formülasyon çalışmaları sırasında etanol miktarının formülasyon oluşumunda önemli bir parametre olduğu görüldü. Bu nedenle formülasyonlara uygulanacak sonikasyonun süresi etanol içeriklerine dayalı olarak ve aynı şekilde partikül boyutu ve boyut dağılımı verileri dikkate alınarak optimize edildi. Bu amaçla farklı etanol oranlarına sahip bileşen ve oranları Tablo 3-7’de verilen transetozom formülasyonları kullanıldı. Sonikasyon gücü %35 amplitude olarak sabitlendi. Sonikasyon süresi kademeli olarak arttırıldı. Sonikasyon süresi olarak 5-40 dk çalışıldı. Sonikasyon 2,5’er dakikalık setler şeklinde uygulandı. Setler arası 30’ar saniyelik dinlenme süresi verildi. Hazırlanan formülasyonlara ait partikül boyutu ve boyut dağılımı bulguları Tablo 4-16’da gösterildi. Etanol içeriği % 30 olan TEZ-T20-ST-30 kodlu formülasyona 5 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 105.10 ± 1.80 nm ve PDI değeri 0.09 ± 0.01 olarak, 10 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu 99.12 ± 0.23 nm ve PDI değeri 0.10 ± 0.01 olarak bulundu. Uygun değerler elde edildiği için daha uzun sonikasyon sürelerinin etkileri incelenmedi. Etanol içeriği % 20 olan TEZ-T20-ST-20 kodlu formülasyona 5 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 106.5 ± 0.50 nm ve PDI değeri 0.38 ± 0.01 olarak, 10 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu 74.73 ± 0.61 nm ve PDI değeri 0.24 ± 0.01 olarak, 20 dakika sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 55.49 ± 1.07 nm ve PDI değeri 0.07 ± 0.02 olarak ve 30 dakika sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 54.95 ± 0.19

nm ve PDI değeri 0.13 ± 0.01 olarak bulundu. 20. dakikadan sonra partikül boyutunda anlamlı bir fark görülmemesi ve buna karşılık PDI değerinde artış olması üzerine 30. dakikadan sonraki sonikasyon sürelerinin etkileri incelenmedi. Etanol içeriği % 10 olan TEZ-T20-ST-10 kodlu formülasyona 20 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 64.52 ± 0.35 nm ve PDI değeri 0.37 ± 0.01 olarak, 30 dk sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu 46.01 ± 0.46 nm ve PDI değeri 0.23 ± 0.01 olarak ve 40 dakika sonikasyon uygulandıktan sonra partikül boyutu değeri 41.02 ± 0.34 nm ve PDI değeri 0.29 ± 0.02 olarak bulundu. 40. dakikadan sonra PDI değerinde artış olması üzerine 40. dakikadan sonraki sonikasyon sürelerinin etkileri incelenmedi. Bu çalışma sonucunda sonikasyon süresi transetozom formülasyonlarının etanol içeriklerine dayalı olarak ve aynı şekilde partikül boyutu ve boyut dağılımı verileri dikkate alınarak optimize edildi. Sonikasyon süresi %10, %20, %30 etanol içeren formülasyonlar için sırasıyla 30, 20 ve 5 dk olarak optimize edildi. Kontrol transferzom formülasyonları için de aynı şekilde çalışılarak sonikasyon süresi 40 dakika olarak belirlendi.

Ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak bileşen ve oranları belirlenen optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları Tablo 4-17 ve Tablo 4-18’de verildi. Bu formülasyonlarda fosfolipit olarak 400 mg Phospholipon 90, sürfaktan olarak 71-171 mg aralığında Tween 20 veya Tween 80 ve hidrasyon ortamı olarak %10-30 aralığında etanol içeren sitrat tamponu kullanıldı. Hazırlanan formülasyonların fizikokimyasal karakterizasyonları değerlendirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH ölçümleri gerçekleştirildi. Fizikokimyasal stabilite takipleri yapıldı.

Optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının partikül boyutu ve boyut dağılımı analizleri dinamik ışık saçılımı tekniği ile gerçekleştirildi. Hazırlanan transetozomların partikül boyutu ve boyut dağılımına ait bulgular Tablo 4-19 ve Tablo 4-20’de gösterildi. TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu FVS yüklü transetozom formülasyonlarına ait partikül boyutu ve boyut dağılımını gösteren grafik Şekil 4-7 ve Şekil 4-8’de gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü %30 etanol içeren transetozomların boyutları 187.90 ± 3.40 - 105.10 ± 1.80 nm aralığında ve PDI değerleri 0.13 ± 0.02 - 0.09 ± 0.01 aralığında; %20 etanol içeren transetozomların boyutları 105.70 ± 0.86 - 55.49 ± 1.07 nm aralığında ve PDI değerleri 0.12 ± 0.02 - 0.06 ± 0.01 aralığında ve %10 etanol içeren transetozomların boyutları 74.08 ± 0.77 - 46.01 ± 0.46 nm

aralığında ve PDI değerleri 0.12 ± 0.01 - 0.23 ± 0.01 aralığında bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü %30 etanol içeren transetozomların boyutları 169.170 ± 1.78 - 103.6 ± 1.04 nm aralığında ve PDI değerleri 0.13 ± 0.01 - 0.19 ± 0.03 aralığında; %20 etanol içeren transetozomların boyutları 100.11 ± 1.48 - 64.87 ± 1.30 nm aralığında ve PDI değerleri 0.09 ± 0.01 - 0.11 ± 0.02 aralığında ve %10 etanol içeren transetozomların boyutları 72.47 ± 0.99 - 51.77 ± 0.17 nm aralığında ve PDI değerleri 0.14 ± 0.01 - 0.26 ± 0.01 aralığında bulundu. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, etanol oranının hem Tween 20 hem de Tween 80 içeren formülasyonların boyutunu etkilediği ve etanol miktarının atmasının partikül boyutu değerlerinde kademeli olarak artışa neden olduğu belirlendi. Ayrıca sürfaktan miktarındaki artışın da partikül boyutunda aynı şekilde artışa yol açtığı belirlendi. Küçük partikül boyutuna sahip lipit veziküllerin ilacın derinin daha derin tabakalarına penetrasyonlarının arttırılmasında daha etkili olduğu bildirilmiştir (Verma ve ark. 2003; Lin ve ark. 2018). Sonuç olarak optimize FVS yüklü transetozomların nano boyutta (<200 nm) ve dar boyut dağılımına (<0.3) sahip veziküler sistemler olduğunu görüldü.

Deri yüzeyinin asidik pH'sı *stratum corneum* homeostazının ve permeabilite bariyerinin korunması için düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmiştir. Deriye uygulanacak formülasyonların pH değerleri uygulanabilirlik açısından mutlaka değerlendirilmelidir. 3-10 arasında değişen pH değerlerinin deri tarafından tolere edilebildiği bildirilmiştir (Sznitowska ve ark. 2001; Hanson ve ark. 2002; Ge ve ark. 2014; Luki'c ve ark. 2021). Deri pH'sı *stratum corneum* homeostazı ve kütanöz bariyer üzerinde etkilidir. (Luki'c ve ark. 2021) Bu bariyer yapının bozulması deri pH'sında artışa sebep olur. Psoriasisli deri bölgelerinin yüzey pH değerlerinin sağlıklı deriden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Ye ve ark. 2014).

Optimize fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının pH ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-19 ve Tablo 4-20'de gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü %30 etanol içeren transetozomların pH değerleri 3.44 ± 0.01 - 3.47 ± 0.01 aralığında, %20 etanol içeren transetozomların pH değerleri 3.25 ± 0.01 - 3.33 ± 0.01 aralığında ve %10 etanol içeren transetozomların pH değerleri 3.15 ± 0.01 - 3.19 ± 0.01 aralığında bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü %30 etanol içeren transetozomların pH değerleri 3.47 ± 0.01 - 3.51 ± 0.01 aralığında, %20 etanol içeren transetozomların pH değerleri 3.27 ± 0.01 - 3.37 ± 0.01 aralığında ve %10 etanol içeren

transetozomların pH değerleri 3.14 ± 0.01 - 3.19 ± 0.01 aralığında bulundu. Transetozom formülasyonlarında etanol miktarının artmasının pH değerlerinde artışa yol açtığı gözlenirken, sürfaktan miktarının formülasyonların pH değerlerinde önemli bir artış ya da azalışa yol açmadığı belirlendi. Hazırlanan tüm formülasyonların pH değerleri derinin tolere edebileceği aralıkta olduğu görüldü ve normal deriden daha yüksek pH'ya sahip psoratik deri yüzeyine uygulanacağı düşünülerek bu değerlerin kabul edilebilir olduğu sonucuna varıldı.

Optimize transetozom formülasyonların fizikokimyasal stabiliteleri buzdolabı koşullarında ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) 24 ay süre ile izlendi. Formülasyonların 15.gün, 1.ay, 3.ay, 6.ay, 12.ay ve 24.ay sonunda partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH'ları ölçülerek fiziksel stabiliteleri değerlendirildi. İki yıl süre ile devam eden stabilite çalışmalarına ait bulgular ise Tablo 4-21 ile Tablo 4-26 aralığında sırasıyla verildi. Hem Tween 20 hem de Tween 80 ile hazırlanan transetozomlar için etanol oranı ve sürfaktan miktarının stabilitenin sürdürülmesinde önemli bir parametre olduğu görüldü. Etanol oranı yüksek olan formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerlerindeki değişimin daha fazla olduğu saptandı. Aynı etanol oranına sahip formülasyonların sürfaktan miktarındaki azalmanın stabiliteyi olumlu etkilediği ve 24 ay sonundaki boyut değişiminin daha az olduğu görüldü. 24 ay sonunda formülasyonlarda görsel bir değişim ve çökme gözlenmedi. Tüm transetozom formülasyonlarının 24 ay süre ile takip edilen pH değerleri incelendiğinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. Hazırlanan tüm formülasyonlara ait bulgular değerlendirildiğinde formülasyonların stabilitelerini büyük ölçüde koruduğu saptandı.

Optimize transetozom formülasyonlarının karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için kullanılacak formülasyonlar belirlendi. Tween 20 ile hazırlanan formülasyonlardan %30 etanol içeren TEZ-T20-4, %20 etanol içeren TEZ-T20-6 ile TEZ-T20-8 ve %10 etanol içeren TEZ-T20-11 kodlu transetozomlar seçildi. Tween 80 ile hazırlanan formülasyonlardan ise %30 etanol içeren TEZ-T80-4, %20 etanol içeren TEZ-T80-5 ile TEZ-T80-6 ve %10 etanol içeren TEZ-T20-10 kodlu transetozomlar seçildi.

Daha ileri çalışmalar için seçilen FVS yüklü formülasyonlar ile diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla zeta potansiyel, iletkenlik, enkapsülasyon etkinliği ölçümleri gerçekleştirildi. Seçilmiş bir

adet formülasyonun Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri alındı ve ATR-FTIR cihazı kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi.

Zetapotansiyel vezikül özellikleri, vezikül deri etkileşimi ve transetozom stabilitesini etkileyen önemli bir parametredir (Abdulbaqi ve ark. 2018). Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri Tablo 4-27’de gösterildi. Fluvastatin sodyum yüklü Tween 20 ile hazırlanan transetozomların zeta potansiyel değerleri $0.15 \pm 0.28 - 0.44 \pm 0.36$ mV aralığında, Tween 80 ile hazırlanan transetozomların zeta potansiyel değerleri $0.07 \pm 0.29 - 0.45 \pm 0.15$ mV aralığında bulundu.

Veziküllerin zeta potansiyel değerleri kullanılan yardımcı maddelere bağlıdır. Fiziksel olarak stabil süspansiyonların elde edilebilmesi için < -30 mV veya $> +30$ mV zeta potansiyel değerleri ideal kabul edilir (Radomska-Soukharev 2007; Sabeti ve ark. 2014). Transetozomlar sıfıra yakın zeta potansiyel değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu durum Tween 20 ve Tween 80’in noniyonize karaktere sahip olması ile açıklanabilir. Fluvastatin sodyumun sudaki çözünürlüğü yüksek olduğundan veziküler sistemlere etkin bir biçimde yüklenebilmesi için maddenin non-iyonik olduğu bir pH değerinde çalışılmıştır. Bu nedenle bu sıfıra yakın zeta potansiyel değerleri, etkin maddenin formülasyonlara etkin bir şekilde yüklendiğini ve dış fazda iyonize ilaç moleküllerinin olmadığını da gösterir.

Diğer taraftan, zeta potansiyel değerleri düşük olmasına rağmen transetozom formülasyonları yüksek fiziksel stabilite göstermiştir (Tablo 4-21-Tablo 4-26). Sürfaktan olarak Tween 80 kullanıldığında; düşük zeta potansiyel değerine rağmen, Tween 80’in nano sistemlere ek bir sterik stabilizasyon sağladığı kayıtlıdır (Radomska-Soukharev 2007; Cattani ve ark. 2010; Bikkad ve ark. 2014; Savian ve ark. 2015). Bu sonuçlar stabilitenin yalnızca zeta potansiyele bağlı olmadığını göstermektedir. Bu durumun sürfaktanlardan kaynaklanan sterik stabilizasyonun etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarının iletkenlik değerleri Tablo 4-27’de gösterildi. Fluvastatin sodyum yüklü Tween 20 ile hazırlanan transetozomların iletkenlik değerleri $609.67 \pm 16.62 - 1250 \pm 55.68$ $\mu\text{S/cm}$ aralığında, Tween 80 ile hazırlanan transetozomların iletkenlik değerleri $639 \pm 17.69 - 1173.30 \pm 50.33$

$\mu\text{S}/\text{cm}$ aralığında bulundu. Tween 20 ile hazırlanan %30 etanol içeren TEZ-T20-4 kodlu transetozomun iletkenlik değeri $609.67 \pm 16.62 \mu\text{S}/\text{cm}$ iken, aynı oranda sürfaktan ile hazırlanan %20 etanol içeren TEZ-T20-8 kodlu transetozom iletkenlik değeri $917 \pm 34.18 \mu\text{S}/\text{cm}$ olarak bulundu. Aynı şekilde, Tween 80 ile hazırlanan %20 etanol içeren TEZ-T80-6 kodlu transetozomun iletkenlik değeri $866.67 \pm 29.14 \mu\text{S}/\text{cm}$ iken, aynı oranda sürfaktan ile hazırlanan %10 etanol içeren TEZ-T80-10 kodlu transetozom iletkenlik değeri $1173.30 \pm 50.33 \mu\text{S}/\text{cm}$ olarak saptandı. Bu durumda etanol miktarındaki artışın iletkenlik değerinde azalmaya sebep olduğu görüldü. Tween 20 ile hazırlanan %30 etanol içeren TEZ-T20-6 kodlu transetozom ile daha düşük oranda sürfaktan içeren TEZ-T20-8 kodlu transetozomların iletkenlik değerleri karşılaştırıldığında sürfaktan miktarındaki artışın iletkenlik değerinde de artışa sebep olduğu gösterildi. Aynı şekilde Tween 80 ile hazırlanan %20 etanol içeren TEZ-T80-5 ve daha düşük oranda sürfaktan içeren TEZ-T80-6 kodlu formülasyon ile de benzer sonuçlar alındı.

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonlarına yüklenen fluvastatin miktarı literatürde yer alan diyaliz yöntemi (Berger ve ark. 2001; Li ve ark. 2016; Moya ve ark. 2019) ve ultrafiltrasyon yöntemi (Bal ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2016) kullanılarak analiz edildi. Diyaliz yönteminde; vezikül içine yüklenmeyen etkin madde diyaliz işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra vezikülün yapısı bozundurulup yüklenen etkin madde miktarı HPLC ile analiz edildi ve enkapsülasyon etkiliği (%EE) hesaplandı. Ultrafiltrasyon yönteminde ise; veziküler sistemin dış fazında bulunan ve vezikül içine yüklenmeyen etkin madde özel santrifüj tüpleri kullanılarak ayrıldı. Filtrattan alınan örnekler HPLC’de analiz edildi. Transetozomlara yüklenmeyen etkin madde miktarından hareketle %EE belirlendi. Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozomların her iki yönteme ait enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-28’de gösterildi. Optimizasyon çalışmaları kapsamında su yerine pH 3 sitrat tamponu kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan sistemlere etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri gereği yüksek oranda yükleneceği öngörüldü.

Diyaliz yönteminde reseptör ortam olarak her bir formülasyon için kendi hidrasyon ortamları kullanıldı. Bu şekilde diyaliz süresi boyunca transetozomlardan reseptör ortama salım olmaması ve sadece dış fazda bulunan ve veziküler sisteme yüklenmeyen etkin maddenin reseptör faza geçerek uzaklaştırılması amaçlandı. Diyaliz

yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan TEZ-T20-4, TEZ-T20-6, TEZ-T20-8 ve TEZ-T20-11 kodlu transetozomların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 83.80 ± 0.79 , 96.02 ± 2.82 , 84.46 ± 4.81 ve 88.67 ± 1.58 olarak hesaplandı. Tween 80 ile hazırlanan TEZ-T80-4, TEZ-T80-5, TEZ-T80-6 ve TEZ-T80-10 kodlu transetozomların enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla 85.40 ± 1.99 , 80.83 ± 1.56 , 83.96 ± 1.11 ve 91.42 ± 1.64 olarak hesaplandı.

Ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan TEZ-T20-4, TEZ-T20-6, TEZ-T20-8 ve TEZ-T20-11 kodlu transetozomların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 99.84 ± 0.06 , 99.43 ± 0.08 , 99.92 ± 0.02 ve 99.99 olarak hesaplandı. Tween 80 ile hazırlanan TEZ-T80-4, TEZ-T80-5, TEZ-T80-6 ve TEZ-T80-10 kodlu transetozomların enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla 99.83 ± 0.06 , 99.78 ± 0.08 , 99.89 ± 0.05 ve 99.99 olarak hesaplandı. TEZ-T20-11 ve TEZ-T80-10 kodlu transetozomların ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta analiz edilen fluvastain sodyum miktarları LOQ değerinin altında kalmıştır. Bu nedenle yüklemenin 99.99 oranında gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Her iki yöntemde de veziküllerin enkapsülasyon etkinliği değerleri yüksek bulunmuştur. Diyaliz yönteminde elde edilen değerlerin daha düşük olmasının 24. saatlik diyaliz süresi boyunca transetozomlardan reseptör ortama ilaç salımı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Transetozom formülasyonlarının şekil ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve FEG (Alan Emisyon Tabancalı) taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. TEM ve SEM analizleri için TEZ-T20-4 kodlu formülasyon seçildi. TEM ve SEM analizleri elde edilen görüntüler sırasıyla Şekil 4-9 ve Şekil 4-10'da gösterildi. Tam bir küresel şekle sahip olmayan, yuvarlak, nanoboyutlu homojen dağılımlı veziküller elde edildiği görüldü. Elde edilen görüntüler literatür ile uyumludur (Ascenso ve ark. 2015; Hussain ve ark. 2017).

IR spektroskopisi kimyasal yapıların tespiti ve tanınmasında kullanılan iyi bilinen bir analiz yöntemidir. Moleküler yapı ve fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlar (Popescu ve ark. 2006). FTIR spektroskopisi analizleri ilaç molekülü-transetozom etkileşiminin değerlendirilmesinde kullanıldı. Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan fosfolipit Phospholipon 90G ile çalışma için seçilen TEZ-T20-4 kodlu boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonlarının ATR-

FTIR spektrofotometre cihazı kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi. ATR-FTIR spektroskopi analizlerine ait bulgular Şekil 4-11 ile Şekil 4-15 aralığında sırasıyla verildi. Karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde; Phospholipon G'ye ait 2925'te ve 2854'te bulunan (C-H gerilme) ve 1737'de bulunan (C=O gerilme) bantların formülasyon içinde de yapısını koruduğu, ancak 1257 cm^{-1} 'de bulunan (ester C-O gerilme) pikin kaybolduğu saptandı (Salama ve ark. 2019). Pik yoğunluğundaki değişikliğin ise formülasyon bileşenlerinde bulunan belirli fonksiyonel gruplara ait bantların üst üste binmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Etkin madde yüklü formülasyonda fluvastatin sodyuma ait 1213 cm^{-1} 'de bulunan (C-O gerilme), 1399 cm^{-1} 'de bulunan (C=C gerilme) ve 1571 cm^{-1} 'de bulunan (C=O gerilme) bantlarının kaybolduğu görüldü. Fluvastatin sodyum kristallerine ait bu bantların görülmemesi, fluvastatin sodyumun dış fazda yer almadığını ve veziküler sistemin iç fazına yüklendiğini göstermektedir.

Transetozomların dermal penetrasyon çalışmaları ve deri lipitleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı transferzom formülasyonları kullanıldı. Seçilen her bir transetozomun aynı oranda fosfolipit ve sürfaktan içeren ancak etanol içermeyen transferzomları hazırlandı. Fluvastatin sodyum yüklü transferzom formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-29'de verildi. Tween 20 ile hazırlanan TEZ-T20-4 kodlu ve TEZ-T20-8 kodlu transetozomların kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T20-4, TEZ-T20-6 kodlu transetozomun kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T20-2, TEZ-T20-11 kodlu transetozomun kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T20-3 olarak belirlendi. Tween 80 ile hazırlanan TEZ-T80-4 kodlu transetozomun kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T80-4, TEZ-T80-5 kodlu transetozomun kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T80-1, TEZ-T80-6 kodlu ve TEZ-T80-10 kodlu transetozomların kontrol transferzom formülasyonu TFZ-T80-2 olarak belirlendi.

Kontrol amaçlı hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü transferzom formülasyonlarının fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında partikül boyutu, boyut dağılımı, pH, iletkenlik, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirildi.

Transferzomların partikül boyutu ve boyut dağılımına ait bulgular Tablo 4-30'da gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü TFZ-T20-2, TFZ-T20-3 ve TFZ-T20-4

kodlu transferzomların boyutları sırasıyla 59.96 ± 1.83 nm, 60.34 ± 0.75 nm ve 67.19 ± 1.52 nm olarak ve PDI değerleri sırasıyla 0.25 ± 0.01 , 0.34 ± 0.01 ve 0.30 ± 0.02 olarak bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü TFZ-T80-1, TFZ-T80-2 ve TFZ-T80-4 kodlu transferzomların boyutları sırasıyla 63.21 ± 1.97 nm, 60.32 ± 1.47 nm ve 70.64 ± 2.04 nm olarak ve PDI değerleri sırasıyla 0.23 ± 0.01 , 0.28 ± 0.04 ve 0.28 ± 0.01 olarak saptandı. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, genel olarak transferzomların boyutlarının transetozomlara göre daha küçük, PDI değerlerinin ise daha yüksek olduğu görüldü. Kontrol transferzomların pH ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-30'da verildi. Fluvastatin sodyum yüklü transferzomların pH değerlerinin $3.20 \pm 0.323 \pm 0.01$ aralığında olduğu saptandı. Hem Tween 20 hem de Tween 80 ile hazırlanan transferzomların benzer pH değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Hazırladığımız formülasyonlarda sürfaktan türü ve oranının pH değerleri üzerinde etkisi olmadığı belirlendi. Transferzom formülasyonlarının zeta potansiyel ve iletkenlik değerleri Tablo 4-31'de gösterildi. Zeta potansiyel değerlerinin -0.05 ± 0.11 - 1.34 ± 0.34 mV ve iletkenlik değerlerinin 1466.67 ± 116.76 - 1733.33 ± 90.73 μ S/cm aralığında olduğu saptandı. Zeta potansiyel değerleri transetozomlar ile benzer şekilde düşük bulundu. İletkenlik değerlerinin ise transetozomlar ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu görüldü.

Transferzom formülasyonlarına yüklenen fluvastatin sodyum miktarı transetozomlarda olduğu gibi hem diyaliz yöntemi hem de ultrafiltrasyon yöntemi ile analiz edildi. Her iki yönteme ait enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-32'de gösterildi. Diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan TFZ-T20-2, TFZ-T20-3 ve TFZ-T20-4 kodlu transferzomların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla $\%93.45 \pm 1.65$, $\%93.27 \pm 2.11$ ve $\%92.24 \pm 1.64$ olarak, Tween 80 ile hazırlanan TFZ-T80-1, TFZ-T80-2 ve TFZ-T80-4 kodlu transferzomların enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla $\%93.96 \pm 2.63$, $\%94.75 \pm 3.34$ ve $\%92.66 \pm 4.40$ olarak hesaplandı. Ultrafiltrasyon yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada, transferzomların ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta analiz edilen fluvastatin sodyum miktarları LOQ değerinin altında kalmıştır. Bu nedenle yüklemenin $\%99.99$ oranında gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Her iki yöntemde de veziküllerin enkapsülasyon etkinliği değerleri yüksek bulunmuştur. Diyaliz yönteminde yine bir miktar solum gerçekleşmiş olabilir.

Fluvastatin sodyumun transetozom ve kontrol transferzom formülasyonlarından deriye penetrasyonunun değerlendirilebilmesi için tam kalınlıklı domuz derisi kullanılarak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edildi. *In vitro* penetrasyon çalışmalarında yerel bir kesimevinden alınan tam kalınlıklı domuz derisinin dormal bölgesi kullanıldı (Babaei ve ark. 2016; Contri ve ark. 2016; Nasr ve ark. 2016). Derideki kıllar cerrahi makas yardımı ile *stratum corneum* tabakasına zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı ve subkütan yağ tabakası çıkarıldı.

Etkin maddenin veya kozmetik bileşenlerin topikal yol ile uygulanması; aktif bileşenin yapısı ve özellikleri, formülasyon tipi ve bileşenleri ve *stratum corneum*'un durumu da dahi olmak üzere birçok faktörden etkilenir. Formülasyonların oklüzif veya non-oklüzif koşullar altında uygulanması topikal uygulama başarısını etkileyen faktörlardan biridir. Cevc ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ultradeforme olabilen lipozomların, oklüzif olmayan koşullar altında uygulandığında daha etkili olduğu bildirilmiştir. Non-oklüzif koşulların, transepidermal ozmotik gradyan oluşturmak ve sonuç olarak dermal penetrasyon için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Cevc ve ark. 2002; Verma ve ark. 2003; Knudsen ve ark. 2012). Bu çalışma kapsamında ilk olarak, *in vitro* dermal penetrasyon çalışması sırasında uygulan oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların, dermal penetrasyon üzerine etkileri incelendi. Optimize edilen seçilmiş TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonundan fluvastatin sodyumun deriye penetrasyonu iki farklı koşulda değerlendirildi. Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarındaki farklılıklar saptandı. Bu çalışmanın sonucuna göre transetozom ve kontrol transferzom formülasyonları ile gerçekleştirilecek *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarının tamamının oklüzif koşullar altında mı yoksa oklüzif olmayan koşullarda mı gerçekleştirileceğine karar verildi.

In vitro dermal penetrasyon çalışmaları Franz difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Reseptör faz olarak PBS pH 7,4 kullanıldı. Domuz derileri *stratum corneum* tabakası üstte olacak şekilde hücrelerin donör ve reseptör faz bölümleri arasına yerleştirildi. Kısaça sabitlendi. Donör faza her bir formülasyonardan 1'er mL otomatik pipet ile ilave edildi. Oklüzif koşul için donör fazın bulunduğu kısım çalışma süresinde parafilm ile sıkıca kapatıldı. Oklüzif olmayan koşul içinse bu kısım açık

bırakıldı. *In vitro* penetrasyon çalışmasına her bir formülasyon için 24 saat devam edildi.

Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edildi (Gürbüz ve ark. 2015). Bant ile soyma yöntemi, topikal yol ile uygulanan ilaçların dermal penetrasyonlarının değerlendirilmesi ve topikal biyoyararlanımlarının incelenmesinde kullanılan non-invaziv bir tekniktir. Formülasyonların topikal uygulanmasını takiben, uygulama yapılan deri yüzeyinden formülasyonun fazlasının uzaklaştırılması ve ardından *stratum corneum* tabakasının yapışkan bantlar yardımıyla soyulması işlemidir. Bu şekilde uzaklaştırılan *stratum corneum* tabakası ve kalan deri çeşitli çözücülerle ektre edilir ve dermal tabakalarda biriken etkin madde miktarları kantitatif olarak analiz edilir (Herkenne ve ark. 2007; Escobar-Chavez ve ark. 2008; Wiedersberg ve Nicoli 2012 p. 109-127; Gürbüz ve ark. 2015).

In vitro penetrasyon çalışmasında, 24 saatlik sürenin sonunda franz difüzyon hücrelerinden alınan derilerin yüzeyindeki formülasyonun fazlası kağıt peçete yardımıyla uzaklaştırıldı. Penetre olmayan ve deri yüzeyinde kalan kısmın tam olarak uzaklaştırılabilmesi için ayrıca distile su geçirildi ve kağıt peçete ile baskı uygulanmadan kurulandı. Tape stripping yönteminin uygulanması sırasında kullanılacak yapışkan bantlar (Scotch® Book Tape) uygun boyutta kesilerek önceden hazırlandı. Deriler köpük levhalar üzerine *stratum corneum* tabakası üstte kalacak şekilde yerleştirildi. Her bir deri yüzeyin yapışkan bant uygulandı ve belirli bir süre belirli bir miktar basınç uygulanması sonrası bant deriden hızlıca çekildi ve ayrı olarak değerlendirilmek üzere tek başına bir tüpe alındı ve aynı deriye arda arda bu işlem 20 kez uygulandı ve bu kez bantlar 5'erli gruplar halinde tüplere yerleştirildi. Soyma işlemi tamamlandıktan sonra kalan deri çok küçük parçalar halinde kesilerek ayrı bir tüpe alındı. Her bir tüpe 5'er mL mobil faz ilave edilerek sıkıca kapatıldı. Tüpler birer dakika vortekslendikten sonra orbital çalkalayıcıya (IKA Shaker, Staufen, Almanya) yerleştirildi. Bant örneklerindeki fluvastatin sodyumun ekstraksiyonu için tüpler oda sıcaklığında, 250 rpm'de 12 saat boyunca çalkalandı. Ekstraksiyon işlemi sonrası ekstraksiyon sıvısı 0,45 µm por çapına sahip PTFE enjektör ucu membran filtreden süzüldü ve HPLC yöntemi ile fluvastatin sodyum miktarı kantitatif olarak analiz edildi. 20 kez ard arda uygulanan tape stripping işlemi sonrası bant örneklerinden analiz edilen

etkin madde miktarlarının *stratum corneum*'daki ilaç birikimini temsil ettiği olduğu farz edildi. *Tape stripping* sonrası kalan deri ekstraksiyonunda analiz edilen etkin madde miktarı ise derinin canlı epidermis ve dermis tabakalarındaki ilaç birikimi olarak belirlendi (Erdal ve ark. 2014; Gürbüz ve ark. 2015; Erdal ve ark. 2016).

TEZ-T20-4 kodlu transetozom formülasyonu kullanılarak oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-33'te, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafiği Şekil 4-16'da gösterildi. *In vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda, transetozomdan oklüzif koşullar altında deriye geçen ve burada biriken fluvastatin sodyum miktarı *stratum corneum*'da $2.961 \pm 0.032 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında $1.213 \pm 0.034 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve derideki toplam miktar $4.174 \pm 0.066 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak saptanırken, oklüzif olmayan koşullar altında bu değerler *stratum corneum*'da $13.338 \pm 1.941 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında $1.791 \pm 0.143 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve derideki toplam miktar $15.129 \pm 1.802 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tayin edildi. Oklüzif koşul ile oklüzif olmayan koşul altında fluvastatin sodyumun deriye penetrasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu. Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları ve kontrol transferzom formülasyonlarının *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarının oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirilmesine karar verildi. Deforme olabilen veziküler sistemlerin dermal penetrasyonlarında, non-oklüzif koşulların transepidermal ozmotik gradyan oluşturarak erkin maddelerin deriye penetrasyonlarını iyileştirdiği düşünülmektedir (Cevc ve ark. 2002; Verma ve ark. 2003). Oklüzif olmayan koşullar ile dermal tabakalarda biriken fluvastatin miktarı daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur.

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom ve kontrol transferzom formülasyonları deriye uygulandıktan sonra, dermal tabakalarda ve toplam deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-34'de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4-17 ile Şekil 4-22 aralığında gösterildi.

In vitro penetrasyon çalışmasının sonunda, Tween 20 ile hazırlanan transetozomlardan deriye geçen ve burada biriken fluvastatin sodyum miktarı *stratum corneum*'da 13.338 ± 1.941 - $5.442 \pm 0.223 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.791 ± 0.143 - $0.324 \pm 0.007 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 15.129 ± 1.802 - $6.735 \pm 0.401 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında saptanırken, kontrol transferzomları için

bu değerler *stratum corneum*'da 3.940 ± 0.108 - 3.327 ± 0.277 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.230 ± 0.240 - 0.410 ± 0.710 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 4.925 ± 0.350 - 3.737 ± 0.974 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında tayin edildi.

Tween 80 ile hazırlanan transetozomlardan deriye geçen ve burada biriken fluvastatin sodyum miktarı *stratum corneum*'da 13.098 ± 1.079 - 5.433 ± 0.679 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 0.972 ± 0.140 - 0.769 ± 0.049 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 14.069 ± 1.010 - 4.341 ± 1.548 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında saptanırken, kontrol transferzomları için bu değerler *stratum corneum*'da 3.846 ± 0.012 - 2.132 ± 0.367 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 0.443 ± 0.118 - 0.177 ± 0.053 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 4.289 ± 0.106 - 2.309 ± 0.386 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında tayin edildi.

Transetozomların *in vitro* penetrasyon çalışmaları sonrası elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, etanol oranının formülasyonların *in vitro* dermal penetrasyonlarını etkilediği ve etanol miktarının atmasının deriden biriken miktarlarda kademeli olarak artışa neden olduğu belirlendi. Fluvastatin sodyum'un dermal tabakalardaki en yüksek birikimi %30 etanol içeren TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu transetozomlar ile sağlandı. Seçilen her bir transetozomun aynı oranda fosfolipit ve sürfaktan içeren ancak etanol içermeyen kontrol transferzomları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde transetozomlara göre *in vitro* dermal penetrasyonlarının daha düşük olduğu saptandı.

Ayrıca transetozomlarda kullanılan sürfaktan oranının etkisini değerlendirmek amacıyla, %20 etanol içeren TEZ-T20-6 ve TEZ-T80-8 kodlu ve TEZ-T80-5 ve TEZ-T80-6 kodlu transetozomların dermal penetrasyonları karşılaştırıldı (Tablo 4-34). Tween 20 ile hazırlanan TEZ-T20-6 ve TEZ-T20-8 kodlu transetozomlardan deriye geçen ve burada biriken toplam fluvastatin sodyum miktarları sırasıyla 10.426 ± 0.175 ve 9.857 ± 1.011 olarak bulundu. TEZ-T20-6 kodlu transetozom TEZ-T20-8 kodlu transetozomdan daha yüksek sürfaktan miktarına (Tablo 4-17) sahip olmakla birlikte ve deride biriken toplam fluvastatin miktarları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Tween 80 ile hazırlanan TEZ-T80-5 ve TEZ-T80-6 kodlu transetozomlardan deriye geçen ve burada biriken toplam fluvastatin sodyum miktarları ise sırasıyla 6.229 ± 0.657 ve 10.744 ± 1.037 olarak saptandı. Sonuçlar incelendiğinde, TEZ-T80-5 kodlu transetozom TEZ-T80-6 kodlu formülasyondan daha yüksek

süpfaktan miktarına sahip olmasına rağmen (Tablo 4-18), deride biriken fluvastatin miktarlarının anlamlı oranda daha düşük olduğu görüldü.

Veziküler yapılara çok yüksek ya da çok düşük konsantrasyonlarda süpfaktan eklenmesinin etkin maddenin deriye penetrasyonunu düşürdüğu bildirilmiştir. El-Magharaby ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada süpfaktan konsantrasyonun belli bir değere kadar artmasının *in vitro* ilaç permeasyonu arttırdığı ancak daha yüksek konsantrasyonlarının permeasyon akısının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (El-Magharaby ve ark. 2000). Aynı çalışma grubu tarafından yapılan başka bir çalışmada edge aktivatörleri ve penetrasyon arttırıcıların lipit veziküler ile etkileşimleri incelenmiştir. Veziküllere süpfaktan ilavesinin bu sistemlerin yapısını daha akışkan hale getirdiği ve etkin maddelerin demal taşınmasında daha etkin olduğu, daha yüksek süpfaktan konsantrasyonlarının ise lipozomların karışık misellere dönüşmesine ve etkin maddenin deriye penetrasyonunun düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (El-Magharaby ve ark. 2004). Dolayısıyla, bizim çalışmamızda Tween 80 ile hazırlanan transetozomlardaki süpfaktan konsantrasyonundaki artışa rağmen deride biriken fluvastatin sodyum miktarının azalmasının, karışık misel yapısına benzer bir yapının oluşması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Infrared (IR) spektroskopisi derinin ve özellikle *stratum corneum*'un bariyer özelliğinin daha iyi anlaşılması için yaygın olarak kullanılan ve *stratum corneum* yapı ve dinamiğine yönelik önemli bulgular sağlayan hassas ve güvenilir bir biyofiziksel bir tekniktir (Naik ve Guy 1997; Mendelsohn ve Moore 2000; Aqil ve ark. 2007). Seçilen fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları ve kontrol transferzom formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmasını takiben ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2950 cm⁻¹) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-35'da, her bir formülasyon için alınan ATR-FTR spektrumları Şekil 4-23 ile Şekil 4-36 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum ise Şekil 4-37'de verildi.

Stratum corneum'un üzerinde gerçekleştirilen spektroskopik çalışmalarda en çok bilgi sağlayan lipit absorpsanları hidrofobik alkil zincirlerinden kaynaklananlardır. *Stratum corneum*'da yer alan hücrelerarası lipitlerin alkil zincir düzeninde sıcaklığa ya da formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin *statum corneum* bileşenleri ile

etkileşmesine bağlı olarak gerçekleşen bozulmalar, karbon-hidrojen (CH₂) asimetric (2920 cm⁻¹) ve simetric (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarının dalga numaralarının daha yüksek değerlere kaymasına (blue shift) sebep olur (Harrison ve ark. 1996; Jadoul ve ark. 1996; Naik ve Guy. 1997; Stuart 2004).

Çalışmamızda kontrol derisinden alınan spektrumda asimetric ve simetric gerilme bantlarına ait dalga numaraları 2919.50±0.01 cm⁻¹ ve 2851.22± 0.02 cm⁻¹ olarak saptanmıştır, bu değerler lipit çifte tabakanın belli bir yapısal düzene sahip olduğunu göstermektedir (Harisson ve ark. 1996).

Tween 20 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T20-4, TEZ-T20-6, TEZ-T20-8 ve TEZ-T20-11 kodlu transetozonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un CH₂ asimetric gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2923.68±0.32 cm⁻¹, 2923.36±0.16 cm⁻¹, 2923.20±0.21 cm⁻¹ ve 2922.89±0.27 cm⁻¹ olarak; CH₂ simetric gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2853.56±0.26 cm⁻¹, 2853.78±0.43 cm⁻¹, 2853.20±0.26 cm⁻¹ ve 2853.02±0.03 cm⁻¹ olarak saptandı. Bu formülasyonların TFZ-T20-2, TFZ-T20-3 ve TFZ-T20-4 kodlu kontrol transferzomları için *stratum corneum*'un CH₂ asimetric gerilme bantlarının dalga numaraları 2923.06±0.09 cm⁻¹, 2922.93±0.23 cm⁻¹ ve 2922.89±0.48 cm⁻¹ olarak, CH₂ simetric gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2853.10±0.08 cm⁻¹, 2853.11±0.06 cm⁻¹ ve 2853.07±0.02 cm⁻¹ olarak bulundu.

Tween 80 kullanılarak hazırlanan fluvastatin sodyum yüklü TEZ-T80-4, TEZ-T80-5, TEZ-T80-6 ve TEZ-T80-10 kodlu transetozomların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un CH₂ asimetric gerilme bantlarındaki değişimler sırasıyla 2924.09±0.01 cm⁻¹, 2922.64±0.34 cm⁻¹, 2919.74±0.49 cm⁻¹ ve 2921.94±0.02 cm⁻¹ olarak; CH₂ simetric gerilme bantlarındaki değişimler sırasıyla 2854.65±0.19 cm⁻¹, 2852.78±0.45 cm⁻¹, 2850.82±0.27 cm⁻¹ ve 2852.28±0.05 cm⁻¹ olarak saptandı. Bu formülasyonların TFZ-T80-1, TFZ-T80-2 ve TFZ-T80-4 kodlu kontrol transferzomları için *stratum corneum*'un CH₂ asimetric gerilme bantlarının dalga numaraları 2924.09±0.23 cm⁻¹, 2922.57±0.07 cm⁻¹ ve 2922.16±0.16 cm⁻¹ olarak, CH₂ simetric gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2854.65±0.45 cm⁻¹, 2852.53±0.05 cm⁻¹ ve 2852.72±0.09 cm⁻¹ olarak bulundu.

Fluvastatin sodyum yüklü Tween 20 içeren transetozomların, kontrol deriye göre asimetric ve simetric gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla yaklaşık 3-

4 cm⁻¹ aralığında ve 2 cm⁻¹'lik bir artışa neden olduğu belirlendi. Bu transetozomların kontrol transferzomları için benzer şekilde asimetric ve simetric gerilme bantlarının dalga numaralarında meydana gelen değişimler sırasıyla 3-4 cm⁻¹ aralığında ve 2 cm⁻¹ artış olarak saptandı. Tween 80 içeren transetozomların, kontrol deriye göre asimetric ve simetric gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla yaklaşık 3-5 cm⁻¹ aralığında ve 1-3 cm⁻¹ aralığında bir artışa neden olduğu belirlendi. Yanlızca TEZ-T80-6 kodlu formülasyonun deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* asimetric gerilme bandında bir değişim olmadığı, simetric gerilme gerilme bandında ise 1 cm⁻¹'lik azalma meydana geldiği belirlendi. Bu transetozomların kontrol transferzomları için benzer şekilde asimetric ve simetric gerilme bantlarının dalga numaralarında meydana gelen değişimler ise sırasıyla 3-5 cm⁻¹ aralığında ve 1-3 cm⁻¹ artış olarak saptandı. Transetozom ve transferzom formülasyonlarında yer alan yardımcı maddelerin *stratum corneum* bileşenleri ile etkileşmesine bağlı olarak deri lipitlerinin yapısal düzeninde değişiklik meydana geldiği gösterilmiştir. Bu durumun fluvastatin sodyum'un deriye penetrasyonunun ve birikiminin artmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar hazırladığımız veziküler sistemlerin yapısal özelliklerinin *stratum corneum* bariyerinin aşılarak etkin maddenin deriye taşınmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.

Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM), deriye uygulanan floresan özellikte madde yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerin penetrasyon derinliği ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi sağlar (Changez ve ark. 2006; Rossetti ve ark. 2013; Gürbüz ve ark. 2015). Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu hakkında bilgi edinebilmek amacıyla CLSM analizleri gerçekleştirildi. Dermal tabaklarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu ile çalışıldı. Bu analiz için öncelikle etkin maddeye benzer lipofilik özelliğe sahip floresan model madde Nil kırmızı yüklü (1 µg/mL) formülasyonlar hazırlandı. Kontrol olarak ise nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu kullanıldı. 24 saatlik *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri örneklerinin penetrasyon gerçekleşen bölgelerinden kriyotom cihazı kullanılarak 20 µm kalınlıkta yatay ve dikey kesitler alındı. Derinin *stratum corneum* yüzeyinden başlayarak yatay olarak alınan her kesit dikkatlice sayıldı ve uzaklaştırılan doku ile deride inilen derinlik saptandı. Lam üzerine alınan dikey ve yatay (20 µm, 160 µm ve 400 µm derinliklerdeki) deri kesitleri HeNe diode lazer içeren CLSM cihazı (Leica TCS SPE) ile incelenerek model boya nil kırmızısının derideki birikimi ve lokalizasyonu

görüntülendi. TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu olarak nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu ile gerçekleştirilen CLSM analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4-38 ile Şekil 4-43 aralığında sırasıyla verildi.

CLSM görüntüleri incelendiğinde, nil kırmızısı yüklü transetozomlar ile tedavi edilen derilere ait floresan yoğunluklarının, PBS süspansiyonu uygulanan derilerden çok daha güçlü olduğu görüldü. Transetozomların uygulandığı deriden alınan yatay kesitler incelendiğinde; *stratum corneum* tabakasının sonlandığı derinlik olarak kabul edilen 20 µm'lik deri kesitlerinde nil kırmızısının varlığı görüldü. Bu tabakadan alınan kontrole ait görüntülerde ise nil kırmızısı floresan yoğunluğunun oldukça düşük olduğu belirlendi. Canlı epidermisin sonlandığı derinlik olarak düşünülen 160 µm'lik deri kesitlerinde her iki formülasyona ait CLSM görüntüleri incelendiğinde, nil kırmızısının varlığı bu tabakalarda da belirgindi. 400 µm derinlikten alınan deri kesitleri incelendiğinde ise nil kırmızısının kıl foliküllerinin etrafında lokalize olduğu tespit edildi. Ayrıca nil kırmızısının yoğunluğunun daha derin tabakalarda giderek azaldığı belirlendi. Ancak kontrole ait deri kesitleri incelendiğinde, nil kırmızısının derinin yüzeyinde kaldığı, 160 µm ve 400 µm derinliklerde nil kırmızısının bulunmadığı saptandı. Transetozomların uygulandığı deriden alınan dikey kesitler incelendiğinde, nil kırmızı yüklü transetozomların *stratum corneum*'u geçerek derinin daha derin tabakalarında kadar taşındığı gösterildi. Kontrol süspansiyonuna ait görüntüler incelendiğinde, nil kırmızısının derinin yüzeyinde kaldığı ve canlı epidermis ve dermis tabakalarına ulaşamadığı saptandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, transetozomların *stratum corneum* bariyerini geçerek etkin maddenin hedef bölgeye taşınmasında etkili bir taşıyıcı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu veriler *in vitro* penetrasyon ve ATR-FTIR çalışmalarından alınan sonuçları destekler niteliktedir.

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu transetozom formülasyonları ile *in vitro* sitotoksosite çalışmaları ve devamında *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmaları sırasında TEZ-T20-4 ve TEZ-T80-4 kodlu formülasyonlar sırasıyla TEZ-T20 ve TEZ-T80 olarak kodlanarak çalışmalara devam edildi.

Sulforhodamin B (SRB) testi, 1990'da Skehan ve arkadaşları tarafından hücre bazlı çalışmalarda sistotoksiteyi incelemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Negatif yüklü pembe aminoksantin boyası olan SRB'nin hücrelerde bazik amino asitler tarafından alınmasına dayanır. Hücresel protein içeriğinin ölçümüne dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılır (Skehan ve ark., 1990; Houghton ve ark. 2007; Vichai ve Kirtikara 2006).

Transetozom formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan akciğer dokusundan izole edilen normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan deri dokusundan izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (T0020001, AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile değerlendirildi. Hücre büyüme kontrolü olarak besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak Triton X-100 (Sigma-Aldrich) kullanıldı. HaCaT hücre hattı ile gerçekleştirilen çalışmalarda sitotoksik potansiyelin değerlendirilmesinin yanı sıra *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A (Recombinant Human IL-17A, Peprotech) ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi de amaçlandı.

Normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite çalışması sonucunda boş transetozom formülasyonları ve kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-36'da, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafik Şekil 4-44'de verildi. Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonlarının konsantrasyonları içerdikleri toplam sıvı ve katı bileşenlerin miktarı üzerinden hesaplandı.

Boş TEZ-T20 ve TEZ-T80 kodlu formülasyonlar 911 µg/mL, 91.10 µg/mL, 45.55 µg/mL ve 18.22 µg/mL konsantrasyonlarda IMR-90 hücre hattına 48 saat süre ile uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri TEZ-T20 için sırasıyla %53.68±6.89, %81.37±11.14, %92.21±8.17 ve %114.72±17.19 olarak; TEZ-T80 için sırasıyla %62.91±3.17, %85.30±4.68, %90.02±3.62 ve %106.38±6.49 olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 12.5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücre canlılığı

yüzdesi değerleri sırasıyla 8.17 ± 0.94 , 30.89 ± 1.13 , 54.52 ± 3.47 ve 73.93 ± 10.58 olarak saptandı. Transetozomların ve kontrol Triton X-100'ün hücrelere uygulanan en yüksek konsantrasyonları kıyaslandığında, transetozomlar yaklaşık 9 kat daha düşük konsantrasyonlarda uygulanmasına rağmen TEZ-T20 için yaklaşık 6,5 kat, TEZ-T80 için ise yaklaşık 7,7 kat daha yüksek hücre canlılığı elde edildi. Bu çalışma ile, TEZ-T20 ve TEZ-80 kodlu transetozomların sitotoksik açıdan güvenli olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar hazırlanan transetozomların deri tarafından kontrole kıyasla daha iyi tolere edilebilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

İnsan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite çalışması sonucunda boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları, kontrol olarak kullanılan Triton X-100, serbest fluvastatin sodyum ve IL-17A'nın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-37 ve Tablo 4-38'de, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-45 ve Şekil 4-47 aralığında verildi. Etkin madde içermeyen transetozom formülasyonlarının konsantrasyonları içerdikleri toplam sıvı ve katı bileşenlerin miktarı üzerinden, etkin madde yüklü transetozomların konsantrasyonları ise içerdikleri etkin madde miktarı üzerinden hesaplandı.

Boş TEZ-T20 ve TEZ-T80 kodlu formülasyonlar, $91.10 \mu\text{g/mL}$, $45.55 \mu\text{g/mL}$, $27.33 \mu\text{g/mL}$, $18.22 \mu\text{g/mL}$ ve $9.11 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda HaCaT hücre hattına 48 saat süre ile uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri TEZ-T20 için sırasıyla 102.59 ± 1.63 , 106.01 ± 2.09 , 104.59 ± 0.20 , 106.92 ± 1.73 ve 105.84 ± 0.88 olarak; TEZ-T80 için sırasıyla 103.51 ± 4.00 , 104.95 ± 3.76 , 106.21 ± 4.36 , 105.86 ± 3.12 ve 106.49 ± 3.56 olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün $100 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücre canlılığı yüzdesi değeri 55.73 ± 11.62 olarak saptandı.

Hem TEZ-T20 hem de TEZ-T80, uygulanan en yüksek konsantrasyonda ($91.10 \mu\text{g/mL}$) bile HaCaT hücrelerinin hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemezken, Triton-X-100 ile tedavi HaCaT hücre hatlarının hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı. Ayrıca, normal insan akciğer dokusundan izole edilen normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) ile yapılan sitotoksikite çalışmasına kıyasla insan deri dokusundan izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ile daha yüksek

hücre canlılığı değerleri elde edildi. Her iki hücre hattı ile de elde edilen veriler TEZ-T20 ve TEZ-T80 kodlu transetozomların sitotoksik açıdan güvenli olduğunu göstermiştir. Sonuçlar hazırlanan transetozomların deri tarafından kontrole kıyasla daha iyi tolere edilebilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

Etkin madde yüklü TEZ-T20-FVS ve TEZ-T80-FVS kodlu transetozom formülasyonlarının ve serbest fluvastatin sodyum'un *in vitro* sitotoksik potansiyelleri HaCaT hücre hattı kullanılarak SRB yöntemi ile incelendi. Ayrıca, *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amaçlandı.

3.83 μ M, 1.92 μ M, 1.15 μ M, 0.77 μ M ve 0.38 μ M konsantrasyonlarda fluvastatin sodyum ve aynı konsantrasyonlarda fluvastatin sodyum yüklü transetozom formülasyonları 48 saat süre ile hücrelere uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri serbest fluvastatin sodyum için sırasıyla %80.21 $\pm$ 0.83, %99.98 $\pm$ 0.49, %101.18 $\pm$ 6.21, %105.16 $\pm$ 2.88, %104.51 $\pm$ 0.25 ve %106.53 $\pm$ 1.47 olarak; TEZ-T20-FVS için sırasıyla %97.57 $\pm$ 5.87, %101.97 $\pm$ 2.62, %104.95 $\pm$ 4.40, %104.54 $\pm$ 5.74 ve %105.81 $\pm$ 2.43 olarak ve TEZ-T80-FVS için ise sırasıyla %100.51 $\pm$ 2.88, %103.06 $\pm$ 0.55, %103.26 $\pm$ 3.42, %105.17 $\pm$ 1.36 ve %104.41 $\pm$ 2.89 olarak hesaplandı. Sonuçlar incelendiğinde, fluvastatin sodyum transetozomlar içine yüklenerek hücrelere uygulandığında etkin madenin sitotoksik potansiyelinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterildi.

IL-17A'nın 200 ng/mL, 100 ng/mL ve 50 ng/mL'lik konsantrasyonlarda uygulanması sonrası yüzde canlılık değerleri sırasıyla %102.33 $\pm$ 2.48, %104.09 $\pm$ 4.69 ve %105.11 $\pm$ 2.06 olarak saptandı. Uygulanan konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı bir değişim gözlenmedi.

Bu çalışmalar sonucunda *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmalarında kullanılacak etkin madde yüklü transetozom formülasyonunun konsantrasyonu 1 μ M olarak belirlendi. Boş formülasyonlar da etkin madde yüklü formülasyonlar ile aynı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilti. Serbest fluvastatin sodyum miktarı 1 μ M olarak belirlendi ve IL-17A'nın literatürde yer alan 200 ng/mL konsantrasyonda (Chen ve ark. 2021) kullanılmasına karar verildi.

Psoriasis IL-17A aracılı inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Furue ve ark. 2019). IL-17A keratinosit hiperproliferasyonu indükler ve keratinositlerin proinflamatuvar sitokinler ve nötrofil mobilize edici kemokinler (IL-6, IL-8) üretmesine neden olur (Chen ve ark. 2021). *In vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları psöriyatik epidermal keratinositlerin hiperproliferatif ve bozulmuş farklılaşmasını taklit eden bir hücre hattı olan insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (Breitkreutz ve ark. 1991) kullanılarak gerçekleştirildi. Transetozom formülasyonlarının *in vitro* antipsöriyatik etkinlikleri; IL-17A ile indüklenmiş keratinosit hücrelerinden hücre kültür ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarının ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile değerlendirildi.

In vitro sitotoksosite çalışması çalışması sonucu *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmasında hücelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlendi. Hücelere serbest fluvastatin sodyum miktarı 1 μ M konsantrasyonda uygulandı. 1 μ M fluvastatin sodyum içeren transetozomlar ve aynı seyreltme oranına sahip boş transetozomlar hücelere verildi. IL-17A konsantrasyonu 200 ng/mL konsantrasyonda kullanıldı. Bu konsantrasyonlar kullanılarak *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi.

Antipsoriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında; IL-17A, serbest haldeki fluvastatin sodyum ve boş ve etkin madde yüklü transetozomlar tek başına hücelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Aynı zamanda IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücelere serbest haldeki fluvastatin sodyum, boş ve etkin madde yüklü transetozomlar ayrı ayrı uygulanarak antipsoriyatik aktiviteleri değerlendirildi. Hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarları sırasıyla Tablo 4-39'te ve Tablo 4-40'te, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-48 ile Şekil 4-51 aralığında verilmiştir.

Hücre kültür ortamlarında analiz edilen IL-6 miktarları uygulama yapılmamış hücelere için 15.03 ± 0.02 pg/mL, serbest fluvastatin sodyum (1 μ M) için 8.42 ± 0.003 pg/mL, IL-17A stimülasyonu sonrası 22.95 ± 0.02 pg/mL ve IL-17A ile uyarılmış hücelere FVS uygulaması sonrası 10.92 ± 0.01 pg/mL olarak saptandı. Boş ve etkin madde yüklü transetozomlar tek başına ve IL-17A ile uyarılmış hücelere uygulanarak IL-6 salımı üzerine etkileri incelendi. TEZ-T20, TEZ-T20-FVS, TEZ-T80 ve TEZ-T80-

FVS kodlu transetozomların hücrelere tek başına uygulanması sonrası analiz edilen IL-6 miktarları sırasıyla 11.07 ± 0.01 pg/mL, 9.32 ± 0.02 pg/mL, 12.25 ± 0.02 pg/mL ve 8.28 ± 0.02 pg/mL olarak bulundu. IL-17A ile uyarılmış hücrelere TEZ-T20, TEZ-T20-FVS, TEZ-T80 ve TEZ-T80-FVS kodlu transetozomların uygulanması sonrası hücre kültür ortamına salınan IL-6 miktarları sırasıyla 21.77 ± 0.02 pg/mL, 13.05 ± 0.01 pg/mL, 17.43 ± 0.004 pg/mL ve 8.47 ± 0.03 pg/mL olarak saptandı.

Hücre kültür ortamlarında analiz edilen IL-8 miktarları uygulama yapılmamış hücreler için 421.61 ± 39.90 pg/mL, serbest fluvastatin sodyum ($1 \mu\text{M}$) için 345.18 ± 4.55 pg/mL, IL-17A stimülasyonu sonrası 461.43 ± 3.79 pg/mL ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere FVS uygulaması sonrası 351.79 ± 21.97 pg/mL olarak saptandı. Boş ve etkin madde yüklü transetozomlar tek başına ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere uygulanarak IL-8 salımı üzerine etkileri incelendi. TEZ-T20, TEZ-T20-FVS, TEZ-T80 ve TEZ-T80-FVS kodlu transetozomların hücrelere tek başına uygulanması sonrası analiz edilen IL-8 miktarları sırasıyla 421.32 ± 6.31 pg/mL, 366.07 ± 24.24 pg/mL, 411.79 ± 9.34 pg/mL ve 320.63 ± 14.77 pg/mL olarak bulundu. IL-17A ile uyarılmış hücrelere TEZ-T20, TEZ-T20-FVS, TEZ-T80 ve TEZ-T80-FVS kodlu transetozomların uygulanması sonrası hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları sırasıyla 490.63 ± 9.98 pg/mL, 387.77 ± 11.74 pg/mL, 449.20 ± 1.39 pg/mL ve 352.59 ± 40.28 pg/mL olarak saptandı.

Çalışmamızda uygulama yapılmamış hücrelerin herhangi bir stimülasyon olmaksızın IL-6 ve IL-8 salgıladığı saptandı. Bununla birlikte, IL-17A uyarımı ile hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarının beklendiği üzere arttığı görüldü. Serbest fluvastatin sodyumun tek başına uygulaması sonrası uygulama yapılmamış hücre ile karşılaştırıldığında IL-6 ve IL-8 salımının azaldığı gösterildi. IL-17A ile uyarılmış hücrelere FVS uygulaması sonrası IL-6 ve IL-8 miktarlarının önemli ölçüde azaldığı saptandı.

Boş transetozomlar TEZ-T20 ve TEZ-T80 uygulama yapılmamış hücreler ile kıyaslandığında IL-6 salımını anlamlı oranda inhibe ettiği gösterildi. Ancak boş transetozomların uygulanması ile uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla IL-8 salımı üzerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi. FVS yüklü transetozomlar TEZ-T20-FVS ve TEZ-T80-FVS ile tedavi edilmiş hücreler serbest FVS'ye benzer IL-6 salımı gösterdi. TEZ-T20-FVS kodlu transetozom FVS'ye kıyasla IL-8 salımını daha az düşürürken, TEZ-T20-FVS transetozomların IL-8 salımını FVS'ye kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla

azalttı. IL-17A ile uyarılmış hücrelere boş transetozomlar uygulandığında, TEZ-T20 ile IL-6 salımında önemli bir farklılık gözlenmezken, TEZ-T80 ile IL-6 salımında anlamlı miktarda azalma saptandı. Boş transetozomların uyarılmış hücrelere uygulanması sonrası, TEZ-T20 ile IL-8 üretiminde tam tersine anlamlı bir artış gözlenirken, TEZ-T80 ile IL-8 üretimi anlamlı miktarda azalttığı gözlemlendi.

FVS yüklü transetozomların uyarılmış hücrelerin IL-6 salımı üzerine etkileri incelendiğinde, her iki transetozomun da IL-6 salımı üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğu görüldü. FVS yüklü TEZ-T20-FVS kodlu transetozom FVS'ye kıyasla uyarılmış hücrelerin IL-6 salımını daha az düşürdü. Ancak TEZ-T80-FVS kodlu transetozom ile IL-6 değerleri FVS'ye kıyasla anlamlı ölçüde daha fazla düşürdüğü gözlemlendi. FVS yüklü transetozomların uyarılmış hücrelerin IL-8 salımı üzerine etkileri incelendiğinde, TEZ-T20-FVS'nin IL-8 salımını üzerinde inhibe edici etkileri olduğunu ancak FVS'ye kıyasla IL-8 salımını daha az azalttığı gözlenirken, TEZ-T80-FVS'nin de benzer şekilde IL-8 salımı üzerine inhibitör etkiye sahip olduğu gösterildi. Ayrıca IL-8 salımı üzerinde etkilerinde serbest FVS'ye kıyasla anlamlı farklılık gözlenmedi. Bu çalışma sonunda elde alınan sonuçlar, FVS yüklü transetozomların, serbest FVS'ye kıyasla HaCaT hücrelerinde IL6 ve IL8 üretimini inhibe ettiğini göstermektedir. Etkin maddenin transetozomlara yüklenerek verilmesi etkin maddenin etkinliğinde azalmaya sebep olmamakla birlikte, transetozomların yapısı gereği ilacın *stratum corneum*'u aşarak hedef bölgeye ulaşan ilaç miktarını ve etkinliğini daha da arttıracak şekilde yorumlanmıştır.

5.4. NLC Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Fluvastatin sodyum'un NLC ve kontrol formülasyonları olarak nanoemülsiyon tipi lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Fluvastatin sodyum yüklü optimum NLC formülasyonlarının hazırlanabilmesi için ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ön formülasyon çalışmalarında öncelikli olarak formülasyon bileşen ve oranlarının belirlenmesi hedeflendi. Optimum formülasyonların belirlenmesinde formülasyon bileşenleri dışında hazırlama parametrelerinin de etkili olduğu göz önünde bulundurularak ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. Çalışmalara etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlanması ile başlandı. Uygun olduğu düşünülen formülasyonlara etkin madde yüklenerek görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisi değerlendirildi.

NLC'ler katı ve sıvı lipit karışımından oluşan bir iç faz ve sulu bir dış fazdan oluşan sistemin bir veya iki sürfaktan ile stabilize edildiği lipit bazlı nanotaşıyıcılardır (Garces ve ark. 2018). NLC Formülasyonları emülsifikasyon-ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı (Zhang ve ark. 2013; Yu ve ark. 2017). Formülasyon bileşenleri olarak katı lipit, sıvı lipit, sürfaktanlar gibi yardımcı maddeler kullanıldı. Ön emülsiyonu oluşturmak için sulu faz ve lipit faz ayrı ayrı hazırlandı. İlk olarak katı ve sıvı lipit karışımı tartıldı ve sıcaklığı 70-80 °C' ye (katı lipit erime derecesinin yaklaşık 5-10 °C üstüne) kadar ısıtıldı. Sulu faz ise sürfaktanın sulu fazda çözündürülmesi ile elde edildi ve lipit faz ile aynı sıcaklığa getirildi. Sulu faz lipit-etkin madde karışımına 1000 rpm' de karıştırılarak damla damla ilave edildi. Bu sırada sistem sıcaklığı 70-80 °C'de sabit tutuldu. Ön emülsiyon hazırlandıktan sonra karışım bir süre daha aynı sıcaklıkta karıştırıldı ve sonra 4 °C'de sulu dispersiyon ortamında dağıtıldı. Daha sonra karışıma bir ultrasonik prob (Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap) ile sonikasyon işlemi uygulanarak nanoyapılı lipit taşıyıcı sistem süspansiyonunun homojen olması ve nano boyuta gelmesi sağlandı. Son olarak sistem önce buz banyosunda daha sonra ise buzdolabında bekletildi. NLC formülasyonlarının etkinliğini karşılaştırmak için kontrol amaçlı olarak nanoemülsiyon tipi taşıyıcı sistemler de geliştirildi. Bu sistemler de aynı yöntemle ancak ısıtma işlemi uygulamadan hazırlandı.

NLC formülasyonları geliştirilirken Tablo 3-8' de verilen katı lipit, sıvı lipit, sürfaktanlar ve bu bileşenlerin farklı oranlardaki karışımları kullanılarak çalışmalara başlandı. Katı lipit olarak Compritol 888 ATO ve Precirol ATO 5 kullanıldı. Sıvı lipit olarak Capryol 90, LabrafacTM Lipophile WL 1349, LabrafacTM PG, oleik asit ve izopropil miristat kullanıldı. Sürfaktan olarak ise Tween 80, Tween 20, Span 20, Span 80, Span 85, Kolliphor EL, Kolliphor RH40, Kolliphor HS15, Gelucire 44/14, Gelucire 48/16 ve Sodyum kolat hidrat kullanılarak çalışmalara başlandı. Sulu faz olarak transetozomların optimizasyonu çalışmaları sonucu kullanılmasına karar verilen pH 3 sitrat tamponu kullanıldı.

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan etkin madde içermeyen formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-9'da gösterildi. İlk denenen NLC formülasyonları tek sürfaktan kullanıldı. Bu formülasyonlarda katı lipit olarak Compritol 888 ATO ve sıvı lipit olarak Capryol 90 kullanıldı. Hazırlanan formülasyonların lipit bazlı nanopartiküler sistem oluşturup oluşturmadığı, görsel olarak

ve partikül boyutu ve boyut dağılımları incelenerek değerlendirildi. Etkin madde içermeyen NLC formülasyonlarına ait bulgular ile değerlendirilmeler Tablo 4-41’de verildi. Gelucire 44/14, Kolliphor HS15 ve Kolliphor RH 40’dan görsel olarak uygun olmaması ve PDI değerlerinin yüksek olması sebebiyle vazgeçildi. Diğer sürfaktanlar Tween 20, Tween 80 ve Kolliphor EL ile hazırlanan formüllerin iyileştirilmesi amaçlandı. Cremophor A25 ve Kolliphor P 188 ile uygun PDI değerleri elde edilememesine rağmen düşük boyutlu partiküller elde edilmesi üzerine ikinci bir sürfaktan olarak sisteme eklenmesinin boyut ve boyut dağılımının iyileştirilmesine katkı sağlayacağı düşünüldü.

Uygun olduğu düşünülen formülasyonların iyileştirilmesi için iki farklı sürfaktan ile çalışmalara devam edildi ve bu formülasyonlar ile bileşen ve oranları Tablo 3-10’de belirtildi. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. Etkin maddesiz ve iki sürfaktan ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-42’de gösterildi. Kolliphor EL ve Cremophor A25 karışımı ile hazırlanan formülasyonlar uygun boyutlara sahip olmasına rağmen PDI değerleri 0.2’den yüksek olduğu için vazgeçildi. Son olarak Tween 20 ve Kolliphor P 188 kullanılarak hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.4’ten büyük olduğu için bu formülasyonlardan da vazgeçildi. Tween 20 ve Tween 80’in Cremophor A25 ile farklı oranlarda kullanılması ile hazırlanan formülasyonların uygun PDI ve partikül boyutu değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu kez sürfaktanlar sabit tutularak farklı katı lipid ve sıvı lipidlerin de denenmesine karar verildi. Uygun olduğu düşünülen bu formülasyonlardan hareketle farklı katı lipid ve sıvı lipidlerin denendiği formülasyonların kodları ile bileşen ve oranları Tablo 3-11’de verildi. Yeni hazırlanan bu formülasyonlar da aynı şekilde görsel olarak ve partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. Hazırlanan formülasyonlara ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-43’te gösterildi. Katı lipid olarak Precirol ATO 5 kullanılan formülasyonların PDI değerleri 0.2’den büyük olduğu için elendi. Bu kez farklı sıvı lipidler ile çalışmalara devam edildi. Lauroglycol FCC, Lauroglycol 90, Plurol Oleique CC 497, Labrafil M 2125 CS, Labrafac PG, Labrafac lipophile WL 1349, İzopropil Miristat ve Oleik asit kullanılarak hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.2-0.6 aralığında ölçüldü ve bu lipidlerin kullanılmasından vazgeçildi. Ön formülasyon çalışmalarına ait bulgular göz önünde bulundurularak uygun olduğu düşünülen formülasyonlar belirlendi. Etkin madde yüklenerek tekrar hazırlandı ve değerlendirildi.

Etkin madde yüklü NLC'lere ait bulgular ile değerlendirmeler Tablo 4-44'de gösterildi. Boş halinde uygun olduğu düşünülen NLC'lere etkin madde yüklenmesi sonrası da partikül boyutu ve PDI değerleri uygun bulundu. Ön formülasyon çalışmaları ile formülasyon bileşen ve oranlarına karar verildi.

NLC formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında ise sırasıyla yüksek devirli homojenizatör kullanımının etkisi ve sonikasyon güç ve süresinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Uygun partikül boyutu ve boyut dağılımına sahip formülasyonlar elde edilebilmesi hedeflendi. Optimizasyon çalışmalarında Tablo 3-10'da bileşen ve oranları verilen NLC-CC90-T20CA25-5 kodlu NLC formülasyonu kullanıldı.

NLC formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında ilk olarak yüksek devirli homojenizatör kullanımının etkisi incelendi. Formülasyonlar tek başına sonikasyon ile, tek başına yüksek devirli homojenizatör kullanılarak ve bu iki yöntem birlikte uygulanarak hazırlandı. Yüksek devirli homojenizatör 20.000 rpm'de 3 dk boyunca uygulandı. Sonikasyon işlemi ise %35 amplitude ve 10 dk olarak uygulandı. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak yanı sıra partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. Yüksek devirli homojenizatör kullanımının lipid bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-45'te gösterildi.

Tek başına sonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan NLC'lerin uygun partikül boyutu (145.33 ± 2.5) ve 0.2'den küçük PDI (0.13 ± 0.02) değerine sahip olduğu görüldü. Aynı bileşen ve oranlara sahip formülasyon bu kez literatürde sıklıkla kullanılan diğer bir yöntem olan yüksek devirli homojenizatör kullanılarak hazırlandı ve değerlendirildi. Tek başına yüksek devirli homojenizatör kullanılarak hazırlanan NLC'nin partikül boyutu (99.21 ± 1.016) uygun olmasına rağmen PDI değerinin (0.397 ± 0.01) yüksek olduğu görüldü. Formülasyonun boyut dağılımını iyileştirmek için yüksek devirli homojenizatör kullanımının ardından sonikasyon işlemi uygulandı. Hazırlanan NLC'lerin partikül boyutu (130.30 ± 1.082) uygun olduğu ve boyut dağılımının (0.194 ± 0.01) 0.2'den küçük olduğu görüldü. Bulgular değerlendirildiğinde en iyi sonucun sonikasyon yöntemi ile alındığı görüldü. Ayrıca uygulanan işlem basamağı sayının fazla olması ve yüksek devirli homojenizatör

kullanımı için daha yüksek miktarlarda formülasyon hazırlanması gerektiği için tez çalışmasında tek başına sonikasyon yönteminin kullanılmasına karar verildi.

NLC formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında ikincil olarak sonikasyon güç ve süresinin optimizasyonu gerçekleştirildi. Sonikasyon gücü olarak %35 ve %50 amplitude değerleri ve sonikasyon süresi olarak 5-20 dk çalışıldı. Sonikasyon 2,5'er dakikalık setler şeklinde uygulandı. Setler arası 30'ar saniyelik dinlenme süresi verildi. NLC formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında gerçekleştirilen ve sonikasyon güç ve süresinin lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-46'da gösterildi.

Sonikasyon gücü %35 olarak sabit tutulan formülasyonlara 10 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 145.33 ± 2.5 ve PDI değeri 0.13 ± 0.02 olarak; 15 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 155.43 ± 0.76 ve PDI değeri 0.156 ± 0.01 olarak; 20 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 163.27 ± 1.72 ve PDI değeri 0.213 ± 0.008 olarak analiz edildi. Tüm formülasyonların homojen görünüme sahip olduğu gözlemlendi. Sonikasyon gücü %50 olarak sabit tutulan formülasyonlara 5 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 151 ± 1.87 ve PDI değeri 0.171 ± 0.023 olarak; 10 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 245.37 ± 0.66 ve PDI değeri 0.43 ± 0.05 olarak; 15 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 228.87 ± 1.21 ve PDI değeri 0.294 ± 0.02 olarak; 20 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 184.23 ± 2.15 ve PDI değeri 0.232 ± 0.008 olarak analiz edildi. Tüm formülasyonların homojen görünüme sahip olduğu gözlemlendi. Sonikasyon güç ve süresinin optimizasyonu kapsamında yapılan çalışma sonucunda en uygun partikül boyutu ve PDI değeri elde edilmesini sağlayan minimum sonikasyon güç ve süresi hedeflendi. Çalışmaya ait bulgular incelendiğinde, NLC formülasyonları için sonikasyon gücü %35 ve sonikasyon süresi 10 dk olarak belirlendi.

Ön formülasyon ve optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak bileşen ve oranları belirlenen optimize fluvastatin odyum yüklü NLC formülasyonları Tablo 4-47 ve Tablo 4-48'de verildi. Bu formülasyonlarda katı lipit olarak 250-350 mg aralığında Compritol 888 ATO, sıvı lipit olarak 150-250 mg aralığında Capryol 90, sürfaktan karışımı olarak 111-204 mg aralığında Tween 20 ve 222-407 mg aralığında Cremophor A25 kullanıldı. Katı lipit: sıvı lipit oranı 50:50, 60:40 ve 70:30 olarak belirlendi. Hazırlanan

formülasyonların fizikokimyasal karakterizasyonları değerlendirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH ölçümleri gerçekleştirildi. Fizikokimyasal stabilite takipleri yapıldı.

Optimize fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının partikül boyutu ve boyut dağılımı analizleri dinamik ışık saçılımı tekniği ile gerçekleştirildi. Hazırlanan NLC'lerin partikül boyutu ve boyut dağılımına ait bulgular Tablo 4-49 ve Tablo 4-50'de gösterildi. NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu FVS yüklü NLC formülasyonlarına ait partikül boyutu ve boyut dağılımını gösteren grafik Şekil 4-54 ve Şekil 4-55'de gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü ve katı lipit: sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC'lerin boyutları $139,23 \pm 2,66$ - $159,67 \pm 1,85$ nm aralığında ve PDI değerleri $0,12 \pm 0,01$ - $0,17 \pm 0,01$ aralığında; katı lipit: sıvı lipit oranı 60:40 olan NLC'lerin boyutları $119,00 \pm 1,08$ - $151,73 \pm 1,69$ aralığında ve PDI değerleri $0,15 \pm 0,01$ - $0,22 \pm 0,01$ aralığında; ve katı lipit: sıvı lipit oranı 70:30 olan NLC'lerin boyutları $100,60 \pm 1,16$ - $193,40 \pm 1,51$ aralığında ve PDI değerleri $0,24 \pm 0,01$ - $0,42 \pm 0,04$ aralığında bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü ve katı lipit: sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC'lerin boyutları $129,53 \pm 3,86$ - $157,23 \pm 10,31$ aralığında ve PDI değerleri $0,13 \pm 0,02$ - $0,19 \pm 0,01$ aralığında, katı lipit: sıvı lipit oranı 60:40 olan NLC'lerin boyutları $111,47 \pm 0,49$ - $204,50 \pm 3,28$ aralığında ve PDI değerleri $0,12 \pm 0,02$ - $0,21 \pm 0,01$ aralığında, katı lipit: sıvı lipit oranı 70:30 olan NLC'lerin boyutları $101,10 \pm 1,50$ - $308,80 \pm 18,58$ ve PDI değerleri $0,19 \pm 0,01$ - $0,54 \pm 0,04$ aralığında bulundu. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, katı lipit: sıvı lipit oranının hem Tween 20 hem de Tween 80 içeren formülasyonların boyutunu etkilediği ve katı lipit oranının artmasının partikül boyutu ve PDI değerlerinde artışa sebep olduğu belirlendi. Ayrıca sürfaktan miktarındaki artışın partikül boyutunda azalmaya yol açtığı belirlendi. Sonuç olarak optimize FVS yüklü NLC'lerin nano boyutta ve dar boyut dağılımına sahip lipit yapıları taşıyıcı sistemler olduğu gösterildi.

Deri yüzeyinin asidik pH'sı *stratum corneum* homeostazının ve permeabilite bariyerinin korunması için düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmiştir. Deriye uygulanacak formülasyonların pH değerleri uygulanabilirlik açısından mutlaka değerlendirilmelidir. 3-10 arasında değişen pH değerlerinin deri tarafından tolere edilebildiği bildirilmiştir (Sznitowska ve ark. 2001; Hanson ve ark. 2002; Ge ve ark. 2014; Luki'c ve ark. 2021). Deri pH'sı *stratum corneum* homeostazı ve kütanöz bariyer üzerinde etkilidir (Luki'c ve ark. 2021). Bu bariyer yapının bozulması deri pH'sında

artışa sebep olur. Psoriasisli deri bölgelerinin yüzey pH değerlerinin sağlıklı deriden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Ye ve ark. 2014).

Optimize fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının pH ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-49 ve Tablo 4-50’de gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü ve katı lipid: sıvı lipid oranı 50:50 olan NLC’lerin pH değerleri $3,14 \pm 0,01$ - $3,17 \pm 0,02$ aralığında, katı lipid: sıvı lipid oranı 60:40 olan NLC’lerin pH değerleri $3,12 \pm 0,01$ - $3,2 \pm 0,01$ aralığında ve katı lipid: sıvı lipid oranı 70:30 olan NLC’lerin pH değerleri $3,17 \pm 0,01$ - $3,25 \pm 0,01$ aralığında bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü ve katı lipid: sıvı lipid oranı 50:50 olan NLC’lerin pH değerleri $3,12 \pm 0,01$ - $3,17 \pm 0,01$ aralığında, katı lipid: sıvı lipid oranı 60:40 olan NLC’lerin pH değerleri $3,12 \pm 0,01$ - $3,20 \pm 0,01$ aralığında, ve katı lipid: sıvı lipid oranı 70:30 olan NLC’lerin pH değerleri $3,15 \pm 0,01$ - $3,18 \pm 0,01$ aralığında bulundu. Hazırlanan tüm formülasyonları için birbirine yakın pH değerleri elde edildi. Katı lipid: sıvı lipid ve sürfaktan oranlarının formülasyonların pH değerlerinde önemli bir artış ya da azalışa yol açmadığı belirlendi. Hazırlanan tüm formülasyonların pH değerleri derinin tolere edebileceği aralıkta olduğu görüldü ve normal deriden daha yüksek pH’ya sahip psoratik deri yüzeyine uygulanacağı düşünüldükçe bu değerlerin kabul edilebilir olduğu sonucuna varıldı. Optimize NLC formülasyonların fizikokimyasal stabiliteleri buzdolabı koşullarında ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) 24 ay süre ile izlendi. Formülasyonların 15.gün, 1.ay, 3.ay, 6.ay, 12.ay ve 24.ay sonunda partikül boyutu, boyut dağılımı ve pH’ları ölçülerek fiziksel stabiliteleri değerlendirildi. İki yıl süre ile devam eden stabilite çalışmalarına ait bulgular ise Tablo 4-51 ile Tablo 4-56 aralığında sırasıyla verildi. Hem Tween 20 hem de Tween 80 ile hazırlanan NLC’ler için katı lipid:sıvı lipid oranının stabilitenin sürdürülmesinde önemli bir parametre olduğu görüldü. Genel olarak partikül boyutu ve PDI değerlerinde anlamlı bir değişim saptanmadı. Ancak katı lipid oranı fazla olan formülasyonlarda boyut değişiminin daha fazla olduğu görüldü. 24 ay sonunda NLC’lerde görsel bir değişim ve çökme gözlenmedi. Tüm NLC formülasyonlarının 24 ay süre ile takip edilen pH değerleri incelendiğinde anlamlı bir değişim saptanmadı. Hazırlanan tüm formülasyonlara ait bulgular değerlendirildiğinde formülasyonların stabilitelerini büyük ölçüde koruduğu görüldü.

Optimize transetozom formülasyonlarının karakterizasyon ve stabilite bulguları değerlendirilerek daha ileri çalışmalar için kullanılacak formülasyonlar belirlendi.

Tween 20 ile hazırlanan formülasyonlardan katı lipit:sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC-T20-1 kodlu ve NLC-T20-3 kodlu, katı lipit:sıvı lipit oranı 60:40 olan NLC-T20-5 kodlu ve katı lipit:sıvı lipit oranı 70:30 olan NLC-T20-9 kodlu NLC'ler seçildi. Tween 80 ile hazırlanan formülasyonlardan katı lipit:sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC-T80-1 kodlu ve NLC-T80-3 kodlu, katı lipit:sıvı lipit oranı 60:40 olan NLC-T80-5 kodlu ve katı lipit:sıvı lipit oranı 70:30 olan NLC-T80-9 kodlu NLC'ler seçildi.

Daha ileri çalışmalar için seçilen FVS yüklü formülasyonlar ile diğer karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında sırasıyla zeta potansiyel, iletkenlik, enkapsülasyon etkinliği ölçümleri gerçekleştirildi. Seçilen formülasyonlar ile gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan 2 adet NLC formülasyonunun ATR-FTIR ve DSC cihazları kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi.

Fiziksel olarak stabil süspansiyonların elde edilebilmesi için < -30 mV veya $> +30$ mV zeta potansiyel değerleri ideal kabul edilir (Radomska-Soukharev 2007; Sabeti ve ark. 2014). Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri Tablo 4-57'de gösterildi. Fluvastatin sodyum yüklü Tween 20 ile hazırlanan NLC'lerin zeta potansiyel değerleri $-0,69 \pm 0,42$ - $-3,17 \pm 0,01$ mV aralığında, Tween 80 ile hazırlanan transetozomların zeta potansiyel değerleri $-0,62 \pm 0,19$ - $-0,37 \pm 0,24$ mV aralığında bulundu. NLC'lerin sıfıra yakın zeta potansiyel değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu durum Tween 20 ve Tween 80'in noniyonize karaktere sahip olması ile açıklanabilir. Fluvastatin sodyumun sudaki çözünürlüğü yüksek olduğundan NLC sistemlere etkin bir şekilde yüklenebilmesi için maddenin non-iyonik olduğu bir pH değerinde çalışılmıştır. Bu nedenle bu sıfıra yakın zeta potansiyel değerleri, etkin maddenin formülasyonlara etkin bir şekilde yüklendiğini ve dış fazda iyonize ilaç moleküllerinin olmadığını da gösterir.

Diğer taraftan, zeta potansiyel değerleri düşük olmasına rağmen transetozom formülasyonları yüksek fiziksel stabilite göstermiştir (Tablo 4-51-Tablo 4-56). Sürfaktan olarak Tween 80 kullanıldığında; düşük zeta potansiyel değerine rağmen, Tween 80'in nano sistemlere ek bir sterik stabilizasyon sağladığı kayıtlıdır (Radomska-Soukharev 2007; Cattani ve ark. 2010; Bikkad ve ark. 2014; Savian ve ark. 2015). Bu sonuçlar stabilitenin yalnızca zeta potansiyele bağlı olmadığını göstermektedir. Bu

durumun sürfaktanlardan kaynaklanan sterik stabilizasyonun etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarının iletkenlik değerleri Tablo 4-57’de gösterildi. Fluvastatin sodyum yüklü Tween 20 ile hazırlanan NLC’lerin iletkenlik değerleri $1906,67 \pm 116,76$ - $2010 \pm 111,36$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ aralığında, Tween 80 ile hazırlanan transetozomların iletkenlik değerleri $1770 \pm 111,36$ - $1870 \pm 111,36$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ aralığında bulundu. Tween 20 ile hazırlanan NLC’lerin iletkenlik değerleri Tween 80 ile hazırlananlardan yüksek olmak ile birlikte, değerler birbirine yakındır.

Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonlarına yüklenen fluvastatin miktarı literatürde yer alan diyaliz yöntemi (Berger ve ark. 2001; Li ve ark. 2016; Moya ve ark. 2019) ve ultrafiltrasyon yöntemi (Bal ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2016) kullanılarak analiz edildi. Diyaliz yönteminde; NLC içine yüklenmeyen etkin madde diyaliz işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra NLC yapısı bozundurularak yüklenen etkin madde miktarı HPLC ile analiz edildi ve enkapsülasyon etkililiği (%EE) hesaplandı. Ultrafiltrasyon yönteminde ise; NLC sistemin dış fazında bulunan ve NLC içine yüklenmeyen etkin madde özel santrifüj tüpleri kullanılarak ayrıldı. Filtrattan alınan örnekler HPLC’de analiz edildi. NLC’lere yüklenmeyen etkin madde miktarından hareketle %EE belirlendi. Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC’lerin her iki yöntemle ait enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-58’de gösterildi. Optimizasyon çalışmaları kapsamında su yerine pH 3 sitrat tamponu kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan sistemlere etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri gereği yüksek oranda yükleneceği öngörüldü.

Diyaliz yönteminde reseptör ortam olarak her bir formülasyon için kendi hidrasyon ortamları kullanıldı. Bu şekilde diyaliz süresi boyunca NLC’lerden reseptör ortama salınmaması ve sadece dış fazda bulunan ve NLC’lere yüklenmeyen etkin maddenin reseptör faza geçerek uzaklaştırılması amaçlandı. Diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan NLC-T20-1, NLC-T20-3, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC’lerin enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 81.95 ± 0.71 , 84.17 ± 4.08 , 78.79 ± 4.35 ve 73.56 ± 0.31 olarak hesaplandı. Tween 80 ile hazırlanan NLC-T80-1, NLC-T80-3, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu NLC’lerin enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla 80.10 ± 2.55 , 88.96 ± 1.54 , 82.73 ± 4.21 ve 80.47 ± 11.51 olarak hesaplandı. Ultrafiltrasyon yöntemi kullanılarak

gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan NLC-T20-1, NLC-T20-3, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC'lerin enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 82.29 ± 0.35 , 84.29 ± 0.27 , 93.34 ± 0.02 ve 97.22 ± 0.07 olarak hesaplandı. Tween 80 ile hazırlanan NLC-T80-1, NLC-T80-3, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu NLC'lerin enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla 93.69 ± 0.07 , 92.48 ± 1.18 , 94.57 ± 0.02 ve 98.93 ± 0.03 olarak hesaplandı. Her iki yöntemde de NLC'lerin enkapsülasyon etkinliği değerleri oldukça yüksek bulunmuştur.

IR spektroskopisi kimyasal yapıların tespiti ve tanınmasında kullanılan iyi bilinen bir analiz yöntemidir. Moleküler yapı ve fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlar (Popescu ve ark. 2006). FTIR spektroskopisi analizleri ilaç molekülü-NLC etkileşiminin değerlendirilmesinde kullanıldı. Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan katı lipit Compritol 888 ATO ile çalışma için seçilen NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonlarının ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanılarak yapı analizleri gerçekleştirildi. ATR-FTIR spektroskopisi analizlerine ait bulgular Şekil 4-56 ile Şekil 4-63 aralığında sırasıyla verildi. Karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde; Compritol 888 ATO'ye ait 2916'da ve 2846'da bulunan (C-H gerilme) ve 1739'de bulunan (C=O gerilme) bantların formülasyon içinde de yapısını koruduğu, ancak 1566 cm^{-1} 'de bulunan (C=O stretching) pikin kaybolduğu saptandı. (Aburahma ve Badr-Eldin 2014; Singh ve ark. 2015) Pik yoğunluğundaki değişikliğin ise formülasyon bileşenlerinde bulunan belirli fonksiyonel gruplara ait bantların üst üste binmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Etkin madde yüklü formülasyonda fluvastatin sodyuma ait 1213 cm^{-1} 'de bulunan (C-O gerilme), 1399 cm^{-1} 'de bulunan (C=C gerilme) ve 1571 cm^{-1} 'de bulunan (C=O gerilme) bantlarının kaybolduğu görüldü. Fluvastatin sodyum kristallerine ait bu bantların görülmemesi, fluvastatin sodyumun dış fazda yer almadığını ve nanopartiküler sistemin iç faza yüklendiğini göstermektedir.

DSC partiküllerin yapısal karakterizasyonları hakkında bilgi veren yaygın kullanılan bir tekniktir. Lipitin durumu ve kristal yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılır. Ayrıca, etkin maddenin formülasyon içindeki fiziksel durumu DSC analizleri ile belirlenebilmektedir (Khosa ve ark. 2018). Fluvastatin sodyum ve formülasyon içeriğinde yer alan katı lipit Compritol 888 ATO ile çalışma için seçilen NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonlarının

DSC analizleri yapılarak termal davranışları değerlendirildi. DSC analizlerine ait bulgular Şekil 4-64 ile Şekil 4-70 aralığında sırasıyla verildi. Karşılaştırmalı DSC termogramı incelendiğinde; Fluvastatin sodyum'a ait endotermik piklerin etkin madde yüklü formülasyonlarda kaybolmuştur. Fluvastatin sodyuma ait endotermik piklerin ilaç yüklü NLC'lerde görülmemesi fluvastatin sodyumun dış fazda yer almadığını ve nanopartiküler sistemin iç faza yüklendiğini göstermektedir. Bir lipitin nanopartiküler forma dönüştürülmesi genellikle lipitin erime noktasında düşüşe sebep olur (Khosa ve ark. 2018). Compritol 888 ATO'ya ait 72,02 °C'de alınan keskin endotermik pik, boş ve etkin madde yüklü formülasyonlarda 66.85-67.68 °C aralığına kaymıştır. Formülasyonda yer alan sıvı lipit ve sürfaktanların katı lipitin erime noktasını düşürdüğü düşünülmektedir.

NLC formülasyonlarının dermal penetasyon çalışmaları ve deri lipitleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı SLN ve nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması amaçlandı. Uygun boyut ve boyut dağılımına sahip formülasyonların elde edilebilmesi için öncelikle hazırlama parametreleri optimize edildi. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül/damlacık boyutu ve dağılımları açısından değerlendirildi.

SLN formülasyonları ilk olarak NLC'ler ile aynı şekilde hazırlandı ve aynı sonikasyon güç ve süresi uygulandı. Bu çalışmaya ait bulgular ve değerlendirmeler Tablo 4-59'da gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan SLN'ye ait partikül boyutu değeri 259.57 ± 1.665 ve PDI değeri 0.502 ± 0.008 ; Tween 80 ile hazırlanan SLN'ye ait 315.97 ± 21.08 ve PDI değeri 0.741 ± 0.171 olarak bulundu. Hazırlanan formülasyonlarda faz ayrımı görüldü ve lipit faz çökerek ayrıldı. Uygun görünüş, boyut ve boyut dağılımına sahip formülasyonlar elde edilememesi üzerine optimizasyon çalışmalarına devam edildi.

Yüksek devirli homojenizatör kullanımının ve sonikasyon güç ve süresinin formülasyon karakterizasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Formülasyonlar tek başına sonikasyon ile, tek başına yüksek devirli homojenizatör kullanılarak ve bu iki yöntem birlikte uygulanarak hazırlandı. Yüksek devirli homojenizatör 20.000 rpm'de 3 dk boyunca uygulandı. Sonikasyon işlemi ise %35 amplitude ve 10 dk olarak uygulandı. Hazırlanan formülasyonlar görsel olarak yanı sıra partikül boyutu ve boyut dağılımları açısından değerlendirildi. SLN formülasyonları için yüksek devirli homejenizatör

kullanımının lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-60'de gösterildi. Tek başına sonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan SLN'lerin partikül boyutu değeri 259.57 ± 1.67 ve PDI değeri 0.502 ± 0.01 olarak ve tek başına yüksek devirli homojenizatör kullanılarak hazırlanan SLN'lere ait partikül boyutu değeri 1392.67 ± 338.91 ve PDI değeri 0.871 ± 0.03 olarak bulundu. Her iki yöntemde de yüksek partikül boyutu ve PDI değerleri elde edildi ve faz ayrımı gözlemlendi. Bunun üzerine formülasyonun boyutunu küçültmek ve boyut dağılımını iyileştirmek için yüksek devirli homojenizatör kullanımının ardından sonikasyon işlemi uygulandı. Hazırlanan SLN'lerin partikül boyutu değeri $188,13 \pm 4,97$ ve PDI değeri $0,417 \pm 0,02$ olarak bulundu. Partikül boyutu ve PDI değerinde iyileşme gerçekleşti. Ancak PDI değerinin <0.5 olması ve faz ayrımı meydana gelmesi sebebiyle optimizasyon çalışmalarına devam edildi. Bulgular değerlendirildiğinde en iyi sonuç her iki yöntemin birlikte kullanıldığı durumda alındı. Ancak uygulanan işlem basamağı sayının fazla olması ve yüksek devirli homojenizatör kullanımı için daha yüksek miktarlarda formülasyon hazırlanması gerektiği için optimizasyon işlemine tek başına sonikasyon yöntemi ile devam edildi.

SLN formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında ikincil olarak sonikasyon güç ve süresinin optimizasyonu gerçekleştirildi. Sonikasyon gücü olarak %35 ve %50 amplitude değerleri ve sonikasyon süresi olarak 5-15 dk çalışıldı. Sonikasyon 2,5'er dakikalık setler şeklinde uygulandı. Setler arası 30'ar saniyelik dinlenme süresi verildi. SLN formülasyonlarının optimizasyonu kapsamında gerçekleştirilen ve sonikasyon güç ve süresinin lipit bazlı taşıyıcı sistemin oluşumu, partikül boyutu ve boyut dağılımı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaya ait bulgular Tablo 4-61'de gösterildi.

Sonikasyon gücü %35 olarak sabit tutulan formülasyonlara 10 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 259.57 ± 1.665 ve PDI değeri 0.502 ± 0.008 olarak ve 15 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 248.42 ± 2.457 ve PDI değeri 0.472 ± 0.143 olarak analiz edildi. Sonikasyon gücü %50 olarak sabit tutulan formülasyonlara 5 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu 327.47 ± 10.15 ve PDI değeri 0.664 ± 0.101 olarak ve 10 dk sonikasyon uygulanması sonrası partikül boyutu $412,83 \pm 34,49$ ve PDI değeri $0,747 \pm 0,069$ olarak analiz edildi. Tüm formülasyonlarda sedimentasyon ve faz ayrımı gözlemlendi. Bu çalışmalar sonucunda

uygun görünüş, partikül boyutu ve boyut dağılıma sahip stabil SLN formülasyonları elde edilememiştir. Bu nedenle NLC formülasyonları için kontrol formülasyonları olarak SLN sistemlerinin kullanımından vazgeçilmiştir.

Kontrol amaçlı kullanılması planlanan bir diğer formülasyon olan nanoemülsiyon formülasyonları da NLC'ler ile aynı şekilde hazırlandı ve aynı sonikasyon güç ve süreleri uygulandı. Bu çalışmaya ait bulgular ve değerlendirmeler Tablo 4-59'da gösterildi. Hazırlanan formülasyonlar organoleptik olarak ve partikül/damlacık boyutu ve dağılımları açısından değerlendirildi. Tween 20 ile hazırlanan nanoemülsiyona ait partikül boyutu değeri 216.03 ± 1.625 ve PDI değeri 0.062 ± 0.021 ve Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyona ait partikül boyutu değeri 223.03 ± 0.067 ve PDI değeri 0.067 ± 0.017 olarak bulundu. Uygun boyut ve boyut dağılımları elde edildiği için yüksek devirli homojenizatör kullanımının ve sonikasyon güç ve süresinin etkisi nanoemülsiyonlar için ayrıca incelenmedi. NLC formülasyonlarının kontrol formülasyonları olarak nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesine karar verildi.

NLC'lerin dermal penetrasyon çalışmaları ve deri lipitleri üzerine etkilerinin incelenmesinde kontrol amaçlı hazırlanan FVS yüklü nanoemülsiyon formülasyonlarının kodları ile bileşen ve oranları Tablo 4-62'de verildi. Seçilen her bir NLC'nin aynı sürfaktan bileşen ve oranına sahip ancak sadece sıvı lipit içeren nanoemülsiyonları hazırlandı. Tween 20 ile hazırlanan NLC-T20-1, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC'lerin kontrol nanoemülsiyonu NE-T20-1; NLC-T20-3 kodlu NLC'nin kontrol nanoemülsiyonu NE-T20-3 olarak belirlendi. Tween 80 ile hazırlanan NLC-T80-1, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu NLC'lerin kontrol nanoemülsiyonu NE-T80-1; NLC-T80-3 kodlu NLC'nin kontrol nanoemülsiyonu NE-T80-3 olarak belirlendi.

Kontrol amaçlı hazırlanan FVS yüklü nanoemülsiyon formülasyonlarının fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Karakterizasyon kapsamında partikül boyutu, boyut dağılımı, pH, iletkenlik, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirildi.

Nanoemülsiyonların partikül boyutu ve boyut dağılımına ait bulgular Tablo 4-63'de gösterildi. Tween 20 ile hazırlanan FVS yüklü NE-T20-1 ve NE-T20-3 kodlu nanoemülsiyonların boyutları sırasıyla 231.63 ± 2.67 nm ve 234.43 ± 5.62 nm olarak ve

PDI değerleri sırasıyla 0.07 ± 0.04 ve 0.04 ± 0.03 olarak bulundu. Tween 80 ile hazırlanan FVS yüklü NE-T80-1 ve NE-T80-3 kodlu nanoemülsiyonların boyutları sırasıyla 234.53 ± 4.51 nm ve 177.90 ± 4.41 nm olarak ve PDI değerleri sırasıyla 0.07 ± 0.02 ve 0.05 ± 0.01 olarak analiz edildi. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, kontrol nanoemülsiyonların boyutlarının NLC'lere göre daha büyük, PDI değerlerinin ise daha düşük olduğu görüldü. Kontrol nanoemülsiyonların pH ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-63'de verildi. FVS yüklü nanoemülsiyonların pH değerlerinin 3.20 ± 0.01 - 3.24 ± 0.01 aralığında olduğu saptandı. Hem Tween 20 hem de Tween 80 ile hazırlanan nanoemülsiyonların benzer pH değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Hazırladığımız formülsiyonlarda sürfaktan türü ve oranının pH değerleri üzerinde etkisi olmadığı belirlendi. Nanoemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyel ve iletkenlik değerleri Tablo 4-64'te gösterildi. Zeta potansiyel değerlerinin -0.43 ± 0.20 - 0.69 ± 0.14 mV ve iletkenlik değerlerinin 1713.33 ± 125.83 - 1780.00 ± 123.24 μ S/cm aralığında olduğu saptandı. Zeta potansiyel değerlerinin NLC'ler ile benzer şekilde sıfıra yakın olduğu bulundu. İletkenlik değerlerinin ise NLC'ler ile kıyaslandığında daha düşük olduğu görüldü.

Nanoemülsiyon formülasyonlarına yüklenen FVS miktarı NLC'lerde olduğu gibi hem diyaliz yöntemi hem de ultrafiltrasyon yöntemi ile analiz edildi. Her iki yöntemde ait enkapsülasyon etkinliği bulguları Tablo 4-65'te gösterildi. Diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışma sonrası Tween 20 ile hazırlanan NE-T20-1 ve NE-T20-3 kodlu nanoemülsiyonların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla $\%68.15 \pm 0.76$ ve $\%83.39 \pm 1.91$ olarak, Tween 80 ile hazırlanan NE-T80-1 ve NE-T80-3 kodlu nanoemülsiyonların enkapsülasyon etkinliği değerleri ise sırasıyla $\%76.10 \pm 3.20$ ve $\%84.89 \pm 2.34$ olarak hesaplandı. Ultrafiltrasyon yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada, nanoemülsiyonların ultrafiltrasyon işleminin ardından filtratta analiz edilen FVS miktarından hareketle enkapsülasyon etkinliği değerleri hesaplandı. Tween 20 ile hazırlanan NE-T20-1 ve NE-T20-3 kodlu nanoemülsiyonların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 71.80 ± 0.66 ve 77.28 ± 0.51 olarak, Tween 80 ile hazırlanan NE-T80-1 ve NE-T80-3 kodlu nanoemülsiyonların enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla 72.67 ± 2.03 ve 81.99 ± 0.32 olarak hesaplandı. Her iki yöntemde de nanoemülsiyonların enkapsülasyon etkinliği değerleri NLC'lere kıyasla daha düşük bulunmuştur.

FVS'nin NLC ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonlarından deriye penetrasyonunun değerlendirilebilmesi için tam kalınlıklı domuz derisi kullanılarak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edildi. *In vitro* penetrasyon çalışmalarında yerel bir kesimevinden alınan tam kalınlıklı domuz derisinin dormal bölgesi kullanıldı (Babaei ve ark. 2016; Contri ve ark. 2016; Nasr ve ark. 2016). Derideki kıllar cerrahi makas yardımı ile *stratum corneum* tabakasına zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı ve subkütan yağ tabakası çıkarıldı.

Bu çalışma kapsamında ilk olarak, *in vitro* dermal penetrasyon çalışması sırasında uygulanan oklüzif ve oklüzif olmayan koşulların, NLC'lerden etkin maddenin dermal penetrasyonu üzerine etkileri incelendi. Optimize edilen seçilmiş NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonundan FVS'nin deriye penetrasyonu iki farklı koşulda değerlendirildi. Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarındaki farklılıklar saptandı. Bu çalışmanın sonucuna göre NLC ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonları ile gerçekleştirilecek *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarının tamamının oklüzif koşullar altında mı yoksa oklüzif olmayan koşullarda mı gerçekleştirileceğine karar verildi.

In vitro dermal penetrasyon çalışmaları Franz difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Reseptör faz olarak PBS pH 7,4 kullanıldı. Domuz derileri *stratum corneum* tabakası üstte olacak şekilde hücrelerin donör ve reseptör faz bölümleri arasına yerleştirildi. Kısaça sabitlendi. Donör faza her bir formülasyonardan 1'er mL otomatik pipet ile ilave edildi. Oklüzif koşul için donör fazın bulunduğu kısım çalışma süresinde parafilm ile sıkıca kapatıldı. Oklüzif olmayan koşul içinse bu kısım açık bırakıldı. *In vitro* penetrasyon çalışmasına her bir formülasyon için 24 saat devam edildi.

Dermal tabakalarda biriken fluvastatin sodyum miktarı bant ile soyma yöntemi kullanılarak tayin edildi (Gürbüz ve ark. 2015). Bant ile soyma yöntemi, topikal yol ile uygulanan ilaçların dermal penetrasyonlarının değerlendirilmesi ve topikal biyoyararlanımlarının incelenmesinde kullanılan non-invaziv bir tekniktir. Formülasyonların topikal uygulanmasını takiben, uygulama yapılan deri yüzeyinden formülasyonun fazlasının uzaklaştırılması ve ardından *stratum corneum* tabakasının yapışkan bantlar yardımıyla soyulması işlemidir. Bu şekilde uzaklaştırılan *stratum*

corneum tabakası ve kalan deri çeşitli çözücülerle ektre edilir ve dermal tabakalarda biriken etkin madde miktarları kantitatif olarak analiz edilir (Herkenne ve ark. 2007; Escobar-Chavez ve ark. 2008; Wiedersberg ve Nicoli 2012 p. 109-127; Gürbüz ve ark. 2015).

In vitro penetrasyon çalışmasında, 24 saatlik sürenin sonunda franz difüzyon hücrelerinden alınan derilerin yüzeyindeki formülasyonun fazlası kağıt peçete yardımıyla uzaklaştırıldı. Penetre olmayan ve deri yüzeyinde kalan kısmın tam olarak uzaklaştırılabilmesi için ayrıca distile su geçirildi ve kağıt peçete ile baskı uygulanmadan kurulandı. Tape stripping yönteminin uygulanması sırasında kullanılacak yapışkan bantlar (Scotch® Book Tape) uygun boyutta kesilerek önceden hazırlandı. Deriler köpük levhalar üzerine *stratum corneum* tabakası üstte kalacak şekilde yerleştirildi. Her bir deri yüzeyin yapışkan bant uygulandı ve belirli bir süre belirli bir miktar basınç uygulanması sonrası bant deriden hızlıca çekildi ve ayrı olarak değerlendirilmek üzere tek başına bir tüpe alındı ve aynı deriye arda arda bu işlem 20 kez uygulandı ve bu kez bantlar 5'erli gruplar halinde tüplere yerleştirildi. Soyma işlemi tamamlandıktan sonra kalan deri çok küçük parçalar halinde kesilerek ayrı bir tüpe alındı. Her bir tüpe 5'er mL mobil faz ilave edilerek sıkıca kapatıldı. Tüpler birer dakika vorteksledikten sonra orbital çalkalayıcıya (IKA Shaker, Staufen, Almanya) yerleştirildi. Bant örneklerindeki fluvastatin sodyumun ekstraksiyonu için tüpler oda sıcaklığında, 250 rpm'de 12 saat boyunca çalkalandı. Ekstraksiyon işlemi sonrası ekstraksiyon sıvısı 0,45 µm por çapına sahip PTFE enjektör ucu membran filtreden süzüldü ve HPLC yöntemi ile fluvastatin sodyum miktarı kantitatif olarak analiz edildi. 20 kez ard arda uygulanan tape stripping işlemi sonrası bant örneklerinden analiz edilen etkin madde miktarlarının *stratum corneum*'daki ilaç birikimini temsil ettiği farz edildi. *Tape stripping* sonrası kalan deri ekstraksiyonunda analiz edilen etkin madde miktarı ise derinin canlı epidermis ve dermis tabakalarındaki ilaç birikimi olarak belirlendi (Erdal ve ark. 2014; Gürbüz ve ark. 2015; Erdal ve ark. 2016).

NLC-T20-1 kodlu NLC formülasyonu kullanılarak oklüzif ve oklüzif olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda ve deride biriken fluvastatin sodyum miktarları Tablo 4-66'da, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafiği Şekil 4-71'de gösterildi.

In vitro penetrasyon çalışmasının sonunda, NLC'den oklüzif koşullar altında deriye geçen ve burada biriken FVS miktarları *stratum corneum*'da 7.754 ± 0.268 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.524 ± 0.448 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve derideki toplam miktar 9.278 ± 0.399 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak saptanırken, oklüzif olmayan koşullar altında bu değerler *stratum corneum*'da 9.479 ± 1.032 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.263 ± 0.114 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve derideki toplam miktar 10.742 ± 0.917 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tayin edildi. Oklüzif koşul ile oklüzif olmayan koşul altında FVS'nin deriye penetrasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır. Bu nedenle seçilen FVS yüklü NLC formülasyonları ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* dermal penetrasyon çalışmalarının transetozomlarda olduğu gibi oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Seçilen FVS yüklü NLC ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonları deriye uygulandıktan sonra, dermal tabakalarda ve toplam deride biriken FVS miktarları Tablo 4-67'de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4-72 ile Şekil 4-77 aralığında gösterildi. *In vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda, Tween 20 ile hazırlanan NLC'lerden deriye geçen ve burada biriken FVS miktarları *stratum corneum*'da 9.597 ± 0.375 - 5.845 ± 0.421 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.570 ± 0.205 - 0.736 ± 0.105 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 10.742 ± 0.917 - 7.415 ± 0.625 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında saptanırken, kontrol nanoemülsiyonları için bu değerler *stratum corneum*'da 5.933 ± 0.440 ve 5.014 ± 0.372 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.111 ± 0.203 ve 1.507 ± 0.111 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak ve derideki toplam miktar 7.044 ± 0.522 ve 6.521 ± 0.479 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tayin edildi. Tween 80 ile hazırlanan NLC'lerden deriye geçen ve burada biriken fluvastatin sodyum miktarı *stratum corneum*'da 8.791 ± 0.867 - 7.173 ± 0.878 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında, canlı epidermis+dermis tabakasında 1.227 ± 0.031 - 0.739 ± 0.045 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında ve derideki toplam miktar 9.871 ± 0.178 - 7.923 ± 0.787 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aralığında saptanırken, kontrol nanoemülsiyonları için bu değerler *stratum corneum*'da 3.719 ± 0.370 ve 3.516 ± 0.346 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak, canlı epidermis+dermis tabakasında 0.953 ± 0.160 ve 1.138 ± 0.016 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak ve derideki toplam miktar 4.671 ± 0.368 ve 4.654 ± 0.354 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak tayin edildi.

NLC'ler ile yapılan *in vitro* penetrasyon çalışmaları sonrası elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, katı lipit: sıvı lipit oranının ve sürfaktan miktarının FVS'nin *in vitro* dermal penetrasyonlarını etkilediği görüldü. FVS'nin dermal tabakalarda en yüksek birikimi katı lipit: sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu NLC'ler ile sağlandı. NLC'lerde kullanılan katı lipit oranının etkisini değerlendirmek amacıyla sırasıyla 50:50, 60:40 ve 70:30 katı lipit: sıvı lipit oranlarına sahip NLC-T20-1, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC'lerin dermal penetrasyonları karşılaştırıldı. NLC-T20-1, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC'lerin deride biriken toplam FVS miktarları sırasıyla $10.742 \pm 0.917 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10.334 \pm 0.428 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $8.749 \pm 0.886 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulundu. NLC-T20-1 ve NLC-T20-5 kodlu NLC'lerden FVS'nin *in vitro* penetrasyon miktarları benzer iken NLC-T20-9 kodlu NLC'den *in vitro* penetrasyon miktarı daha düşük bulundu. T80 ile hazırlanan NLC'ler incelendiğinde, NLC-T80-1, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu NLC'lerin deride biriken toplam FVS miktarları sırasıyla $9.871 \pm 0.178 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $9.529 \pm 0.866 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $7.923 \pm 0.787 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulundu. Sırasıyla 50:50, 60:40 ve 70:30 katı lipit:sıvı lipit oranlarına sahip NLC-T80-1, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu formülasyonlar ile de benzer sonuçlar elde edildi. Belli bir orandan sonra katı lipit miktarı arttıkça dermal penetrasyonun azaldığı görüldü.

Ayrıca, sürfaktan oranının etkisini değerlendirmek amacıyla katı lipit: sıvı lipit oranı 50:50 olan NLC-T20-1 ve NLC-T20-3 kodlu formülasyonlardan FVS'nin dermal birikimleri karşılaştırıldı ve deride biriken toplam FVS miktarları sırasıyla $10.742 \pm 0.917 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $7.415 \pm 0.625 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulundu. Tween 80 ile hazırlanan NLC-T80-1 ve NLC-T80-3 kodlu formülasyonlar ile de benzer sonuçlar alındı. Bu durumda, sürfaktan oranındaki artışın etkin maddenin dermal penetrasyonunda artışa sebep olduğu belirlendi.

Son olarak, seçilen her bir NLC'nin aynı sürfaktan bileşen ve oranlarına sahip ancak katı lipit içermeyen kontrol nanoemülsiyonları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde NLC'lere göre *in vitro* dermal penetrasyonlarının daha düşük olduğu saptandı. NLC'lerin daha yüksek penetrasyona sahip olmalarının içerdiği katı lipitten kaynaklanan oklüzyon etkisi ile ilgili olabileceği düşünüldü.

Infrared (IR) spektroskopisi derinin ve özellikle *stratum corneum*'un bariyer özelliğinin daha iyi anlaşılması için yaygın olarak kullanılan ve *stratum corneum* yapı ve dinamiğine yönelik önemli bulgular sağlayan hassas ve güvenilir bir biyofiziksel bir

tekniktir (Naik ve Guy 1997; Mendelsohn ve Moore 2000; Aqil ve ark. 2007). Seçilen fluvastatin sodyum yüklü NLC formülasyonları ve kontrol nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmasını takiben ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH₂ asimetrik (2920 cm⁻¹) ve CH₂ simetrik (2950 cm⁻¹) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-68'de, her bir formülasyon için alınan ATR-FTR spektrumları Şekil 4-78 ile Şekil 4-89 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum ise Şekil 4-90'de verildi.

Stratum corneum'un üzerinde gerçekleştirilen spektroskopik çalışmalarda en çok bilgi sağlayan lipit absorpsanları hidrofobik alkil zincirlerinden kaynaklananlardır. *Stratum corneum*'da yer alan hücrelerarası lipitlerin alkil zincir düzeninde sıcaklığa ya da formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin SC bileşenleri ile etkileşmesine bağlı olarak gerçekleşen bozulmalar, karbon-hidrojen (CH₂) asimetrik (2920 cm⁻¹) ve simetrik (2850 cm⁻¹) gerilme bantlarının dalga numaralarının daha yüksek değerlere kaymasına (blue shift) sebep olur (Harrison ve ark. 1996; Jadoul ve ark. 1996; Naik ve Guy. 1997; Stuart 2004).

Çalışmamızda kontrol derisinden alınan spektrumda asimetrik ve simetrik gerilme bantlarına ait dalga numaraları 2919.50±0.01 cm⁻¹ ve 2851.22± 0.02 cm⁻¹ olarak saptanmıştır, bu değerler lipit çifte tabakanın belli bir yapısal düzene sahip olduğunu göstermektedir (Harisson ve ark. 1996).

Tween 20 kullanılarak hazırlanan FVS yüklü NLC-T20-1, NLC-T20-3, NLC-T20-5 ve NLC-T20-9 kodlu NLC'lerin deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un CH₂ asimetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2918.30±0.37 cm⁻¹, 2914.72±0.14 cm⁻¹, 2915.25±0.26 cm⁻¹ ve 2914.14±0.09 cm⁻¹ olarak; CH₂ simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2850.79±0.77 cm⁻¹, 2848.97±0.35 cm⁻¹, 2849.45±0.52 cm⁻¹ ve 2848.89±0.46 cm⁻¹ olarak saptandı. Bu formülasyonların NE-T20-1 ve NE-T203 kodlu kontrol nanoemülsiyonları için *stratum corneum*'un CH₂ asimetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2922.70±0.36 cm⁻¹ ve 2923.04±0.21 cm⁻¹ olarak, CH₂ simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2852.60±0.12 cm⁻¹ ve 2852.79±0.01 cm⁻¹ olarak bulundu.

Tween 80 kullanılarak hazırlanan FVS yüklü NLC-T80-1, NLC-T80-3, NLC-T80-5 ve NLC-T80-9 kodlu NLC'lerin deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un

CH₂ asitmetik gerilme bantlarındaki değişimler sırasıyla 2915.19±0.53 cm⁻¹, 2914.57±0.12 cm⁻¹, 2914.95±0.07 cm⁻¹ ve 2915.19±0.15 cm⁻¹ olarak; CH₂ simetrik gerilme bantlarındaki değişimler sırasıyla 2849.47±0.37 cm⁻¹, 2849.07±0.32 cm⁻¹, 2849.18±0.09 cm⁻¹ ve 2849.41±0.07 cm⁻¹ olarak saptandı. Bu formülasyonların NE-T80-1 ve NE-T80-3 kodlu kontrol nanoemülsiyonları için *stratum corneum*'un CH₂ asitmetik gerilme bantlarının dalga numaraları 2923.41±0.24 cm⁻¹ ve 2922.61±0.34 cm⁻¹ olarak, CH₂ simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla 2852.79±0.01 cm⁻¹ ve 2852.43±0.21 cm⁻¹ olarak bulundu.

FVS yüklü Tween 20 içeren NLC'lerin, kontrol deriye göre asimetric ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla yaklaşık 1-5 cm⁻¹ aralığında ve 1-3 cm⁻¹ aralığında bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu NLC'lerin kontrol nanoemülsiyonları için asimetric ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında meydana gelen değişimler sırasıyla 3-4 cm⁻¹ aralığında ve 1 cm⁻¹'lik artış olarak saptandı. Tween 80 içeren NLC'lerin, kontrol deriye göre asimetric ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla yaklaşık 4-5 cm⁻¹ aralığında ve 2 cm⁻¹'lik bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu NLC'lerin kontrol nanoemülsiyonları için asimetric ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında meydana gelen değişimler ise sırasıyla 3-4 cm⁻¹ aralığında ve 1 cm⁻¹'lik artış olarak saptandı. NLC ve nanoemülsiyon formülasyonlarında yer alan yardımcı maddelerin *stratum corneum* bileşenleri ile etkileşmesine bağlı olarak deri lipidlerinin yapısal düzeninde değişiklik meydana geldiği gösterilmiştir. Bu durumun FVS'nin deriye penetrasyonunun ve birikiminin artmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar hazırladığımız lipid bazlı taşıyıcı sistemlerin yapısal özelliklerinin *stratum corneum* bariyerinin aşarak etkin maddenin deriye taşınmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.

Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM), deriye uygulanan floresan özellikte madde yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerin penetrasyon derinliği ve penetrasyon yolağı hakkında bilgi sağlar (Changez ve ark. 2006; Rossetti ve ark. 2013; Gürbüz ve ark. 2015). Deriye uygulanan formülasyonlardan fluvastatin sodyumun dermal tabakalardaki lokalizasyonu hakkında bilgi edinebilmek amacıyla CLSM analizleri gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu ile çalışıldı. Bu analiz için öncelikle etkin maddeye benzer lipofilik özelliğe sahip floresan model madde Nil kırmızı yüklü

(1 µg/mL) formülasyonlar hazırlandı. Kontrol olarak ise nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu kullanıldı. 24 saatlik *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası deri örneklerinin penetrasyon gerçekleşen bölgelerinden kriyotom cihazı kullanılarak 20 µm kalınlıkta yatay ve dikey kesitler alındı. Derinin *stratum corneum* yüzeyinden başlayarak yatay olarak alınan her kesit dikkatlice sayıldı ve uzaklaştırılan doku ile deride inilen derinlik saptandı. Lam üzerine alınan dikey ve yatay (20 µm, 160 µm ve 400 µm derinliklerdeki) deri kesitleri HeNe diode lazer içeren CLSM cihazı (Leica TCS SPE) ile incelenerek model boya nil kırmızısının derideki birikimi ve lokalizasyonu görüntüledi. Aynı formülasyonlar ile floresan mikroskop görüntüleme işlemi de yapıldı. NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu formülasyonlar ve bir adet kontrol formülasyonu olarak nil kırmızısının pH 7,4 PBS çözeltisindeki süspansiyonu ile gerçekleştirilen floresan mikroskop ve CLSM analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4-91 ile Şekil 4-99 aralığında sırasıyla verildi.

CLSM ve floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, nil kırmızısı yüklü transetozomlar ile tedavi edilen derilere ait floresan yoğunluklarının, PBS süspansiyonu uygulanan derilerden çok daha güçlü olduğu görüldü. Transetozomların uygulandığı deriden alınan yatay kesitler incelendiğinde; *stratum corneum* tabakasının sonlandığı derinlik olarak kabul edilen 20 µm’lik deri kesitlerinde nil kırmızısının varlığı görüldü. Bu tabakadan alınan kontrole ait görüntülerde ise nil kırmızısı floresan yoğunluğunun oldukça düşük olduğu belirlendi. Canlı epidermisin sonlandığı derinlik olarak düşünülen 160 µm’lik deri kesitlerinde her iki formülasyona ait CLSM görüntüleri incelendiğinde, nil kırmızısının varlığı bu tabakalarda da belirgindi. 400 µm derinlikten alınan deri kesitleri incelendiğinde ise nil kırmızısının kıl foliküllerinin etrafında lokalize olduğu tespit edildi. Ayrıca nil kırmızısının yoğunluğunun daha derin tabakalarda giderek azaldığı belirlendi. Ancak kontrole ait deri kesitleri incelendiğinde, nil kırmızısının derinin yüzeyinde kaldığı, 160 µm ve 400 µm derinliklerde nil kırmızısının bulunmadığı saptandı. Transetozomların uygulandığı deriden alınan dikey kesitler incelendiğinde, nil kırmızı yüklü transetozomların *stratum corneum*’u geçerek derinin daha derin tabakalarında kadar taşındığı gösterildi. Kontrol süspansiyonuna ait görüntüler incelendiğinde, nil kırmızısının derinin yüzeyinde kaldığı ve canlı epidermis ve dermiş tabalarına ulaşmadığı saptandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, transetozomların *stratum corneum* bariyerini geçerek etkin maddenin hedef bölgeye taşınmasında etkili

bir taşıyıcı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu veriler *in vitro* penetrasyon ve ATR-FTIR çalışmalarından alınan sonuçları destekler niteliktedir.

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası dermal tabakalarda en yüksek birikim sağlayan NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu NLC formülasyonları ile *in vitro* sitotoksosite çalışmaları ve devamında *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmaları sırasında NLC-T20-1 ve NLC-T80-1 kodlu formülasyonlar sırasıyla NLC-T20 ve NLC-T80 olarak kodlanarak çalışmalara devam edildi.

Sulforhodamin B (SRB) testi, 1990'da Skehan ve arkadaşları tarafından hücre bazlı çalışmalarda sistotoksositeyi incelemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Negatif yüklü pembe aminoksantin boyası olan Sulforhodamin B (SRB)'nin hücrelerde bazik amino asitler tarafından alınmasına dayanır. Hücre protein içeriğinin ölçümüne dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılır (Skehan ve ark., 1990; Houghton ve ark. 2007; Vichai ve Kirtikara 2006).

NLC formülasyonlarının sitotoksik potansiyelleri normal insan akciğer dokusundan izole edilen normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) (CCL-186, ATCC, USA) ve insan deri dokusundan izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (T0020001, AddexBio, USA) kullanılarak SRB yöntemi ile değerlendirildi. Hücre büyüme kontrolü olarak besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak Triton X-100 (Sigma-Aldrich) kullanıldı. HaCaT hücre hattı ile gerçekleştirilen çalışmalarda sitotoksik potansiyelin değerlendirilmesinin yanı sıra *in vitro* antipsoriatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ile IL-17A (Recombinant Human IL-17A, Peprotech) ve serbest fluvastatin sodyumun sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi de amaçlandı.

Normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksosite çalışması sonucunda boş NLC formülasyonları ve kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-69'da, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafik Şekil 4-100'de verildi. Etkin madde içermeyen NLC formülasyonlarının konsantrasyonları içerdikleri toplam sıvı ve katı formülasyon bileşenlerinin miktarı üzerinden hesaplandı.

Boş NLC-T20 ve NLC-T80 kodlu formülasyonlar 24.38 µg/mL, 12.19 µg/mL, 6.10 µg/mL, 3.48 µg/mL ve 2.44 µg/mL konsantrasyonlarda IMR-90 hücre hattına 48 saat süre ile uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri NLC-T20 için sırasıyla %90.58±5.36, %93.49±6.31, %106.66±1.81, %113.84±17.36 ve %113.33±16.64 olarak; NLC-T80 için sırasıyla %61.45±4.15, %68.43±6.98, %109.65±1.93, %111.31±13.46 ve 120.18±27.59 olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 12.5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücre canlılığı yüzdesi değerleri sırasıyla %8.17±0.94, %30.89±1.13, %54.52±3.47 ve %73.93±10.58 olarak saptandı. NLC'lerin ve kontrol Triton X-100'ün hücrelere uygulanan konsantrasyonları kıyaslandığında, özellikle 12.5 µg/mL'lik konsantrasyonları için NLC'ler ile daha yüksek hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir. Bu çalışma ile, NLC-T20 ve NLC-80 kodlu transetozomların sitotoksik açıdan güvenli olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar hazırlanan transetozomların deri tarafından kontrole kıyasla daha iyi tolere edilebilecekleri şeklinde yorumlanmıştır.

İnsan keratinosit hücre hattı (HaCaT) kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite çalışması sonucunda boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları, kontrol olarak kullanılan Triton X-100 ve serbest FVS'nin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile elde edilen % canlılık değerleri Tablo 4-70'de, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-101 ve Şekil 4-102'de verildi. Etkin madde içermeyen NLC formülasyonlarının konsantrasyonları içerdikleri toplam sıvı ve katı bileşenlerin miktarı üzerinden, etkin madde yüklü NLC konsantrasyonları ise içerdikleri FVS miktarı üzerinden hesaplandı.

Boş NLC-T20 ve NLC-T80 kodlu formülasyonlar, 101.59 µg/mL, 40.63 µg/mL, 20.32 µg/mL, 10.16 µg/mL ve 5.08 µg/mL konsantrasyonlarda HaCaT hücre hattına 48 saat süre ile uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri NLC-T20 için sırasıyla %34.94±11.51, %57.15±6.17, %96.54±4.20, %96.81±1.32 ve %102.91±1.38 olarak; NLC-T80 için sırasıyla %48.01±25.42, %62.86±2.43, %83.64±9.21, %98.04±5.45 ve %101.59±1.79 olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100'ün 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücre canlılığı yüzdesi değeri %55.73±11.62 olarak saptandı. NLC-T20 ve NLC-T80 (101.59 µg/ml)

ile Triton X-100 (100 µg/ml) 'ün uygulanan en yüksek konsantrasyonu kıyaslandığında HaCaT hücrelerinin hücre canlılığını değerlerinin her üçü içinde < %50 olduğu saptandı ve NLC'ler ile daha düşük hücre canlılığı değerleri elde edildi. Ayrıca, normal insan akciğer dokusundan izole edilen normal insan fibroblast hücre hattı (IMR-90) ile yapılan sitotoksikite çalışmasına kıyasla insan deri dokusundan izole edilen ve *in vitro* ortamda transforme edilen insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) ile daha yüksek hücre canlılığı değerleri elde edildi.

Etkin madde yüklü NLC-T20-FVS ve NLC-T80-FVS kodlu NLC formülasyonlarının ve serbest FVS'nin *in vitro* sitotoksik potansiyelleri HaCaT hücre hattı kullanılarak SRB yöntemi ile incelendi. Ayrıca, *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları öncesi hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü transetozom formülasyonları ve serbest FVS'nin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amaçlandı. 1.92 µM, 1.15 µM, 0.77 µM, 0.38 µM ve 0.1 µM konsantrasyonlarda FVS ile 1.92 µM, 0.77 µM, 0.38 µM, 0.19 µM ve 0.1 µM konsantrasyonlarda FVS yüklü transetozom formülasyonları 48 saat süre ile hücrelere uygulandı. SRB yöntemi ile hücre canlılığı yüzdesi değerleri hesaplandı. Uygulanan her bir konsantrasyona karşılık gelen yüzde canlılık değerleri serbest fluvastatin sodyum için sırasıyla %99.98±0.49, %101.18±6.21, %105.16±2.88, %104.51±0.25 ve %106.53±1.47 olarak; NLC-T20-FVS için sırasıyla %36.43±15.88, %75.72±1.43, %97.01±13.21, %105.63±0.49 ve %108.10±1.70 olarak ve NLC-T80-FVS için ise sırasıyla %34.88±15.71, %64.06±10.43, %77.11±3.16, %99.91±0.51 ve %98.24±1.22 olarak hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda *in vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmalarında kullanılacak etkin madde yüklü NLC formülasyonunun konsantrasyonu 0.2 µM olarak belirlendi. Boş formülasyonlar da etkin madde yüklü formülasyonlar ile aynı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilti. Serbest fluvastatin sodyum miktarı 0.2 µM olarak belirlendi ve IL-17A'nın literatürde yer alan 200 ng/mL konsantrasyonda (Chen ve ark. 2021) kullanılmasına karar verildi.

Psoriasis IL-17A aracılı inflamatuvar bir deri hastalığıdır (Furue ve ark. 2019). IL-17A keratinosit hiperproliferasyonu indükler ve keratinositlerin proinflamatuvar sitokinler ve nötrofil mobilize edici kemokinler (IL-6, IL-8) üretmesine neden olur (Chen ve ark. 2021). *In vitro* antipsoriyatik aktivite çalışmaları psöriyatik epidermal keratinositlerin hiperproliferatif ve bozulmuş farklılaşmasını taklit eden bir hücre hattı

olan insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) (Breitkreutz ve ark. 1991) kullanılarak gerçekleştirildi. NLC formülasyonlarının *in vitro* antipsöriyatik etkinlikleri; IL-17A ile indüklenmiş keratinosit hücrelerinden hücre kültür ortamına salınan proenflamatuvar sitokin (IL-6 ve IL-8) miktarının ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi ile değerlendirildi.

In vitro sitotoksite çalışması sonucu *in vitro* antipsöriyatik aktivite çalışmasında hücrelere uygulanacak boş ve etkin madde yüklü NLC formülasyonları ile IL-17A ve serbest FVS'nin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının belirlendi. Hücrelere serbest fluvastatin sodyum miktarı 0.2 μ M konsantrasyonda uygulandı. 0.2 μ M fluvastatin sodyum içeren transetozomlar ve aynı seyreltme oranına sahip boş transetozomlar hücrelere verildi. IL-17A konsantrasyonu 200 ng/mL konsantrasyonda kullanıldı. Bu konsantrasyonlar kullanılarak *in vitro* antipsöriyatik aktivite çalışmaları gerçekleştirildi.

Antipsöriyatik aktivitenin değerlendirilmesi kapsamında; IL-17A, serbest haldeki FVS ve boş ve etkin madde yüklü NLC'ler tek başına hücrelere uygulandı ve uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla sitokin salımı üzerine etkileri incelendi. Aynı zamanda IL-17A ile sitokin salımı uyarılmış hücrelere serbest haldeki FVS, boş ve etkin madde yüklü NLC'ler ayrı ayrı uygulanarak antipsöriyatik aktiviteleri değerlendirildi. Hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarları sırasıyla Tablo 4-71'te ve Tablo 4-72'de, bu bulgulara ait karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4-103 ve Şekil 4-104'te verildi.

Hücre kültür ortamlarında analiz edilen IL-6 miktarları uygulama yapılmamış hücreler için 15.03 ± 0.02 pg/mL, serbest FVS (0.2 μ M) için 11.92 ± 0.01 pg/mL, IL-17A stimülasyonu sonrası 22.95 ± 0.02 pg/mL ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere FVS uygulaması sonrası 17.43 ± 0.01 pg/mL olarak saptandı. Boş ve etkin madde yüklü NLC'ler tek başına ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere uygulanarak IL-6 salımı üzerine etkileri incelendi. NLC-T20, NLC-T20-FVS, NLC-T80 ve NLC-T80-FVS kodlu NLC'lerin hücrelere tek başına uygulanması sonrası analiz edilen IL-6 miktarları sırasıyla 8.14 ± 0.03 pg/mL, 8.24 ± 0.01 pg/mL, 7.15 ± 0.01 pg/mL ve 5.22 ± 0.01 pg/mL olarak bulundu. IL-17A ile uyarılmış hücrelere NLC-T20, NLC-T20-FVS, NLC-T80 ve NLC-T80-FVS kodlu NLC'lerin uygulanması sonrası hücre kültür ortamına salınan IL-

6 miktarları sırasıyla 13.09 ± 0.01 pg/mL, 11.96 ± 0.07 pg/mL, 10.17 ± 0.02 pg/mL ve 10.45 ± 0.02 pg/mL olarak saptandı.

Hücre kültür ortamlarında analiz edilen IL-8 miktarları uygulama yapılmamış hücreler için 421.61 ± 39.90 pg/mL, serbest FVS ($0.2 \mu\text{M}$) için 414.91 ± 20.08 pg/mL, IL-17A stimülasyonu sonrası 461.43 ± 3.79 pg/mL ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere FVS uygulaması sonrası 410.18 ± 8.84 pg/mL olarak saptandı. Boş ve etkin madde yüklü NLC'ler tek başına ve IL-17A ile uyarılmış hücrelere uygulanarak IL-8 salımı üzerine etkileri incelendi. NLC-T20, NLC-T20-FVS, NLC-T80 ve NLC-T80-FVS kodlu NLC'lerin hücrelere tek başına uygulanması sonrası analiz edilen IL-8 miktarları sırasıyla 363.04 ± 22.98 pg/mL, 343.04 ± 13.13 pg/mL, 368.93 ± 30.81 pg/mL ve 365.09 ± 0.88 pg/mL olarak bulundu. IL-17A ile uyarılmış hücrelere NLC-T20, NLC-T20-FVS, NLC-T80 ve NLC-T80-FVS kodlu transetozomların uygulanması sonrası hücre kültür ortamına salınan IL-8 miktarları sırasıyla 410.09 ± 5.43 pg/mL, 330.36 ± 1.52 pg/mL, 369.82 ± 11.11 pg/mL ve 321.43 ± 42.17 pg/mL olarak saptandı.

Çalışmamızda uygulama yapılmamış hücrelerin herhangi bir stimülasyon olmaksızın IL-6 ve IL-8 salgıladığı saptandı. Bununla birlikte, IL-17A uyarımı ile hücre kültür ortamına salınan IL-6 ve IL-8 miktarının beklendiği üzere arttığı görüldü. Serbest fluvastatin sodyumun tek başına uygulaması sonrası uygulama yapılmamış hücre ile karşılaştırıldığında IL-6 ve IL-8 salımının azaldığı gösterildi. IL-17A ile uyarılmış hücrelere FVS uygulaması sonrası IL-6 ve IL-8 miktarlarının önemli ölçüde azaldığı saptandı.

Boş NLC'ler NLC-T20 ve NLC-T80 uygulama yapılmamış hücreler ile kıyaslandığında IL-6 salımını anlamlı oranda inhibe ettiği gösterildi. Ancak bu değer tek başına FVS ($0.2 \mu\text{M}$) uygulaması sonrası elde edilen IL-6 miktarından daha düşük bulundu. Aynı şekilde boş NLC'lerin uygulanması ile uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla IL-8 salımı önemli oranda inhibe edildi. Ancak bu değer de tek başına FVS ($0.2 \mu\text{M}$) uygulaması sonrası elde edilen IL-8 miktarından daha düşük olduğu saptandı. FVS yüklü NLC'ler NLC-T20-FVS ve NLC-T80-FVS ile tedavi edilmiş hücreler serbest FVS'den daha düşük IL-6 ve IL-8 salımı gösterdi. Ancak bu değerler ve boş NLC'ler ile elde edilen değerler kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

IL-17A ile uyarılmış hücrelere boş NLC'ler uygulandığında, Hem TEZ-T20 hem de TEZ-T80 ile IL-6 ve IL-8 salımında anlamlı bir azalma gözlemlendi. FVS yüklü

NLC'lerin uyarılmış hücrelerin IL-6 ve IL-8 salımı üzerine etkileri incelendiğinde, her iki NLC'nin de IL-6 ve IL-8 salımı üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğu görüldü. Ancak uyarılmış hücrelere uygulanan boş ve FVS yüklü NLC'ler IL-6 ve IL-8 salımını serbest FVS'den daha fazla düşürdüğü gözlemlendi. Ayrıca boş ve FVS yüklü NLC'lerin IL-6 ve IL-8 salımı kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde; boş NLC'lerin IL-6 ve IL-8 salımını serbest FVS'ye kıyasla daha fazla düşürmesi NLC'lerin FVS'nin antipsoriatik aktivitesini iyileştirip iyileştiremeyeğine yönelik yorum yapmamızı engellemektedir. Doğru bir değerlendirme yapabilmek için, antipsoriatik aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak arttığı transetozomlar ile yapılan çalışmada gösterilen FVS'nin daha yüksek konsantrasyonları kullanılmalıdır. Ancak bu kez de taşıyıcı sistemin daha yüksek konsantrasyonlarında hücre canlılığı yüzde yüzün altına düştüğünden değerlendirme yapmak mümkün olmayacaktır. Bu nedenle taşıyıcı sistemin etkinliğini *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile doğrulayabilmek için ilacın NLC'lere daha yüksek konsantrasyonlarda yüklenmesi gerekmektedir. Ancak NLC sistemlerin *stratum corneum*'u aşarak hedef bölgeye ulaşan ilaç miktarını ve etkinliğini daha da arttıracak *in vitro* penetrasyon, ATR-FTIR ve CLSM çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu nedenle ilerleyen aşamalarda yapılacak *in vivo* çalışmalar ile de antipsoriatik aktivitenin doğrulanabilmesi mümkündür.

5.5. Transetozomal jel ve NLC jel Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

FVS yüklü veziküler ve lipit bazlı taşıyıcı sistemlerin topikal uygulanması için konvansiyonel bir formülasyon içine dahil edilmesi düşünüldü ve jel sistemi ile kombine edilmesine karar verildi. Transetozom ve NLC formülasyonlarından FVS'nin *in vitro* deriye penetrasyonu çalışması sonrası dermal tabakalarda en yüksek birikimini sağlayan ikişer adet formülasyon seçildi ve bu iki farklı nanotaşıyıcı sistemi içeren jel formülasyonları hazırlandı. Hazırlanan formülasyonların önce karakterizasyon çalışmaları daha sonra da sırasıyla *in vitro* dermal penetrasyon ve ATR-FTIR analizleri gerçekleştirildi.

Transetozom ve NLC formülasyonlarının jel sistemlerinin hazırlanabilmesi için farklı jelleştirme ajanları kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Kullanılacak jelleştirici ajan, hazırladığımız formülasyonların pH'sında (yaklaşık 3-3,5 arası değişen) stabil olma ve yine bu pH'da jel oluşturabilme özelliğine sahip olma durumları göz önüne

alınarak seçildi. Yapılan ön denemelerde çeşitli jelleştirici ajanlar (sodyum aljinat, HPMC, HPC, ksantan zımkı, pluronic vb.) incelendi ve ksantan zımkı ile çalışılmasına karar verildi.

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonları hazırlanırken ilk olarak transetozom ve NLC dispersiyonları hesaplı miktarda tartıldı. Daha sonra üzerine jelleştirici ajan ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde düşük devirde karıştırılarak bir gece oda sıcaklığında şişmesi sağlandı. Farklı oranlarda jelleştirici ajan içeren sistemler hazırlandı. Hazırlanan jel sistemlerin uygunluğu organoleptik olarak değerlendirildi ve yüzde % 2,5 (a/h) oranında ksantan zımkı kullanılmasına karar verildi. Hazırlanan jel sistemlerin fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Karakterizasyon alışmaları kapsamında pH ölçümleri yapıldı, reolojik özellikleri ve mekanik özellikleri incelendi.

Deri yüzeyinin asidik pH'sı *stratum corneum* homeostazının ve permeabilite bariyerinin korunması için düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmiştir. Deriye uygulanacak formülasyonların pH değerleri uygulanabilirlik açısından mutlaka değerlendirilmelidir. 3-10 arasında değişen pH değerlerinin deri tarafından tolere edilebildiği bildirilmiştir (Sznitowska ve ark. 2001; Hanson ve ark. 2002; Ge ve ark. 2014; Luki'c ve ark. 2021). Deri pH'sı *stratum corneum* homeostazı ve kütanöz bariyer üzerinde etkilidir (Luki'c ve ark. 2021). Bu bariyer yapının bozulması deri pH'sında artışa sebep olur. Psoriasisli deri bölgelerinin yüzey pH değerlerinin sağlıklı deriden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Ye ve ark. 2014). FVS yüklü transetozomal jel ve NLC jel formülasyonlarının pH değerlerine ait bulgular Tablo 4-73'te gösterildi. TEZ-T20-4 jel ve TEZ-T80-4 jel kodlu transetozomal jel formülasyonlarının pH değerleri sırasıyla 4.10 ± 0.01 ve 4.11 ± 0.01 olarak bulundu. NLC-T20-1 jel ve NLC-T80-1 jel kodlu NLC jel formülasyonlarının pH değerleri sırasıyla 3.60 ± 0.01 ve 3.55 ± 0.02 olarak saptandı. Hazırlanan tüm formülasyonların pH değerleri derinin tolere edebileceği aralıkta olduğu görüldü ve normal deriden daha yüksek pH'ya sahip psoratik deri yüzeyine uygulanacağı düşünülerek bu değerlerin kabul edilebilir olduğu sonucuna varıldı.

Jel sistemlerinin akış özelliklerinin incelenmesi kayma gerilimi ve kayma hızı testleri ile incelenlendi. Değişen kayma hızına (τ) karşı ölçülen kayma gerilimi ($\dot{\gamma}$) ve viskozite (η) değerlerine ait grafikler şekil 4-105 ile şekil 4-108 aralığında,

formülasyonlara ait farklı akış modelleri için hesaplanan değerler Tablo 4-74’de verildi. Formülasyonların hangi akış modeline uygun davrandığı tespit edildi. Hazırlanan sistemlerin psödoplastik akış özelliğine sahip olduğu görüldü. Farklı akış modelleri için yapılan hesaplamalar sonucunda jel formülasyonlarının kayma ile incelen (*shear thinning*) ve kayma hızı artışıyla azalan viskoziteyi tanımlayan Herschel-Bulkley modeline uygun olduğu gösterildi (Mezger 2006; Pang ve ark. 2020). Jel sistemlerinin viskoelastik özelliklerinin incelenmesi kapsamında iki aşamalı osilasyon testleri gerçekleştirildi. İlk olarak genlik taraması yapılarak linear viskoelastik bölge belirlendi. Kayma gerilimi genliği testi yapıldı ve linear viskoelastik bölgede seçilen bir genlik değeri kullanılarak çalışmanın ikinci kısmı olan frekans taraması testi gerçekleştirildi. Osilasyon testine ait grafikler Şekil 4-109 ile Şekil 4-112 aralığında gösterildi. Formülasyonlar için G' (elastik modül), G'' (viskoz modül) ve $\tan\delta$ (G''/G') değerleri hesaplandı ve Tablo 4-75’te verildi. $G' > G''$ olduğu ve $\tan\delta < 1$ olduğu belirlendi. Formülasyonların viskoelastik yarı katı özellik gösterdiği doğrulandı (Mezger 2006; Dong ve ark. 2015).

Jel sistemlerinin mekanik özellikleri (adezyon, kohezyon, sertlik ve sıkıştırılabilirlik) Brookfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak incelendi. Güç-zaman eğrisi yoluyla jellerin sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği ve kohezifliği hesaplandı. Formülasyonlara ait TPA grafikleri Şekil 4-113 ile Şekil 4-116 aralığında, güç-zaman eğrisi yoluyla hesaplanan jellerin sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği ve kohezifliğine ait değerler Tablo 4-76’de gösterildi. Jel formülasyonlarının yayılabilirliği Brookfield CT3 doku analizi test cihazı kullanılarak ölçüldü. Güç-zaman eğrisi yoluyla jellerin yayılabilirliği hesaplandı. Yayılabilirlik değerlerine ait bulgular Tablo 4-77’te verildi. Hem transetozomal jellerin hem de NLC’lerin benzer mekanik özelliklere ve yayılma özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. Formülasyonların uygulama bölgesinde kalış süreni artıracığı, uygulama bölgesinde kolaylıkla yayılabileceği ve topikal uygulama için uygun oldukları sonucuna varılmıştır.

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının *in vitro* penetrasyon çalışmaları ve dermal tabakarda etkin madde miktar tayini analizleri Yöntem 3.2.5.6’de anlatıldığı şekilde çalışılarak incelendi. Çalışma transetozomlarda ve NLC’ler de olduğu gibi oklüzif olmayan koşullar altında gerçekleştirildi. Dermal tabakalarda ve deride biriken FVS miktarları Tablo 4-78’de, deriye penetrasyonun karşılaştırmalı grafiği Şekil

4-117'te gösterildi. TEZ-T20-4 jel ve TEZ-T80-4 jel kodlu transetozomal jel formülasyonlarından *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* tabakasında biriken FVS miktarları sırasıyla $0.607 \pm 0.252 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0.665 \pm 0.406 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında biriken miktarlar sırasıyla $0.146 \pm 0.012 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0.209 \pm 0.117 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve deride biriken toplam miktarlar sırasıyla $0.753 \pm 0.264 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0.875 \pm 0.435 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulundu. NLC-T20-1 jel ve NLC-T80-1 jel kodlu NLC jel formülasyonlarından *in vitro* penetrasyon çalışması sonrası *stratum corneum* tabakasında biriken FVS miktarları sırasıyla $0.768 \pm 0.147 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0.954 \pm 0.358 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, canlı epidermis+dermis tabakasında biriken miktarlar sırasıyla $0.365 \pm 0.059 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0.348 \pm 0.071 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve deride biriken toplam miktarlar sırasıyla $1.134 \pm 0.206 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $1.302 \pm 0.402 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulundu.

Nanotaşıyıcı sistemleri içeren jel formülasyonlarının ATR-FTIR analizi ile deri lipitleri üzerine etkileri Yöntem 3.2.5.7'de anlatıldığı şekilde çalışılarak değerlendirildi. Formülasyonların deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinden kaynaklı CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) ve CH_2 simetrik (2950 cm^{-1}) gerilme bantlarındaki değişimler Tablo 4-75'de, her bir formülasyon için alınan ATR-FTR spektrumları Şekil 4-118 ile Şekil 4-121 aralığında sırasıyla gösterildi. Kontrol derisinden alınan spektrum Şekil 4-122'de ve plasebo jel formülasyonu uygulanan deriden alınan spektrum ise Şekil 4-123'da verildi.

Çalışmamızda kontrol derisinden alınan spektrumda asimetrik ve simetrik gerilme bantlarına ait dalga numaraları $2919.50 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ ve $2851.22 \pm 0.02 \text{ cm}^{-1}$ olarak saptandı, bu değerler lipit çifte tabakanın belli bir yapısal düzene sahip olduğunu göstermektedir (Harisson ve ark. 1996). TEZ-T20-4 jel ve TEZ-T80-4 jel formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un CH_2 asimetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla $2922.57 \pm 0.36 \text{ cm}^{-1}$ ve $2922.16 \pm 0.07 \text{ cm}^{-1}$ olarak ve CH_2 simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla $2852.72 \pm 0.02 \text{ cm}^{-1}$ ve $2852.72 \pm 0.02 \text{ cm}^{-1}$ olarak saptandı.

NLC-T20-1 jel ve NLC-T80-1 jel formülasyonlarının deriye uygulanması sonrası *stratum corneum*'un CH_2 asimetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla $2918.30 \pm 0.03 \text{ cm}^{-1}$ ve $2920.23 \pm 0.07 \text{ cm}^{-1}$ olarak ve CH_2 simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları sırasıyla $2850.79 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ ve $2850.79 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ olarak saptandı. Plasebo jel formülasyonu hazırlandı ve deriye uygulanması sonrası *stratum*

corneum'un CH₂ asitmetik gerilme bantlarının dalga numaraları $2920.23 \pm 0.68 \text{ cm}^{-1}$ olarak ve CH₂ simetrik gerilme bantlarının dalga numaraları $2850.79 \pm 0.57 \text{ cm}^{-1}$ olarak saptandı. FVS yüklü transetozomal jellerin kontrol deriye göre asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla yaklaşık 3 cm^{-1} 'lik ve 1 cm^{-1} 'lik bir artışa neden olduğu belirlendi. FVS yüklü NLC-T20-1 jel kodlu formülasyonun deriye uygulanması sonrası *stratum corneum* asitmetik ve simetrik gerilme bantlarında 1'er cm^{-1} 'lik bir azalma, NLC-T80-1 jel kodlu formülasyon ile asitmetik gerilme bandında 1 cm^{-1} 'lik artış ve simetrik gerilme bandında 1 cm^{-1} 'lik azalma olduğu belirlendi. Plasebo jel ile ise asitmetik gerime bandında cm^{-1} 'lik bir azalma, NLC-T80-1 jel kodlu formülasyon ile asitmetik gerilme bandında 1 cm^{-1} 'lik artış ve simetrik gerilme bandında 1 cm^{-1} 'lik azalma olduğu saptandı. NLC-T80-1 jel formülasyonu plasebo jel ile benzer etkiler göstermiştir. Plasebo jellerin de kontrol deriye göre asimetrik ve simetrik gerilme bantlarında değişim meydana getirdiği görülmüştür. Transetozomal jeller ve NLC jel formülasyonlarında yer alan yardımcı maddelerin *stratum corneum* bileşenleri ile etkileşmesine bağlı olarak deri lipidlerinin yapısal düzeninde değişiklik meydana geldiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak psoriasis tedavisindeki etkinliği *in vitro* hücre çalışmaları ile kanıtlanmış, deri ile uyumlu, stabil ve etkin maddenin derideki hedef bölgede lokalizasyonunu sağlayarak etkinliğini arttıran fluvastatin sodyum yüklü yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Abdulbaqi, I. M., Darwis, Y., Khan, N.A.K., Assi, R.A. ve Khan, A.A. (2016). Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 2279-2304.

Abdulbaqi, I.M., Darwis, Y., Assi, R.A. ve Khan, N.A.K. (2018). Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: Statistical optimization, characterization, and ex vivo evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*, **12**, 795-813.

Aburahma, M.H. ve Badr-Eldin, S.M. (2014). Compritol 888 ATO: A multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**, 1865-1883.

Agrawal, U., Gupta, M. ve Vyas S.P. (2015). Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, **43**, 33-39.

Ahad, A., Aqil, M., Kohli, K., Sultana, Y., Mujeeb, M., Ali, M. (2012). Formulation and optimization of nanotransfersomes using experimental design technique for accentuated transdermal delivery of valsartan. *Nanomedicine*, **8**, 237-249.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y. ve ark. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8**, 1-9.

Akhtar, N. ve Pathak, K. (2012). Cavamax W7 composite ethosomal gel of clotrimazole for improved topical delivery: Development and comparison with ethosomal gel. *AAPS PharmSciTech*, **13**, 344-355.

Akram, M.W., Jamshaid, H., Rehman, F.U., Zaeem, M., Khan, J.Z. ve Zeb, A. (2021). Transfersomes: A revolutionary nanosystem for efficient transdermal drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, **23**, 1-18.

Almeida, B., Nag, O.K., Rogers, K.E. ve Delehanty, J.B. (2020). Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery. *Molecules*, **25**, 1-28.

Almutawa F, Thalib L, Hekman D, Sun Q, Hamzavi I, Lim HW. (2015). Efficacy of localized phototherapy and photodynamic therapy for psoriasis: a systematic review and meta-analysis, *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 31, 5-14.

Andrade, L.M., Silva, L.A.D., Krawczyk-Santos, A.P., Amorim, I.C.S.M., Rocha, P.B.R., Lima, E.M., ve ark. (2017). Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: Study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **199**, 142-149.

Aqil, M., Ahad, A., Sultana, Y. ve Ali, A. (2007). Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today*, **12**, 1061-1067.

Armstrong, A.W. ve Read, C. (2020). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *Journal of the American Medical Association*, 323, 1945-1960.

Arora, R., Katiyar, S.S., Kushwah, V. ve Jain, S. (2017). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carrier-based nanotherapeutics in treatment of psoriasis: a comparative study. *Expert Opinion On Drug Delivery*, **14**, 165-177.

Asberg, A. ve Holdaas, H. (2004). Fluvastatin and fluvastatin extended release: A clinical and safety profile. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, **2**, 641-652.

Ascenso, A., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Praça, F.G., Bentley, M.V.L.B. ve Simões S. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, **18**, 454-468.

Babaei, S., Ghanbarzadeh, S., Adib, Z.M., Kouhsoltani, M., Davaran, S. ve Hamishehkar, H. (2016). Enhanced skin penetration of lidocaine through encapsulation into nanoethosomes and nanostructured lipid carriers: A comparative study. *Die Pharmazie*, **71**, 247-251.

Bal, S.M., Hortensius, S., Ding, Z., Jiskoot, W. ve Bouwstra, J.A. (2011). Co-Encapsulation of antigen and Toll-like Receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine*, **29**, 1045–1052.

- Barry, B.W. (2006). Penetration Enhancer Classification. İçinde E.W. Smith ve H.I. Maibach (Ed.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, Roca Raton, London, New York: CRS Press, Taylor & Francis; 3-15.
- Beckenbach, L., Baron, J.M., Merk, H.F., Löffler, H. ve Amann, P.M. (2015). Retinoid treatment of skin diseases. *European Journal of Dermatology*, **25**, 384-391.
- Benítez, J.M. ve Montáns, F.J. (2017). The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Computers & Structures*, **190**, 75-107.
- Benson, H.A.E. (2012). Skin Structure, Function, and Permeation. İçinde H.A.E. Benson and A.C. Watkinson (Ed.), *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons; 3-22.
- Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R. ve Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, **31**, 55-68.
- Bhise, K., Kashaw, S.K., Sau, S. ve Iyer, A.K. (2017). Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach. *International Journal of Pharmaceutics*, **526**, 506-515.
- Bikkad, M.L., Nathani, A.H., Mandlik, S.K., Shrotriya, S.N. ve Ranpise, N.S. (2014). Halobetasol propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *Journal of Liposome Research*, **24**, 113-123.
- Bikkad, M.L., Nathani, A.H., Mandlik, S.K., Shrotriya, S.N. ve Ranpise, N.S. (2014). Halobetasol Propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *Journal of Liposome Research*, **24**, 113-123.
- Blakely K, Gooderham M. (2016). Management of scalp psoriasis: current perspectives. *Psoriasis: targets and therapy*, **6**, 33-40.
- Blatteis, C.M. (2012). Age-dependent changes in temperature regulation - a mini review. *Gerontology*, **58**, 289-295.
- Boehncke, W.H. ve Schön, M.P. (2015). Psoriasis. *Lancet*, **386**, 983-994.
- Borges, A., Freitas, V., Mateus, N., Fernandes, I. ve Oliveira, J. (2020). Solid lipid nanoparticles as carriers of natural phenolic compounds. *Antioxidants*, **9**, 1-24.

- Borgmann, S.H.M., Bernardi, L.S., Rauber, G.S., Oliveira, P.R., Campos, C.E.M., Monti, G. ve ark. (2013). Solid-state characterization and dissolution properties of Fluvastatin sodium salt hydrates. *Pharmaceutical Development and Technology*, **18**, 525-534.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. ve Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, **280**, 241-251.
- Bozzuto, G. ve Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, **10**, 975-999.
- Brauchli, Y.B., Jick, S.S. ve Meier, C.R. (2011). Statin use and risk of first-time psoriasis diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **65**, 77-83.
- Breitkreutz, D., Boukamp, P., Ryle, C.M., Stark, H.J., Roop, D.R. ve Fusenig, N.E. (1991). Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. *Cancer Research*, **51**, 4402-4409.
- Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S.A. ve Akomeah, F.K. (2006). Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects. *Drug Delivery*, **13**, 175-187.
- Burton, R.F. (2008). Estimating body surface area from mass and height: theory and the formula of Du Bois and Du Bois. *Annals of Human Biology*, **35**, 170-184.
- Cai, Y. ve Zhao, F. (2021). Fluvastatin suppresses the proliferation, invasion, and migration and promotes the apoptosis of endometrial cancer cells by upregulating Sirtuin 6 (SIRT6). *Bioengineered*, **12**, 12509-12520.
- Carrascosa, J.M., Vanaclocha, F., Borrego, L., Fernández-López, E., Fuertes, A., Rodríguez-Fernández-Freire, L. ve ark. (2009). Update of the topical treatment of psoriasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, **100**, 190-200.
- Cattani, V.B., Fiel, L.A., Jäger, A., Jäger, E., Colomé, L.M., Uchoa, F. ve ark. (2010). Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **39**, 116–124.

Celia, C., Cilurzo, F. ve Trapasso, E. (2012). Ethosomes® and Transfersomes® containing linoleic acid: Physicochemical and technological features of topical drug delivery carriers for the potential treatment of melasma disorders. *Biomedical Microdevices*, **14**, 119–130.

Cevc, G. (1996). Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, **13**, 257-388.

Cevc, G. ve Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et biophysica acta*, **1104**, 226-232.

Cevc, G. ve Blume, G. (2001). New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1514**, 191–205.

Cevc, G., Schätzlein, A. ve Richardsen, H. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1564**, 21-30.

Changez, M., Chander, J. ve Dinda, A.K. (2006). Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **48**, 58-66.

Chen, H.L., Chiang, P.C., Lo, C.H., Lo, Y.H., Hsu, D.K., Chen, H.Y., Liu, F.T. (2016). Galectin-7 regulates keratinocyte proliferation and differentiation through JNK-miR-203-p63 signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*, **136**, 182-191.

Chen, H.L., Lo, C.H., Huang, C.C., Lu, M.P., Hu, P.Y., Chen, C.S., Chueh, D.Y. ve ark. (2021). Galectin-7 downregulation in lesional keratinocytes contributes to enhanced IL-17A signaling and skin pathology in psoriasis. *The Journal of Clinical Investigation*, **131**, 1-13.

Choi, M.J. ve Maibach, H.I. (2005). Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacology and Physiology*, **18**, 209–219.

- Contri, R.V., Fiel, L.A., Alnasif, N., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. ve Schafer-Korting, M. (2016). Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *International Journal of Pharmaceutics*, **507**, 12-20.
- Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. (1995). Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res.*, 31, 9-27.
- Corsini, A. (2000). Fluvastatin: effects beyond cholesterol lowering. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, **5**, 161-175.
- Cosco, D., Celia, C., Cilurzo, F., Trapasso, E. ve Paolino, D. (2008). Colloidal carriers for the enhanced delivery through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **5**, 737-755.
- Das, S. ve Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, **12**, 62-76.
- Değim, T. (2009). Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. İçinde F. Acartürk, İ. Ağabeyoğlu, N. Çelebi, T. Değim, Z. Değim, T. Doğanay, S. Takka ve F. Tırnaksız (Ed.), *Modern Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını; 337-364.
- Desu, P.K., Pasam, V. ve Kotra ,V. (2020). Implications of superporous hydrogel composites-based gastroretentive drug delivery systems with improved biopharmaceutical performance of fluvastatin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **57**, 1-11.
- Di Bello, E., Zwergel, C., Mai, A. ve Valente, S. (2020). The innovative potential of statins in cancer: New targets for new therapies. *Frontiers in Chemistry*, **8**, 1-9.
- Dong, L., Liu, C., Cun, D. ve Fang, L. (2015). The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78**, 140-150.
- Dubertret, L., Mrowietz, U., Ranki, A., van de Kerkhof, P.C., Chimenti, S., Lotti T. ve ark. (2006). European patient perspectives on the impact of psoriasis: the EUROPSO patient membership survey. *The British journal of dermatology*, 155, 729-736.

Dvorakova, V. ve Markham, T. (2013). Psoriasis: Current treatment options and recent advances. *Prescriber*, **19**, 13-20.

Eckert, R.L. (1989). Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiological Reviews*, **69**, 1316-1346.

Eckert, R.L. ve Rorke, E.A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental Health Perspectives*, **80**, 109-116.

Eichstädt, H.V. Abletshauser, C.B., Störk, T. ve Weidinger, G. (2000). Beneficial effects of fluvastatin on myocardial blood flow at two time-points in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **35**, 735-740.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W. ve Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **34**, 203-222.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2000). Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International Journal of Pharmaceutics*, **196**, 63–74.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2004). Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, **276**, 143–61.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**, 415–429.

El Zaafarany, G.M., Awad, G.A., Holayel, S.M. ve Mortada, N.D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **397**, 164–172.

Elias, P.M. (1981). Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *International Journal of Dermatology*, **20**, 1-19.

Elias, P.M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *The Journal of Investigative Dermatology*, **80**, 44-90.

- El-Zaafarany, G.M. ve Nasr, M. (2021). Insightful exploring of advanced nanocarriers for the topical/transdermal treatment of skin diseases. *Pharmaceutical Development and Technology*, **26**, 1136-1157.
- Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*, **86**, 484-493.
- Endo, A., Kuroda, M. ve Tanzawa, K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters*, **72**, 323-326.
- Erdal, M.S., Ozhan, G., Mat, M.C., Ozsoy, Y. ve Gungor, S. (2016). Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: Characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 1027-1037.
- Erdal, M.S., Peköz Yıldız, A., Aksu, B. ve Araman, A. (2014). Impacts of chemical enhancer on skin permeation and deposition of terbinafine. *Pharmaceutical Development and Technology*, **19**, 565-570.
- Erdal, S., Özhan, G., Mat, M.C., Özsoy, Y. ve Güngör, S. (2016). Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 1027-1037.
- Faghihi, T., Radfar, M., Mehrabian, Z., Ehsani, A.H. ve Rezaei Hemami, M. (2011). Atorvastatin for the treatment of plaque-type psoriasis. *Pharmacotherapy*, **31**, 1045-1050.
- Fan, C., Li, X., Zhou, Y., Zhou, Y. Ma, S., Li, W., Liu, Y. ve Li, G. (2013). Enhanced topical delivery of tetrandrine by ethosomes for treatment of arthritis. *BioMed Research International*, **2013**, 1-13.
- Fang, C.L., Al-Suwayeh, S.A. ve Fang, J.Y. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targetin. *Recent Patents On Nanotechnology*, **7**, 41-55.
- Fang, J.Y., Fang, C.L., Liu, C.H. ve Su, Y.H. (2008). Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**, 633-640.

Fast JP, Mecozzi S. Nanoemulsions for Intravenous Drug Delivery. İçinde Villiers MMd, Editor. Nanotechnology in Drug Delivery. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS); 2009.

Fernandez, P., André, V., Rieger, J. ve Kühnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **251**, 53-58.

Ferreira, K.C.B., Valle, A.B.C.D.S., Paes, C.Q., Tavares, G.D. ve Pittella, F. (2021). Nanostructured lipid carriers for the formulation of topical anti-inflammatory nanomedicines based on natural substances. *Pharmaceutics*, **13**, 1-22.

Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: The bare essentials. *The Journal of Cell Biology*, **111**, 2807-2814.

Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Nakahara, T. ve Furue, M. (2020). The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. *Scandinavian Journal Of Immunology*, **91**, 1-6.

Gao, J., Shen, X., Ko, R., Huang, C. ve Shen C. (2021). Cognitive Process of Psoriasis and Its Comorbidities: From Epidemiology to Genetics. *Frontiers in genetics*, 12, 735124.

Garcês, A., Amaral, M.H., Sousa-Lobo, J.M. ve Silva, A.C. (2018). Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **112**, 159-167.

García-Fuentes, M., Torres, D. ve Alonso, M.J. (2003). Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **27**, 159-168.

Garg, V., Singh, H., Bimbrawh, S., Kumar Singh, S., Gulati, M., Vaidya, Y. Ve Kaur, P. (2016). Ethosomes and Transfersomes: Principles, *Perspectives and Practices*. *Current Drug Delivery*, **14**, 613-633.

Garg, V., Singh, H., Singh, B. ve Beg, S. (2017). Systematic development of transethosomal gel system of piroxicam: formulation optimization, *in vitro* evaluation, and ex vivo assessment. *AAPS PharmSciTech*, **18**, 58–71.

Garrett, I.R., Gutierrez, G. ve Mundy, G.R. (2001). Statins and bone formation. *Current Pharmaceutical Design*, **7**, 715-736.

- Garwood, E.R., Kumar, A.S., Baehner, F.L., Moore, D.H., Au, A., Hylton, N. ve ark. (2010). Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **119**, 137-144.
- Ge, S., Lin, Y., Lu, H., Li, Q., He, J., Chen, B. ve ark. (2014). Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: Formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, **465**, 120-131.
- Gelmetti, C. (2009). Therapeutic moisturizers as adjuvant therapy for psoriasis patients. *American Journal of Clinical Dermatology*, **10**, 7-12.
- Getschman, A.E., Imai, Y., Larsen, O., Peterson, F.C. Wu, X., Rosenkilde, M.M. ve ark. (2017). Protein engineering of the chemokine CCL20 prevents psoriasiform dermatitis in an IL-23-dependent murine model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 12460-12465.
- Gheorghe, G.S., Hodorogea, A.S. ve Nanea, I.T. (2014). Statins-from bench to bedside. *Romanian Journal of Cardiology*, **24**, 170-177.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**, 338-344.
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran N. (2013). Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **13**, 114-122.
- Gillet, A., Evrard, B. ve Piel, G. (2011). Liposomes and parameters affecting their skin penetration behaviour. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **21**, 35-42.
- Golden, J.B., McCormick, T.S. ve Ward, N.L. (2013). IL-17 in psoriasis: implications for therapy and cardiovascular co-morbidities. *Cytokine*, **62**, 195-201.
- Goldenberg, G., Lanoue, J. ve Dong, J. (2016). New oral therapies for psoriasis: A comprehensive review. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, **9**, 25-28.
- Griffiths, C.E. ve Barker, J.N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, **370**, 263-271.
- Gungor, S. ve Rezigue, M. (2017). Nanocarriers mediated topical drug delivery for psoriasis treatment. *Current Drug Metabolism*, **18**, 454-468.

- Gupta, A., Aggarwal, G., Singla, S. ve Arora, R. (2012). Transfersomes: A Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery of Sertraline: Development, Characterization, and Performance Evaluation. *Sci Pharm*, **80**, 1061-1080.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A. ve Doyle, P.S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, **12**, 2826-2841.
- Gürbüz, A., Özhan, G., Güngör, S. ve Erdal, M.S. (2015). Colloidal carriers of isotretinoin for topical acne treatment: Skin uptake, ATR-FTIR and in vitro cytotoxicity studies. *Archives of Dermatological Research*, **307**, 607-615.
- Haak, E., Abletshauser, C., Weber, S., Goedicke, C., Martin, N., Hermanns, N. ve ark. (2001). *Atherosclerosis*, **155**, 395-401.
- Hägg, D., Eriksson, M., Sundström, A. ve Schmitt-Egenolf, M. (2013). The higher proportion of men with psoriasis treated with biologics may be explained by more severe disease in men. *Public Library of Science one*, **8**, 63619.
- Hall, S., Cooke, M., El-Hamouz, A. ve Kowalski, A.J. (2011). Droplet break-up by in-line Silverson rotor–stator mixer. *Chemical Engineering Science*, **66**, 2068–2079.
- Hanson, K.M., Behne, M.J., Barry, N.P., Mauro, T.M., Gratton, E. ve Clegg, R.M. (2002). Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophysical Journal*, **83**, 1682–1690.
- Harrison, J.E., Groundwater, P.W., Brain, K.R. ve Hadgraft, J. (1996). Azone induced fluidity in human stratum corneum. A fourier transform infrared spectroscopy investigation using the perdeuterated analogue. *Journal of Controlled Release*, **41**, 283-290.
- Hedrick, M.N., Lonsdorf, A.S., Hwang, S.T. ve Farber, J.M. (2010). CCR6 as a possible therapeutic target in psoriasis. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, **14**, 911-922.
- Hendriks, A.G., Keijsers, R.R., de Jong, E.M., Seyger, M.M. ve van de Kerkhof, P.C. (2013). Efficacy and safety of combinations of first-line topical treatments in chronic plaque psoriasis: A systematic literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **27**, 931-951.

Herman, A. ve Herman, A.P. (2016). Topically used herbal products for the treatment of psoriasis – mechanism of action, drug delivery, clinical studies. *Planta Medica*, **82**, 1447-1455.

Hoffman, M.B., Hill, D. ve Feldman, S.R. (2016). Current challenges and emerging drug delivery strategies for the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **13**, 1461-1473.

Horn, E.J., Domm, S., Katz, H.I., Lebwohl, M., Mrowietz, U. ve Kragballe, K. (2010). Topical corticosteroids in psoriasis: Strategies for improving safety. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **24**, 119-124.

Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P.J. ve Lee, C.C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, **42**, 377-387.

Hussain, A., Singh, S., Sharma, D., Webster, T.J., Shafaat, K. ve Faruk, A. (2017). Elastic liposomes as novel carriers: Recent advances in drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 5087-5108.

Hussain, A., Singh, S., Sharma, D., Webster, T.J., Shafaat, K., Faruk, A. (2017). Elastic liposomes as novel carriers: Recent advances in drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 5087-5108.

Iqbal, B., Ali, J. ve Baboota, S. (2018). Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. *International Journal of Dermatology*, **57**, 646-660.

Iraji, F., Tajmirriahi, N., Siadat, A.H., Momeni, I. ve Nilforoushzadeh, M.A. (2014). Efficacy of adding topical simvastatin to topical calcipotriol on improvement of cutaneous plaque psoriasis. *Advanced Biomedical Research*, **9**, 1-6.

Ishida-Yamamoto, A., Hohl, D., Roop, D.R., Iizuka, H. ve Eady, R.A. (1993). Loricrin immunoreactivity in human skin: Localization to specific granules (L-granules) in acrosyngia. *Archives Of Dermatological Research*, **285**, 491-498.

- Ito, T., Ikeda, U., Yamamoto, K. ve Shimada, K. (2002). Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **165**, 51-55.
- Iurian, S., Tomuța, I., Rus, L., Achim, M. ve Leucuta, S.E. (2015). Optimization of the sonication process for meloxicam nanocrystals preparation. *Clujul Medical*, **88**, 366-372.
- Jadoul, A., Doucet, J., Durand, D. ve Preat, V. (1996). Modifications induced on stratum corneum structure after in vitro iontophoresis: ATR-FTIR and X-ray scattering studies. *Journal of Controlled Release*, **42**, 165-173.
- Jain, S., Patel, N., Madan, P. ve Lin, S. (2015). Quality by design approach for formulation, evaluation and statistical optimization of diclofenac-loaded ethosomes via transdermal route. *Pharmaceutical Development and Technology*, **20**, 473-489.
- Jain, S., Patel, N., Shah, M.K., Khatri, P. ve Vora, N. (2017). Recent advances in lipid-based vesicles and particulate carriers for topical and transdermal application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **106**, 423-445.
- Jasmina, H., Džana, O., Alisa, E., Edina, V. ve Ognjenka, R. (2017). Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowerenergy emulsification method. *CMBEBIH*, **62**, 317-322.
- Jean, J. ve Pouliot, R. (2010). In vivo and in vitro models of psoriasis. *Tissue Engineering*, doi:10.5772/8582.
- Joshi, M.D. ve Müller, R.H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **71**, 161-172.
- Kalepu, S. ve Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta pharmaceutica Sinica B*, **5**, 442-453.
- Katare, O.P., Raza, K., Singh, B. ve Dogra, S. (2010). Novel drug delivery systems in topical treatment of psoriasis: rigors and vigors. *Indian Journal Of Dermatology, Venereology And Leprology*, **76**, 612-621.
- Kaur, I.P., Rana, C., Singh, M., Bhushan, S., Singh, H. ve Kakkar, S. (2012). Development and evaluation of novel surfactant-based elastic vesicular system for

ocular delivery of fluconazole. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 484-496.

Khadke, S., Stone, P., Rozhin, A., Kroonen, J. ve Perrie, Y. (2018). Point of use production of liposomal solubilised products. *International Journal of Pharmaceutics*, **537**, 1-8.

Khosa, A., Reddi, S. ve Saha, R.N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed Pharmacother*, **103**, 598-613.

Kim, T.G., Byamba, D., Wu, W.H. ve Lee, M.G. (2011). Statins inhibit chemotactic interaction between CCL20 and CCR6 in vitro: Possible relevance to psoriasis treatment. *Experimental Dermatology*, **20**, 836–857.

Kirkham, B.W., Kavanaugh, A. ve Reich, K. (2014). Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology*, **141**, 33-142.

Knudsen, N.Ø., Rønholdt, S., Salte, R.D., Jorgensen, L., Thormann, T., Basse, L.H., Hansen, J. ve ark. (2012). Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **81**, 532-539.

Koç, E. (2016). Psoriasiste biyolojik ajan kullanımı. *Arch Turk Dermatol Venerology* **50**, 29-32.

Koroleva, M.Y. ve Yurtov, E.V. (2012). Nanoemulsions: The properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, **81**, 21-43.

Kosch, M., Barenbrock, M., Suwelack, B., Schaefer, R.M., Rahn, K.H., Hausberg, M. (2003). Effect of a 3-year therapy with the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-inhibitor fluvastatin on endothelial function and distensibility of large arteries in hypercholesterolemic renal transplant recipient. *American Journal Of Kidney Diseases*, **41**, 1088-1096.

Krueger, J.G., Wharton Jr, K.A., Schlitt, T., Suprun, M., Torene, R.I., Jiang, X.ve ark. (2019). IL-17A inhibition by secukinumab induces early clinical, histopathologic, and molecular resolution of psoriasis. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, **144**, 750-763.

Kumar, A., Pathak, K. ve Bali, V. (2012). Ultra-adaptable nanovesicular systems: A carrier for systemic delivery of therapeutic agents. *Drug Discovery Today*, **17**, 1233–1241.

Kumari, S. ve Pathak, K. (2013). Cavamax W7 composite psoralen ethosomal gel versus cavamax W7 psoralen solid complex gel for topical delivery: A comparative evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **3**, 171-182.

Küchler, S., Herrmann, W., Panek-Minkin, G., Blaschke, T., Zoschke, C., Kramer, K.D., Bittl, R. ve Schäfer-Korting, M. (2010). SLN for topical application in skin diseases—Characterization of drug–carrier and carrier–target interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, **390**, 225-233.

Lamba, S. ve Labwohl, M. (2001). Combination therapy with vitamin D analogues” *British Journal of Dermatology*, **144**, 27-32.

Lamperti, C., Naini, A.B., Lucchini, V., Prella, A., Bresolin, N., Moggio, M., Sciacco, M. ve ark. (2005). Muscle coenzyme Q10 level in statin-related myopathy. *Archives of Neurology*, **62**, 1709-1712.

Langley, R.G., Krueger, G.G. ve Griffiths, C.E. (2005). Psoriasis: Epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of The Rheumatic Diseases*, **64**, 18-23.

Langley, R.G., Krueger, G.G. ve Griffiths, C.E. (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the rheumatic diseases*, **64**, 18-23.

Law, M. ve Rudnicka, A.R. (2006). Statin safety: A systematic review. *The American Journal of Cardiology*, **97**, 52-60.

Lawrence, J.M. ve Reckless, J.P.D. (2002). Fluvastatin. *Expert Opin. Pharmacother*, **3**, 1631-1641.

Li, C., Li, X., Li, S., Weng, Y., Wang, K., Zhang, T. ve ark. (2016). Development and Validation of a Method for Determination of Encapsulation Efficiency of CPT-11/DSPE-mPEG2000 Nanoparticles. *Medicinal chemistry*, **6**, 345-348.

Lin, H., Xie, Q., Huang, X., Ban, J., Wang, B., Wei, X. ve ark. (2018). Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **13**, 831-842.

- Lin, Y.K., Huang, Z.R., Zhuo, R.Z. ve Fang, J.Y. (2010). Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **5**, 117–128.
- Liu, X., Liu, H., Liu, J., He, Z., Ding, C., Huang, G. ve ark. (2011). Preparation of a ligustrazine ethosome patch and its evaluation in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, **6**, 241–247.
- Lovelyn, C. ve Attama, A.A. (2011). Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **2**, 626-639.
- Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M. ve Krueger, J.G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual Review of Immunology*, **32**, 227-255.
- Lukic, M., Pantelici I. ve Savic, S.D. (2021). Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products. *Cosmetics*, **8**, 1-18.
- Ma, M., Wang, J., Guo, F., Lei, M., Tan, F. ve Li, N. (2015). Development of nanovesicular systems for dermal imiquimod delivery: physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Materials Science*, **26**, 1-11.
- Mabuchi, T., Chang, T.W., Quinter, S. ve Hwang, S.T. (2012). Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, **65**, 4-11.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, **121**, 231-241.
- Maestrelli, F., Capasso, G., González-Rodríguez, M.L., Rabasco, A.M., Ghelardini, C. ve Mura, P. (2009). Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *Journal of Liposome Research*, **19**, 253-260.
- Manosroi, A., Jantrawut, P. ve Manosroi, J. (2008). Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium. *International Journal of Pharmaceutics*, **360**, 156-163.
- Marianecchi, C., Rinaldi, F., Marzio, L.D., Mastriota, M., Pieretti, S., Celia, C., ve ark. (2014). Ammonium glycyrrhizinate-loaded niosomes as a potential nanotherapeutic system for anti-inflammatory activity in murine models. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 635-651.

Marzuki, N.H.C., Wahab, R.A. ve Hamid, M.A. (2019). An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **33**, 779–797.

Mason, A.R., Mason, J., Cork, M., Dooley, G. ve Hancock, H. (2013). Topical treatments for chronic plaque psoriasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **28**, CD005028.

Mavropoulos, A., Rigopoulou, E.I., Liaskos, C., Bogdanos, D.P. ve Sakkas, L.I. (2013). The role of p38 MAPK in the aetiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Clinical & Developmental Immunology*, **2013**, 1-8.

McFarlane, S.I., Muniyappa, R., Francisco, R. ve Sowers, J.R. (2002). Pleiotropic effects of statin: Lipid reduction and beyond. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87**, 1451–1458.

McKenney, J.M. (2005). Pharmacologic options for aggressive low-density lipoprotein cholesterol lowering: Benefits versus risks. *The American Journal of Cardiology*, **96**, 60-66.

Mendelsohn, R. ve Moore, D.J. (2000). Infrared determination of conformational order and phase behavior in ceramides and stratum corneum models. *Methods in Enzymology*, **312**, 228-247.

Menezes, A.C., Campos, P.M., Euletério, C., Simões, S., Praça, F.S., Bentley, M.V., Ascenso, A. (2016). Development and characterization of novel 1-(1-Naphthyl) piperazine loaded lipid vesicles for prevention of UV-induced skin inflammation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **104**, 101-109.

Mennickent, S. (2015). Pleiotropic Effects of Statins. İçinde S.A. Kumar (Ed.), *Hypercholesterolemia*. Intech: London.

Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S.R., Voorhees, A.S.V., Leonardi, C.L., Gordon, K.B. ve ark. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis, Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*, **58**, 826-850.

Menter, A., Korman, N.J., Elmets, C.A., Feldman, S.R., Gelfand, J.M., Gordon, K.B. ve ark. (2009). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis.

Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **60**, 643-659.

Menter, A., Korman, N.J., Elmets, C.A., Feldman, S.R., Gelfand, J.M., Gordo, K.B. ve ark. (2009). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*, **60**, 643-659.

Mezei, M. ve Gulasekharam, V. (1980). Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sciences*, **26**, 1473-1477.

Mezger, T.G. (2006). The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers. Hannover: Vincentz Network GmbH&Co KG.

Mihos, C.G. ve Santana, O. (2011). Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. *International Journal of General Medicine*, **4**, 261-271.

Mishra, K.K., Deep Kaur, C., Verma, S., Sahu, A. K., Dash, D.K., Kashyap, P. ve Mishra, S.P. (2019). Transethosomes and nanoethosomes: Recent approach on transdermal drug delivery system. *Nanomedicines*, **Chapter 2**, 33-54.

Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, M.G., Micicché, L., Maccioni, A.M. ve ark. (2016). From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **32**, 100-112.

Montoto, S.S., Muraca, G. ve Ruiz, M.E. (2020). Solid lipid nanoparticles for drug delivery: Pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Front in Molecular Biosciences*, **7**, 1-24.

Mosiewicz, J., Pietrzak, A., Chodorowska, G., Trojnar, M., Szepietowski, J., Reich, K. ve Rizzo, M. (2013). Rational for statin use in psoriatic patients. *Archives Of Dermatological Research*, **305**, 467-472.

Moyá, M.L., López-López, M., Lebrón, J.A., Ostos, F.J., Pérez, D., Camacho, V. ve ark. (2019). Preparation and characterization of new liposomes. bactericidal activity of cefepime encapsulated into cationic liposomes. *Pharmaceutics*, **11**, 1-12.

Mozaffar, S., Radi, M., Amiri, S. ve McClements, D.J. (2021). A new approach for drying of nanostructured lipid carriers (NLC) by spray-drying and using sodium chloride as the excipient. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**, 1-11.

Muqri, F., Helkin, A., Maier, K.G. Gahtan, V. (2020). Thrombospondin-5 and fluvastatin promote angiogenesis and are protective against endothelial cell apoptosis. *Journal Of Cellular Biochemistry*, **121**, 4154-4165.

Müller, R.H., Petersen, R.D., Hommoss, A. ve Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 522-530.

Müller, R.H., Radtke, M. ve Wissing, S.A. (2002a). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 131-155.

Müller, R.H., Radtke, M. ve Wissing, S.A. (2002b). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, **242**, 121-128.

Müller, R.H., Shegokar, R. ve Keck, C.M. (2011). 20 Years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. *Current Drug Discovery Technologies*, **8**, 207-227.

Myers, W.A., Gottlieb, A.B. ve Mease, P. (2006). Psoriasis and psoriatic arthritis: Clinical features and disease mechanisms. *Clinics in Dermatology*, **24**, 438-447.

Myers, W.A., Gottlieb, A.B. ve Mease, P. (2006). Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. *Clinics in dermatology*, **24**, 438-447.

Naik, A. ve Guy, R.H. (1997). Infrared Spectroscopic and Differential Scanning Calorimetric Investigations of the Stratum Corneum Barrier Function. İçinde R.O. Potts ve R.H. Guy (Ed.), *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery*. New York: Marcel Dekker; 87-162.

Naseri, M., Hadipour, A., Sepaskhah, M. ve Namazi, M.R. (2010). The remarkable beneficial effect of adding oral simvastatin to topical betamethasone for treatment of psoriasis: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Nigerian Journal of Medicine*, **19**, 58-61.

- Naseri, N., Valizadeh, H. ve Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure, preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **5**, 305-313.
- Nasr, M. ve Abdel-Hamid, S. (2016). Optimizing the dermal accumulation of a tazarotene microemulsion using skin deposition modeling. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **42**, 636- 643.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H. ve Barker, J. (2009). Psoriasis. *The new england journal of medicine*, **361**, 496-509.
- Nyambuya, T.M., Dlodla, P.V., Mxinwa, V. ve Nkambule, B.B. (2021). The pleiotropic effects of fluvastatin on complement-mediated T-cell activation in hypercholesterolemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **143**, 1-6.
- Oesterle, A., Liao, J.K. (2019). The pleiotropic effects of statins- from coronary artery disease and stroke to atrial fibrillation and ventricular tachyarrhythmia. *Current Vascular Pharmacology*, **17**, 222-232.
- Palmer, B.C. ve DeLouise, L.A. (2016). Nanoparticle-Enabled transdermal drug delivery systems for enhanced dose control and tissue targeting. *Molecules*, **21**, 1-17.
- Pang, B., Wang, S., Chen, W., Hassan, M. ve Lu, H. (2020). Effects of flow behavior index and consistency coefficient on hydrodynamics of power-law fluids and particles in fluidized beds. *Powder Technology*, **366**, 249–260.
- Pardeike, J., Hommoss, A. ve Müller, R.H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, **366**, 170-184.
- Patravale, V.B. ve Date, A.A. (2009). Microemulsions: Pharmaceutical Applications. İçinde C. Stubenrauch (Ed.), *Microemulsions Background, New Concepts, Applications, Perspectives*. UK: JohnWiley & Sons; 259-301.
- Pauli, G., Tang, W.L. ve Li, S.D. (2019). Development and characterization of the solvent-assisted active loading technology (SALT) for liposomal loading of poorly water-soluble compounds. *Pharmaceutics*, **11**, 1-12.
- Pawar, K.R. ve Babu, R.J. (2014). Lipid materials for topical and transdermal delivery of nanoemulsions. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **31**, 429-458.

- Pearce, D.J., Spencer, L., Hu, J., Balkrishnan, R., Fleischer, A.B. ve Jr, Feldman, S.R. (2004). Class I topical corticosteroid use by psoriasis patients in an academic practice” *Journal of Dermatological Treatment*, **15**, 235-238.
- Pietrzak, A., Chabros, P., Grywalska, E., Kiciński, P., Pietrzak-Franciszkiewicz, K., Krasowska, D. ve Kandzierski, G. (2019). Serum lipid metabolism in psoriasis and psoriatic arthritis - an update. *Archives Of Medical Science : AMS*, **15**, 369-375.
- Pinto, M.F., Moura, C.C., Nunes, C., Segundo, M.A., Lima, S.A.C. ve Reis S. (2014). A new topical formulation for psoriasis: development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, **477**, 519-526.
- Po, H.N. ve Senozan, N.M. (2001). The Henderson–Hasselbalch equation: Its history and limitations. *Journal of Chemical Education*, **78**, 1499.
- Popescu, M.C., Filip, D., Vasile, C., Cruz, C., Rueff, J.M., Marcos, M. ve ark. (2006). Characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and 2D IR correlation spectroscopy of PAMAM dendrimer. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 14198- 14211.
- Pradhan, M., Singh, D. ve Singh, M.R. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis: current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release*, **170**, 380-395.
- Proksch, E., Brandner, J.M. ve Jensen, J.M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, **17**, 1063-1072.
- Prosperi, D., Colombo, M., Zanoni, I. ve Granucci, F. (2017). Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases. *Seminars in Immunology*, **34**, 61-67.
- Puglia, C. ve Bonina, F. (2012). Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **9**, 429-441.
- Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Li, J.H., Jin, D., Teng, Y.C. ve ark. (2009). Fluvastatin inhibits expression of the chemokine MDC/CCL22 induced by interferon- γ in HaCaT cells, a human keratinocyte cell line. *British Journal of Pharmacology*, **157**, 1441-1450.
- Radomska-Soukharev, A. (2007). Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 411-418.

- Rahman, M., Kumar, V., Beg, S., Sharma, G., Katare, O.P. ve Anwar, F. (2016). Emergence of liposome as targeted magic bullet for inflammatory disorders: current state of the art. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **44**, 1597-1608.
- Rajguru, J.P., Maya, D., Kumar, D., Suri, P., Bhardwaj, S. ve Patel, N.D. (2020). Update on psoriasis: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, **9**, 20–24.
- Rajguru, J.P., Maya, D., Kumar, D., Suri, P., Bhardwaj, S. ve Patel, N.D. (2020). Update on psoriasis: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, **9**, 20-24.
- Rajpara, A.N., Goldner, R. ve Gaspari, A. (2010). Psoriasis: Can statins play a dual role? *Dermatology Online Journal*, **16**, 2.
- Ramadon, D., McCrudden, M.T.C., Courtenay, A.J. ve Donnelly, R.F. (2022). Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Delivery and Translational Research*, **12**, 758-791.
- Ramkumar, S., Raghunath, A. ve Raghunath S. (2016) Statin Therapy: Review of Safety and Potential Side Effects. *Acta Cardiol Sin*, **32**, 631-639.
- Richards, H.L., Fortune, D.G. ve Griffiths, C.E. (2006). Adherence to treatment in patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **20**, 370-379.
- Rossetti, F.C., Depieri, L.V. ve Bentley, M.V.L.B. (2013). Confocal Laser Scanning Microscopy as a Tool for the Investigation of Skin Drug Delivery Systems and Diagnosis of Skin Disorders. İçinde N. Lagali (Ed.) *Confocal Laser Microscopy- Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences*. Intech: London.
- Sabeti, B., Noordine, M.I.B, Javar, H.A., Davoudi, E.T. ve Kadivar, A. (2014). Characterization of diclofenac liposomes formulated with palm oil fractions. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **13**, 185–190.
- Sabitha, M., Rejinold, N.S., Nair, A., Lakshmanan, V.K., Nair, S.V., Jayakumar, R. (2013). Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. *Carbohydrate Polymers*, **91**, 48-57.

Sadowitz, B., Maier, K.G. ve Gahtan, V. (2010). Basic science review: Statin therapy--Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease. *Vascular and Endovascular Surgery*, **44**, 241-251.

Sala, M., Diab, R., Elaissari, A. ve Fessi, H. (2018). Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **535**, 1-17.

Sala, M., Elaissari, A. ve Fessi, H. (2016). Advances in psoriasis physiopathology and treatments: Up to date of mechanistic insights and perspectives of novel therapies based on innovative skin drug delivery systems (ISDDS). *Journal of Controlled Release*, **239**, 182-202.

Salager, J.L. (2006). Emulsion Phase Inversion Phenomena. İçinde J. Sjöblöm (Ed.), *Emulsions and Emulsion Stability*, London: Taylor and Francis.

Salama, A., Badran, M., Elmowafy, M. ve Soliman, G.M. (2019). Spironolactone-Loaded LeciPlexes as Potential Topical Delivery Systems for Female Acne: In Vitro Appraisal and Ex vivo Skin Permeability Studies. *Pharmaceutics*, **12**, 1-17.

Salim, N., Ahmad, N., Musa, S.H., Hashim, R., Tadros, T.F. ve Basri, M. (2016). Nanoemulsion as a topical delivery system of antipsoriatic drugs. *RSC Advances*, **6**, 6234–6250.

Samarasekera, E., Sawyer, L., Parnham, J., Smith, C.H., Guideline Development Group (2012). Assessment and management of psoriasis: Summary of NICE guidance. *BMJ : British Medical Journal / British Medical Association*, **345**, 42-47.

Samson, K.T.R., Minoguchi, K., Tanaka, A., Oda, N., Yokoe, T., Yamamoto, Y. ve ark. (2006). Inhibitory effects of fluvastatin on cytokine and chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with allergic asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, **36**, 475-482.

Sausseza S. ve Kiss, R. (2006). Galectin-7. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**, 686-697.

Savian, A.L., Rodrigues, D., Weber, J., Ribeiro, R.F., Motta, M.H., Schaffazick, S.R. ve ark. (2015). Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and

reduce the in vitro irritation potential of this drug. *Materials Science & Engineering C*, **46**, 69–76.

Sawant, B. ve Khan, T. (2017). Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **96**, 1478-1490.

Schachter, M. (2004). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **9**, 117-125.

Schmelz, M. (2011). Neuronal sensitivity of the skin. *European Journal of Dermatology: EJD*, **21**, 43-47.

Scholz, P. ve Keck, C.M. (2015). Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring. *International Journal of Pharmaceutics*, **482**, 110-117.

Schön, M.P. ve Boehncke, W.H. (2005). Psoriasis. *The New England Journal of Medicine*, **352**, 1899-1912.

Segre, J.A. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1150–1158.

Setya, S., Talegaonkar, S. ve Razdan, B.K. (2014). Nanoemulsions: Formulation methods and stability aspects. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3**, 2214-2228.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E. ve Harding, I. (2015). Composition and Structure. İçinde R. Shah (Ed.), *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability*. New York: Springer.

Shaker, D.S., Ishak, R.A.H., Ghoneim, A. ve Elhuoni, M.A. (2019). Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Scientia Pharmaceutica*, **87**, 1-34.

Sharma, B. ve Sharma, A. (2012). Future prospect of nanotechnology in development of anti-ageing formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 57-66.

Shen, L. ve Tang, C.H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, **48**, 108-118.

Shidhaye, S.S., Vaidya, R., Sutar, S., Patwardhan, A. ve Kadam, V.J. (2008). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers--innovative generations of solid lipid carriers. *Current Drug Delivery*, **5**, 324-331.

Shirinsky, I.V. ve Shirinsky, V.S. (2007). Efficacy of simvastatin in plaque psoriasis: A pilot study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **57**, 529-531.

Singh, H., Jindal, S., Singh, M., Sharma, G. ve Kaur, I.P. (2015). Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability: Development, characterization and in vivo safety. *International Journal of Pharmaceutics*, **485**, 138-151.

Singh, R., Koppu, S., Perche, P.O. ve Feldman SR. (2021). The Cytokine Mediated Molecular Pathophysiology of Psoriasis and Its Clinical Implications. *International journal of molecular sciences*, **22**, 12793.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. ve ark. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 1107-1112.

Smeden, J.V., Janssens, M., Gooris, G.S. ve Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1841**, 295-313.

Smeden, J.V. ve Bouwstra, J.A. (2016). Stratum corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. İçinde T. Agner (Ed.), *Current Problems in Dermatology*. Copenhagen: Karger.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. ve Garcia-Celma, M.J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **10**, 102-110.

Souto, E.B., Baldim, I., Oliveira, W.P., Rao, R., Yadav, N., Gama, F.M. ve Mahant, S. (2020). SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert opinion on Drug Delivery*, **17**, 357-377.

Souto, E.B., de Souza, A.L.R., Dos Santos, F.K., Sanchez-Lopez, E., Cano, A., Zielińska, A. ve ark. (2021). *Lipid nanocarriers for hyperproliferative skin diseases. Cancers*, **13**, 1-16.

Souto, E.B., Macedo, A.S., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Zielińska, A. ve Matos, C.M. (2021). Elastic and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of active

- pharmaceutical ingredients (APIs). *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1-14.
- Stancu, C. ve Sima, A. (2001). Statins: Mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **5**, 378-387.
- Steiling, W., Kreutz, J. ve Hofer, H. (2001). Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes in vitro. *Toxicology in Vitro*, **15**, 565–570.
- Steven, A.C., Bisher, M.E., Roop, D.R. ve Steinert, P.M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *Journal of Structural Biology*, **104**, 150-162.
- Stuart, B. (2004). Biological Applications. İçinde B. Stuart (Ed.), *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. England: John Wiley&Sons; 138-140.
- Sun, L. ve Zhang X. (2014). The immunological and genetic aspects in psoriasis. *Applied Informatics*, **1**, 1-21.
- Sznitowska, M., Janicki, S. ve Baczek, A. (2001). Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *Journal of Controlled Release*, **76**, 327–335.
- Talegaonkar, S. ve Bhattacharyya, A. (2019). Potential of lipid nanoparticles (SLNs and NLCs) in enhancing oral bioavailability of drugs with poor intestinal permeability. *AAPS PharmSciTech*, **20**, 1-15.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J. ve Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers NLC A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **19**, 29-43.
- Tavakkoli, A., Johnston, T.P. ve Sahebkar, A. (2020). Antifungal effects of statins. *Pharmacology & Therapeutics*, **208**, 1-17.
- Tırnaksız F. Nanoemülsiyonlar. İçinde: Zırh-Gürsoy A (ed). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Derneği Yayını, 2014: 101-110.
- Touitou, E., Godin, B. ve Weiss, C. (2000). Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers. *Drug Development Research*, **50**, 406-415.

Tran, V.V., Moon, J.Y. ve Lee, Y.C. (2019). Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *Journal of Controlled Release*, **300**, 114-140.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G. ve Fahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, **258**, 141-151.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G. ve Fahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, **258**, 141-151.

Verma, P. ve Pathak, K. (2010). Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **1**, 274-282.

Vichai, V. ve Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, **1**, 1112-1116.

Vincent, N., Ramya, D.D. ve Vedha, H.B. (2014). Progress in psoriasis therapy via novel drug delivery systems. *Dermatol Reports*, **6**, 14-18.

Walters, K.A. ve Roberts, M.S. (2002). The structure and function of Skin. İçinde K.A. Walters (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*. New York: Marcel Dekker.

Wang, H.R., Li, J.J., Huang, C.X. ve Jiang H. (2005). Fluvastatin inhibits the expression of tumor necrosis factor- α and activation of nuclear factor- κ B in human endothelial cells stimulated by C-reactive protein. *Clinica Chimica Acta*, **353**, 53-60.

Wang, Y., Thakur, R., Fan, Q. ve Michniak, B. (2005). Transdermal iontophoresis: Combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **60**, 179-191.

Weber, S., Zimmer, A. ve Pardeike, J. (2014). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, **86**, 7-22.

Wilbur, R.L. (2017). The difference between topical and transdermal medications. *Topical v Transdermal White Paper*, 1-2.

- Wolkenstein, P., Revuz, J., Roujeau, J.C., Bonnelye, G., Grob, J.J. ve Bastuji-Garin, S. (2009). Psoriasis in France and associated risk factors: Results of a case-control study based on a large community survey. *Dermatology*, **218**, 103-109.
- Wu, Y. ve Li, J. (2004). Expression of CC Chemokine Ligand 20 and CC Chemokine Receptor 6 mRNA in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, **24**, 297-299.
- Yamamoto, A., Hoshi, K. ve Ichihara, K. (1998). Fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. *European Journal of Pharmacology*, **361**, 143-149.
- Yang, Z., Su, Z., DeWitt, J.P., Xie, L., Chen, Y., Li, X., ve ark. (2017). Fluvastatin prevents lung adenocarcinoma bone metastasis by triggering autophagy. *EBioMedicine*, **19**, 49-59.
- Ye, L., Lv, C., Man, G., Song, S., Elias, P.M. ve Man, M.Q. (2014). Abnormal epidermal barrier recovery in uninvolved skin supports the notion of an epidermal pathogenesis of psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, **134**, 2843-2846.
- Yu, D. ve Liao, J.K. (2022). Emerging views of statin pleiotropy and cholesterol lowering. *Cardiovascular Research*, **118**, 413-423.
- Yu, S., Tan, G., Liu, D., Yang X. ve Pan, W. (2017). Nanostructured lipid carrier (NLC)-based novel hydrogels as potential carriers for nepafenac applied after cataract surgery for the treatment of inflammation: design, characterization and in vitro cellular inhibition and uptake studies. *RSC Advances*, **7**, 16668-16677.
- Yukuyama, M.N., Ghisleni, D.D., Pinto, T.J. ve Bou-Chacra, N.A. (2016). Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics – a review. *International Journal of Cosmetic Science*, **38**, 13-24.
- Zhang, J., Chen, Y., Li, X., Liang, X. ve Luo, X. (2016). The influence of different long-circulating materials on the pharmacokinetics of liposomal vincristine sulfate. *International Journal of Nanomedicine*, **11**, 4187-4197.

Zhang, J.P., Wei, Y.H., Zhou, Y., Li, Y.Q. ve Wu X.A. (2012). Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: A comparative study. *Arch Pharm Res*, **35**, 109–117.

Zhang, W., Li, X., Ye, T., Chen, F., Sun, X., Kong, J. ve ark. (2013). Design, characterization, and in vitro cellular inhibition and uptake of optimized genistein-loaded NLC for the prevention of posterior capsular opacification using response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutics*, **454**, 354-366.

Zhou, Q. ve Liao, J.K. (2010). Pleiotropic effects of statins: Basic research and clinical perspectives. *Circulation Journal*, **74**, 818-826.

Zhou, Y., Wei, Y., Liu, H., Zhang, G., Wu, X. (2010). Preparation and in vitro evaluation of ethosomal total alkaloids of *Sophora alopecuroides* loaded by a transmembrane pH-gradient method. *AAPS PharmSciTech*, **11**, 1350–1358.

PSORİASİS TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE TOPİKAL TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 11	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.oftalmoloji.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.ubaksymposium.org İnternet Kaynağı	<% 1
9	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1