T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

KONTROLLÜ SALIM YAPAN BİYOADEZİF YENİ VAJİNAL İLAÇ ŞEKİLLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Füsun ACARTÜRK

ANKARA
Kasım 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

KONTROLLÜ SALIM YAPAN BİYOADEZİF YENİ VAJİNAL İLAÇ ŞEKİLLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Füsun ACARTÜRK

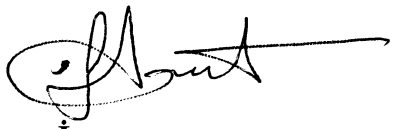
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-02/2006-08 numaralı proje ve TÜBİTAK 104S324 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
Kasım 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 25/11/2009



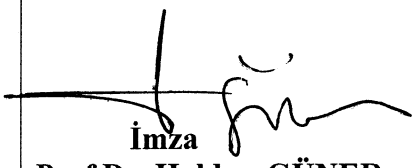
İmza
Prof.Dr. Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof.Dr. İlbeyi AĞABEYOĞLU
Gazi Üniversitesi



İmza
Prof.Dr. Nevin ÇELEBİ
Gazi Üniversitesi



İmza
Prof.Dr. Haldun GÜNER
Gazi Üniversitesi



İmza
Doç.Dr. Erem BİLENSOY
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	**I**
İÇİNDEKİLER	**II**
ŞEKİLLER	**XVII**
TABLOLAR	**XXVII**
RESİMLER	**XXXII**
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	**XXXIV**
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vajinanın Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri	3
2.1.1. Vajinanın Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.2. Vajinal Sıvı ve Servikal Mukus	6
2.1.3. Vajinal Flora ve Vajinal pH	7
2.1.4. Enzimatik Aktivite	8
2.2. Vajinal Absorbsiyon	9
2.3. Vajinal İlaç Uygulamasının Avantajları Ve Dezavantajları	11
2.4. Vajinaya Uygulanan İlaçlar	12
2.4.1. Vajinaya Uygulanan İlaçların Farmakolojik Grupları	12
2.4.2. Vajinaya Uygulanan İlaçların Farmasötik Şekilleri	12
2.5. Mukoadezyon	13
2.5.1. Mukoadezyon Mekanizmaları	14
2.5.2. Mukoadezyon Teorileri	15
2.5.3. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler	17
2.5.4. Mukoadezyon Ölçümünde Kullanılan Yöntemler	17
2.6. Biyoadezif Vajinal Jeller	19
2.6.1. Biyoadezif Vajinal Jeller Üzerinde Yapılan Çalışmalar	21
2.6.1.1. Poliakrilatlar ile Yapılan Çalışmalar	21
2.6.1.2. Selüloz Türevleri ile Yapılan Çalışmalar	27
2.6.1.3. Kitosan ile Yapılan Çalışmalar	30
2.6.1.4. Sıcaklığa Hassas Polimerler ile Yapılan Çalışmalar	33

2.6.2. Biyoadezif Vajinal Jellerin Farmasötik Karakterleri 35
2.6.2.1. Jellerden İlaç Salımı ve Permeabilite 35
2.6.2.2. Jellerin Reolojik ve Textural (Sertlik/Yumuşaklık) Özellikleri 36
2.6.2.3. Vajinal Yayılma ve Tutulma 38
2.7. Kullanılan Etkin Maddelerin Özellikleri Ve Konu İle İlgili Yapılan Çalışmalar 40
2.7.1. CİDOFOVİR (HPMPC) 40
2.7.1.1. Cidofovirin Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması 41
2.7.1.2. Cidofovirin Farmakokinetiği 42
2.7.1.3. Cidofovir İle Yapılan Çalışmalar 43
2.7.2. OKSİBÜTİNİN HİDROKLORÜR (OXB) 47
2.7.2.1. Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması 47
2.7.2.2. Oksibütininin Farmakokinetiği 50
2.7.2.3. Oksibütinin İle Yapılan Çalışmalar 50
3. GEREÇ VE YÖNTEM 53
3.1. GEREÇ 53
3.1.1. Etkin Maddeler 53
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 53
3.1.3. Kullanılan Aletler ve Malzemeler 55
3.2. YÖNTEM (Cidofovire ait yöntem) 57
3.2.1. Cidofovir (CV) Etkin Maddesi İle Yapılan İn Vitro Çalışmalar 57
3.2.1.1. Kullanılan Tampon Çözeltinin Hazırlanışı 57
3.2.1.2. Cidofovir Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 58
3.2.1.2.1. Etkin Maddelerin Erime Noktası Tayini 58
3.2.1.2.2. Partikül Büyüklüğü Analizi 58
3.2.1.2.3. IR Spektrumu 59
3.2.1.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi 59
3.2.1.2.5. UV Spektrumu 59
3.2.1.3. Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayin Yöntemi, Standart Doğrunun Hazırlanması ve Validasyon 59
3.2.1.3.1. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve

Standart Doğrunun Hazırlanması 59
3.2.1.3.2. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 60
3.2.1.3.2.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery) 60
3.2.1.3.2.2. Kesinlik (precision) 60
3.2.1.3.2.2.1. Tekrar Edilebilirlik (repeatability) 61
3.2.1.3.2.3. Özgünlük, Seçicilik (specificity, selectivity) 61
3.2.1.3.2.4. Doğrusallık (linearity) 61
3.2.1.3.2.5. Stabilite (stability) 62
3.2.2. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar 62
3.2.2.1. Farklı Polimer Örneklerinde Viskozite Değerinin ve Akış Özelliklerinin Saptanması 62
3.2.3. Formülasyon Çalışmaları 63
3.2.4. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmaları 64
3.2.4.1. Kitosan Jel Formülasyon Çalışmaları 64
3.2.4.1.1. Kitozan-jel Formülasyonunda Kullanılan Bileşenlerin Oranlarının Belirlenmesi 64
3.2.4.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 66
3.2.4.3. HPMC Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 67
3.2.4.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 67
3.2.5. Biyoadezif Jel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller 68
3.2.5.1. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonunda Fiziksel Görünüş 68
3.2.5.2. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonunun Akış Özelliklerinin ve Viskozitesinin İncelenmesi 69
3.2.5.3. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonlarının pH'sı 69
3.2.5.4. Etkin Madde Miktar Tayini 69
3.2.5.5. Etkin Madde İçeren Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 69
3.2.5.6. Biyoadezif Jel Formülasyonlarının Stabilite Çalışması 70

3.2.6. Lipozom Formülasyon Çalışmaları 71
3.2.6.1. Film-Hidrasyon Yöntemi ile Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması 71
3.2.6.2. Poliol Dilüsyon Yöntemi ile Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması 74
3.2.7. Hazırlanan Lipozomların Karakterizasyonu 76
3.2.7.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı 76
3.2.7.2. Ekstruksiyon İşleminin Partikül Büyüklüğüne Etkisi 77
3.2.7.3. Lipozomlarda Zeta Potansiyel Tayini 78
3.2.7.4. Lipozomların Işık Mikroskobu Görüntüleri 78
3.2.7.5. Lipozomların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri 79
3.2.7.6. Lipozomların Yükleme Kapasitesinin Ölçülmesi 79
3.2.7.7. Lipozomların Stabilite Çalışmaları 80
3.2.8. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonları 81
3.2.8.1. Biyoadezif Lipojel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller 82
3.2.9. Mikroküre Formülasyonları 83
3.2.9.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 83
3.2.9.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 85
3.2.9.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 86
3.2.9.4. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 88
3.2.9.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 88
3.2.10. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu 89
3.2.10.1. Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği 89
3.2.10.2. Hazırlanan Mikroküre Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli 90

3.2.10.3. Mikrokürelerin Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri 90
3.2.10.4. Etkin Madde İçeren Mikroküre Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 90
3.2.11. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları 91
3.2.11.1. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Farmasötik Kontrolleri 92
3.2.12. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik olarak Değerlendirilmesi 92
3.2.13. Biyoadezif Formülasyonlarda Texture Profil Analizi (TPA) (Yapı Profil Analizi) 93
3.2.14. Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmaları 96
3.2.14.1. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Daldırma Sıvılarının Denenmesi 99
3.2.14.2. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Prob Hızlarının Denenmesi 100
3.2.14.3. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Prob Kuvveti Uygulanarak Yapılan Çalışma 100
3.2.14.4. Mukoadezyon Çalışmalarında Örneğin Farklı Temas Sürelerinin Değerlendirilmesi 100
3.2.14.5. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyon Testleri 100
3.2.15. İn Vivo Çalışmalar 102
3.2.16. Cidofovirin Sığır Herpes Virüsü Tip 1 (Bhv 1) Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Tayin Edilmesi İçin Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları 104
3.2.16.1. Hücrelerin İdamesi ve Subkültürü 105
3.2.16.2. Dulbeco's Minimal Essential Medium (DMEM) İle Biyoadezif Jellerin Hazırlanması 106
3.2.16.3. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneyleri 106
3.2.16.4. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Agar Overlay Test Yöntemi ile Sitotoksisite Deneyleri 107

3.2.16.4.1. Boyama ve Mikroskobik Değerlendirme 108
3.2.16.5. Cidofovirin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneyleri 108
3.2.16.6. Cidofovirin Antiviral Aktivite Tayini 109
3.2.16.6.1. Çalışmada Kullanılan Virüs 109
3.2.16.6.2. Antiviral Aktivite Tayini 109
3.3. YÖNTEM (Oksibütinine ait yöntem) 111
3.3.1. In Vitro Çalışmalar 111
3.3.1.1. Oksibütinin Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 111
3.3.1.1.1.Etkin Maddelerin Erime Noktası Tayini 111
3.3.1.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi 111
3.3.1.1.3. IR Spektrumu 111
3.3.1.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi 111
3.3.1.1.5. UV Spektrumu 112
3.3.1.1.6. Oksibütininin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayin Yöntemi, Standart Doğrunun Hazırlanması ve Validasyon 112
3.3.1.1.6.1. Oksibütininin HPLC ile Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması 112
3.3.1.1.6.2. HPLC ile Oksibütininin %4'lük pH 4.5 Fosfat Tamponundaki Kalibrasyon Denkleminin Elde Edilmesi 114
3.3.1.1.6.3.HPLC ile Oksibütininin %4'lük pH 4.5 Fosfat Tamponundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu 115
3.3.1.1.6.3.1.Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery) 115
3.3.1.1.6.3.2. Kesinlik 115
3.3.1.1.6.3.3. Özgünlük, Seçicilik 115
3.3.1.1.6.3.4. Doğrusallık 115
3.3.1.1.6.3.5. Duyarlılık 115
3.3.1.1.6.3.6. Saptama Sınırı 116
3.3.1.1.6.3.7. Duyarlılık Sınırı 116
3.3.1.1.6.3.8. Stabilite 116
3.3.1.2. Formülasyon Çalışmaları 117
3.3.1.2.1. OXB-Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmaları 117

3.3.1.2.1.1. OXB-Kitosan Jel Formülasyon Çalışmaları 117
3.3.1.2.1.2. OXB-Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 118
3.3.1.2.1.3. OXB-HPMC Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 118
3.3.1.2.1.4. OXB-Poloksamer Jel Formülasyonlarının Hazırlanması 118
3.3.1.2.1.5. Biyoadezif Jel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller 119
3.3.1.2.1.6. Biyoadezif Jel Formülasyonlarının Stabilite Çalışması 119
3.3.1.2.1.7. Oksibütinin İçeren Jel Formülasyonların Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmaları 119
3.3.1.2.2. OXB-Lipozom Formülasyon Çalışmaları 121
3.3.1.2.2.1. Hazırlanan Lipozomların Karakterizasyonu 122
3.3.1.2.2.2. Lipozomların Stabilite Çalışmaları 122
3.3.1.2.3. OXB-Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonları 123
3.3.1.2.3.1. Biyoadezif Lipojel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller 123
3.3.1.2.4. OXB-Mikroküre Formülasyonları 124
5.1.2.4.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 124
3.3.1.2.4.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 124
3.3.1.2.4.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 124
3.3.1.2.4.4.Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 125
3.3.1.2.4.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması 125
3.3.1.2.4.6. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu 126
3.3.1.2.5. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları 127
3.3.1.2.5.1. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Farmasötik Kontrolleri 128
3.3.1.3. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik olarak Değerlendirilmesi 128

3.3.1.4. Oksibütinin İçeren Biyoadezif Formülasyonlarda Texture Profil Analizi ve Mukoadezyon Çalışmaları 128
3.3.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR 129
3.3.2.1. Oksibütininin Tavşan Serumdan HPLC Yöntemi ile Analizi 129
3.3.2.1.1. Örnek Hazırlama ve Kullanılan Yöntem 129
3.3.2.1.2. HPLC Yöntemi Kullanılarak Oksibütininin Tavşan Serumunda Standart Doğru Denkleminin Hazırlanması 134
3.3.2.1.3. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu 134
3.3.2.1.3.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery) 134
3.3.2.1.3.2. Kesinlik 135
3.3.2.1.3.3. Doğrusallık 135
3.3.2.1.3.4. Özgünlük, Seçicilik 135
3.3.2.1.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 135
3.3.2.1.3.6. Stabilite 136
3.3.2.2. Oksibütininin İn Vivo Tavşan Deneyleri 136
3.3.2.2.1. İn Vivo Deney Tasarımı 136
3.3.2.2.2. Farmakokinetik Analiz 139
3.3.2.2.3. Tavşan Vajinal Dokularının Histolojik Açıdan İncelenmesi 139
3.3.2.2.4. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etki Çalışması 139
4. BULGULAR (Cidofovire ait bulgular) 142
4.1. Cidofovirin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular 142
4.1.1. Erime Noktası Tayini 142
4.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi 142
4.1.3. IR Spektrumu 143
4.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi
4.1.5. UV Spektrumu 145
4.1.6.Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması 146
4.1.6.1. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Yönteminin Validasyonu 147

4.1.6.1.1. Doğruluk (accuracy) ve ve Gerielde (recovery) 147
4.1.6.1.2. Tekrar Edilebilirlik 147
4.1.6.1.3. Özgünlük, Seçicilik (specificity, selectivity) 148
4.1.6.1.4. Doğrusallık (linearity) 148
4.1.6.1.5. Stabilite (stability) 149
4.2. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar 150
4.2.1. Polimerlerin pH'sı, Viskozite Değerleri ve Akış Özellikleri 150
4.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 152
4.3.1. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 152
4.3.1.1. Kitosan-Jel Formülasyonuna Ait Bulgular 152
4.3.1.1.1. Etkin Madde İçermeyen Kitosan-Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 152
4.3.1.1.2. Etkin Madde İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 154
4.3.1.1.3. CV İçeren Kitosan-Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular 155
4.3.1.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonuna Ait Bulgular 156
4.3.1.2.1. CV İçeren Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular 158
4.3.1.3. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 159
4.3.1.3.1. CV İçeren HPMC Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular 160
4.3.1.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 161
4.3.1.4.1. Poloksamer Jellerde Jelleşme Sıcaklığı ($T_{sol-jel}$) 161
4.3.1.4.2. Poloksamer Jellerin Fiziksel Görünüşleri, pH'sı, Viskozitesi ve Akış Özellikleri 162
4.3.1.4.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 163
4.3.1.5. Jel Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular 164
4.3.2. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular 168
4.3.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular 168

4.3.2.2. Lipozomların Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntülerine Ait Bulgular 171
4.3.2.3. Lipozomların Yükleme Kapasitesine Ait Bulgular 175
4.3.2.4. Lipozomların Stabilitesine Ait Bulgular 176
4.3.2.5. Lipozom Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 184
4.3.2.6. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulgular 185
4.3.3. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulgular 187
4.3.3.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 187
4.3.3.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 188
4.3.3.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 190
4.3.3.4. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 193
4.3.3.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 193
4.3.3.6. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu 194
4.3.3.6.1. Hazırlanan Mikrokürelerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği 194
4.3.3.6.2. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ve Zeta Potansiyeli 195
4.3.3.7. Mikrokürelere-Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu 195
4.3.3.7.1. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Akış Özellikleri 195
4.3.3.7.2. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular 196
4.4. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi 201
4.5. Biyoadezif Jellerin Texture Profil Analizi'ne (TPA) Ait Bulgular 203
4.6. Vajinal Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmalarına

Ait Bulgular 209
4.6.1. Farklı Daldırma Sıvılarının Denenmesine Ait Bulgular 209
4.6.2. Farklı Prob Hızlarının Denenmesine Ait Bulgular 211
4.6.3. Mukoza İle Ölçümü Yapılan Örneğin Farklı Temas Sürelerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular 212
4.6.4. Mukoadezyon Test Parametrelerin Değerlendirilmesinin Sonuçları 214
4.6.5. Etkin Madde İçermeyen Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyonlarına Ait Bulgular 214
4.6.6. Cidofovir Etkin Maddesi İçeren Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyon Testleri 216
4.7. İn Vivo Çalışmalar Ait Bulgular 218
4.8. Cidofovirin Sığır Herpes Virüsü (Bhv) Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Tayin Edildiği Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular 223
4.8.1. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular 223
4.8.2. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Agar Overlay Test Yöntemi ile Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular 226
4.8.3. Cidofovirin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular 229
4.8.4. Antiviral Aktivite Tayinine Ait Bulgular 229
5. BULGULAR (oksibütinine ait bulgular) 230
5.1. Oksibütininin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular 230
5.1.1. Erime Noktası Tayini 230
5.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi 230
5.1.3. IR Spektrumu 231
5.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi 231
5.1.5. UV Spektrumu 233
5.1.6. Oksibütininin HPLC ile İn Vitro Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Yönteminin Validasyonu 235
5.1.6.1. Oksibütininin İn Vitro HPLC ile Analiz Yöntemi 235
5.1.6.2. HPLC ile Oksibütininin % 4 Oranında Seyreltilmiş pH 4.5 Fosfat

Tamponundaki Standart Doğrusunun Elde Edilmesi 237
5.1.6.3. HPLC ile Oksibütininin % 4 Oranında Seyreltilmiş pH 4.5 Fosfat Tamponundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu 237
5.1.6.3.1. Doğruluk 237
5.1.6.3.2. Kesinlik 238
5.1.6.3.3. Doğrusallık 239
5.1.6.3.4. Özgünlük, Seçicilik 239
5.1.6.3.5. Duyarlılık 240
5.1.6.3.6. Saptama Sınırı 240
5.1.6.3.7. Duyarlılık Sınırı 240
5.1.6.3.8. Stabilite 240
5.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 241
5.2.1. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 241
5.2.1.1. Kitosan-Jel Formülasyonuna Ait Bulgular 241
5.2.1.1.1. OXB İçeren Kitosan-Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular 242
5.2.1.2. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 243
5.2.1.2.1. OXB İçeren HPMC Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular 244
5.2.1.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 245
5.2.1.3.1. Poloksamer Jellerde Jelleşme Sıcaklığı ($T_{sol-jel}$) 245
5.2.1.3.2. Poloksamer Jellerin Fiziksel Görünüşleri, pH'sı, Viskozitesi ve Akış Özellikleri 245
5.2.1.3.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 246
5.2.1.4. Jel Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular 247
5.2.1.5. Oksibütinin İçeren Jel Formülasyonların Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular 250
5.2.2. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular 252
5.2.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular 252

5.2.2.2. Lipozomların Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntülerine Ait Bulgular 254
5.2.2.3. Lipozomların Yükleme Kapasitesine Ait Bulgular 257
5.2.2.4. Lipozomların Stabilitesine Ait Bulgular 258
5.2.2.5. Lipozom Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi 266
5.2.2.6. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulgular 267
5.2.3. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulgular 269
5.2.3.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 269
5.2.3.2. İyonotropik Emülsiyon Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 270
5.2.3.3. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 271
5.2.3.4. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular 272
5.2.3.5. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu 272
5.2.3.5.1. Hazırlanan Mikrokürelerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği 272
5.2.3.5.2. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ve Zeta Potansiyeli 273
5.2.3.5.3. OXB-Mikroküre Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular 273
5.2.4. Mikrokürelere-Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular 274
5.2.4.1. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Akış Özellikleri 274
5.2.4.2. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular 275
5.3. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi 279
5.4. OXB-Jellerin Texture Profil Analizi'ne (TPA) Ait Bulgular 282
5.5. Vajinal Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmalarına

Ait Bulgular 286
5.5.1. OXB Etkin Maddesi İçeren Biyoadezif Vajinal Formülasyonların Mukoadezyon Testleri 286
5.6. Oksibütinin İle Yapılan İn Vivo Çalışmalar Ait Bulgular 288
5.6.1. Oksibütininin Tavşan Serumundan HPLC Yöntemi ile Analizine Ait Bulgular 288
5.6.1.1. Örnek Hazırlamaya Ait Bulgular 288
5.6.1.3. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu 289
5.6.1.3.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery) 289
5.6.1.3.2. Kesinlik 289
5.6.1.3.3. Doğrusallık 290
5.6.1.3.4. Özgünlük, Seçicilik 290
5.6.1.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 291
5.6.1.3.6. Stabilite 291
5.6.2. Tavşanlara Üropan Tablet ve Vajinal Jel Uygulaması 292
5.6.3. Tavşan Vajinal Dokusunun Histolojik Açıdan İncelenmesi 300
5.6.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular 300
5.6.3.2. Vajinal OXB Çözeltisi Uygulanan Gruba Ait Bulgular 302
5.6.3.3. Vajinal OXB-HPMCK100M2 Formülasyonu Uygulanan Gruba Ait Bulgular 304
5.6.3.4. Vajinal OXB-KITH3 Formülasyonu Uygulanan Gruba Ait Bulgular 306
5.6.4. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etki Çalışmasına Ait Bulgular 308
6. TARTIŞMA 309
6.1.Etkin Maddeler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler 309
6.2. Polimerlerin Viskozite Ve Akış Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 311
6.3. Biyoadezif Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 313
6.3.1. Kitosan Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 313
6.3.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların

Değerlendirilmesİ 315
6.3.3. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 317
6.3.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 318
6.3.5. Jellerin Stabilitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 320
6.3.6. Oksibütinin Jel Formülasyonlarının Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmasının Değerlendirilmesi 321
6.4. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 323
6.4.1. Lipozom Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 323
6.4.2. Lipozomlarda Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi329
6.5. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 333
6.6. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 336
6.6.1. Mikroküre Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 336
6.7. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 339
6.8. Diyaliz membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi 342
6.9. Biyoadezif Jellerin Texture Profil Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 342
6.10. Mukoadezyon Çalışmalarına Ait Bulgular 344
6.11. Cidofovirin Sığır Herpes Virüsü Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Değerlendirilmesi 346
6.12. Oksibütininin İn Vivo Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 348
6.12.1. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Analizinin Değerlendirilmesi 348
6.12.2. Tavşanlara Üropan Tablet Ve Vajinal Jel Uygulaması Sonucu Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi 348
6.13. Tavşan Vajinal Dokusunun Histolojik Değerlendirilmesi 352

6.14. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etkinin Değerlendirilmesi 352
7. SONUÇ 354
8. ÖZET 359
9. ABSTRACT 361
10. KAYNAKLAR 363
11. EKLER 391
12. TEŞEKKÜR 393
13.ÖZGEÇMİŞ 395

ŞEKİLLER

Şekil 1: Kadın üreme sisteminin şematik görüntüsü 4
Şekil 2: Vajinal dokuda bulunan epitel kalınlığının yaşa göre değişkenliği 5
Şekil 3: Vajina duvarının kesiti 5
Şekil 4. İnterpenetrasyon teorisi; mukoadezif polimer ile müsin arasındaki Girişim 16
Şekil 5. Dehidrasyon teorisidir 16
Şekil 6. Mukoadezif bağlarda kopma olabilecek olası bölgeler 17
Şekil 7. Cidofovirin kimyasal yapısı 40
Şekil 8. Oksibütininin yapısal formülü 47
Şekil 9. Franz difüzyon hücresi 70
Şekil 10. Lipozomların hazırlanmasında kullanılan film hidrasyon yönteminin şematik gösterimi 72
Şekil 11. Lipozomların hazırlanmasında kullanılan poliol dilüsyon yönteminin şematik gösterimi 75
Şekil 12. Mini-extruder aleti 78
Şekil 13. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu yöntemi ile kitosan mikrokürelerinin hazırlanması 87
Şekil 14. Texture profil analizi, birinci ve ikinci kompresyon döngüsü grafiği 95
Şekil 15. Playtlerde virüs sulandırma basamaklarının playt 110
Şekil 16. Horizontal difüzyon ünitesinde apikal ve bazolateral kompartmanlar 120
Şekil 17. Horizontal difüzyon ünitesi 120
Şekil 18. Oksibütinin ve Propiverine ait kimyasal yapılar 129
Şekil 19. İn vivo çalışmada kan örneğinden ekstraksiyon ile örnek hazırlama yöntemi 130
Şekil 20. Ekstraksiyon işleminden önce tavşan serumunun kromotogramı 131
Şekil 21. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunun kromotogramı 132
Şekil 22. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunda OXB Kromotogramı 132

Şekil 23. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunda propiverin kromotogramı 133
Şekil 24. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunda propiverin ve oksibütinin kromotogramı 133
Şekil 25. Cidofovirin partikül büyüklüğü dağılımı 142
Şekil 26. Cidofovirin FT-IR spekturumu 143
Şekil 27. Cidofovirin, HPMCK100M polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı 144
Şekil 28. Cidofovirin, Carbopol 974P polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı 144
Şekil 29. Cidofovirin, Kitosan H polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı 145
Şekil 30. Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponundaki UV spektrumu 145
Şekil 31. Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu 146
Şekil 32. Formülasyonda cidofovir dışındaki maddeler karışımının UV spektrumları 148
Şekil 33. Cidofovirin stabilitesi 149
Şekil 34. Polimerlerin %1'lik jellerinin akış diyagramı 151
Şekil 35. Hazırlanan H grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı 153
Şekil 36. Hazırlanan M grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış Diyagramı 153
Şekil 37. Hazırlanan L grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış Diyagramı 154
Şekil 38. CV içeren kitosan jellerin 25°C'deki akış diyagramı 154
Şekil 39. Kitosan jel formülasyonlarından cidofovirin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 156
Şekil 40. CV içermeyen Carbopol 974P ve polikarbofil jellerin akış diyagramı 156
Şekil 41. CV içeren Carbopol 974P ve polikarbofil jellerin akış diyagramı 157
Şekil 42. Carbopol ve polikarbofil jel formülasyonlarından CV'in diyaliz

membrandan geçişi (n=6) 158
Şekil 43. CV içermeyen HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış Diyagramı 159
Şekil 44. CV içeren HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı 159
Şekil 45. CV içeren HPMC jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6) 161
Şekil 46. Poloksamer jellerin 25°C'deki akış diyagramı 163
Şekil 47. CV içeren poloksamer jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6) 164
Şekil 48. F1 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki(b) partikül büyüklüğü dağılımı 168
Şekil 49. CV-F2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı 169
Şekil 50. P1 (a) ve CV-P2 (b) lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önceki partikül büyüklüğü dağılımı 170
Şekil 51a. Ekstruksiyon yapılmadan önce F1 lipozomlarının ışık mikroskobu görüntüsü (x40) 172
Şekil 51b. Ekstruksiyon yapıldıktan sonra F1 lipozomlarının ışık mikroskobu görüntüsü (x60) 172
Şekil 52. Ekstruksiyon yapıldıktan sonra P1 lipozomlarının SEM görüntüsü (x40) 173
Şekil 53. CV-FS2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü 174
Şekil 54. CV-PS2 formülasyonunun SEM görüntüsü 174
Şekil 55. CV içeren CV-FS1, CV-FS2, CV-PS1 ve CV-PS2 lipozomlarında % yükleme kapasitesi 175
Şekil 56. Stabilite çalışmalarında CV-F2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi 180
Şekil 57. Stabilite çalışmalarında CV-P2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi 180
Şekil 58. Stabilite çalışmalarında CV-FS1 ve CV-FS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi 181

Şekil 59. Stabilite çalışmalarında CV-PS1 ve CV-PS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi 181
Şekil 60. Cidofovir etkin maddesi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarından etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 184
Şekil 61. CV-FS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 185
Şekil 62. CV-PS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 186
Şekil 63. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan E1 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 187
Şekil 64. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan E2 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 188
Şekil 65. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 188
Şekil 66. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-T1 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 189
Şekil 67. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 189
Şekil 68. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-T1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 190
Şekil 69. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 191
Şekil 70. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-K1 kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 191
Şekil 71. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 192
Şekil 72. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-K1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 192

Şekil 73. Kompleks Koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV-AS4 kitosan mikroküre lerinin SEM görüntüsü 193
Şekil 74. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV-BT4 kitosan mikro- partiküllerinin SEM görüntüsü 194
Şekil 75. CV-T1 mikroküre ve mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 196
Şekil 76. CV-K1 mikroküre ve mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 197
Şekil 77. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 198
Şekil 78. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 198
Şekil 79. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 199
Şekil 80. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jellerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 200
Şekil 81. KITH3 jel formülasyonuna ait TPA grafiği 203
Şekil 82. CV-KITH3 jel formülasyonuna ait TPA grafiği 204
Şekil 83. HP407 jel formülasyonuna ait TPA grafiği 204
Şekil 84. CV-HP407 jel formülasyonuna ait TPA grafiği 204
Şekil 85. KR jel formülasyonuna ait TPA grafiği 205
Şekil 86. CV-KR jel formülasyonuna ait TPA grafiği 205
Şekil 87. K100M jel formülasyonuna ait TPA grafiği 205
Şekil 88. CV-K100M jel formülasyonuna ait TPA grafiği 206
Şekil 89. PB kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 209
Şekil 90. NS kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 209
Şekil 91. VFS kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 210
Şekil 92. VFS+müsin kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen

kuvvet-mesafe grafiği 210
Şekil 93. 1 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 211
Şekil 94. 2.5 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 211
Şekil 95. 5 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 212
Şekil 96. 60 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 213
Şekil 97. 150 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 213
Şekil 98. 300 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği 213
Şekil 99. KR jelin kuvvet-mesafe grafiği 215
Şekil 100.K100M jelin kuvvet-mesafe grafiği 215
Şekil 101.KITH3 jelin kuvvet-mesafe grafiği 215
Şekil 102. HP407 jelin kuvvet-mesafe grafiği 215
Şekil 103. CV içeren farklı jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları 216
Şekil 104. OXB'nin partikül büyüklüğü dağılımı 230
Şekil 105. OXB'nin FT-IR spekturumu 231
Şekil 106. OXB'nin, HPMCK100M'in ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları 232
Şekil 107. OXB'nin, Kitosan H'ın ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları 232
Şekil 108. OXB'nin, Carbopol 974P'nin ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları 233
Şekil 109. Oksibütininin kloroform tabakasındaki spekturumu(208 nm) 234
Şekil 110. Oksibütininin kloroform tabakasındaki spekturumu (240 nm) 234
Şekil 111. pH 4.5 fosfat tamponuna ait pikler 235
Şekil 112. % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponuna ait pikler 236
Şekil 113. Oksibütininin % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin

HPLC analizi 236
Şekil 114. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 kalibrasyon grafiği 237
Şekil 115. Oksibütinin bulunmayan çözeltinin HPLC'de analizi 239
Şekil 116.Oksibütininin oda sıcaklığında ve 37°C'de % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki stabilitesi 240
Şekil 117. OXB içeren kitosan jellerin 25°C'deki akış diyagramı 241
Şekil 118. Kitosan jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 242
Şekil 119. OXB içeren HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı 243
Şekil 120. OXB içeren HPMC jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6) 244
Şekil 121. OXB-poloksamer jellerin 25°C'deki akış diyagramı 246
Şekil 122. OXB içeren poloksamer jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6) 247
Şekil 123. OXB içeren jel formülasyonlarının tavşan vajinal dokusundan Geçişi 250
Şekil 124. OXB-F2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı 252
Şekil 125. OXB-P2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önceki partikül büyüklüğü dağılımı 253
Şekil 126. OXB-F2 formülasyonuna ait zeta potansiyel grafiği 254
Şekil 127. OXB-F2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü(x40) 255
Şekil 128. OXB-FS2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü 256
Şekil 129. OXB-PS2 formülasyonunun SEM görüntüsü 257
Şekil 130. OXB içeren FS1, FS2, PS1 ve PS2 lipozomlarında % yükleme kapasitesi 258
Şekil 131. Stabilite çalışmalarında OXB-F2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi 262
Şekil 132. Stabilite çalışmalarında OXB-P2 lipozomlarının içindeki OXB

miktarının zamana göre değişimi 262
Şekil 133. Stabilite çalışmalarında OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi 263
Şekil 134. Stabilite çalışmalarında PS1 ve PS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi 255
Şekil 135. OXB etkin maddesi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarından etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 266
Şekil 136. OXB-FS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 267
Şekil 137. OXB-PS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri 268
Şekil 138. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-T1 kitosan mikroküresinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 269
Şekil 139. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-T1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 269
Şekil 140. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB içeren kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5) 270
Şekil 141. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-K1 kitosan mikroküresinin SEM görüntüsü 271
Şekil 142. Kompleks Koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan OXB-AS4 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü 271
Şekil 143. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan BT4 kitosan mikro- partiküllerinin SEM görüntüsü 272
Şekil 144. OXB-mikroküre formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 274
Şekil 145. OXB-T1 mikroküre ve OXB-T1 mikroküre-jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 275
Şekil 146. OXB-K1 mikroküre ve OXB-K1 mikroküre-jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 276
Şekil 147. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden

OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 277
Şekil 148. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 277
Şekil 149. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 278
Şekil 150. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jellerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6) 279
Şekil 151. OXB-KT jel formülasyonuna ait TPA grafiği 282
Şekil 152. OXB-HPMC jel formülasyonuna ait TPA grafiği 283
Şekil 153. OXB-HPMC-POL jel formülasyonuna ait TPA grafiği 283
Şekil 154. OXB'nin tavşan serumundan analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği 288
Şekil 155. Ektraksiyon işleminden sonra tavşan serumunun kromotogramı 291
Şekil 156. OXB'nin taşan serumundadaki stabilitesi 292
Şekil 157. Hemen salım yapan Üropan Tabletin 6 tavşana günde bir uygulandığında elde edilen kan profili 294
Şekil 158. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-K100M2 jelin 6 tavşana iki günde bir uygulandığında elde edile kan profili 295
Şekil 159. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-KTH3 jelin 6 tavşana iki günde bir uygulandığında elde edile kan profili 295
Şekil 160. Vajinal uygulanan OXB çözeltisinin 6 tavşana iki günde bir uygulandığında elde edile kan profili 296
Şekil 161. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-K100M2, OXB-KTH3 jel, OXB çözelti ve oral üropan tabletin 6 tavşanda ortalama kan profili 296
Şekil 162. Film yöntemi ile hazırlanan ve 4°C'de üç ay boyunca bekletilen lipozomların partikül büyüklüğü ve PI değerleri. PB:partikül büyüklüğü, PI:polidispersite indeksi 330
Şekil 163. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve 4°C'de üç ay boyunca bekletilen lipozomların partikül büyüklüğü ve PI değerleri. PB:partikül büyüklüğü, PI:polidispersite indeksi 331

TABLOLAR

Tablo 1: Yapay vajinal sıvı ortamının içeriği 7
Tablo 2. Kitosan jel formülasyonlarına ait bileşenlerin belirlenmesi çalışması sırasında hazırlanan ön formülasyonlar 65
Tablo 3. CV-kitosan jel formülasyonunun bileşenleri 66
Tablo 4. Carbopol 974P ve Polikarbofil kullanılarak hazırlanan formülasyonların bileşenleri 66
Tablo 5. HPMC jel formülasyonunun bileşenleri 67
Tablo 6. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının bileşenleri 68
Tablo 7. Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri 73
Tablo 8. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri 76
Tablo 9. Lipojel formülasyonlarının bileşenleri 82
Tablo 10. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile kitosan mikroküre ön formülasyonlarının hazırlanmasında deney koşulları 84
Tablo 11. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile kitosan mikroküre formülasyonlarının hazırlanmasında deney koşulları 85
Tablo 12. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerin formülasyon içerikleri 86
Tablo 13. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerin formülasyon içerikleri 87
Tablo 14. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri 88
Tablo 15. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri 89
Tablo 16. Biyoadezif mikroküre-jel formülasyonlarının kodları (1:10 a/a karışım) 91
Tablo 17. Mukoadezyon testleri yapılan jeller 95
Tablo 18. Mukoadezyon test koşulları 98

Tablo 19. Örnek hesap 99
Tablo 20. Mukoadezyon testleri yapılan jeller 101
Tablo 21. OXB-kitosan jel formülasyonunun bileşenleri 117
Tablo 22. OXB-HPMC jel formülasyonlarının bileşenleri 118
Tablo 23. OXB-Poloksamer 407 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının bileşenleri 118
Tablo 24. Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri 121
Tablo 25. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri 122
Tablo 26. Lipojel formülasyonlarının bileşenleri 123
Tablo 27. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri 125
Tablo 28. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri 125
Tablo 29. Biyoadezif mikroküre-jel formülasyonlarının kodları (1:10 a/a karışım) 127
Tablo 30. TPA ve Mukoadezyon testleri yapılan OXB içeren jeller 128
Tablo 31. Cidofovirin pH 4.5'deki kalibrasyon parametreleri (n=3) 146
Tablo 32. Cidofovirin geri elde ile hesaplanan madde miktarı sonuçları 147
Tablo 33. Tekrarlanabilirlik sonuçları 147
Tablo 34. Polimerlerin viskozite ve pH değerleri 150
Tablo 35. Farklı glasiyel asetik asit ve kitosan oranlarına sahip etkin madde içermeyen jellerin pH ve viskozite değerleri 152
Tablo 36. Cidofovir içeren %3'lük kitosan jellerin özellikleri 158
Tablo 37. Farklı jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları 157
Tablo 38. HPMC jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları 160
Tablo 39. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının jelleşme sıcaklığı 162

Tablo 40. CV içermeyen ve içeren poloksamer jellerin viskozite değerleri 162
Tablo 41. CV-KITH3 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 165
Tablo 42. CV-C974P2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 165
Tablo 43. CV-HPMCK100M2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 166
Tablo 44. CV-HP407 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 166
Tablo 45. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri 171
Tablo 46. F1 ve CV-F2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışması boyunca ölçülen partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV) 176
Tablo 47. P1 ve CV-P2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV) 177
Tablo 48. CV-FS1 ve CV-FS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV) 178
Tablo 49. CV-PS1 ve CV-PS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV) 179
Tablo 50. CV'in CV-F2, CV-FS1 ve CV-FS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler 182
Tablo 51. CV'in CV-P2, CV-PS1 ve CV-PS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler 183
Tablo 52. Lipojellerin viskozite değerleri 186
Tablo 53. Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinin formülasyon İçerikleri 194
Tablo 54. Hazırlanan kitosan mikrokürelerin ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel (mV) 195
Tablo 55. Mikroküre içeren jellerin viskozite değerleri 195
Tablo 56. Hazırlanan CV içeren formülasyonların diyaliz membrandan geçiş verilerinin kinetik incelemesi 201
Tablo 57. Hazırlanan biyoadezif jel, lipojel ve mikoküre içeren jel formülayonlarının mekanik özellikleri (n=6) 207
Tablo 58. Farklı daldırma sıvılarda yapılan mukoadezyon ölçümünün Sonuçları 210

Tablo 59. Farklı prob hızlarında yapılan mukoadezyon ölçümünün sonuçları 212
Tablo 60. Farklı temas sürelerinde yapılan mukoadezyon ölçümünün Sonuçları 214
Tablo 61. Validasyon çalışması sonucunda elde edilen ve tüm çalışmalarda kullanılacak olan mukoadezyon test koşulları 214
Tablo 62. Etkin madde içermeyen farklı jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları 215
Tablo 63. CV içeren jellerin, lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları 217
Tablo 64. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki analizine ait doğruluk sonuçları 238
Tablo 65. Oksibütininin %4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki analizine ait kesinlik testi sonuçları 238
Tablo 66. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki deneylerarası kesinlik testi sonuçları 239
Tablo 67. OXB içeren %3'lük kitosan jellerin özellikleri 242
Tablo 68. 0XB-HPMC jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları 243
Tablo 69. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının jelleşme sıcaklığı 245
Tablo 70. OXB içeren poloksamer jellerin viskozite değerleri 245
Tablo 71. OXB-KITH3 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 248
Tablo 72. OXB-HPMCK100M2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 248
Tablo 73. OXB-HP407 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları 249
Tablo 74. Dokudan geçiş verilerinin kinetik incelemesi 251
Tablo 75. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri 254
Tablo 76. OXB-F2 lipozom formülasyonunun stabilite çalışması boyunca ölçülen partikül büyüklüğü (μm) ve zeta potansiyeli (mV) 259
Tablo 77. OXB-P2 lipozom formülasyonunun stabilite çalışmasındaki

partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV) 259
Tablo 78. OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV) 260
Tablo 79. OXB-PS1 ve OXB-PS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV) 261
Tablo 80. OXB'in OXB-F2, OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler 264
Tablo 81. OXB'in OXB-P2, OXB-PS1 ve OXB-PS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler 265
Tablo 82. Lipojellerin viskozite değerleri 268
Tablo 83. Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinin işlem etkinliği 273
Tablo 84. Hazırlanan OXB kitosan mikrokürelerin ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel (mV) 273
Tablo 85. OXB-Mikroküre içeren jellerin viskozite değerleri 274
Tablo 86. Hazırlanan OXB içeren formülasyonların diyaliz membrandan Geçiş verilerinin kinetik incelemesi 280
Tablo 87. Hazırlanan biyoadezif jel, lipojel ve mikrküre içeren jel formülayonlarının mekanik özellikleri (n=6) 284
Tablo 88. OXB içeren jellerin, lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları 286
Tablo 89. Oksibütininin tavşan serumunda ekstraksiyon işlemi uygulanarak yapılan analizine ait doğruluk test sonuçları 289
Tablo 90. OXB'nin tavşan serumunda ekstraksiyon işleminden sonra deneyiçi kesinlik sonuçları 289
Tablo 91. OXB'nin tavşan serumunda ekstraksiyon işleminden sonra deneylerarası kesinlik sonuçları 290
Tablo 92. OXB'nin Üropan tablet ve HPMC vajinal jel uygulamaları sonucunda bulunan AUC, Cmax ve tmax değerleri 298
Tablo 93. İn vivo çalışmalarda tavşanların çene altı tükrük bezlerindeki MDA, GSH ve Total NOx değerleri 308
Tablo 94. Stabilitesi inecelenen lipozomların bozunma kinetikleri ve raf ömürleri 332

RESİMLER

Resim 1.TA-XT*Plus* Texture profil analiz cihazı ve penetrometre 93
Resim 2. CRPV çözeltisi ile sırtından enfekte edilen tavşan resmi 103
Resim 3. Değişik boyutlarda üretilmiş VERO hücresi bulunan plateler 105
Resim 4. DMEM kullanılarak hazırlanan jeller 106
Resim 5. Biyoadezif jellerin tavşanlara vajinal uygulaması 138
Resim 6. Tavşanların kulak venlerine intraket takılması 138
Resim 7. Tavşanların kulak venlerinden kan alınması 139
Resim 8. Tavşanların vajinasının çıkarılması 140
Resim 9. Tavşanların vajinasının çıkarılması 140
Resim 10. CRPV ile enfekte edilen 4.tavşanın ilk gün resmi 219
Resim 11. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın birinci hafta resmi 219
Resim 12. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın ikinci hafta resmi 220
Resim13. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın üçüncü hafta resmi 220
Resim 14. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın dördüncü hafta resmi 221
Resim 15. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın beşinci hafta resmi 221
Resim 16. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın altıncı hafta resmi 222
Resim 17. Kontrol gurubu, sağlam VERO hücreleri 224
Resim 18. Kitosan jelin (KITH3) uygulandığı VERO hücre hattı 224
Resim 19. Carbopol jelin (KR) uygulandığı VERO hücre hattı 225
Resim 20. HPMC jelin (K100M) uygulandığı VERO hücre hattı 225
Resim 21. Poloksamer-HPMC jelin (HP407) uygulandığı VERO hücre hattı 226
Resim 22. Carbopol jelin (KR) Agar Overlay Test görüntüsü 227
Resim 23. Kitosan jelin (KITH3) Agar Overlay Test görüntüsü 227
Resim 24. Poloksamer-HPMC jelin (HP407) Agar Overlay Test görüntüsü 228
Resim 25. HPMC jelin (K100M) Agar Overlay Test görüntüsü 228
Resim 26. Kontrol grubuna ait yarı ince kesit resimleri
(Toluidin mavisi X 1A:400, 1B:1000) 300
Resim 27. Kontrol grubuna ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). 301
Resim 28. Kontrol grubuna ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). 301
Resim 29. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait yarı ince kesit resimleri

(Toluidin mavisiX 3A, 3B, 3C: 1000). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P) 302
Resim 30. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va) 303
Resim 31. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). Vakuoller (Va), mikrovillus benzeri yapılar (Mv) 303
Resim 32. OXB-HPMCK100M2 formülasyon grubuna ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisiX 5A, 5B, 5C: 1000). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va) 304
Resim 33. OXB-HPMCK100M2 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va) 305
Resim 34. OXB-HPMCK100M2 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va) 305
Resim 35. OXB-KITH3 formülasyon grubuna ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisiX 7A, 7B: 1000). 306
Resim 36. OXB-KITH3 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). 307
Resim 37. OXB-KITH3 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat X). 307
Resim 38. Tavşanların çene altı tükrük bezleri 308

KISALTMALAR

AUC: Plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan

Bhv 1: Sığır Herpes Virüsü Tip 1

CRPV: Cottontail Rabbit Papillomavirus

CHOL: Kolesterol

C_{max}: Pik plazma konsantrasyonu

Cl: Klirens

CV: Cidofovir

DMEM: Dulbeco's Minimal Essential Medium

DPPC:L-alpha-Dipalmitoyl phosphatidylcholine

DGPC:1-2 Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

F:Kuvvet

FDS: Fötal dana serumu

FM: Film yöntemi

FT: Dondurup çözme işlemi

FT-IR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GAA: Glasiyel asetik asit

HIV:Human Immundefinency Virus

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)

HPV: Human Papilloma Virus

HSV:Herpes Simplex Virüs

Lipojel: Lipozom-Jel

log *P*: Partisyon katsayısı

N: Newton

Na_2SO_4: Sodyum sülfat

NS: Serum fizyolojik

OXB: Oksibütinin

PB: pH 4.5 fosfat tamponu

PD: Poliol Dilüsyon yöntemi

PI: Polidispersite indeksi

pKa: Disasosiasyon katsayısı

PVP: Propiverine HCL

r: Determinasyon katsayısı

r^2:korelasyon katsayısı

rpm: Dakikada dönme sayısı

SA: Stearilamin

SEM: Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)

t_{max}: Pik konsantrasyona ulaşma zamanı

$t_{1/2}$:Yarılanma ömrü

$T_{sol\text{-}jel}$: Sol-jel geçiş sıcaklığı

TPA: Texture Profil Analizi

TPP: Tripolifosfat

Vd: Sanal dağılma hacmi

VFS: Yapay vajinal sıvıdır

W: İş

***G′*:** Elastiklik modülü

G″: Viskozluk modülü

***η′*:** Dinamik viskozite

<u>Polimer İsimlerinin Kısaltmaları:</u>

Kitosan H=KITH3: Yüksek viskoziteki kitosan

Kitosan M: Orta viskoziteli kitosan

Kitosan L : Düşük viskoziteli Kitosan

HPMC K100M=K100M: HPMC, Methocel K100M CR Premium USP/EP

HPMC K15M: HPMC, Methocel K15M CR Premium USP/EP

C974P=KR: Carbopol 974 P

Pol: Polikarbofil

P188: Poloksamer 188

P407: Poloksamer 407

FORMÜLASYON KODLARI:

Kitosan Jel Formülasyonları:

CV-KITH1: %1 oranında CV ve %1 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITH2: %1 oranında CV ve %2 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITH3: %1 oranında CV ve %3 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITM1: %1 oranında CV ve %1 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITM2: %1 oranında CV ve %2 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITM3: %1 oranında CV ve %3 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITL1: %1 oranında CV ve %1 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITL2: %1 oranında CV ve %2 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITL3: %1 oranında CV ve %3 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
CV-KITH1: %1 oranında CV ve %1 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITH2: %1 oranında OXB ve %2 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITH3: %1 oranında OXB ve %3 oranında Kitosan H polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITM1: %1 oranında OXB ve %1 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITM2: %1 oranında OXB ve %2 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITM3: %1 oranında OXB ve %3 oranında Kitosan M polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITL1: %1 oranında OXB ve %1 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITL2: %1 oranında OXB ve %2 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu
OXB-KITL3: %1 oranında OXB ve %3 oranında Kitosan L polimeri içeren kitosan jel formülasyonu

Carbopol ve Polikarbofil Jel Formülasyonları:

C974P1: %1 oranında Carbopol 974P polimeri içeren jel formülasyonu
C974P2: %2 oranında Carbopol 974P polimeri içeren jel formülasyonu
CV-C974P1: %1 oranında CV ve %1 oranında Carbopol 974P polimeri içeren jel formülasyonu
CV-C974P2: %1 oranında CV ve %2 oranında Carbopol 974P polimeri içeren jel formülasyonu
POL1: %1 oranında Polikarbofil AA-1polimeri içeren jel formülasyonu
POL2: %2 oranında Polikarbofil AA-1polimeri içeren jel formülasyonu
CV-POL1: %1 oranında CV ve %1 oranında Polikarbofil AA-1polimeri içeren jel formülasyonu
CV-POL2: %1 oranında CV ve %2 oranında Polikarbofil AA-1polimeri içeren jel formülasyonu

HPMC Jel Formülasyonları:

HPMCK100M1: %1 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
HPMCK100M2: %2 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu

CV-HPMCK100M1: %1 oranında CV ve %1 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
CV-HPMCK100M2: %1 oranında CV ve %2 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-HPMCK100M1: %1 OXB ve %1 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-HPMCK100M2: %1 OXB ve %2 oranında HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
HPMCK15M1: %1 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu
HPMCK15M2: %2 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu
CV-HPMCK15M1: %1 oranında CV ve %1 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu
CV-HPMCK15M2: %1 oranında CV ve %2 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-HPMCK15M1: %1 oranında OXB ve %1 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-HPMCK15M2: %1 oranında OXB ve %2 oranında HPMC K15M polimeri içeren jel formülasyonu

Poloksamer Jel Formülasyonları:

P407 : %20 oranında Poloksamer 407 polimeri içeren jel formülasyonu
P188: %20 oranında Poloksamer 188 polimeri içeren jel formülasyonu
MP407: %20 oranında Poloksamer 407 ve %0.2 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
HP407: %20 oranında Poloksamer 407 ve %0.5 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
CV-P407: %1 CV ve %20 oranında Poloksamer 407 polimeri içeren jel formülasyonu
CV-MP407: %1 CV, %20 Poloksamer 407 ve %0.2 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
CV-HP407: %1 CV, %20 Poloksamer 407 ve %0.5 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-P407: %1 OXB ve %20 oranında Poloksamer 407 polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-MP407: %1 OXB, %20 Poloksamer 407 ve %0.2 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu
OXB-HP407: %1 OXB, %20 Poloksamer 407 ve %0.5 HPMC K100M polimeri içeren jel formülasyonu

Film Yöntemi ile Hazırlanan Lipozom Formülasyonları:

F1: Film yöntemi ile hazırlanan etkin madde içermeyen liozom formülasyonu
CV-F2: CV içeren film yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu
CV-FS1: CV ve SA içeren film yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu
CV-FS2: CV ve SA içeren film yöntemi ve dondurup çözme ile hazırlanan liozom formülasyonu
OXB-F2: OXB içeren film yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu
OXB-FS1: OXB ve SA içeren film yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu
OXB-FS2: OXB ve SA içeren film yöntemi ve dondurup çözme ile hazırlanan liozom formülasyonu

Poliol Dilüsyon Yöntemi ile Hazırlanan Lipozom Formülasyonları:

P1: Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan etkin madde içermeyen liozom formülasyonu
CV-P2: CV içeren Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu
CV-PS1: CV ve SA içeren Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu

CV-PS2: CV ve SA içeren Poliol dilüsyon yöntemi ve dondurup çözme ile hazırlanann liozom formülasyonu

OXB-P2: OXB içeren Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan liozom formülasyonu

OXB-PS1: OXB ve SA içeren Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozom formülasyonu

OXB-PS2: OXB ve SA içeren Poliol dilüsyon yöntemi ve dondurup çözme ile hazırlanan liozom formülasyonu

Lipojel Formülasyonları:

CV-F2-KR: CV içeren F2 lipozomunu taşıyan KR jel formülasyonu

CV-F2-KITH3: CV içeren F2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

CV-F2-K100M: CV içeren F2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

CV-P2-KR: CV içeren P2 lipozomunu taşıyan KR jel formülasyonu

CV-P2-KITH3: CV içeren P2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

CV-P2-K100M: CV içeren P2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

CV-FS2-KR: CV içeren FS2 lipozomunu taşıyan KR jel formülasyonu

CV-FS2-KITH3: CV içeren FS2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

CV-FS2-K100M: CV içeren FS2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

CV-FS2-P407: CV içeren FS2 lipozomunu taşıyan P407 jel formülasyonu

CV-PS2-KR: CV içeren PS2 lipozomunu taşıyan KR jel formülasyonu

CV-PS2-KITH3: CV içeren PS2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

CV-PS2-K100M: CV içeren PS2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

CV-PS2-P407: CV içeren PS2 lipozomunu taşıyan P407 jel formülasyonu

OXB-FS2-KITH3: OXB içeren FS2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

OXB-FS2-K100M: OXB içeren FS2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

OXB-FS2-P407: OXB içeren FS2 lipozomunu taşıyan P407 jel formülasyonu

OXB-PS2-KITH3: OXB içeren PS2 lipozomunu taşıyan KITH3 jel formülasyonu

OXB-PS2-K100M: OXB içeren PS2 lipozomunu taşıyan K100M jel formülasyonu

OXB-PS2-P407: OXB içeren PS2 lipozomunu taşıyan P407 jel formülasyonu

Mikroküre Formülasyonları:

E1: Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre ön formülasyonu

E2: Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

CV-T1: CV içeren İyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

CV-K1: CV içeren iyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi ile hazırlanan mikroküre formülasyonu

CV-AS4: CV içeren kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

CV-BT4: Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

OXB-T1: OXB içeren İyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

OXB-K1: OXB içeren iyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi ile hazırlanan mikroküre formülasyonu
OXB-AS4: OXB içeren kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu
OXB-BT4: Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonu

Biyoadezif mikroküre-jel formülasyonları:

CV-T1-KR: CV içeren T1 mikroküresini taşıyan KR mikroküre jel formülasyonu
CV-T1-KITH3: CV içeren T1 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
CV-T1-K100M: CV içeren T1 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
CV-K1-KR: CV içeren K1 mikroküresini taşıyan KR mikroküre jel formülasyonu
CV-K1-KITH3: CV içeren K1 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
CV-K1-K100M: CV içeren K1 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
CV-AS4-KR: CV içeren AS4 mikroküresini taşıyan KR mikroküre jel formülasyonu
CV-AS4-KITH3: CV içeren AS4 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
CV-AS4-K100M: CV içeren AS4 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
CV-BT4-KR: CV içeren BT4 mikroküresini taşıyan KR mikroküre jel formülasyonu
CV-BT4-KITH3: CV içeren BT4 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
CV-BT4-K100M: CV içeren BT4 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
OXB-T1-KITH3: OXB içeren T1 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
OXB-T1-K100M: OXB içeren T1 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
OXB-T1-P407: OXB içeren T1 mikroküresini taşıyan P407 mikroküre jel formülasyonu
OXB-K1-KITH3: OXB içeren K1 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
OXB-K1-K100M: OXB içeren K1 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
OXB-K1-P407: OXB içeren K1 mikroküresini taşıyan P407 mikroküre jel formülasyonu
OXB-AS4-KITH3: OXB içeren AS4 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
OXB-AS4-K100M: OXB içeren AS4 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
OXB-AS4-P407: OXB içeren AS4 mikroküresini taşıyan P407 mikroküre jel formülasyonu
OXB-BT4-KITH3: OXB içeren BT4 mikroküresini taşıyan KITH3 mikroküre jel formülasyonu
OXB-BT4-K100M: OXB içeren BT4 mikroküresini taşıyan K100M mikroküre jel formülasyonu
OXB-BT4-P407: OXB içeren BT4 mikroküresini taşıyan P407 mikroküre jel formülasyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu tezin amacı lokal etkili cidofovir ve sistemik etkili oksibütinin etkin maddelerinin kontrollü salım yapan yeni biyoadezif vajinal ilaç şekillerinin geliştirilmesi ve bu sistemlerin in vitro ve in vivo olarak değerlendirilmesidir. Bu amaçla farklı polimerler kullanarak 5 farklı dozaj şekli, değişik hazırlama yöntemleri ile hazırlanmıştır. Bu dozaj şekillerinin lokal ve sistemik etkinlikleri hücre kültürü çalışmaları ve in vivo tavşan deneyleri ile tayin edilmiştir.

İlaçların vajinal yoldan uygulanması, ilk geçiş etkisinden korunma, yüksek absorbsiyon ve paranteral uygulamalara alternatif olması gibi pek çok avantaj sağlar. Bayanlarda genital sistemin hijyenini sağlamak ve özellikle postmenapozal dönemde ortaya çıkan hastalıkların tedavisinin sağlanması için hazırlanan formülasyonların vajinal uygulaması önem taşımaktadır. Vajinal yolla ilaç verilişinde, jeller, supozituvarlar, vajinal tabletler, vajinal halkalar ve cisimler kullanılmaktadır. Bu ilaç taşıyıcı sistemler ile etkin maddenin vajinada istenilen sürede kalması ve etkinliğini göstermesi amaçlanır. Özellikle kontrollü salım yapan vajinal preparatların hazırlanmasında aranacak en önemli özellik vajinada kalış süresidir. Bu amaçla vajinal formülasyonun vajinada kalış süresini uzatacak biyoadezif sistemler geliştirilmiştir. Çalışmamızda lokal ve sistemik etkili iki etkin madde kullanılarak beş farklı dozaj formu hazırlanmıştır. Farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan biyoadezif vajinal ilaç formlarında farklı polimerler kullanılmıştır. Böylece vajinal uygulandığında 48 saat süresince kontrollü salım yapabilen ve vajinal mukozaya tutunma yeteneği olan en iyi formülasyon belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızın birinci bölümünde Human Papilloma Virus'ün (HPV) neden olduğu genital siğillerde etkili olabilecek vajinal yoldan uygulanan sistemik yan etkileri azaltılmış, kontrollü salım yapan biyoadezif vajinal cidofovir preparatı geliştirilmiştir. Yeni bir sınıf antiviral etkin madde olan cidofovir, sistemik kullanıldığında biyoyararlanımı son derece düşük ve

nefrotoksik bir etkin maddedir. Çalışmamız sırasında lokal etkili tedaviye yönelik olarak yeni vajinal ilaç şekilleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu ilaç şekillerinin hücre kültürü çalışmaları ile antiviral etkinliği test edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise oksibütinin ile çalışılmıştır. Oksibütinin sistemik etkilidir ve üriner inkontinans (idrar tutamama) tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalık, mesanesi aşırı aktif olan kişilerde ve menapozdaki kadınlarda görülür, hastanın sosyal yaşantısını etkiler. Oksibütinin oral biyoyararlanımı düşük ve yan etkileri fazla olan bir madde olduğu için vajinal uygulamasının avantajlı olduğu düşünülerek, vajinada uzun süre kalacak, kontrollü salım yapacak ilaç şekilleri geliştirilmiştir. Oksibütininin vajinal uygulamasına yönelik yapılan çalışmalarda biyoadezif sistemlerin hazırlanmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biyoadezif vajinal sistemler ilacın mukoza ile temas süresini uzatarak etkinin daha uzun süre devam etmesini sağlarlar. Hazırlanan yeni biyoadezif vajinal sistemler ile özellikle menapozdaki kişilerde görülen idrar tutamama hastalığının tedavisinde, daha az sıklıkla kullanılan, uzun etkili preparatlar geliştirilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamız kapsamında cidofovir ve oksibütinin etkin maddeleri için yapılan in vitro ve in vivo deneylerin amaçları şunlardır:

- Lokal ve sistemik etkisi incelenecek olan her iki etkin maddenin 48 saat süre boyunca kontrollü salım yapacak en uygun biyoadezif vajinal formülasyonunu (jel, lipojel ve mikroküre içeren jel) geliştirmek,
- Hazırlanan ilaç şekillerinin farmasötik karakterlerini, mukoadezyon özelliklerini ve stabilitesini incelemek,
- Cidofovir ile in vitro çalışmalarda olumlu sonuç veren formülasyonların antiviral etkinliğini in vivo olarak tavşanlarda ve hücre kültürü çalışmaları ile incelemek,
- Oksibütinin içeren sonuç formülasyonların tavşan vajinal dokusundan geçiş özelliğini belirlemek ve tavşanlarda in vivo uygulanan formülasyonların kan konsantrasyonunu izleyerek oral piyasa preparatı ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

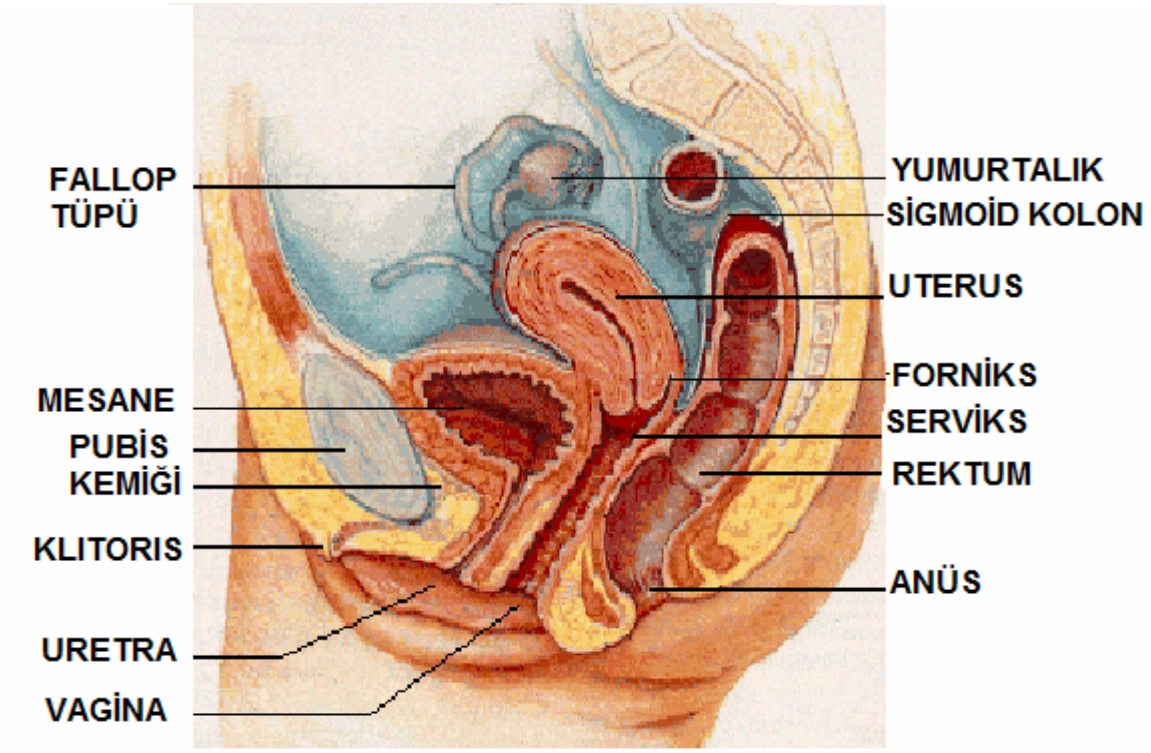
2.1. Vajinanın Anatomik ve Fizyolojik Özellikleri

2.1.1. Vajinanın Anatomisi ve Histolojisi

Vajinal ilaç şekilleri, lokal etkili ilaçlar ve bazı sistemik ilaçlar için uzun yıllardır geliştirilmiş ve klinikte kullanılmıştır[1]. Vajinal yoldan ilk ilaç uygulamaları genellikle kontraseptif amaçla ve vajinal enfeksiyonların lokal tedavisi amacıyla başlamıştır[2]. 1918'den önce vajinanın sistemik absorbsiyon için yetersiz olduğu düşünülüyordu. Ancak 1918'de morfin, atropin ve potasyum iyodürün vajinadan absorbe olduğu bildirildi ve lokal tedaviler sırasında bazı ilaçların yeterli serum seviyesine ulaştığı gözlendi, böylece bazı ilaçlar oral yol yerine vajinadan uygulanmaya başlandı[3]. Vajinanın yüzey alanı geniş ve kan damar ağı bakımından oldukça zengindir[4]. Dolayısıyla ilaçların sistemik absorbsiyonu transdermal ve diğer transmukozal yollara göre daha fazladır. Oral yoldan uygulanan ilaçlara göre vajinal uygulanan ilaçların avantajı, ilaçların ilk geçiş etkisine uğramadan sistemik dolaşıma geçebilmeleridir. Vajinal tablet, krem ve supozituvarlar yaygın olarak kullanılan vajinal formülasyonlardır. Vajinada kontrollü salım yapan sistemler ilk defa 1970'de geliştirilmiştir. O yıllarda ilk defa medroxyprogesteron asetatın kontrasepsiyon amacı ile kontrollü salım yapan vajinal halkası kullanılmıştır[2]. Son yıllarda vajinal anatomi, fizyoloji, mikroflora ve salgıların iyi araştırılması sayesinde vajinal ilaç uygulanmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir[5].

Vajina, diğer bir adıyla doğum kanalı, ince bir duvara sahip fibromüsküler bir tüp şeklindedir. Vajina girişiyle başlayan ve uç kısmında rahim ağzının yer aldığı boru şeklindeki yapı yaklaşık 8-12 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde bir yapı olup uterusun devamı şeklindedir. Üst tarafında uterus, ön tarafında uretra ve mesane, arkasında ise rektum bulunmaktadır[6] (Şekil 1). Vajinanın üst ucu serviksi dıştan bir halka şeklinde sarar ve serviks duvarına sıkıca yapışıktır. Kas ve zarlardan

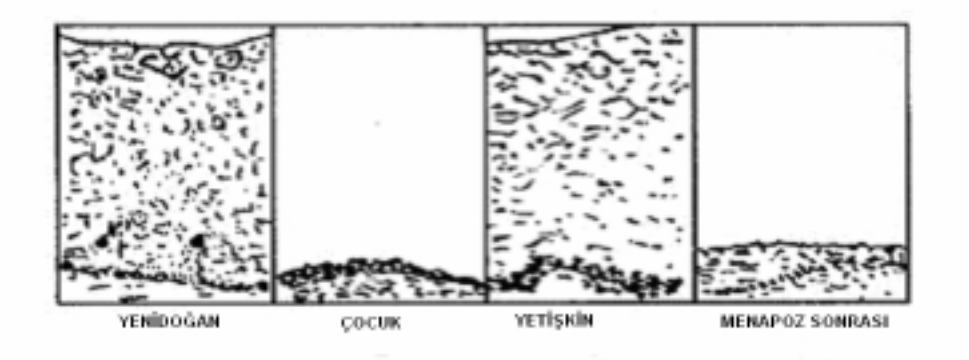
oluşan bu üreme organı, uterus boşluğu ve serviks kanalını dış ortam ile birleştirir[7]. Cinsel ilişki süresince penisden gelen sperm burada depolanır. Aynı şekilde menstrual kanın dışa aktığı ve doğum zamanı gelmiş bebeğin doğum sırasında geçtiği yol da vajinadır[8,9].



Şekil 1: Kadın üreme sisteminin şematik görüntüsü[10]

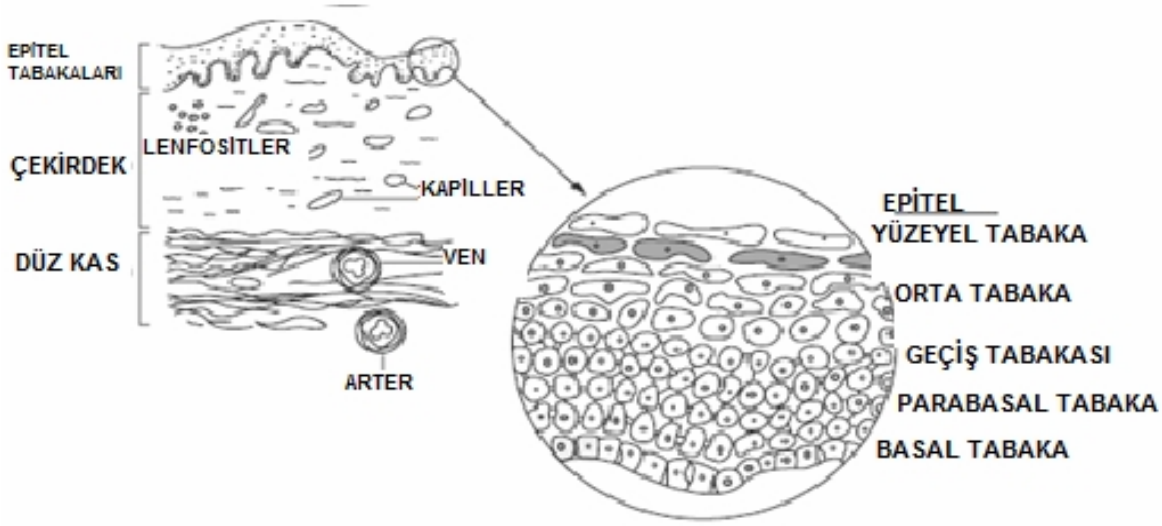
Vajina, üreme çağındaki kadınlarda çok sayıda ruga denilen kıvrımlara sahiptir, bu özelliğinden dolayı vajina duvarının yüzey alanı çok geniştir[3]. Vajina histolojik olarak incelendiğinde dört farklı tabakadan oluştuğu görülmektedir. En yüzeyde yassı epitel tabaka bulunur ve salgı bezi içermez. Daha sonra kollajen ve elastinden oluşan lamina propria veya tunica denilen tabaka gelir, bu tabaka vasküler ve lenfatik kanallar açısından zengindir. Üçüncü tabaka kas tabakasıdır, düz kas lifleri boyuna ve dairesel olarak çalışır. Son tabaka ise gözenekli destek doku ve kan damar ağından oluşmaktadır. Vajinal doku yağ hücreleri, salgı bezleri veya kıl kökü içermez[3].

Vajinal fizyoloji, yaş, hormon seviyesi, hamilelik durumu ve pH değişimi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir[3]. Vajina dokusundaki epitel tabaka 200-300 µm kalınlığındadır ve bu kalınlık estrojen seviyesine göre değişkendir. Menapoz sonrası epitelin kalınlığı azalır ve geçirgenliği artar. Vajina epitelinin kalınlığı estrojen seviyesine bağlı olarak menstrüel siklus boyunca da değişmektedir. Bu değişmeler vajinadan ilaç absorbsiyonunu da etkilemektedir[11] (Şekil 2).



Şekil 2: Vajinal dokuda bulunan epitel kalınlığının yaşa göre değişkenliği[11]

Vajinal mukozanın elektron mikroskobundaki görüntüsü Şekil 3'de gösterilmiştir[1].



Şekil 3: Vajina duvarının kesiti[1]

2.1.2. Vajinal Sıvı ve Servikal Mukus

Vajinanın yüzeyi bir film tabakası ile kaplıdır. Bu film vajinal sıvı olarak bilinir ve servikal mukus ile pul pul olup dökülmüş hücreleri içerir. Bu sıvı, Bartholin ve Skene bezlerinden salgılanır[12]. Vajina epiteli goblet hücrelerini (mukus salgılayan tek hücreli bez) içermemesine ve müsinin doğrudan salgılandığı bir yer olmamasına karşın ince bir mukus tabakasına sahiptir[5].

Vajinal sekresyon, en fazla servikal sekresyonlar ve vajinanın lümenine hücrelerarası kanallardaki kan damarlarından gelen sıvıdan oluşmaktadır[13]. Vajinal sıvı, elektrolitler (kalsiyum, potasyum, sodyum ve klorür), enzimler, çeşitli enzim inhibitörleri, proteinler, karbohidratlar, amino asitler, alkoller, hidroksi-ketonlar, aromatik bileşikler, laktik asit, asetik asit, gliserin, üre, glikojen ve glikozdan oluşur. Bu sıvının bileşimi yaşa, hastalık durumuna ve menstrüel siklusa göre değişkenlik gösterir, yani estrojen üretimine bağlıdır[12]. Mukusun miktarı menstruasyondan hemen sonra minimumdur, öncesinde ise transparan, viskoz ve elastikdir[10]. Üreme çağındaki kadınlarda salgılanan vajinal sıvı yaklaşık olarak 3-4 g/4 saat olarak ölçülmüştür. Estrojenden yoksun postmenopozal kadınlarda üretilen sıvının miktarı %50 daha azdır[13].

Terapötik, kontraseptif veya farmakolojik etkinliği olan formülasyonlar vajinaya uygulandığında fiziksel ve kimyasal özellikleri değişken olan bu sıvı ile karşılaşırlar. Vajinal formülasyonların akışı, vajinada tutunması, ilaç dağılımı ve kinetiği gibi özellikleri, bu sıvı ile etkileşmelerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu etkileşmelerin anlaşılabilmesi için yapay vajinal sıvı ortamları ile çalışılmıştır[14]. Yapay vajinal sıvı ortamı, in vitro çalışmalarda kullanılmak üzere, vajinal ve servikal sıvının özellikleri taklit edilerek geliştirilmiştir[14,15]. Yapay vajinal bir sıvının içeriğine bir örnek Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Yapay vajinal sıvı ortamının içeriği[14]

BİLEŞİM	KONSANTRASYON (g/L)
Sodyum klorür	3.5
Potasyum hidroksit	1.4
Kalsiyum hidroksit	0.22
Sığır serum albümini	0.018
Laktik asit	2.0
Asetik asit	1.0
Gliserin	0.16
Üre	0.40
Glukoz	5.0
HCl	pH 4.2'ye ayarlanacak
Su	ym 1000 mL

2.1.3. Vajinal Flora ve Vajinal pH

Vajinanın normal florası çoğunlukla zararsız bakterileri içerir, bu bakteriler servikal mukustan beslenirler. Normal postpubertal vajinal mikroflorada en fazla bulunan mikroorganizmalar *Lactobacillus* türleridir[6]. Laktobasiller vajinal epitelyum yanında insan ve hayvanların intestinal kanal ve oral boşluklarındaki nemli yüzeylerde kolonize olan, çok az bir kısmı anaerobik koşullarda üremesine rağmen genel olarak fakültatif anaerob (hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda solunum yaparak gelişebilen) üreyen mikroorganizmalardır[16]. Türk kadınlarının vajinal florasından izole edilen suşlar arasında en yaygın bulunan suşun *Lactobacillus gasseri* olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar mikrofloranın ırka, yaşa ve yaşanılan bölgeye göre farklılıklar gösterebileceğini ortaya koymaktadır[11,17]. Laktobasillerin vajinadaki fonksiyonu, patojen mikroorganizmaların üremesini kısıtlayan ortam yaratmak ve bu ortamı sürdürmektir. Bakteriyel floradaki faydalı basiller (*Doderlein's bacillus, Lactobacillus acidophilus*) vajinada glikojeni metabolize eder ve bunun sonucunda laktik asit ile hidrojen peroksit oluşmasına neden olur. Bu durum vajinada zayıf asidik bir ortamın meydana gelmesine neden olur (pH 4-5). Hidrojen peroksit üreten laktobasillerin azalması, genital ve üriner enfeksiyonlarda artışa neden

olmaktadır[6,18]. Hidrojen peroksit üreten laktobasillerin kolonize olduğu kadınların bakteriyel vajinozis, HIV enfeksiyonu ve gonoreye yakalanma riskinin düşük olduğu belirtilmektedir[16].

Sağlıklı bir kadında vajinal pH 4-5 arasında olup, dökülen epitel hücrelerdeki gikojeni laktik aside dönüştüren laktobasiller tarafından bu pH sürdürülmektedir. Menapozdan sonra servikal mukusdaki glikojen miktarı düşer ve buna bağlı olarak pH değeri 7.0-7.4'e yükselir[5,6]. Menstruel, servikal, uterin salgılar ve sperm, ortamı alkaliye çeviren ajanlar olarak rol oynamakta ve pH'yı artırmaktadır (pH 7.0-8.0)[5]. Bu etki hızlı oluşmakta ve birkaç saat sürmektedir. Kadın hijyen ürünleri ve farklı yıkama yolları bakteri kolonizasyonunu artırmakta ve vajinal pH değişmektedir. Bu durum patojen bakterilerin ve mayaların hızla çoğalmasına neden olur[3,19]. Menstruel siklus sırasında estrojen düzeyindeki değişiklikler nedeniyle epitel hücre tabakasının kalınlığında, hücrelerarası kanalların genişliğinde, pH ve salgılarda değişiklikler oluşmaktadır[11]. Postmenepoz ve menepoz dönemlerinde estrojen üretimindeki ve epitel hücre tabakasının kalınlığındaki azalmaya bağlı olarak, vajinal glikojen içeriğinde de kalıcı bir azalma olmaktadır[20]. Pek çok patojenik bakteri pH 4.1-4.9 arasında üreme şansı bulamadığı için vajinal mukozanın asidik özelliğinin devamının sağlanması klinik açıdan çok büyük önem taşımaktadır[7].

2.1.4. Enzimatik Aktivite

Vajinada görülen enzimatik aktivite, gastrointestinal sistem ile karşılaştırıldığında daha düşüktür[21]. Vajinal mukoza aminopeptidaz, β-glukuronidaz, fosforik asit, α-napthylesterase, diphosphopyridine nucleotide-diaphorase (DPNH), fosfoamidaz ve suksinik dehidrogenaz içermektedir. Bu enzimler vajinal ilaç dağılımını ve dolayısıyla bu yoldan alınan ilaçların yararlılığını etkilemektedir[6]. Vajinal membrana bağlı olan aminopeptidazlar vajinal yoldan uygulanan peptit ve protein yapısındaki ilaçların biyoyararlılıklarının düşmesine neden olurlar[22].

Değişik türler vajinal enzimatik aktivite açısından karşılaştırıldığında, aminopeptidaz aktivitesi yüksekten düşüğe doğru şöyle bulunmuştur: koyun>domuz>tavşan≥insan≥sıçan. Bu sıralamaya göre sıçan ve tavşan enzimatik aktivite çalışmalarında ve peptid protein yapısındaki ilaçların degradasyonlarının belirlenmesinde en iyi model olarak belirlenmiştir[22,23].

2.2. Vajinal Absorbsiyon

Vajinal mukozadan emilim başlıca üç yolla gerçekleşmektedir[12,23].

- Hücreiçi yol (transelüler yol): konsantrasyona bağlı olarak hücre içinden difüzyonla gerçekleşir.
- Hücrelerarası yol (interselüler yol=paraselüler yol): Sıkı bağlantı noktalarının (tight junctions) aracılık ettiği geçiş.
- Veziküler ve reseptör aracılı taşıma.

Vajinal ilaç sistemlerinde ilacın absorbsiyonu iki ana adımda gerçekleşir[23]:

1. İlacın vajina kanalında çözünmesi,
2. Membran penetrasyonu.

Bu basamakları etkileyen bir çok faktör vardır. Bunların başında fizyolojik faktörler ve ilacın fizikokimyasal özellikleri gelir. Fizyolojik faktörlerin arasında; siklus değişimi, epitelin kalınlığı, enzimatik aktivite, porozitesi ve hacmi, vajinal sıvının viskozitesi ve pH'sı sayılabilir[11,24]. Vajina epitelinin normal kalınlığı 200-300 μm'dir. Menstrüel siklus boyunca değişen estrojen miktarına bağlı olarak epitelin kalınlığı da değişmektedir. Bu durum ilaç absorbsiyonunu etkiler[21].

Vajinal sıvının yapısı da, ilaç emilimini önemli derecede etkiler. Sıvının miktarının artması, ilacın çözünmesini kolaylaştıracağı için bir avantaj olabilir. Bunun yanında aynı sıvı, vajinadan dışarı yavaş yavaş aktığı için, ilacı da dışarı atabilir. Ayrıca çoğu zaman vajinada bulunan koyu kıvamlı servikal mukus, mikropartiküllerin biyoadezyonunda ve ilaç salımı için bariyer olarak etki gösterebilir[2]. Mukozal bariyerin alşılmasında partikül büyüklüğü, konsantrasyon ve yüzey yükü etkilidir. Pozitif yüzey yüküne sahip olan ilaçların müsin içeren vajinal ortamda daha stabil

oldukları ve daha fazla absorbe oldukları bildirilmiştir. Vajinal uygulamada karşılaşılan en büyük sorunlardan biri ise vajinanın kendi kendini temizlemesinden kaynaklanan düşük tutunma kapasitesidir[4]. Vajinada kalış süreleri uzatılmış olan ilaç taşıyıcı sistemlerinden etkin maddenin vajinal absorbsiyonunun rektum veya intestinal mukozadan daha fazla olduğu bildirilmiştir[25]. Bazı zayıf asit yapısındaki ilaçların pH değişimine bağlı olarak iyonizasyon dereceleri değişmekte ve bu durum vajinal absorbsiyonlarını da etkilemektedir. PGE_2 içeren vajinal formülasyonların in vitro salım çalışmalarında pH'nın etkili olduğu bulunmuştur. pH'ya duyarlı ilaçların salım profilleri vajinal pH'nın değişiminden etkilenmektedir[23]. İlacın fizikokimyasal özelliklerinin arasında ise, molekül ağırlığı, iyonizasyon derecesi ve lipofilitesi vardır. Tavşanlar üzerinde yapılan hayvan çalışmalarında vajinal epitelden geçiş incelenmiş ve lipofilik yapıdaki progesteronun geçişi hidrofilik yapıdaki mannitolden daha fazla bulunmuştur. Progesteronun vajinal geçişi ile lipofilitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirtilmiştir[26]. Düşük molekül ağırlıklı lipofilik ilaçların absorbsiyonunun büyük moleküllü hidrofilik veya lipofilik ilaçlardan daha fazla olduğu bildirilmiştir[23].

Vajinaya uygulanan ilaçların biyoyararlılıklarının iyileştirilmesi için kimyasal penetrasyon artırıcılar (sodyum taurokolat, dimetil-β-siklodekstrin vb.) kullanılmaktadır. Bu maddeler epiteldeki sıkı bağlantı noktalarını (tight junctions) açarak alternatif interselüler penetrasyon yolu oluştururlar, böylece peptit-protein gibi büyük molekül ağırlıklı terapötik maddelerin geçişlerine imkan sağlanmış olur[10]. Vajinal absorbsiyon çalışmalarında pek çok hayvan modeli kullanılmıştır. Bunlar arasında sıçan, fare, tavşan, maymun, köpek ve koyun vardır[27,28]. Farklı vajinal epitellerden absorbsiyon da farklı olmaktadır. Kemirgenlerin östrus durumları farklı absorbsiyon oranlarına neden olmaktadır. Antiviral bir madde olan trisodyum fosfonofosfatın köpek ve tavşana vajinal uygulamasından sonra, mutlak biyoyararlanım köpekte %14 tavşanda ise %34 olarak bulunmuştur[29].

2.3. Vajinal İlaç Uygulamasının Avantajları Ve Dezavantajları

Vajinal yoldan uygulanan ilaçların avantajları söyle sıralanabilir[5,30,31].

- Hepatik ilk geçiş etkisinden korunma. Örneğin propranololün vajinal uygulanmasındaki biyoyararlanımı oral biyoyararlanımına göre oldukça yüksektir.
- Vajinal duvarda yoğun kan damar ağı bulunduğu için yüksek absorbsiyon görülür.
- Gastrointestinal yan etkiler oluşmaz (örnek olarak bromokriptin uygulaması)
- Steroit kullanımı, hormon yerine koyma tedavisi ve kontrasepsiyon amacıyla kullanılan ilaçların hepatik yan etkileri azalır.
- Parenteral ilaç uygulamasında görülen; doku hasarından, olası enfeksiyon riskinden ve ağrı sebebi ile hasta uyuncu riskinden uzaktır.
- İlacı hastanın kendi uygulama kolaylığı ve uygulamadan sonra vazgeçip geri alınabilme imkanı sağlar.

Bütün bu avantajlarından dolayı pek çok ilacın lokal uygulanmasında vajinal yol tercih edilmektedir. Vajinal bölge progesteron ve danazol gibi uterusa hedeflenen etkin maddeler için de potansiyel bir veriliş yolu olarak kabul edilmektedir[11]. Bayanlarda genital sistemin hijyenini sağlamak ve özellikle postmenapozal dönemde sıklıkla rastlanan vajinal kuruluğun giderilmesi için hazırlanan formülasyonların uygulanması açısından vajinal yol önem taşımaktadır[32].

Vajinal yoldan uygulanan ilaçların dezavantajları ise şöyledir[5,11,33,34].

- Uygulama sadece kadınlara özgüdür.
- Estrojen konsantrasyonunun değişmesi sonucunda vajinal geçirgenliğin değişmesi ve buna bağlı olarak sistemik etki için tasarlanan ilaçların farmakokinetik özelliklerinin değişmesi söz konusu olabilir.
- Uygulama bölgesinde kalış süresi kısadır.

- Tedavi bitmeden hasta ilacı kullanmayı bırakabilmekte ve hastalık tekrarlayabilmektedir.
- Kültürel yapı da vajinal ilaç kullanımını sınırlayabilir.

2.4. Vajinaya Uygulanan İlaçlar

Vajinaya uygulanan ilaçlar farmakolojik gruplarına göre ve farmasötik şekillerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar.

2.4.1. Vajinaya Uygulanan İlaçların Farmakolojik Grupları

Vajinaya uygulanan ilaçlar farmakolojik gruplarına göre şöyle sınıflandırılabilirler[1,3,10,21,23].

- ❖ Antimikrobiyal ilaçlar: metronidazol, klindamisin, penisilin, sulfanilamid ve gentamisin
- ❖ Antikanser ilaçları: cisplatin, fentikonazol
- ❖ Prostaglandinler: prostaglandin E_2
- ❖ Spermisitler, mikrobisidler: nonoxynol-9, 5-Fluorourasil
- ❖ Steroidler: progesteron ve estrojen
- ❖ Peptit ve Proteinler: insülin, gonadotropin releasing hormon, salmon calcitonin, rekombinant human relaxin
- ❖ Aşılar, Antijenler ve Gen Tedavisi
- ❖ İdrar tutamama durumunda kullanılan ilaçlar: Oksibütinin
- ❖ Ağrı Kesiciler: Morfin
- ❖ Antifungal, Antiviral, Antiparaziter ve Diğerleri: asiklovir, cidofovir, imidazol türevleri, ekonazol vb.

2.4.2. Vajinaya Uygulanan İlaçların Farmasötik Şekilleri

Vajinaya uygulanan ilaç şekilleri ise şöyle sıralanabilir[12,35]:

- ❖ Vajinal tabletler ve kapsüller
- ❖ Vajinal supozituvarlar ve ovüller
- ❖ Vajinal krem ve jeller
- ❖ Vajinal halkalar

- ❖ Biyoadezif sistemler
- ❖ Vajinal çözelti, emülsiyon ve süspansiyonlar
- ❖ İlaçlı vajinal tamponlar
- ❖ Vajinal köpükler
- ❖ Vajinal implantlar.

Bu ilaç şekillerinin etkili tedavi sağlayabilmeleri için vajinada kalış sürelerinin uygun olması gerekir. Konvansiyonel vajinal dozaj formlarının, vajinal sıvının kendine özgü dinamiği nedeniyle uygulama alanında sınırlı kalabilmesi ilaç etkinliğini azaltmaktadır[36]. Bu nedenle son yıllarda ilaçların vajinada kalış süresinin artırılması hedeflenmiş ve pek çok biyoadezif polimer bu amaçla kullanılmıştır[37]. Biyoadezif polimerler, mukozaya yapışan ilaç sistemlerinin hazırlanmasını sağlarlar. Bu polimerlerle hazırlanan biyoadezif sistemler ilaçların biyoyararlılıklarını anlamlı bir şekilde artırmaktadırlar[38].

Vajinal biyoadezif sistemlere örnekler verilmeden önce mukoadezyon ve biyoadezyon kavramları hakkında bilgi verilmiştir.

2.5. Mukoadezyon

Biyoadezyon en az biri biyolojik bir substrat olan iki materyalin yüzey güçleri sayesinde birarada tutunma sürelerindeki uzama olarak tanımlanır. Eğer substrat olarak mukus söz konusu ise, biyoadezyon yerine mukoadezyon kullanılabilir[39]. Mukoadezyonda adezif yüzeyi oluşturan tabaka mukustur. Mukusun jel benzeri özelliklerine neden olan bileşeni glikoproteindir ve bu jel yapı glikoprotein molekülleri arasındaki disülfit bağları arasındaki etkileşimler ile stabilize edilmiştir[40]. Mukus glikoproteinleri yani musinler bir protein çekirdek ve buna bağlı karbonhidrat yan zincirlerden oluşmaktadır[41].

Vajinal yol biyoadezif ilaçların uygulanması için oldukça elverişli bir yoldur ve sıklıkla lokal etkili ilaçlar için ve bazı sistemik etkili ilaçlar için veya kontrasepsiyon amacı ile bu sistem kullanılmaktadır[42]. Vajinal ilaç

taşıyıcı sistemleri içinde mukoadezif formülasyon olarak en çok kullanılan ilaç şekli jellerdir[43].

Biyoadezif ilaç şekillerinin avantajları şöyle sıralanabilir[44,45]:

- Belirli bölgede lokalizasyon sağlayarak, ilacın biyoyararlanımı iyileştirilir, artırılır,
- Dozaj şeklinin kalış süresini uzatarak vajina için günlük doz uygulama sayısı bire düşürülür,
- Absorbsiyon bölgesi ile optimum temas sonucu doku geçirgenliği modifikasyonla artırılır, enzim aktivitesi de inhibe edilerek peptit, protein absorbsiyonu sağlanır.
- Uygulama süresine bağlı olarak ilk geçiş etkisi elimine edilebilir.

2.5.1. Mukoadezyon Mekanizmaları

Mukoadezif bağ oluşum mekanizmaları oldukça karışık bir mekanizmaya sahip olup günümüzde bile tam olarak aydınlatılamamıştır.

Mukoadezif bağ oluşumunda gerçekleşen olaylar şöyle sıralanabilir[42,46,47]:

- İlk olarak mukoza ile polimerin yakın teması sonucu, ara yüzeyde atomlar arası ve moleküller arası kuvvetlerin oluşması ile çok yakın temas kurulması ve polimerin mukus ile ıslanarak şişmesi.
- Polimerik yapının mukus jel tabakasına difüzyonu ve müsin molekülleri ile girişimi.
- Bu girişim sırasında musin ve polimer zincirleri arasında mukoadezyonun gücünü de belirleyen fiziksel ve zayıf kimyasal bağlar kurulmaktadır. Bu girişim hızı her bir polimer zincirinin esnekliğine bağlıdır. İyi bir biyoadezif polimerin mukusa girişimini sağlayacak zincir esnekliği ve iyonik/hidrojen bağları oluşturacak fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir[48].

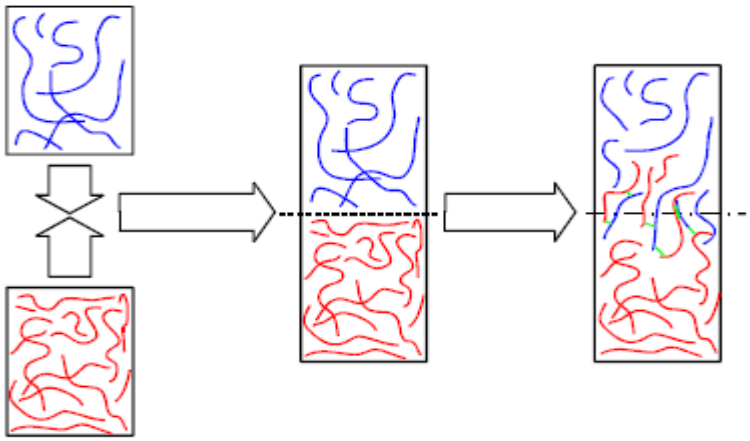
Mukoadezif bağ oluşturan kuvvetler arasında iyonik bağlar, kovalent bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik bağlar ve Van der Waals bağları sayılabilir. Mukoadezyonun moleküler düzeyde olması için çekme etkileşimi itmeden daha büyük olmalıdır.

2.5.2. Mukoadezyon Teorileri

Mukoadezif polimer ile mukus arasındaki adezyonu açıklayan beş teori vardır[4,42,45,49.]

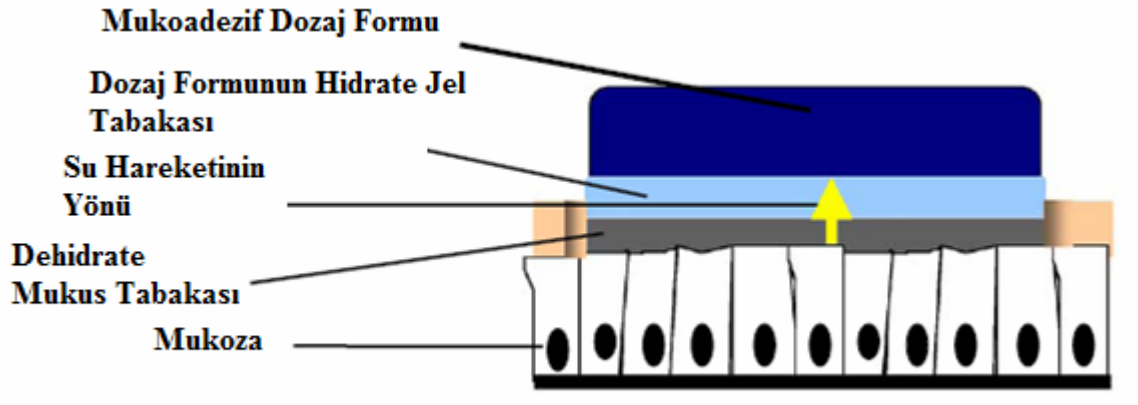
1. Islanma Teorisi: Yüzeyler arasındaki gerilim üzerine kurulmuştur, buna göre maddelerin yüzey enerjileri mukoadezif performansları hakkında bilgi verir.
2. Adsorpsiyon teorisi:Adezyon teorisi olarak da bilinen en yaygın teoridir. Mukoadezif polimer ile mukus arasındaki etkileşmenin van der Waal's etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşmelerden oluştuğunu açıklar.
3. Kopma teorisi: İki yüzeyin etkileşmesinden sonra yani adezyonundan sonra kopmaları için gereken kuvvetin ölçülmesini inceler.
4. Elektron transfer teorisi: Mukoadezif polimer ile mukus arasında ara yüzeyde elektriksel çif tabaka oluştuğu ve bu çift tabakada oluşan elektron transferinden dolayı bir çekiş gücü oluştuğu varsayılır
5. Yüzeylerarası penetrasyon teorisi: Mukoadezif polimerlerin zincirlerinin müsin ağı ile yeterli derinlikte penetrasyonu sonucu adezif bağ oluşumu esasına dayanır.

Bu teorilerin yanında adezyon olayını açıklayan esas olarak iki teori daha vardır[42]. Bunlardan ilki yine yüzeylerarası penetrasyonu, yani difüzyon teorisine benzer. Yapısal olarak uyumlu olan polimer zincirleri ile müsin uzantılarının birbiri içine difüze olmasını esas almaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. İnterpenetrasyon teorisi; mukoadezif polimer ile müsin arasındaki girişim[42]

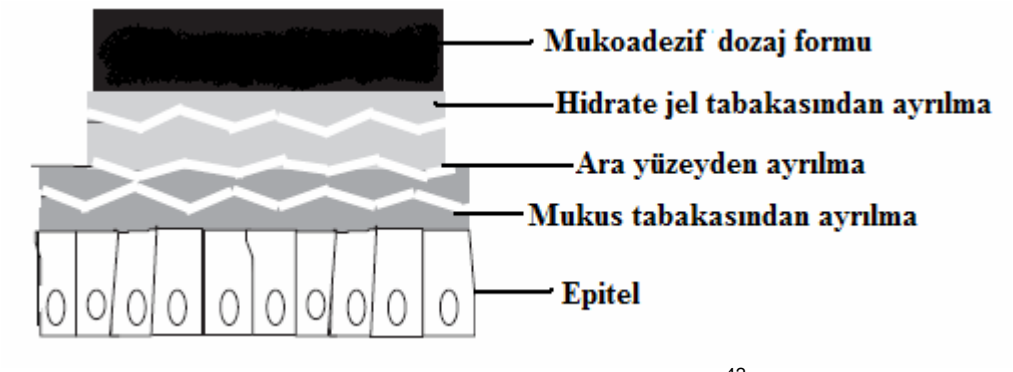
İkincisi ise dehidrasyon teorisidir. Polimere osmotik basınç etkisiyle su geçişi olmakta ve şişme gerçekleşmektedir (Şekil 5). Poliakrilik asit gibi polimerler suya çok güçlü afinite gösterirler ve bunun sonucunda oluşan yüksek osmotik basınca bağlı olarak polimer suyu çeker ve şişer. Dehidrate bir mukus tabakası oluşur ve bu tabaka adezif özelliği belirler.



Şekil 5. Dehidrasyon teorisi[42]

Adezyon özelliğin sona ermesi ise şu şekilde olmaktadır:

- Zayıf adeziflerde ayrılma mukoadezif ile mukus ara yüzeyinde olur.
- Kuvvetli adeziflerde ise, ayrılma mukus tabakasında meydana gelmektedir, ancak daha sonra hidrate olan mukoadezif materyalde de kopma olabilmektedir



Şekil 6. Mukoadezif bağlarda kopma olabilecek olası bölgeler[42].

Polimerlerin veya hazırlanan mukoadezif dozaj formlarının mukoadezif özelliğinin belirlenmesinde standart bir deney tekniği bulunmamaktadır. Bu nedenle biyoadezif polimer ile biyolojik materyal arasındaki etkileşimi değerlendirmek için çoğu araştırmacı kendi tekniğini geliştirmiştir. Her teknik kendine özgüdür, böylece deney sonuçlarını karşılaştırmak zor olmaktadır. Verilerin tutarsızlığı sadece farklı yaklaşımlardan değil, farklı kişisel yorumlardan da kaynaklanmaktadır[47,50].

En çok kullanılan yöntem ise gerilme direncinin ölçüldüğü yöntemdir. Günümüzde bu prensip ile ile çalışan "Texture Analyzer" test cihazı ile gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır[51,52].

2.5.3. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler

Mukoadezyonu etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir[42,44,53]:

- **Polimere İlişkin Faktörler:** molekül ağırlığı, polimer halkalarının esnekliği, polimer konsantrasyonu, polimerin viskozitesi, ıslanabilirliği
- **Çevresel Faktörler:** pH, basınç, temas süresi, şişme, ortamda suyun varlığı, ilaç uygulanırken yapılan baskı kuvveti
- **Fizyolojik Faktörler:** Müsin miktarı, hastalık durumu

2.5.4. Mukoadezyon Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Polimer ile mukus arasındaki biyoadezif kuvvetin ölçümünde kullanılan teknikler, in vitro, ex vivo ve in vivo teknikler şeklinde üç ana

gruba ayrılmaktadır. Son zamanlarda ex vivo yöntemlerin diğerlerine oranla daha çok ilgi çektiği gözlenmektedir. Ex vivo yöntemler özellikle polimerlerin adezif özelliklerine göre sınıflandırılmaları için kullanılabilmektedirler[44].

Bu yöntemler arasında:

- Wilhelmy tablası yüzey gerilim metodu
- Floresans işaretleme metodu
- Değiştirilmiş yüzey gerilim metodu
- Özofagusa yapışma metodu
- Akış kanal metodu
- Gerilme direnci metodu

Gerilme direnci metodu pratikte en çok kullanılan metoddur. Bu teknik "Instron" gerilim test cihazı değiştirilerek gerçekleştirilmiştir[54]. Bu metodda alt destek üzerine biyolojik substrat, üst desteğin alt yüzeyine ise biyoadezif materyal yerleştirilir. Polimer yüzey ile mukozal yüzey belli sürede temas eder ve sonunda yüzeylerin ayrılması için gereken kuvvet ölçülür. Texture analyzer test cihazı da aynı prensip ile ölçüm yapmakta ve gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmektedir[51]. Tamburic[55] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mukoadezyonun ölçülmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Dinamik osilator reometresi ve texture analiz cihazı ile Carbopol 974P, Polikarbofil AA-1 ve Carbopol 971P'nin kopma kuvvetleri belirlenmiştir. Her iki yöntemle de en yüksek mukoadezif özellik gösteren polimer olarak Carbopol 974P bulunmuştur.

Bu genel bilgilerden sonra, vajinaya uygulanan biyoadezif jeller üzerinde yapılmış çalışmalara örnekler verilmiştir.

2.6. Biyoadezif Vajinal Jeller

Biyoadezif sistemler, ilacın salımını kontrol edebilen, hedeflenen bölgede etkin bir tedavi gerçekleştiren, sağlıklı bir yaşamın temini ve devamlılığının sağlanmasında önemli yer tutan sistemlerdir. İlacın bir farmasötik şekil olarak sunumu, amaçlanan hedefle ilişkili olarak çok farklı şekillerde yapılabilir. Ancak böyle bir sistemin başarısı yine de absorbsiyon bölgesinde ilacın kalış süresi ile ilgilidir. Bu durum, ilacın hedef bölgede daha kalıcı olmasını sağlayan mukozaya yapışabilen sistemlerin yani biyoadezif sistemlerin hazırlanmasının önemini açıklar .

Vajinal ilaç sistemleri çok sayıda ve farklı farmasötik formları kapsar. Bunlardan biri de yarı-katı (krem, merhem, jel) sistemlerdir. Yarı katı preparatların en önemli avantajı, vajinal uygulama için uygun ve mantıklı olması ayrıca ucuz olmasıdır. Dezavantajları ise, kirlilik hissi vermesi, rahatsızlık vermesi, sızıntı olması ve uygulandığı alandan çok hızlı bir şekilde yer değiştirmesidir[23,56]. Jinekolojik olarak kullanılmak üzere geliştirilen ilaçlardan biyoadezif jeller, vajinal mukoza ile etkin maddenin uzun süreli etkileşimi sağlar ve kontrollü salım gerçekleştirir, böylece hasta uyuncu açısından en etkili ideal sistem elde edilmiş olur[57].

Jeller küçük bir parça katı ve ona göre büyük oranda sıvıdan oluşur. Ufak anorganik partiküler jel yapısı içinde üç boyutlu şebeke oluştururlar[58]. Diğer taraftan doğal veya sentetik polimerler olan büyük anorganik makromoleküller ise birbirlerinin zinciri ile temasta olarak jel yapısını oluştururlar. Çözücünün yapısı jelin su bazlı (hidrojel) veya su içermeyen çözücü bazlı (organojel) olacağını belirler. Jellerin viskozitesi, gerilim uygulaması veya sıcaklık artışı ile azalır. Jeller, jel yapıcı maddenin özelliğine bağlı olarak Newton tipi, plastik veya psödoplastik akış gösterebilirler. Polimerin molekül ağırlığı kadar jel yapıcı maddenin konsantrasyonu da formülasyonun kıvamını etkiler[59].

Vajinal jellerde kullanılan eksipiyanlar arasında; jel yapıcı ajan (genellikle polimerler kullanılır), koruyucu ve taşıyıcılar vardır. Bu maddelerin, farmakolojik ve toksikolojik olarak inert olmaları istenir[60].

Biyoadezif vajinal jellerde ise %1-3 oranında mukoadezif polimer bulunur ve içine yumuşatıcı ve nemlendirici ilave edilerek kıvamlı jel hazırlanır. Etkin madde çözelti veya süspansiyon olacak şekilde jele ilave edilebilmektedir[12].

Vajinal jel hazırlamak için kullanılan polimerler[39]:

- Carbopol® (974P, 934P, 980, 971P and 943)
- Polikarbofil
- Jelatin
- Hidroksietilselüloz
- Hidroksipropilselüloz
- Hidroksipropilmetilselüloz
- Metilselüloz
- PEG
- Hyaluronik asit
- Polivinilpirolidon
- Sodyum aljinat
- Sodyum karboksimetilselüloz
- Nişasta
- Karragenler
- Kitosan

Piyasada bu polimerler ile hazırlanan pek çok ürün bulunmaktadır. ACIDFORM® adlı mukoadezif jelin vajinada tutunma zamanı benzer jellerden (Conceptrol®, Advantage S®, Replens®, Aci-Jel® ve K-Y® Jelly) daha iyi bulunmuştur[4]. ACIDFORM® vajinada, vajinal sıvı ve semen ile dilüe olduğunda viskoelastik özelliği ve kalış süresi artar[60]. Oniki saat süreyle vajinada kalabildiği bildirilmiştir[61]. Yine piyasada bulunan kontraseptif vajinal jeller ile yapılan bir çalışmada Conceptrol®, Advantage S®, Gyno II ve KY Plus'ın vajinal sıvı ile dilüe olduklarında gösterdikleri vajinal dağılım incelenmiştir. Bu özellikleri, jellerin vajinanın yüzeyinde

yayılmasında ve tutunmasında etkili kritik parametrelerdir. Bütün jellerin non-Newtonian akış gösterdiği ve vajinal sıvı ile karşılaştıklarında farklı cevaplar verdiği bildirilmiştir[62].

2.6.1. Biyoadezif Vajinal Jeller Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Mukoadezif vajinal ilaçlar içinde jeller hasta uyuncu yüksek olduğu için en çok tercih edilen ilaç şekilleridir. Vajinal mukoadezif jel sistemlerinde pek çok farklı grup polimer kullanılmış ve bunların çeşitli testleri yapılmıştır. Bizim çalışmamız kapsamında vajinaya uygulanan ilaçlarda en çok tercih edilen polimerlerden; Carbopol 974P, Polikarbofil, HPMC, kitosan ve poloksamerler kullanılmıştır.

Bu bölümde, adı geçen polimerler ile yapılan vajinal jel çalışmaları hakkında örnekler verilecek ve biyoadezif jellerin lokal veya sistemik etki için kullanıldığı çalışmalar özetlenecektir.

2.6.1.1. Poliakrilatlar ile Yapılan Çalışmalar

Vajinaya uygulanan biyoadezif polimerler kapsamında en çok incelenen polimerler poliakrilatlardır. Bu grup polimerler vajinal yoldan kullanıldığı gibi diğer mukozal yollardan da sıklıkla uygulanmıştır[11]. Poliakrilatlar biyoadezif vajinal tabletlerin hazırlanmasında da en sık tercih edilen bir polimer grubudur[63-65].

Carbopoller, akrilik asitin polialkenil eterler ya da divinil glikol ile çapraz bağlı polimerleridir. Kolayca su absorbe etme, hidrate olma ve şişme özellikleri vardır. Hidrofilik yapılarının yanında, sıkı çapraz bağ taşımaları nedeniyle jel oluşturma, fakat suda tam çözünmeme özellikleri, Carbopollerin kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler içinde potansiyel bir yer edinmesini sağlamıştır. Bukkal[66], oftalmik[67], intestinal[68], nazal[69], rektal[70] ve vajinal[71] mukoadezyon uygulamalarında Carbopoller sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle Noveon firması tarafından üretilen Polikarbofil AA-1 mukoadezyon için bir endüstri standartıdır[4,11,72,73]. Çeşitli biyoadezif

polakrilik asit polimerlerinin fiziko kimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada Carbopol 910, Polikarbofil, Carbopol 940 ve Carbopol 934'ün şişme özelliklerinin pH'dan nasıl etkilendiği incelenmiş, sığır sublingual mukusu varlığında biyoadezyon gücü ölçülmüştür. Polimerlerin pH'ya bağlı olarak şiştikleri ve düşük molekül ağırlığına sahip Carbopol 910 ile Polikarbofilin, Carbopol 940 ve Carbopol 934 PH'ya göre daha fazla biyoadezif güce sahip oldukları bulunmuştur[74].

Vajina kuruluğu menapoza giren kadınlarda yaşla birlikte artmaktadır. Ellili yaşlarda menapoza giren kadınlarda vajina kuruluğu görülme oranı % 52 iken, bu oran yaş ilerledikçe estrojen miktarındaki azalmaya bağlı olarak artmaktadır. Altmışlı yaşlarda % 65'e, 70 yaş üstünde ise % 77'ye çıkmaktadır. Vajina kuruluğunun giderilmesinde hormon yerine koyma tedavisine alternatif olarak mukoadezif jeller kullanılmıştır, böylece hormon tedavisi ile oluşan kanser riski de ortadan kaldırılmış olmaktadır. Replens® jel bu amaçla kullanılan ve % 1-3 oranında Polikarbofil içeren bir jeldir. Vajinada 3-4 gün kalabildiği gösterilmiştir[57,75]. Polikarbofil bazlı Replens® jel ile pektin bazlı Summer's Eve® jeli vajina kuruluğunu tedavi etmek için 51 hasta üzerinde denenmiş ve Replens® jel daha etkili bulunmuştur[76]. Başka bir polikarbofil bazlı vajinal jel formülasyonu olan Acidform® jelin, Faz 1 çalışmalarında genital yüzeye ince bir tabaka şeklinde yayıldığı bulunmuş ve vajinal kurulukta kullanılabileceği belirtilmiştir. Acidform®'un asit tamponlayan, biyoadezif, vajinada alıkonmasını sağlayacak uygun viskozite ve spermisid özelliği piyasadaki diğer ürünler ile karşılaştırıldığında, Aci-Jel® gibi, daha etkili bulunmuştur. Çünkü yüksek asit kapasitesi olduğu için spermisid etkisi kuvvetlidir[60,61]. Vajina kuruluğunun lokal hormon tedavisi için de jel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu jellere ait dünya patentleri bulunmaktadır[57].

Mauck[77] ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada vajinaya uygulanan K-T® jel (HEC içerir) ve Replens® jelin (Polikarbofil ve Carbomer 934P içerir) vajinadaki dağılımı magnetik resonans, gama sintigrafi ve fiberoptik prob kullanılarak görüntülenmiştir. Jeller vajinaya 3.5

mL olarak uygulanmış ve farklı zamanlarda izlenmiştir. İlk uygulamanın ardından jellerin vajinanın üçte ikilik alanına yayıldığı görülmüştür, 45 dakika sonra ise maksimum yayılma olduğu izlenmiştir. İki jel arasında yayılma süresi açısından fark bulunamazken, üç farklı görüntüleme yönteminin de başarılı sonuç verdiği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada, vajinada oluşan çeşitli enfeksiyonların tedavisinde veya hormon eksikliğinde lokal olarak uygulanan yeni vajinal ilaç şekillerinin dağılımı gama sintigrafi yöntemi ile izlenmiştir. Sağlıklı gönüllülerde rastgele çapraz yapılan çalışmada piyasada bulunan ve klotrimazol (clotrimazole) içeren krem ile test edilecek jel ürünü ^{99m}Tc-DTPA ile işaretlenmiş ve 24 saat boyunca izlenmiştir. Uygulanan ürünlerin yoğunluğunun da ölçüldüğü çalışmanın sonunda iki ürünün vajinal dağılımları benzer bulunmuştur[78].

Carbopol C971 ve Carbopol C974P ile hazırlanan ve kosolvan olarak gliserin ile PEG 400'ün kullanıldığı bir jel çalışmasında kosolvanlara bağlı olarak farklı reolojik, mukoadezif ve salım özellikleri gözlenmiştir. Carbopol-PEG 400 ve Carbopol-su jelleri benzer özellikler göstermiş ancak Carbopol-gliserin jeli onlardan farklı özellikler göstermiştir. Genel olarak çalışmanın sonucunda C974'ün C971'den daha elastik olduğu belirtilmiştir. Carbopol-PEG 400 ve Carbopol-su jellerinin uygulandığı bölgede uzun süre salım yaptığı ve iyi adezif özellik gösterdiği bulunmuştur[79].

Kontrasepsiyon amacıyla hazırlanan ve spermisit madde içeren karboksimetilselüloz ve poliakrilik asit yapısındaki 4 farklı jelin reolojik özellikleri incelenmiş ve vajinal sıvı ile semen sıvısının jellerin releojik özelliklerini nasıl etkilediği bulunmuştur. Poliakrilik asit yapısındaki jelin özelliklerinin dilüe olduğu sıvının yapısına bağlı olarak, özellikle de pH'ya bağlı olarak değiştiği bulunmuştur[80].

Cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmak için mikrobisid bir madde olan sodyum dodesil sülfatın Carbopol 934P ve HPMC kullanılarak kontrollü salım yapan vajinal jellerinin hazırlandığı bir çalışmada vajinal

sistemi taklit eden bir ortamda jellerin salım özellikleri incelenmiştir. Salım diyaliz membrandan gerçekleştirilmiş ve salımı etkileyen faktörler arasında, vajinadaki sıvı akışı (3 mL/h, 5ml/h), pH (4.0, 5.5, 7.4), sodyum dodesil sülfatın konsantrasyonu (% 3, % 5) ve konulan jelin ağırlığı (1.8 g, 3.0 g) incelenmiştir. Vajinal sıvı akışı ve pH salımı etkilerken, sodyum dodesil sülfat konsantrasyonundaki değişimin salımı etkilemediği bulunmuştur. Sonuçta hazırlanan jelin kontrollü salım yaptığı ve cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmada etkili olabileceği bildirilmiştir[81].

Değişik konsantrasyonlarda nonoxynol-9 ve EDTA ile hazırlanan mukoadezif bir ilaç veriliş sisteminde % 1.25, 1.5, 1.75 ve 2 oranında Carbopol 934P kullanılmıştır. Hazırlanan sistemin stabilite, mukoadezyon ve ilaç salımı gibi in vitro testleri yapılmıştır. Testlerin sonucunda Carbopol 934'ün kuzu vajinal dokusunda iyi biyoadezif özellik gösterdiği ve sistemin uzun süreli nonoxynol-9 saldığı bulunmuştur. EDTA'nın ise sistemin içinde, Carbopol 934P'nin bioadezif kuvvetini arttırdığı ve nonoxynol-9'un salımını etkilemediği belirtilmiştir[82]. Fiorilli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise bakteriyal vajinitin tedavisi için Carbopol ve Polikarbofil ile hazırlanan mukoadezif vajinal jel kullanılmış ve etkili ve güvenli tedavi sağlanmıştır[83].

Pavelic[84] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da genital herpesin oluşturduğu siğillerin lokal tedavisi için asiklovir içeren, kontrollü salım yapan lokal etkili lipozom-jel formülasyonu geliştirilmiştir. Asiklovirin lipozom içinde enkapsülasyonunu sağlamak için poliol dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Lipozomun vajinal uygulanmasında taşıyıcı olarak Carbopol® 974P ile hazırlanan biyoadezif jelin en uygun taşıcı olduğu belirlenmiştir. İn vitro salım deneylerinde lipozom içeren jellerin asikloviri salım profili incelenmiştir. Pozitif yüzey yüküne sahip lipozom içeren jellerin musin içeren vajinal ortamlarda en stabil formülasyon olduğu ve kontrollü salım için en uygun profili gösterdiği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada Carbopol® 934P ve HPMC kullanılarak vajinaya uygulanacak kontrollü salım yapan ideal bir jel formülasyonları

geliştirilmeye çalışılmış ve model madde olarak spermisidler kullanılmıştır. HPMC viskozite artırıcı olarak kullanılmış ve iki polimerin farklı konsantrasyonları pH 4 ve 6'da denenerek optimum kombinasyon araştırılmıştır. İnsan servikal mukusunda bulunan ve fizikokimyasal olaylarda etkili olan müsin, farklı konsantrasyonlarda, hazırlanan vajinal sıvıya eklenerek viskozite ve yüzey gerilimine etkisi incelenmiştir. Sonuçta servikal mukusun yapısı ve formülasyonun özelliklerinin spermisidlerin mukozal penetrasyonunda çok belirleyici olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca Carbopol ile HPMC kombinasyonlarının spermisid ajanlar için ideal kontrollü salım yapan vajinal sistemler olduğu da belirtilmiştir[85].

Vajinal yol sistemik etki elde etmek için de kullanılmıştır. Özellikle Carbopol kullanılan ve sistemik etki amaçlanan çalışmalara örnekler şöyledir:

Ludwig[86] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada infertilite tedavisi için tasarlanmış progesteronu kontrollü olarak salan Crinone® jel ile oral olarak tasarlanan ve vajinal yoldan kullanılan Utrogest® kapsül, 126 hasta üzerinde rastgele çalışılmıştır. Crinone jel mukoadezif bir polimer olan Polikarbofil içermekte ve vajinal uygulanan kapsül ile benzer etki göstermektedir ancak Crinone jel uygulama kolaylığı ve rahatlığı gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Crinone ile yapılan başka bir çalışmada mikronize progesteron içeren insert (Endometrin) ve Polikarbofil ile hazırlanmış Crinone jel sağlıklı gönüllüler üzerinde denenmiştir. Üç grup halinde yapılan çalışmada birinci gruba Endometrin günde iki defa, ikinci gruba Endometrin günde üç defa ve son gruba Crinone jel günde 90 mg olarak uygulanmıştır. Farmakokinetik değerlendirmenin sonunda Endometrin'in en yüksek C_{max} değerine ulaştığı, steady state drumuna hızla ulaştığı ve en yüksek AUC değerini gösterdiği ve bu nedenle Crinone jele göre daha etkili olduğu belirtilmiştir[87].

Gastrointestinal sistemde enzimlerin degredasyonuna uğrayan insülin oral yolla alınamadığı için piyasada paranteral formları mevcuttur. İnsülinin vajinal uygulaması yapılan bir çalışmada biyoyararlılığının

artırılması ve insülini enzimlerden korunacak alternatif bir uygulama yolu geliştirilmeye çalışılmıştır. İnsülinin vajinal absorbsiyonunun incelendiği bir çalışmada, insülinin poliakrilik asit ile jel formu hazırlanmış ve diyabetik tavşan ve sıçanlar üzerinde çalışılmıştır. Jel halinde vajinal olarak uygulanan insülinin, sıçanlarda ve tavşanlarda plazma seviyesi yükselmiş ve uzun süreli plazma seviyesi elde edilmiştir. Bu nedenle insülinin vajinadan jel halinde uygulanmasının kolay, kullanışlı, ağrısız ve uzun etkili olduğu sonucuna varılmıştır[88]. Richardson ve Illum'un[27] yaptığı bir çalışmada da insülinin vajinal mukozadan absorbsiyonu artırılmaya çalışılmış ve sitrik asitin en etkili absorbsiyon artırıcı olduğu bulunmuştur.

Okada[89,90] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda Leuprolide adlı hormon analoğu (luteinizing hormone-releasing hormone) bir maddenin ovülasyon aktivitesini artırması amacıyla oral, nazal ve vajinal uygulaması sıçanlarda çalışılmıştır. Vajinal uygulama jel veya tablet şeklinde yapılmış ve absorbsiyon artırıcı olarak sitrik asit, süksinik asit, tartarik asit, laktik asit, askorbik asit gibi maddeler kullanılmıştır. Sonuçta vajinal uygulama ile leuprolide'nin ovülasyon aktivitesini arttırdığı bulunmuş ve absorbsiyon artırıcıların da etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca vajinal yol, kolay uygulanması, uzun etki sağlaması açısından da avantajlı bulunmuştur.

Bakteriyal vajinitte uygulanan antibiyotik (metronidazol ve klindamisin gibi) tedavisi uzun sürmekte ve tedaviden sonra vajina pH'sının arttığı görülmektedir. Antibiyotik tedavisinden sonra genellikle vajinal pH'sının normalizasyon çalışması yapılmaktadır. Bunun için Miphil™ (Mipham, İtalya) adlı mukoadezif jel, polikarbofil ve karbopol içerir, vajinal pH'yı düşürmek için kullanılmıştır. Polikarbofil zayıf poliasit yapısındadır ve büyük molekül ağırlığına sahip olduğu için vajina epitel hücrelerine yapışarak 3-5 gün orada kalabilir. Bakteriyal vajiniti olan 45 kadın üzerinde çif kör ve plasebo kontrollü yapılan çalışmada hastalara 2.5 g Miphil™ uygulanmış ve plasebo ile karşılaştırılmıştır. Miphil™ kullanılan hastaların vajinal pH'sında belirgin bir düşme gözlenmiş ve bakteriyal vajinitin tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir[91]. Mukozal yollardan uygulanacak ilaç

şekli geliştirien bir çalışmada kalsein ve griseofulvin etkin maddeleri ile lipozom-jel formülasyonu hazırlanmıştır. Film yöntemi ile hazırlanan lipozomlar Carbopol 974 jel ve HEC jel içinde taşınmış ve salım özellikleri ile reolojik özellikleri incelenmiştir. Her iki etkin maddenin de Carbopol 974 jelden salımı HEC jelden salımından daha hızlı bulunmuştur. Çalışmada ayrıca lipozomal jel formülasyonlarının özelliklerinde en etkili parametrenin etkin maddenin lipofilik veya hidrofilik durumu olduğu belirtilmiş ve bu özelliklere uygun lipit kompozisyonunun ve jel sisteminin belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır[92].

2.6.1.2. Selüloz Türevleri ile Yapılan Çalışmalar

Hidroksipropil metilselüloz'un (HPMC) ham maddesi pamuk veya kağıt hamuru olabilir[93]. Bizim çalışmamızda kullanılan ve Methocel® olarak adlandırılan ürünler, anhidroglukoz birimlerinin tekrarlanmasından oluşmuş, doğal karbohidratların polimerik iskeletinden meydana gelmiştir. Üretim sırasında selüloz lifleri kostik çözeltiyle ısıtıldıktan sonra metil klorür ile muamele edilir. Son aşamada ise propilen oksit, metil klorüre ilave edilir ve anhidrglukoz birimlerinin üzerindeki hidroksipropil sübsititüenti elde edilir[94]. Polimerin viskozitesi, molekül ağırlığına ya da zincir uzunluğuna bağlıdır. Ayrıca ürünler non-iyonik özellikte olduklarından çözeltileri geniş bir pH aralığında stabildir[95]. HPMC'nin konsantrasyonu arttığında viskozitesi de artar ve ilaç salım süresi uzar. Polimerin kimyasal yapısına bağlı olarak farklı oranlarda hidrate olma durumu meydana gelebilir[96]. HPMC farmasötik teknolojide:

1. Tabletlerde bağlayıcı olarak
2. Uzun etkili preparatlarda salımı geciktirici olarak[97]
3. Yarı katı ve kozmetik preparatlarda viskozite artırıcı olarak
4. Süspansiyonlarda, süspansiyon ajanı olarak kullanılmaktadır.

Farmasötik endüstride çok çeşitli HPMC bulunmaktadır ve bunlar moleküler ağırlık (viskozite), kimyasal sübstitüsyon ve partikül büyüklüklerine göre farklılaşırlar[98].

HPMC hidrofilik matris sistemlerde taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Bu grup polimerler arasında özellikle sodyum karboksi metilselülozun mükemmel mukoadezif özellik gösterdiği bildirilmiştir. Sodyum karboksi metilselüloz kullanılarak hazırlanan Gyno II ve Jelly® Jel, kontrasepsiyon amacı ile vajinadan uygulanan preparatlardır[11]. HPMC'nin tek başına veya poliakrilatlar ile uygun oranda karıştırılması ile hazırlanmış vajinal biyoadezif kontrollü salım yapan tabletler elde edilmiştir[99-103]. HPMC kapsül de vajinal uygulama için kullanılmış ve içine mikrokristalin selüloz pellet ve nişasta pelletleri konularak vajinadaki dağılımları kolposkopi ile izlenmiştir[104]. Perioli[105] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada vajinaya uygulanan yeni mukoadzeif yarı katı ilaç şekilleri benzydamine etkin maddesi ile geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada NaCMC ve HEC kullanılarak basit jeller ve emuljel adı verilen formülasyonlar hazırlanmıştır. Çalışmanın sonucunda reolojik, mukoadezif ve salım özellikleri incelenen jellerden NaCMC içeren formülasyonlarda yüksek mukoadezyon gücü ve istenilen salımın elde edildiği gözlemlenmiştir. US patenti olarak sunulan bir çalışmada etkin maddenin dağılımını sağlamak için % 1-5 oranında HPMC içeren jel hazırlanmıştır. Gliserin, dietilen glikol, monoetil eterin surfaktan olarak kullanıldığı çalışmada jele koruyucu (preservative) madde (% 0.05 - 1) oranında ve asitlendirici eklenmiştir[57].

Kulp[106] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada cinsel yolla bulaşan hastalıklara veya istenmeyen hamileliklere karşı mikrobisid madde içeren iyonik ve noniyonik yapıda dört farklı jel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu jellerin vajinada dağılımları magnetik rezonans yöntemi ile izlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu jellerden %3 HPMC ve %1.5 metil selüloz içeren jelin 6 sağlıklı kadın denekte en iyi yayılmayı ve optimal sonuçları verdiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada NaCMC ve gellan gum kullanılarak secnidazole'nin uzun süreli salım yapan vajinal jeli hazırlanmış ve Trichomonas vaginalis'in neden olduğu vajinitte lokal etkisinden dolayı kullanılması amaçlanmıştır. Gellan gum formülasyonlarda % 0.1 ile 0.75

arasında değişen oranlarda kullanılırken NaCMC bütün formülasyonlarda % 0.5 oranında kullanılmıştır. En yüksek gellan gum oranına sahip formülasyon en yüksek viskoziteyi ve mukoadezif kuvveti gösterirken 6 saatin sonunda en az salım yapan formülasyon olmuştur[107].

Conceptrol® ve Advantage™ adlı iki vajinal kontraseptif jelin sağlıklı gönüllülerde vajinal dağılımlarının incelendiği bir çalışmada yeni bir optik görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Farklı moleküler yapıya ve biyofiziksel özelliklere sahip jellerden Conceptrol® NaCMC kullanılarak, Advantage™ ise Polikarbofil kullanılarak hazırlanmıştır. Her iki jelde nonoxynol-9 içermektedir. Çalışmanın sonunda Advantage™'nin vajinal dağılımı Conceptrol®'a göre daha fazla ve daha düzgün=uniform bulunmuştur[108].

Human papillomavirüs'ün neden olduğu vajinal siğillerin tedavisinde 5-fluorourasil (%1) içeren vajinal hidrofilik bir jelin klinik araştırması yapılmış ve bu çalışmada, %1 oranında HPMC kullanılarak jel hazırlanmıştır. Altmış adet bayan gönüllünün katıldığı klinik çalışmada 5-fluorourasil içeren jel ile plasebo jel karşılaştırılmıştır. Jellerin uygulanması gece yatmadan önce yapılmış ve gün aşırı uygulama tekrarlanmıştır. Maksimum 12 uygulamanın sonunda 5-fluorourasil içeren jel hastaların % 83'ünde etkili olurken plasebo ancak % 13'ünde etkili olmuştur. Sonuçta vajinal uygulama için hazırlanan hidrofilik HPMC jelin güvenli ve etkili bir şekilde uygulanabileceği bildirilmiştir[109].

HPMC K4M, K15M ve K100M (% 2) kullanılarak yapılan bir çalışmada anestezik benzokain jel hazırlanmış ve biyoadezif özelliği incelenmiştir. Maksimum kopma kuvvetinin ölçüldüğü çalışmada sıçan bağırsağı kullanılmış ve ölçüm Auto Peeling Tester'de yapılmıştır. Biyoadezif kuvvet sıra ile K4M<K15M<K100M olarak bulunmuş ve maksimum biyoadezyon özelliği gösteren HPMC K100M ile çalışmalara devam edilmiştir[110].

Dünyada 2005 yılı itibariyle 38.6 milyon insanın HIV pozitif olduğu belirlenmiştir. Buna göre her yıl 340 milyon insan cinsel yolla geçen hastalık taşıyan kişilerle ilişki halindedir. Bu hastalıklardan ve özellikle

HIV'den korunmak için kadınlara uygulanan ürünlere ihtiyaç duyulmuş ve topik olarak uygulanabilen jel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu jel formülasyonları hastalıklara karşı kimyasal bir bariyer oluşturmakta ve vajina ile serviksi kaplayarak hastalıklardan korunmaya yardımcı olmaktadırlar. Bu amaçla yapılan bir çalışmada cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı kullanılan topikal mikrobisid formülasyonu geliştirilmiştir. Farklı oranlarda HPMC, poloxamer ve Carbopol içeren dört farklı biyoadezif jel formülasyonu hazırlanmış ve çapraz, çif-kör bir çalışma yapılmıştır. Altı sağlıklı kadın üzerinde yapılan çalışmada magnetik rezonans yöntemi ile dört farklı jelin vajinada nasıl dağıldığı görüntülenmiştir. Jellerin vajina boyunca dağılımı 4 saatin sonunda % 86-102 arasında olmuştur. Sonuçta % 3 ve % 1.5 HPMC içeren jellerin en iyi yayılma gösterdiği bildirilmiştir[111]. Başka bir çalışmada HIV'e karşı koruma sağlaması için klorokin'in (chloroquine) vajinal jel formülasyonu geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Jel hazırlanırken noniyonik bir polimer olan HEC kullanılmış ve in vitro çalışmalarda klorokin içeren bu jelin HIV'e karşı etkili olduğu bulunmuştur[112].

2.6.1.3. Kitosan ile Yapılan Çalışmalar

Doğada özellikle eklembacaklıların dış iskeletinde, yengeç, karides ve ıstakoz gibi deniz canlılarının kabuklarından elde edilen kitinin temel türevi kitosandır. Doğal bir polikatyonik madde olan kitosan eczacılıkta pek çok alanda kullanılmaktadır[113]. Kitosan pH<6.5 de negatif yüklü molekülleri çeken ve iyon olarak onlara bağlanan güçlü pozitif yüke sahiptir. Kitosanın biyogeçimli (toksik olmayan, irritan olmayan, antijenik olmayan) ve biyoaktif (yara iyileştirici, antimikrobiyal, fungustatik vb) olması kullanımını yaygınlaştırmıştır[114].

Kitosanın en önemli kullanım alanlarından birisi ilaç endüstrisidir. İlaç taşıyıcı materyal olarak hidrojeller, tabletler, granüller ve mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır[115-119]. Kitosan pozitif yüküne bağlı olarak, fizyolojik pH'da biyoadeziftir ve bu da

uygulama bölgesinde tutunmasını arttırır[120-122]. Bu nedenle kitosan, ilaçların mukozal uygulamalarında sıklıkla kullanılmıştır. Örneğin, antifungal bir maddenin kitosan jel ve kitosan film formülasyonları şekilinde oral mukozal uygulaması yapılmıştır[123]. Başka bir çalışmada da peptid yapısındaki bir maddenin kitosan jel formülasyonu bukkal mukozaya uygulanmıştır[124].

Penetrasyon arttırma kapasitesi, biyouyumlu, biyoparçalanır, biyoadezif ve bakteriostatik etkisinden dolayı kitosan vajinal uygulamalar için umut vaad eden bir polimerdir. Yüksek molekül ağırlığı olan kitosan türevlerinin (5-metil-pirolidin kitosan) özellikle hidrofilik ilaçların vajinal mukozadan absorbsiyonunu arttırdığı bildirilmektedir[125]. Vajinal tabletlerin hazırlanmasında da kullanılan kitosan ile sildenafilin uzun süreli salım yapan tablet formülasyonları geliştirilmiştir[126]. Klotrimazolün biyoadezif vajinal tabletlerinin hazırlanmasında kitosanın tiyoglikolik asit ile modifikasyonu sonucu elde edilen polimerler kullanılmış ve klotrimazolün vajinal mukozada kalış süresi uzatılmıştır[127].

Kitosan jellerin mukoza ıslatıcı özelliği ile biyoadezif özelliği, mukozal ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilebilmesini sağlamıştır. Kitosan jeller ile ilgili olarak çapraz bağlanma mekanizmaları, erozyon mekanizmaları ve salım profilleri üzerine kitosan oranının etkisi pek çok çalışmada incelenmiştir[128]. Metronidazolün model ilaç olarak kullanıldığı bir çalışmada lokal vajinal tedavi sağlamak ve ilaç-mukoza temas süresini uzatmak amacı ile yeni mukoadezif jel formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar HPMC, kitosan, 5-metil-pirolidin kitosan ve bunların karışımları kullanılarak hazırlanmıştır. Bütün formülasyonların psödoplastik akış gösterdiği ve viskozitenin kitosan oranına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada kitosan içeren jellerin mukoadezyon kuvvetleri ölçülmüş ve piyasa preparatı olan Zidoval®'den (metronidazol içeren, % 0.75 Carbopol 974P jel) daha yüksek mukoadezif performans gösterdiği bulunmuştur. Çalışmada jellerin metronidazolü salım özellikleri de incelenmiş ve piyasa preparatının kitosan jellere göre daha uzun

sürede salım yaptığı bildirilmiştir[129]. Aynı araştırmacılar bu çalışmanın devamında metronidazolün vajinaya uygulanmak üzere tablet formülasyonlarını kitosan, polivinilpirolidon ve Polikarbofil gibi polimerler kullanarak hazırlamışlardır. Tüm farmasötik karakterleri, mukoadezyon kuvveti ve salım özellikleri incelenen formülasyonlardan 1:1 oranında kitosan ve polivinilpirolidon karışımı ile hazırlanan formülasyon vajinal uygulama için en iyi formülasyon olarak seçilmiştir[105].

Bonferoni[130] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da kitosanın sitrat tuzlarının zayıf permeabilitesi olan ilaçlar için vajinal uygulamada uygun bir taşıyıcı olacağı belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kitosan sitrat vajinal uygulamalarda penetrasyon artırıcı ve proteaz enzim inhibitörü gibi pek çok farklı amaç için kullanılmaktadır. Bu polimerin reolojik, ilaç salımı ve ilaç penetrasyonu gibi özellikleri kitosan HCl ile hazırlanan jeller ile karşılaştırılmıştır. Model madde olarak düşük molekül ağırlıklı asiklovir, siprofloksasin ile hidrofilik ve yüksek molekül ağırlıklı fluorescein izotiyosiyanat dekstran (Fluorescein isothiocyanate dextran) seçilmiştir. Kitosan sitratın ve kitosan HCl'nin % 3 'lük jellerinin viskozite-kayma gerilimi (shear rate) grafiği benzer bulunmuş ve kitosan tuzlarının türünün viskoziteyi etkilemediği bildirilmiştir. Salım deneyleri Franz difüzyon hücresinde 0.45 μm polyvinylidene fluoride membrandan yapılmıştır. Asiklovirin kitosan jel ve süspansiyon formülasyonlarının salım profilleri benzer bulunmuş aynı şekilde siprofloksasinin de kitosan jel ve çözeltisinin salım profilleri üst üste çıkmıştır. Buna bağlı olarak kitosan jelin ilaç salımını etkilemediği belirtilmiştir. Çalışmada ilaçların penetrasyon çalışması da Franz difüzyon hücresinde domuz vajinal mukozasından yapılmış ve sonuçta kitosan sitrat jelin, etkin madde penetrasyonu en iyi olan formülasyon olduğu bulunmuştur.

İnsülinin vajinal ve rektal uygulandığı bir çalışada insülinin kitosan jel formülasyonları hazırlanmış ve çeşitli penetrasyon artırıcılar formülasyona ileve edilerek tavşanlar üzerinde in vivo çalışma yapılmıştır. Kan glukoz

seviyesini en fazla düşüren uygulamanın insülin ve dimetil-β-siklodekstrin içeren kitosan jel formülasyonu olduğu bulunmuştur[131].

Klomifen sitratın vajinal HPV'nin lokal tedavisinde kullanıldığı bir çalışmada Polikarbofil, kitosan ve bunların tiyoglikolik asit ve L-sistein ile konjugatları kullanılarak mukoadezif jel formülasyonları geliştirilmiştir. Tiyol grupların artması ile kitosan ve Polikarbofil jellerde mukoadezyon özelliği de artmıştır. Jellerden salım özellikleri incelendiğinde ise Polikarbofil ve konjugatlarından salım 70 saate kadar uzanırken kitosan ve konjugatlarından salım ancak 12 saat sürmüştür[132].

2.6.1.4. Sıcaklığa Hassas Polimerler ile Yapılan Çalışmalar

Poloxamerler, selüloz türevleridir ve kitosan gibi en çok kullanılan polimerler arasındadır. Etilen oksit ve propilen oksitten oluşan üçlü bloklardan ibaret kopolimerlerdir[133]. Hidrofilik oksit gruplarının varlığı poloxamerlerin, mukusun oligosakkaritlerine bağlanmasını sağlar ve bu da onlara biyoadezif özellik kazandırır[134]. Bu polimerler için en önemli özellik sıcaklığa bağlı olarak sol-jel geçişleridir. Bu geçişlerin yaşandığı sıcaklık $T_{sol\text{-}jel}$ olarak gösterilir ve sol-jel geçiş sıcaklığı olarak tanımlanır. Bu sıcaklığın altında sıvı formdadır, bu sıcaklığın üstünde ise jel haldedir[135]. Sol-jel geçişi sıcaklığa bağlı olan poloksamerler ile vajinaya uygulanan biyoadezif jeller hazırlanmış ve genellikle Polikarbofil ve HPMC gibi polimerler ile kombine edilmiştir. Poloksamerler ile hazırlanan vajinal sistemlerin uygulaması son yıllarda önem kazanmıştır[57].

Chang ve arkadaşlarının[136] yaptığı bir çalışmada ısıya hassas ve mukoadezif polimerler kullanılarak hazırlanan jellerin vajinal dağılımı ve reolojik özellikleri incelenerek ilaçların dağılımı için uygunlukları araştırılmıştır. Klotrimazol model ilaç olarak seçilmiş, polimer olarak Poloxamer® P407 , Poloxamer® P188 ve Polikarbofil® AA-1 kullanılmıştır. Jeller soğuk metotla hazırlanmıştır. Jellerde elastik modül belirlenerek, sıcaklık ve jelleşme arasındaki ilişki incelenmiştir. Jelleşme sıcaklığı vajina için uygun olmalıdır. Elastik modül, uygulanan gerilim ve sonucunda

oluşan deformasyon ile hesaplanır. Ölçüm için osilasyon yöntemi kullanılmıştır. Viskozite modülü ölçülerek zamana göre nasıl davranış gösterdikleri yine osilasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Viskozite modülü/elastik modül oranının 1'den küçük olduğu durumlarda sistem elastikdir yani jel özelliği iyidir. Bunun için elastik modülün büyük olması gerekmektedir. Vajinal uygulama için kısa jelleşme zamanı, uygulama ve uzun süre uygulama yerinde kalması açısından avantajlıdır. % 20 P188 içeren formülasyonun uygulanan her gerilim değerinde elastik modülünün viskozite modülünden yüksek olduğu yani jel özelliğinin iyi olduğu görülmektedir. Bu jel formülasyonları 20°C'de Newtonian akış gösterirken sıcaklık 37°C'ye çıktığında akışın non-Newtonian olduğu görülmüştür. Bütün jellerin vajinal sıcaklığın altında jelleştiği ve vajinal sıvı ile muamele olduktan sonra farklı jelleşme süresi ve viskoelastik özellikler gösterildiği bildirilmiştir[136].

Çalışmanın devamında hazırlanan sıcaklığa hassas, mukoadezif jellerin, mukoadezyon kuvveti ölçülmüş ve dişi sıçanlarda antifungal aktiviteleri tayin edilmiştir. Mukoadezyon çalışmasında sıçan vajinal mukozası kullanılmış ve TA-XT2 Texture Analyzer ile ölçümleri yapılmıştır. Mukoadezyon kuvvetinin ve kopma işinin (expulsion work) Polikarbofil miktarının artması ile arttığı ve P407/P188 oranı 15/20 olan formülasyonun mukoadezyon kuvvetinin 15/15 olan formülasyondan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Vajinal mukozanın morfolojisinin de incelendiği çalışmanın sonucunda klotrimazol içeren jel sisteminin mukozada herhangi bir toksikolojik etkiye neden olmadığı, güvenli ve etkili bir tedavi sağladığı bildirilmiştir[137].

Asiklovirin model ilaç olarak kullanıldığı başka bir çalışmada poloksamer 407 ile karragen kombine edilerek vajinal jel formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan jellerin in vitro salım özellikleri ve sıçanlarda vajinada kalış süresi izlenmiştir. Çalışmada asiklovirin in vitro salımının jel formülasyonundaki karragenin miktarı arttıkça azaldığı görülmüştür. İn vivo deneylerde belli sürelerde sıçanların vajinası yıkanarak, yıkama suyunda

HPLC ile asiklovir tayini yapılmıştır. İn vivo sonuçlar, karragenin vajinada kalış süresini artırmada Carbopol kadar etkili olduğunu göstermiştir[138]. Yine asiklovir ile yapılan başka bir çalışmada hyaluronik asit ile poloksamerler (F127 ve F68) kombine edilerek sıcaklığa hassas, mukoadezif jel formülasyonları hazırlanmıştır[139].

Bilensoy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise HPV'nin neden olduğu servikal kanserin tedavisi amacı ile 5-fluorourasil içeren jel formülasyonları geliştirilmiştir. 5-fluorourasil'in çözünürlüğünün arttırılması için β-siklodekstrin veya hidroksipropil-β-siklodekstrin ile kompleksi hazırlanmıştır. Sıcaklığa hassas Pluronic® F127 ile birlikte mukoadezif polimerlerden hyoluronik asit, Carbopol 934 ve HPMC kombine edilerek hazırlanan vajinal jel formülasyonlarının reolojik özellikleri ve in vitro ilaç salımı belirlenmiştir. Salım profilleri incelendiğinde 5-fluorourasilin hidroksipropil-β-siklodekstrin kompleksinin, 92 saat boyunca en kontrollü salımının Carbopol içeren poloksamer jelden olduğu görülmüştür. Poloksamerin kontrollü salım için tek başına yeterli olmadığı diğer mukoadezif polimerler ile kombine edildiğinde salımın yavaşladığı bildirilmiştir[140].

2.6.2. Biyoadezif Vajinal Jellerin Farmasötik Karakterleri

2.6.2.1. Jellerden İlaç Salımı ve Permeabilite

İlaç geliştirilmesinde ve kalite kontrollerinde ilaç salım çalışmaları çok önemlidir. Seçilen in vitro metot her zaman in vivo ortamı tam olarak sağlamayabilir, ancak hazırlanan farmasötik formülasyonun performansı açısından önemli bilgiler verir[141]. Vajinaya uygulanan topik jellerden ilaç salımını incelemek için in vitro çalışmalarda genellikle Franz difüzyon hücresi kullanılır[142].

Bonferoni[130] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ex vivo ilaç geçişi incelenmiş ve domuz vajinal dokusundan çeşitli etkin maddelerin geçiş çalışması yapılmıştır. Asiklovir, siprofloksasin ve fluorescein etkin

maddelerinin %3 kitosan sitrat veya %3 kitosan hidroklorür jel şeklinde Franz difüzyon hücrelerinden geçişi incelenmiştir. İki kitosan tuzunun jelinin de permeabilitesi düşük olan bu ilaçların geçişini arttırdığı bildirilmiştir.

Vajinal jellerin mukozadan difüzyonunda pH ve osmotik basınç etkilidir[14]. Sandri[143] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mukoadezif ve absorbsiyon arttırıcı özelliğinden dolayı kitosan türevi polimerler, asiklovirin vajinal mukozadan geçiş deneylerinde kullanılmıştır. Franz difüzyon hücresinden yapılan deneyde asiklovirin geçişini en iyi şekilde sağlayan kitosan türevi polimer saptanmıştır.

Vajinal jellerin aktif sistemik absorbsiyon göstermeleri amaçlandığında permeabilite çalışmaları yapılmış ve iyi sonuç alınmış olmalıdır. Sistemik absorbsiyon çalışmalarında insan ve hayvan vajinal mukozalarından ilacın penetrasyon çalışmaları yapılmaktadır. Ancak hayvan çalışmalarının hiçbiri insanlarda elde edilen sonuçlar ile tam olarak örtüşmemektedir[144]. Penetrasyon çalışmalarında insan vajinal mukozası kullanıldığında preparatın tedavi etkinliği tam olarak anlaşılabilir. Başka bir deyişle tam olarak tutarlı ve homojen penetrasyon cevabı alınmış olur. Bu çalışmalar için Chamber Tekniği önerilmektedir ve bu metot ile elde edilen sonuçlar in vitro vajinal penetrasyon çalışması olarak değerlendirilir[145].

2.6.2.2. Jellerin Reolojik ve Textural (Sertlik/Yumuşaklık) Özellikleri

Jeli oluşturan yapının bileşenleri reolojik özellikleri belirler ve bu bileşenler değiştiğinde farklı reolojik özellikler görülebilir[146]. Reolojik özelliklerin belirlenmesinde osilator=salınımlı=titreşimli reometre (oscillatory) veya akış reometresi tercih edilir. Osilator ile ölçüm yapıldığında sistemin komple karakteri (elastikiyet ve viskozite) belirlenebilmektedir. Bu üstünlüğü nedeniyle akışın ölçülmesinde tercih edilir[147]. Valenta[25] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada model ilaç olarak progesteron kullanılmış ve poliakrilik asit polimerinin türevleri ile vajinada uzun süre kalması planlanan adezif tabletler hazırlanmıştır.

Tabletlerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin reolojik özellikleri osilator ile belirlenmiştir. Osilator ile elastiklik modülü (*G'*), viskozluk modülü (*G''*) ve dinamik viskozite (*η'*) belirlenmiştir. Sonuçta tiyollenmiş poliakrilik asit türevi polimerlerin, tiyollenme oranına göre elastikiyet özelliklerinin ve viskozitesinin arttığı görülmüştür.

Vajinal jeller için ideal bir viskozite belirlemek zordur. Jeller genellikle non-Newtonian akış göstermektedirler. Vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan biyozdezif jellerin viskozite ölçümlerinde çok noktalı viskozimetrelerin kullanılması uygundur. Ayrıca vajinaya uygulanan jellerin viskozite değerini, yüksek kayma hızı uygulandığında veya vajinal sıvı ile karşılaştığında korumaları gerekmektedir[60]. Kontrasepsiyon amacıyla hazırlanan ve spermisit madde içeren vajinal jellerin reolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada jeller poliakrilik asit türevlerinden hazırlanmıştır. Vajinal sıvının ve semen sıvısının jellerin releojik özelliklerini nasıl etkilediği incelenmiş ve jellerin reolojik özelliklerinin dilüe edildikleri sıvının cinsine ve miktarına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. Sıcaklık, pH, vajinal sıvı ile etkileşme viskozitenin değişmesine neden olabilir. Formülasyon geliştirilmesinde bu faktörler değerlendirilmelidir[80]. Tırnaksız[148] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Pluronik (Pluronic® F-127), Polikarbofil (Noveon® AA-1) ve bunların karışımları ile hazırlanan jellerin reolojik ve mukoadezif özellikleri incelenmiştir. Jellerin viskozitesi rotasyonel viskozimetre ile ölçülmüş ve pluronik ile hazırlanan jellerin viskozitesinin sıcaklık ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Pluronik ve Polikarbofil karışımı ile hazırlanan jellerin viskozitesi sadece pluronik kullanılarak hazırlananlardan daha yüksek bulunmuştur. Mukoadezyon çalışmasında adezyon gücü, hassas terazi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite değerleri oldukça farklı olan pluronik ve Polikarbofilin benzer mukoadezif özellik gösterdiği, ancak en yüksek mukoadezyon değerinin pluronik/Polikarbofil karışımından elde edildiği bildirilmiştir. Bu jel sistemlerinin biyoadezif, sıcaklığa hassas ve kontrollü salım formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Reolojik özellikler vajinal sıvı ile etkileşmeden önce ve sonra ölçülebilir. Texture Profil Analizi (TPA) ile yarı katıların reolojik özellikleri belirlenebilmektedir. Vajinal jeller ile jel-vajinal sıvı karışımlarının üzerinde TPA ölçümler yapılarak sertlik, sıkışabilirlik/yayılabilirlik ve yapışkanlık gibi önemli parametreler belirlenebilir[147]. Cevher[149] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada klomifen sitrat jel formülasyonu hazırlanmış ve mekanik özellikleri TA-XTPlus texture analyzer cihazı ile belirlenmiştir. İnsan papilloma virüsün (HPV) neden olduğu enfeksiyonlarda uzun süreli salım yapmak üzere geliştirilen jeller farklı poliakrilik asit türevleri (Carbopol® 934P, Carbopol® 971P, Carbopol® 974P) ve bu polimerlerin tiol grupları ile oluşturulan konjugatları ile hazırlanmış ve sertlik, elastikiyet, sıkışabilirlik, adezif ve kohezif özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda Carbopol® 934P ile hazırlanan jel formülasyonu sertlik ve sıkışabilirlik özelliği bakımından uygun bulunurken Carbopol® 934P-Cys konjugatı ile hazırlanan jel formülasyonunun en yüksek elastikiyet ve kohezyon özellikleri gösterdiği ve vajinal mukozaya uygulanacak en iyi formülasyon olduğu belirlenmiştir. Tiol grubunun artması ile mukoadezyon özelliğin arttığı bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

2.6.2.3. Vajinal Yayılma ve Tutulma

Vajinal jellerin taşıdıkları aktif molekülün etkinliğinin görülebilmesi için jelin vajinada yayılması ve tutunması çok önemli iki parametredir. Vajinal jeller epitel tabakaya yayılmalı ve oradaki devamlılığını sağlayabilmelidir. Bu durumu etkileyen faktörler arasında yüksek uygulama hacmi (2.5-3.5 mL) ve cinsel birleşme sayılmaktadır[150]. Vajinal jellerin yayılmasında ön deneme olarak eğimli bir yüzeyde jellerin akışı incelenmiş ve matematiksel modeller kullanılarak in vivo davranışlar hakkında tahmin yürütülmüştür. Reolojik özellikler vajinal yüzeyde jellerin yayılma ve tutulmasında çok önemlidir. Doğru viskozitede hazırlanan bir jel vajinada yeterli tutulma ve yayılma gösterecektir[62]. İlaçların vajinada yayılmasını belirlemek için in vivo görüntüleme çalışmaları da yapılmıştır. Magnetik rezonans ve gama

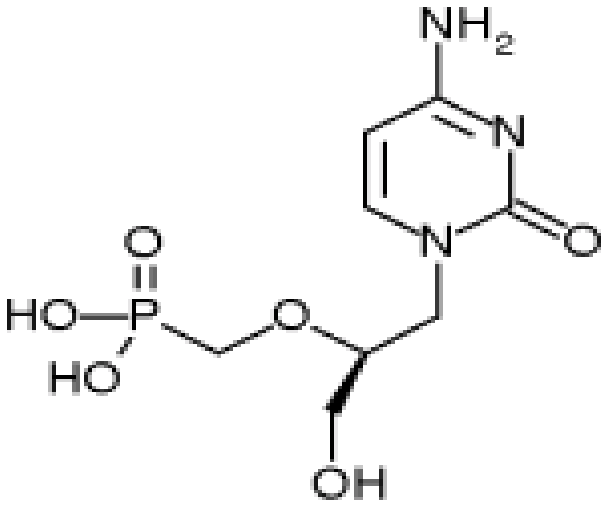
sintigrafi gibi teknikler kullanılmıştır[151]. Vermani[32] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada xanthan zamkı, sodyum aljinat, Polikarbofil ve bunların kombinasyonlarının, koyun vajinal dokusunda tutunma zamanları incelenmiştir. Bunun için koyun vajinası dik bir şekilde yerleştirilmiş, jelin akışı izlenmiş ve jelin ağırlığındaki değişme zamana göre kaydedilmiştir. Xanthan zamkı ile sodyum aljinat en iyi tutunma süresi gösteren polimerler olarak belirlenirken, kitosan ve Polikarbofil düşük tutunma süresi göstermiştir.

2.7. Kullanılan Etkin Maddelerin Özellikleri Ve Konu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

2.7.1. CİDOFOVİR (HPMPC)=(CV)

Cidofovir (S - 1 - (3 - hydroxy – 2 - phosphonylmethoxypropyl) cytosine = HPMPC), genital siğillerde etkili olan, akrilik fosfonat nükleotid analoğu bir önilaçtır.Yeni bir sınıf antiviral madde olan cidofovir, viral DNA sentezini inhibe ederek etki gösterir.

Kimyasal formülü $C_8H_{14}N_3O_6P$ olup molekül ağırlığı 279.19 g/mol olan kokusuz beyaz toz şeklinde bir maddedir. Sudaki çözünürlüğü 10mg/mL'den daha az, asidik ve nötral pH'da çözünürlüğü iyidir (>100 mg/mL) (170 mg/mL pH 6-8). 290°C'nin üzerinde bozulur, normal ortam koşullarında stabildir[152].



Şekil 7. Cidofovirin kimyasal yapısı

Cidofovirin uygulama dozu aşağıdaki gibidir[153].

- **AKUT UYGULAMA**: ilk hafta IV, 5 mg/kg
- **DEVAM ETTİRME DOZU**: Devam eden iki haftada da yine IV, 5 mg/kg

2.7.1.1. Cidofovirin Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması

Cidofovir genital siğillerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kondilom ya da condyloma accumunata adı verilen genital siğiller pek çok kadına sıkıntı veren lezyonlardır. HPV'nin neden olduğu kondilomlar cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardır[154,155]. HPV sadece genital siğillere neden olmaz. Bu virusun 100'den fazla değişik alt grubu vardır ve bu gruplardan bazılarının rahim ağzı kanserine neden olduğu bilinmektedir.

Bazı tipleri ise anüs kanserine yol açabilmektedir. Genelde dış genital bölgede küçük siğiller ortaya çıkar. Bu siğiller vajen ve servikste de yerleşir. Bunlar kişinin kendisi tarafından görülebilir ya da elle hissedilebilir. Siğiller yumuşak, pembe-beyaz renkli, karnıbahar benzeri oluşumlardır[156]. HPV ile enfekte olmuş kadınlarda vulva ve serviks kanseri riski artmıştır.

DNA viruslerinden olan Papovaviridae içinde yer alan, insanda hastalık oluşturduğu bilinen HPV serviks kanserine neden olabilir.

Özellikle HPV tip 16 ve 18, serviks kanserleri ile yakından ilişkili olarak bulunmuştur[157]. Campo[158] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise hayvan Papillom virüsleri incelenmiştir. Bovine Papillomavirus (BPV), Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) ve Canine Oral Papillomavirus üzerinde yapılan incelemeler sonucunda bu virüslerin hayvanlarda siğil ve lezyonlara neden olduğu görülmüştür. Ayrıca bu Papillom virüslerinin karsinojenik olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan Papillom virüslerinin HPV enfeksiyonları için iyi bir model olacağı belirtilmektedir. Benzer bir çalışmada ise CRPV'nin oluşumuna neden olduğu tavşan Papillomlarının, kanser gelişimine neden olduğu belirtilmektedir[159].

HPV'nin oluşturduğu siğillerin tedavisi için, hiçbir şey yapılmadan siğillerin geçmesi beklenilebilir, kimyasallar uygulanabilir, krioterapi denilen sıvı azot ile siğiller dondurulabilir, siğiller elektrik akımı ile imha edilebilir (Elektrokoterizasyon), lazer ışını ile yok edilebilir veya interferon tedavisi uygulanabilir. Tedavide kullanılan ilaçlar arasında, keratolitik ajanlar, immunomodülatörler (podophyllin), intralezyonal uygulanan bleomisin ve

interferon alfa, sistemik etkili simetidine, retinoidler ve antiviral olarak da cidofovir bulunmaktadır[160,161].

Cidofovir, HSV ve HPV'de etki gösterir, ayrıca servikal displazide de etkili olduğu bulunmuştur[162]. Cidofovir, etkili olduğu virüslerin replikasyonunu, virüs DNA polimeraz sentezini inhibe ederek baskılar, cidofovirin aktif metaboliti olan cidofovir difosfat tarafından inhibe edilir. Viral aktivitesi: HSV-1 ve 2, HPV, asiklovire direnç kazanmış Molloscum (MCV), HIV ve Varicella Zoster (VZV) üzerine olan cidofovirin oral absorbsiyonu oldukça düşüktür[156].

Türkiyede ticari preparatı bulunmayan cidofovirin, Amerika'da VISTIDE® (Steril, hipertonik sulu çözelti şeklindedir ve sadece IV infüzyon ile uygulanır) ve FORVADE™ (% 1'lik topikal jel ve krem) isimli iki preparatı bulunmaktadır[163,164].

Cidofovir doza bağlı olarak nefrotoksisite gösterdiği için dozu bu toksisiteye göre belirlenir. Akut renal bozukluklar yapabilir ve diyaliz ile sonuçlanan durumlar ortaya çıkabilir. Doz rejimi çok sıkı kontrol edilmelidir. 3 mg/kg, 5mg/kg haftalık dozlarda uygulanmaktadır ve tedavi 2 hafta sürer[162].

2.7.1.2. Cidofovirin Farmakokinetiği

Cidofovirin 75 mg/mL injeksiyon şeklinde uygulandığında bulunan farmakokinetik parametreleri şöyledir[153].

- ABSORBSİYON: Probenecid ile uygulandığında C_{max}= 9.8'den 19.6 µg/mL'ye çıkmaktadır.

- DAĞILMA: Vd=410 mL/kg (steady state)
  Proteinlere bağlanma %6'dan az.

- ELİMİNASYON: Cl=148 mL/dak/1.73m^2.
  Renal Cl=98.6 mL/dak/1.73m^2.

2.7.1.3. Cidofovir İle Yapılan Çalışmalar

Santoyo[165] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada cidofovirin deriden penetrasyonunu sağlamak için topikal olarak uygulanan mikropartiküler bir sistem hazırlanmıştır. Çalışmada cidofovirin topikal uygulama sonucunda bazal epidermise kadar ulaşması ve uzun süreli bir terapötik etkinliğin görülmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla cidofovirin mikropartikülleri PLGA (poly lactide-co-glikolid) kullanılarak solvan uçurma ve püskürterek kurutma yöntemleri kullanılarak hazırlanmıştır. Mikropartiküllerin karakteristik özellikleri incelenmiş ve deriden geçişlerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçta cidofovir yüklenmiş mikropartiküllerin deriden penetrasyonunun, cidofovirin topikal olarak uygulanan süspansiyonuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Başka bir çalışmada ise cidofovirin domuz derisinin farklı tabakalarına perkutan penetrasyonu incelenmiştir. Bunun için HPLC ile bir yöntem geliştirilmiş ve cidofovirin deri katmanlarındaki miktarının analizi yapılmıştır. Perkutan uygulamadan sonra Franz difüzyon hücresinin reseptör kompartmanından alınan örneklerin analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda cidofovirin domuz deri tabakalarında topikal uygulama ile 400 μm kadar derine inebildiği analiz edilmiştir. Cidofovir miktarının en yüksek olduğu tabaka 0-40 μm arasındadır[166].

Afouna[167] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada penetrasyon artırıcı bir madde olan Azon'un (Azone) derideki serbest ilaç miktarını nasıl etkilediği in vitro çalışmalar ile gösterilmiş ve cidofovirin HSV-1 enfeksiyonlarındaki in vivo antiviral aktivitesi arasında korelasyon kurulmaya çalışılmıştır. Cidofovirin, Azon içeren ve içermeyen formülasyonları hazırlanmıştır. İn vitro çalışmalar sonucunda Azon içeren formülasyonların akıyı(flux)=geçirgenliği çok fazla artırdığı görülmüştür. İn vivo çalışmada ise HSV-1 ile infekte edilen tüysüz fareler kullanılmış ve cidofovir formülasyonları uygulanmıştır. Sonuçta bu formülasyonların HSV-1 enfeksiyonlarına karşı tedavi edici ve koruyucu olarak çok büyük bir etkinliği olduğu saptanmıştır.

Cidofovirin lokal etkisine yönelik çalışmalarda ise HPV ve HSV lezyonları üzerindeki etkinliği araştırılmaktadır. Cidofovir ile yapılan klinik bir çalışmada, HIV'li hastaların çoğunda HPV enfeksiyonlarına rastlandığı belirtilmektedir. Bu tür anogenital siğillerin tedavisi için cidofovirin %1'lik preparatı günde bir defa olmak üzere iki hafta süreyle kullanmıştır. Tedavi sonucunda HIV'li hastalardaki HPV siğillerinin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir[168]. Orlando[169] ve arkadaşları ise yine HIV ile enfekte olmuş external genital siğilleri olan hastalar ile çalışmışlardır. Hastalara üç farklı tedavi uygulanmıştır. Bunlar elektrik ile siğilleri tahrip etmek, siğillere %1 cidofovir içeren topikal jel uygulamak ve bu iki işlemi birlikte yapmak şeklindedir. Çalışmanın sonucunda tedavi şekli sırasına göre, % 93, % 76 ve % 100 oranında başarı sağlanmıştır.

External genital herpesi olan 96 hastada cidofovir jelin etkinliğinin incelenmesi için çok merkezli, çift kör rastgele bir çalışma yapılmıştır. % 1, 3 ve 5 cidofovir içeren jeller ve plasebo jel hastalara 12 saat süre ile uygulanmıştır. Doza bağlı olarak cidofovir jellerin genital herpesli hastaların tedavisinde başarılı olduğu gözlenmiştir[155]. Başka bir çalışmada, 37 yaşında HIV pozitif olan Kenyalı bir bayan hastada incelemeler yapılmış, ayakta ve external genital bölgede Human Papilloma Virüsün neden olduğu siğillere rastlanmıştır. Bu siğillerin tedavisi için hastaya % 3'lük cidofovir krem uygulanmış ve tedaviye 3 gün devam edilmiştir. Yedi gün sonunda siğillerin ortadan kalktığı bildirilmektedir[170].

HPV'nin, insanlarda servikal kanser riskini oldukça yüksek oranda artırdığı bilinmektedir. Cidofovirin ise servikal karsinomalarda oluşan tümördeki protein yapısını etkileyerek etki gösterdiği belirtilmektedir[171]. Snoeck[172] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, servikste epitel doku içinde oluşan tümörün üçüncü evresinde, HPV'nin DNA aktivitesini etkileyerek etki gösteren cidofovir, topikal olarak uygulanmıştır. % 1 cidofovir içeren jel günde üç defa olmak üzere 15 gönüllü bayan hastada bir ay süreyle kullanılmıştır. Tedavi sonunda on beş hastanın yedisinde servikal lezyonlarda histolojik olarak tam bir iyileşme görülmüş, beş

hastada kısmen cevap alınmıştır, iki hastada ise bir değişiklik görülmemiştir. Polymer Chain Reaction (PCR) ile yapılan çalışmada ise yedi hastadan dördünde histolojik olarak tam cevap alındığı saptanmıştır. Çalışmada aynı zamanda cidofovirin normal epitel doku için toksik olmadığı da belirtilmektedir.

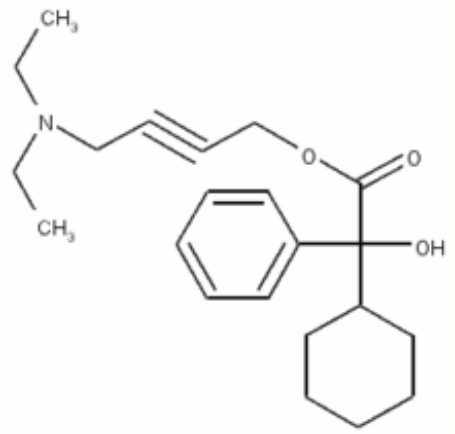
Yetmişden fazla farklı genotipi bulunan HPV'nin mukozal yüzeylere karşı aşırı bir ilgisi vardır. HPV'nin spesifik genital virüsleri (tip 16 ve 18) servikal kansere neden olmaktadır. Bu çalışmada cidofovirin farelerdeki servikal karsinomaların büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Hayvanlara 0.25mg ve 0.5mg dozda cidofovir, intratümöral olarak uygulanmıştır. Haftada 3 veya 5 defa bu uygulama yapılmış ve tedavi 4 hafta sürmüştür. Tedavi sonunda plasebo grubuna göre cidofovir uygulanan grupta tümör büyüklüğünde anlamlı bir küçülme olduğu belirtilmektedir[173]. HPV'nin servikal kansere neden olduğu bilinen tip 16 ve 18'inin pozitif olduğu altmış yaşındaki bir bayan hastada, hipofaringeal (hypopharyngeal) ve özefagal (esophageal) olarak oluşan Papillom lezyonları tesbit edilmiştir. Bu lezyonlara görüntülü endoskopi aleti ile intratümöral olarak 1.25 mg/kg dozda cidofovir uygulanmıştır. Cidofovir ile tedavi sonucunda lezyonların küçüldüğü saptanmıştır[174].

Reuter[175] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise CRPV (cottontail rabbit papilloma virus), HPV'nin insanda oluşturduğu hastalığa benzer semptomları tavşanlarda oluşturması için kullanılmıştır. CRPV papillomaların oluşmasına neden olmakta ve bu papillomların % 70'i kansere dönüşmektedir. Çalışmada tavşanlar CRPV ile enfekte edilerek hastalık yapılmaya çalışılırken dört farklı teknik kullanılmış ve bunlar karşılaştırılmıştır. Bunlar, dövme iğnesi ile mürekkepli ve mürekkepsiz uygulama, intradermal enjeksiyon, dövme iğnesi ile elle yapılan uygulama ve son olarak steril kesici bir alet (jilet) ile yara oluşturmak ve bu yaraya yine dövme iğnesi ile virüs uygulamak şeklindedir. Siğiller inokulasyondan 6 hafta sonra görülmeye başlanmıştır. Oluşan siğillerin kapladığı alan açısından uygulanan metotlar karşılaştırıldığında en iyi yöntemin en son

yöntem olduğu görülmüştür. Dördüncü yöntem ile en geniş siğil alanı oluşumu sağlanmıştır.

2.7.2. OKSİBÜTİNİN HİDROKLORÜR (OXB)

Oksibütinin molekül ağırlığı 394 olan beyaz toz şeklinde bir etkin maddedir. Alkolde çözünebilen ve fakat suda yeterli oranda çözülemeyen oksibütinin kimyasal olarak *d,l* (rasemik) 4-dietilamino-2-butinil fenilsikloheksilglikolat klorür şeklinde isimlendirilebilir. Oksibütininin amprik formülü ise $C_{22}H_{31}NO_3$.HCl şeklindedir[176]. Şekil 8'de oksibütininin yapısal formülü görülmektedir.



Şekil 8. Oksibütininin yapısal formülü

2.7.2.1. Kullanıldığı Yerler ve Etki Mekanizması

Oksibütinin düz kaslar üzerinde doğrudan bir etkinliğe sahiptir. Antikolinerjik etkinliği nedeniyle düz kaslar üzerinde asetilkolinin yaptığı etkileri inhibe etmektedir. Oksibütinin, örneğin tavşan detrusor kası üzerine, antikolinerjik etkinlik olarak atropinden daha zayıfken, antispazmodik etkisi yaklaşık 10 kat daha fazladır. Otonom sinir sistemi gangliyonlarında herhangi bir etkinliğe sahip olmadığından dolayı antinikotinik etkinlik göstermemektedir. Oksibütinin mesane düz kasını gevşeterek primer etkinliğini göstermektedir. Oksibütininin aktif enansiyomeri olan S-oksibütinin de oldukça etkilidir[177]. Buna ek olarak R izomerinde de antimuskarinik etkin görüldüğü bildirilmiştir[178].

Oksibütinin, günlük idrar çıkış sayısında artış (sık idrar-frequency), ani sıkışma hissi (urgecy) ve/veya sıkışma tipi idrar kaçırma (urge

incontinence) belirtileri ile ortaya çıkan Overactive Mesane= Çok Fazla Çalışan Mesane hastalarında kullanılan bir etkin maddedir[179]. Overaktif mesane rahatsızlığı yetişkin popülasyonunun yaklaşık %17'sinde görülmektedir ve bu oranın yaşla birlikte arttığı saptanmıştır[180]. Overaktif mesane hastalığı idrara sıkışılacağı anlaşılsın ya da anlaşılmasın acil idrar yapma zorunluluğuyla karakterize bir hastalıktır. Bir günlük periyodda 8 ya da daha fazla ve bir gece boyunca ise 2-3 defa idrara kalkmayı gerektirmektedir[181]. Overaktif mesane rahatsızlığı nedeni kesin olarak bilinmeyen bir sendrom olarak sınıflandırılmaktadır[182]. Özellikle postmenopozal kadınlarda görülen bu üriner inkontinens hastalıklarının tedavisi için 1995 yılında ABD'nde yaklaşık 26 milyar dolar harcandığı gözönüne alınırsa hastalığın tedavisinin önemi bir kez daha anlaşılabilir[183].

Hastalığın patofizyolojisine bakıldığında hastalığa neden olabilecek bir çok farklı faktörün olduğu görülmektedir. Ürinasyon, bilindiği gibi, beyin korteksi, spinal kord, periferal otonomik ve somatik sistem gibi karmaşık bir çok sistemin etkisi altındadır. Dolayısıyla bu sistemlerden herhangi birinde ortaya çıkacak bir rahatsızlığın overaktif mesane semptomları verilmesine neden olacağı da açıktır. Bu nedenle bugüne kadar yapılan çalışmalarda etkin bir tedavi yapabilecek herhangi bir madde bulmak tam anlamıyla gerçekleşememiştir. Hastalık nedenlerinin çeşitli olması ve kullanılan ilaçların yan etkilerinin ciddi olması nedeniyle hastalığın tedavisi çok belirgin bir şekilde yapılamamaktadır. Bu nedenle hastalığın tedavisinin yeni ajanlar bulunana kadar eldeki ajanların verilme yollarının ve verilme şekillerinin değiştirilmesiyle yapılmaya çalışıldığı da bildirilmektedir[184].

Günümüzde bu hastalığın tedavisi için kullanılan ve en fazla onay almış ilaç gurubu tolterodin ve oksibütinin de içinde olduğu antikolinerjiklerdir. Bununla beraber, bu grup ilaçların doza bağımlı, fakat terapötik aralıkta oluşturdukları yan etkilerin önemli olması nedeniyle yeni grup ilaçların da kullanıma girmeye başladığına dikkat çekilmektedir. 2004 yılında US FDA'nın trospium, solifenasin ve darifenasin gibi üç yeni etkin

maddeyi daha onayladığı ve hastalığın tedavisi için bu etkin maddelerin kullanılmaya başladığı bildirilmektedir[185].

Oksibütinin overaktif mesane hastalığının dışında uyanıkken idrar kaçırma (enürezis diurna) ve uykuda idrar kaçırma (enürezis nokturna) gibi genellikle çocukluk dönemlerinde görülen hastalıklarda da kullanılmaktadır. Buna karşın geriatrik üriner disfonksiyon durumlarında yapılan bir çalışmada oksibütininin bu hastalıkta etkin olmadığı gösterilmiştir[186]. Bununla beraber oksibütininin kullanıldığı durumlara menapoz, mesane, rahim ve vajinayı içeren ürogenital sistemde atrofiyle meydana gelen çeşitli komplikasyonlar dolayısıyla oluşan idrar tutamama rahatsızlığı da eklenebilir[187]. Yapılan çalışmalar overaktif mesanelerde oksibütininin hastaların % 60'ına yakınında sağaltım yapabildiğini göstermektedir[188]. Aşırı aktif mesane hastalığının, hastalarda sıklıkla belirgin sosyal, psikolojik, mesleki fiziksel ve cinsel sorunlara yol açtığı ve bu bireylerin idrar kaçırmaktan korktukları gözönüne alındığında hastaların sosyal ilişkilerinin ve cinsel etkinliklerinin sekteye uğrayacağı açıktır[189]. Bu veriler bile oksibütininin etkinliğinin ne derece önemli olduğunu gösterir niteliktedir.

Oksibütininin mesane üzerindeki antikolinerjik etkileri muskarinik reseptörler üzerinde olan bloke edici etkinliğinden kaynaklanmaktadır. Mesane kasılmaları genel olarak çok çeşitli muskarinik reseptörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Örneğin M_2 alt tipi reseptörler mesanede daha yaygınken, M_3 reseptörleri ise detrusor kasta daha fazla bulunmaktadır. M_2 reseptörler asetilkolinin etkileri nedeniyle mesane üzerindeki gevşetici etkinliğin inhibe edilmesine ve mesanenin kasılmasına neden olmaktadırlar. Oksibütinin bu reseptör alt tiplerini bloke etmek suretiyle bu etkiyi yok etmekte ve mesanenin gevşemesine neden olmaktadır[190]. Bununla beraber antikolinerjik etkilerinden dolayı meydana gelen yan etkileri bu etkin maddenin kullanımını kısıtlar niteliktedir[191]. Oral yolla alınan oksibütininin ağız kuruluğu, görme bulanıklığı ve ciddi taşikardik etkiler yapabilmesi nedeniyle kullanımında zaman zaman

kısıtlamalar yapılmaktadır. Beş yaşından küçük çocuklarda ve gebelerde kullanılmaz[192]. Aktif metabolit olan N-dezetiloksibütinin, toksik ve yan etkilere neden olur[193].

2.7.2.2. Oksibütininin Farmakokinetiği

Oksibütinin öncelikle karaciğerde ilk geçiş etkisiyle önemli derecede presistemik eliminasyona uğramaktadır[194]. Bundan dolayı oral yolla verilen oksibütininin biyoyararlanımı yaklaşık % 6 civarındadır[195]. Transdermal olarak verilen oksibütininin bu derecede yüksek bir eliminasyona uğramadığı görülmektedir[196]. Oksibütinin alındıktan sonra oluşan metaboliti dezetiloksibütininin in vitro olarak antikolinerjik etkinlik gösterdiği gösterilmiştir[197].

Oksibütinin kısa yarılanma ömrüne sahiptir ve intravenöz uygulama sonrasında hızla vücuttan atılır. Oral olarak verildiğinde ise gastointestinal sistemden oldukça hızlı emilmesine karşın daha önce de belirtildiği gibi ilk geçiş eliminasyonuna uğramaktadır. Oksibütinin karaciğerdeki Sitokrom P 450 3A4 enzimi tarafından metabolize edilmektedir. İdrardan değişmeden atılan ilaç miktarı çok azdır, yarılanma ömrü ortalama 1.6 saattir[198].

2.7.2.3. Oksibütinin İle Yapılan Çalışmalar

Oksibütüninin uzun etkili tabletleri[199,200], transdermal preparatı[201,202] ve vajinal halkası[194] ile yapılmış çalışmalar yer almaktadır. Oxytrol® adı verilen transdermal preparatı haftada iki defa kullanılmaktadır[203].

Oksibütininin transdermal preparatı ile yine idrar tutamama durumunda kullanılan başka bir etkin madde olan tolterodinin uzun etkili oral preparatının etkinliği 361 yetişkin hasta üzerinde karşılaştırılmıştır. On iki hafta boyunca çif kör, rastgele çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada oksibütininin transdermal preparatı haftada iki defa hastalara uygulanmaktadır ve günde 3.9 mg salım yapacak şekilde tasarlanmıştır. Uzun etkili tolteredin ise her gün 4 mg dozda verilir. Çalışmada bir gruba da her gün plasebo preparat uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda her iki

preparatın da idrar tutamamada etkili olduğu bulunmuştur. Ancak sistemik yan etkiler bakımından transdermal oksibütinin daha uygundur. Ayrıca haftada iki defa uygulandığı için hastanın yaşam kalitesini yükseltir. Ancak lokal deri irritasyonuna neden olabileceği bildirilmektedir[204].

Oksibütininin iki farklı modifiye salım yapan preparatının farmakokinetik parametrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, oksibütininin transdermal preparatı (Oxytrol, 3.9 mg/gün) ile uzun süreli salım yapan oral preparatı (Ditropan XL, 10 mg) kullanılmıştır. On üç sağlıklı gönüllü üzerinde rastgele, çift yönlü çapraz çalışma yapılmıştır. Belli zamanlarda kan ve tükrük örnekleri alınarak analiz edilmiştir. Kararlı kal (steady-state) kan seviyesine ilk olarak transdermal preparat ulaşmış, daha sonra uzun etkili oral preparat ulaşmıştır. AUC değerleri ise transdermal preparat için 10.8, oral preparat için 9.2 ng/h.mL'dir. Bu değerlere göre transdermal preparatın biyoyararlılığının daha iyi olduğu yorumu yapılmıştır[205].

Amerikada 17 milyon kadın ve erkek aşırı aktif masane semptomları göstermektedir. Oksibütinin aşırı aktif mesane hastalarının tedavisinde etkili bir maddedir ancak çoklu verilen günlük dozunun yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle oksibütininin günde bir defa salım yapan ve yan etkileri azaltılmış preparatları hazırlanmıştır. Gelecekte yeni ilaç şekillerinin geliştirilmesi ile daha etkili oksibütinin preparatlarının hazırlanacağı düşünülmektedir[206]. Oksibütininin vajinal uygulamasına yönelik yapılan çalışmalarda vajinadan emildiği bilinmektedir.

Malcolm ve arkadaşlarının[207] yaptığı bir çalışmada, kadınlarda idrar tutamama durumunda kullanılmak üzere oksibütininin kontrollü salım yapan vajinal halkası geliştirilmiştir. Silikon elastomerler kullanılarak günde 5 mg oksibütinin salan ve 14 gün süre ile salım yapan halka şeklinde preparatlar hazırlanmıştır. İn vitro salım özellikleri incelendiğinde sıfır derece kinetikle salım yaptığı gözlenmiştir. Hedeflenen salıma, halkada küçük değişiklikler yapılarak ulaşılmıştır. Sonuç olarak uzun süreli salım yapan oksibütinin vajinal halkası başarı ile geliştirilmiştir.

Başka bir çalışmada yine oksibütinin içeren vajinal cisim hazırlanmıştır. Schröder[208] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hazırlanan vajinal cisim tavşanlara uygulanarak plazma kan seviyeleri incelenmiştir. Silikon elastomer yapısındaki cisim dişi tavşanlara uygulanmış ve 0.5, 1.0, 5.0 mg salım yapacak şekilde tasarlanmıştır. Kan seviyesindeki oksibütinin ve aktif metaboliti 7 gün boyunca izlenmiştir. En yüksek kan seviyesine, 7 gün boyunca, 5 mg oksibütinin içeren vajinal cisim ile ulaşıldığı görülmüştür. Sonuçta vajina duvarında hiçbir irritasyona neden olmadan uzun süreli salım yapan oksibütinin preparatı hazırlanmıştır.

Oksibütininin vajinal uygulama sonucunda etkinliğinin tavşanlar üzerinde incelendiği başka bir çalışmada 30 tane Yeni Zellanda tavşanı kullanılmıştır. Tavşanlara oral ve vajinal olarak oksibütinin uygulanmış ve asetil kolin (ACh) seviyesini ve kan basıncını nasıl etkilediği incelenmiştir. Oksibütinin aşırı aktif mesane hastalığında ACh salımını inhibe ederek etki göstermektedir. Çalışmada yüksek doz vajinal oksibütinin preparatının (1.5 g oksibütinin içeren 3 mL jel) ACh salımını tamamen inhibe ettiği ve kan basıncını değiştirmediği görülmüştür[209].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Etkin Maddeler

- Cidofovir (CV) :Gilead Sciences, Inc., USA
- Oxybutynin HCl (OXB) :Sigma, USA

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Chitosan Highly-Viscous
  Deasetilasyon derecesi:%75-85
  MA:270 000 g/mol :Fluka, USA
- Chitosan Middle-Viscous
  Deasetilasyon derecesi:%40-50
  MA:210 000 g/mol :Fluka, USA
- Chitosan
  Deasetilasyon derecesi:%75-85
  MA:170 000 g/mol :Acros, USA
- Glasiyel Asetik Asit :Merck, Germany
- Disodyum Hidrojen Fosfat($PO_4Na_2H.2H_2O$):Panreac, Barcelona
- Citric Acid Monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) :Merck, Germany
- Amonyum Asetat :Rhone-Poulenc-Chimine Fine, France
- Hydroxypropyl methylcellulose(HPMC), Methocel K100MCR Premium USP/EP :Colorcon, UK
- Hydroxypropyl methylcellulose(HPMC), Methocel K15MCR Premium USP/EP :Colorcon, UK
- Carbopol® 974 P :Noveon, Parkoteks Kimya, İstanbul
- Policarbophil® AA-1 :Noveon, Parkoteks Kimya, İstanbul

- Sodyum Hidroksit :Merck, Germany
- Metanol :J.T. Baker, Holland
- Asetonitril :Merck, Germany
- L-alpha-Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) :Acros Organics, USA
- 1-2 Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DGPC) :Sigma, USA
- Kolesterol :Sigma, USA
- Kloroform :Merck, Germany
- n-Hekzan :Merck, Germany
- HCl :Merck, Germany
- Poloksamer P407 (Lutrol® F127) :Basf, Germany
- Poloksamer P188 (Lutrol® F68) :Basf, Germany
- Sığır serum albumin (BSA) :Sigma, USA
- Polisorbat 80 :Merck, Germany
- Diklorometan :Merck, Germany
- Glutaraldehit :Merck, Germany
- Tripolifosfat (TPP) :Merck, Germany
- Kalsiyum hidroksit :Emir Kimya, Turkey
- Potasyum hidroksit :Emir Kimya, Turkey
- Üre :Emir Kimya, Turkey
- Glukoz :Emir Kimya, Turkey
- Sodyum klorür :Merck, Germany
- Müsin :Sigma, USA
- Gliserin :Merck, Germany
- Sıvı parafin :Birpa, Turkey
- Dietil eter :Merck, Germany
- Aseton :Merck, Germany
- Laktik asit :Emir Kimya, Turkey

3.1.3. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

- Etüv :Heraeus, Germany
- İklim Dolabı :Model MLR 350 H, Japan
- Difüzyon Sistemi
  Horizontal Difüzyon Ünitesi :Harvard Apparatus, USA
- Viskozimetre :Brookfield, USA
  Programmable, DV-III+Rheometer
  TC-502 Temperature Controller
- Peristaltik Pompa :Master Flex Computerized, Drive 7019-00 model, Switzerland
- Termostatlı Isıtıcı :Heto DT Hetotherm, Germany
- Foto-ışık mikroskop, DCM 4000 :Leica, Germany
- Fourier Transform Infrared
  Spektrofotometresi :Brouker, Vektör 22, USA
- pH metre :Schott CG 840, Germany
- Ultrasonik Banyo :Bransonic 221, Germany
- Partikül Büyüklüğü Aleti :Sympatec Gmbh System-Partikel Technik, Germany
- Partikül Büyüklüğü Aleti :Malvern Zeta Sizer, UK
- Membran Filtre, 0.45µm'lik,Whatman :Sigma, USA
- Diyaliz Membran (M.A<12000Da) :Sigma, USA
- Magnetik Karıştırıcı :Snijders, Holland
- Öğütücü :Geratetechnik, Tip A70,UK
- Elek :Haver-Boecker (250 µm), Germany
- Distile Su Ünitesi :Nüve marka, NS serisi, UK

- HPLC, UV Dedektör, pompa, injection port ve 20 µl Rheodyne loop :Hewlett-Packard Series 1050, Germany
- İntegratör :Hewlett-Packard Series, Germany
- HPLC Kolon Lichrosorb RP-C18, 5µm, 150mmx 4,6mm :Supelco INC., USA
- Enjektör, 100µL :Hamilton, USA
- HPLC Filtrasyon Ünitesi :Milipore, Bedford, USA
- Spektrofotometre(UV) :Beckman DU-600, USA
- Franz Difüzyon Hücresi :Çalışkan Cam, Ankara, Turkey
- Mini-Extruder : Avanti polar lipids, USA
- Rotavapor : Heidolph, UK
- Vakum pompası : Neuberger, Germany
- Vorteks :Nüve-NM 110, UK
- TA.XT. Plus Texture Analyzer : Stable Micro Systems, UK
- Altılı göz tabla :Grainer GmbH, Germany
- Flask (25 cm^2) : Grainer GmbH, Germany
- CO_2 etüvü :Sanyo, Japan

3.2. YÖNTEM (Cidofovire ait yöntem)

Tez çalışmamız, cidofovir etkin maddesi ile yapılan çalışmalar ve oksibütinin etkin maddesi ile yapılan çalışmalar olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Öncelikle cidofovir ve oksibütinin ile yapılan çalışmaların yöntemleri ardından da ayrı ayrı bulguları verilecetir.

Bu şekliyle çalışmaların ve özellikle formülasyonların daha iyi takip edilmesi amaçlanmaktadır. Her iki etkin maddenin tartışması birlikte yapılacaktır.

Yöntem kısmındaki ortak olan bölümler cidofovir ile yapılan çalışmalar kısmında anlatılacak ve oksibütinin kısmında da o bölüme atıf yapılacaktır.

3.2.1. Cidofovir (CV) Etkin Maddesi İle Yapılan İn Vitro Çalışmalar

3.2.1.1. Kullanılan Tampon Çözeltinin Hazırlanışı

pH 4.5 Fosfat Tamponu (USP XXVII)

Disodyum Hidrojen Fosfat		32.4 g
Sitrik Asit		12 g
Distile Su	ym	1000 mL

Maddeler yukarıdaki miktarda tartıldıktan sonra magnetik karıştırıcıda homojen çözelti oluşana kadar karıştırıldı ve pH metre ile ölçüm yapıldı. Vajinal pH'ya uygun olması için in vitro çalışmalarda pH 4.5 tamponu kullanılmıştır.

3.2.1.2. Cidofovir Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

3.2.1.2.1.Etkin Maddelerin Erime Noktası Tayini

Cidofovirin erime noktası tayini Elektrotermal 9200 aleti ile yapıldı. Etkin maddenin ortalama erime noktası ve %95 olasılıklı ± güven aralığı ile bağıl sapması bulundu.

Tüm deneylerde yapılan hesaplarda güven aralıkları %95 olasılıkla bulunmuştur.

3.2.1.2.2. Partikül Büyüklüğü Analizi

Partikül büyüklüğünü belirlemek için Laser-Diffraction Particle Sizer kullanıldı. Ölçüm, aletin küvet sisteminde petrol eteri içinde bir miktar cidofovirin disperse edilmesi ile gerçekleştirildi. Dispersiyon ortamını seçerken etkin maddenin içinde çözünmediği ortam seçildi.

Laser diffraction tekniği, partikül yüzeyine çarpan ışığın gösterdiği optik etkileri kullanır. Bu etkileşmelere saçılım ve absorbsiyon neden olur. Difraksiyon (dağılım), saçılım ve absorbsiyondan sonra ışığın geriye kalan kesridir. Fraunhofer difraksiyonu ileri doğrultudaki ışık kısmı ile ilgilenir. Bu sistem, optik eksen boyunca düzenlenmiş laser, ışın artırıcı, ölçme noktası, lens odaklayıcı ve çok elemanlı fotodedektörden oluşur. Ölçme zonu ve lenslerin odaklanması fotodedektördeki spekturumu belirler. Fotodedektör lensin odak noktasına göre düzenlenmiştir. Partikül büyüklüğü dağılımına bağlı olarak radyal simetrik bir görüntü oluşur. Enerji yoğunluğu merkezden uzaklaştıkça düşer. Çok elemanlı fotodedektör ışığın dağılımını ve yoğunluğunu ölçme kapasitesine sahip 31 adet yarı halka şeklinde alanlardan oluşmaktadır. Işık yoğunluğu orantılı bir akıma dönüştürülür, dijitalize edilir, kaydedilir ve bilgisayarda değerlendirilir.

3.2.1.2.3. IR Spektrumu

Cidofovir etkin maddesinin yaklaşık olarak 1 mg'ı 200 mg potasyum bromür ile tekdüze edilerek karıştırıldı. Toz karışımı, 1000 $kg.cm^{-3}$'lük basınç altında sıkıştırıldı ve elde edilen etkin madde potasyum bromür karışımı disklerin FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) spektrumu alındı.

3.2.1.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

DSC (Differantial Scanning Calorimetry) kullanılarak, 10°C/dak tarama hızında yapıldı ve 300°C'ye kadar olan sıcaklık aralığı kullanıldı. Etkin madde ve polimerler tek olarak ve karışımlarının termogramları incelenmiştir. Örnekler, aluminyum örnek kabına yerleştirilmiş ve ısıtma hücresine konmuştur. 0-300°C sıcaklık aralığında , azot atmosferi altında çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2.5. UV Spektrumu

Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponunda 15 µg/mL derişiminde çözeltisi hazırlandı. 200-400 nm arasında 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanılarak, köre karşı spektrumları alındı ve λ_{max} değeri saptandı.

3.2.1.3. Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayin Yöntemi, Standart Doğrunun Hazırlanması ve Validasyon

3.2.1.3.1. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

Cidofovirin difüzyon deneylerinde ve miktar tayininde kullanılması için pH 4.5 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi bulundu. Bunun için etkin maddenin, 100 µg/mL derişiminde stok çözeltisinden hareketle, artan derişimlerde (3-25 µg/mL arasında) 10 seyreltme yapılarak çözeltileri hazırlandı. Önceden belirlenen maksimum dalga boyunda bu derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri okundu.

Çalışma üç defa tekrarlandı ve ortalama değerler hesaplandı. Cidofovirin derişimine karşı, absorbans değerleri grafiklendi. Daha sonra gerekli hesaplar yapılarak standart doğru denklemi çizildi.

3.2.1.3.2. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Validasyon, etkin maddenin miktar tayini için, yöntemin doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken bütün işlemleri kapsar. Böylece yöntemin güvenirliliği kanıtlanmış olur. Yöntem validasyonu pH 4.5'da yapıldı.

3.2.1.3.2.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery)

Gerçek değer ile saptanan değerin birbirine olan yakınlığı, miktar tayini yönteminin doğruluğunu gösterir. Geri elde ile hesaplanır. Yöntemin doğruluğu bu geri alma yüzdesine bağlıdır. %95 olasılıkla daha önceden kabul edilen ölçütler arasında kalmalıdır.

Bunun için hazırlanan jel formülasyonlarındaki etkin madde miktarının %80'ini, %100'ünü ve %120'sini kapsayan miktarlarda üç ayrı jel formülasyonundan geri elde çalışması yapıldı. %1 cidofovir içeren jel formülasyonu %100 kabul edilerek hesaplanan miktardaki jel içerikleri 50 mL'ik balon jojelerde pH 4.5 fosfat tamponunda ultrasonik banyoda çözüldü. Süzme işlemi 0.45 µm selüloz filtre ile yapıldıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak spektrofotometrede absorbansları bulundu. Kalibrasyon denkleminde bulunan absorbans değerleri yerine konularak konsantrasyonları hesaplandı. Geri elde edilen miktar hesaplandı ve gerekli istatiksel hesaplar yapıldı.

3.2.1.3.2.2. Kesinlik (precision)

Miktar tayininde kullanılan spektrofotometrik yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesidir. Standart sapma ve bağıl

sapma ile ifade edilir. Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve yeniden yapılabilirlik derecesinin bir ölçütüdür.

3.2.1.3.2.2.1. Tekrar Edilebilirlik (repeatability)

Deney içi kesinlik ve deneylerarası kesinlik olmak üzere iki kısımda incelenir. Biz deneylerimizin validasyonunda deney içi kesinliği kullandık.

Bu amaçla, cidofovirin kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için pH 4.5'deki tampon çözelti stokundan (100 µg/mL) seyreltme ile hazırlanan herhangi bir konsantrasyondaki örneklerden birinin spektrofotometrede ve çalışılan dalga boyunda ard arda 10 kez ölçülmesi ile elde edilen absorbanslara karşı gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması (SD) ve bağıl sapması hesaplandı. Bağıl sapmanın %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.2.1.3.2.3. Özgünlük, Seçicilik (specificity, selectivity)

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenilen yapıyı saptayabilmesi için, etkin madde olarak cidofovirin kullanıldığı jel formülasyonlarına giren, etkin madde dışındaki bileşenlerin pH 4.5'de ve 200-400 nm dalga boyları arası taranarak spektrumları alındı.

3.2.1.3.2.4. Doğrusallık (linearity)

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Bunun için konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri regresyon doğrusu ile hesaplandı. Cidofovirin pH 4.5'de 100 µg/mL konsantrasyonda üç adet stok çözeltisi hazırlandı ve her stoktan 10 seyreltme yapılarak bir seri farklı konsantrasyonda çözelti elde edildi. Her konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu.

3.2.1.3.2.5. Stabilite (stability)

Etkin maddenin çözünme ortamındaki stabilitesini incelemek amacıyla cidofovirin pH 4.5'deki stabilitesi incelendi. Bu amaçla etkin maddenin belli derişimde çözeltisi hazırlanıp, oda sıcaklığında ve 37±0.5°C'deki etüvde 24 saat süreyle bekletildi ve belli zamanlarda numune alınarak absorbans değerlerinde ve spektrumlarında bir değişiklik olup olmadığı incelendi. Ayrıca poliol dilüsyon yöntemi ile lipozom hazırlanması sırasında ortam sıcaklığı 60°C'ye çıktığı için CV'in bu sıcaklıkta da stabilite çalışması yapılmıştır.

3.2.2. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1. Farklı Polimer Örneklerinde Viskozite Değerinin ve Akış Özelliklerinin Saptanması

Çalışmada farklı tipte polimerler kullanılmıştır ve aşağıdaki gibi adlandırılmıştır.

1. Yüksek viskoziteki kitosan (Fluka): **Kitosan H**
2. Orta viskoziteli kitosan (Fluka): **Kitosan M**
3. Düşük viskoziteli Kitosan (Acros): **Kitosan L**
4. HPMC, Methocel K100M CR Premium USP/EP: **HPMC K100M**
5. HPMC Methocel K15M CR Premium USP/EP: **HPMC K15M**
6. Carbopol 974 P: **C974P**
7. Polikarbofil: **Pol**
8. Poloksamer 188: **P188**
9. Poloksamer 407: **P407**

Polimerlerin viskozitesi %1'lik çözeltileri Brookfield Programmable, DV-III viskozimetresinde, 25±0.1°C'de ölçüldü ve akış özellikleri yine aynı viskozimetrede 8 farklı rpm'de ölçüm yapılarak belirlendi. Ölçüm için Spindle no: 52 kullanıldı.

3.2.3. Formülasyon Çalışmaları

Tez çalışmamızın amacı CV etkin maddesi ile biyoadezif kontrollü salım yapan vajinal jel formülasyonları geliştirmek ve in vivo kontrolleri yapıldıktan sonra in vivo değerlendirilmesinin yapılmasıdır.

Bu kapsamda farklı polimerler kullanılarak mukoadezif vajinal jeller hazırlandı ve kontrollü salım elde etmek için mikropartiküler ilaç şekilleri hazırlanarak bu jeller ile taşınması sağlandı.

CV'nin vajinaya uygulanmak üzere yukarıda görülen biyoadezif polimerler ile çeşitli jel ve mikropartiküler formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar şöyle sıralanabilir:

1. **Biyoadezif Jel Formülasyonları**: CV'nin dokuz farklı polimer ile farklı yöntemler kullanarak jelleri hazırlanmış ve farmasötik kontrolleri yapılmıştır.

2. **Biyoadezif Lipozom-Jel Formülasyonları**: Öncelikle CV'in iki farklı yöntem ile lipozomları hazırlanmış, karakteristik özellikleri incelenmiş ve daha sonra uygun jel içine konularak salım çalışmaları yapılmıştır.

3. **Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları**: Etkin maddelerin beş farklı yöntem kullanılarak kitosan mikroküreleri hazırlanmış ve uygun jel içine konularak karakteristik özellikleri incelenmiştir.

3.2.4. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Kitosan Jel Formülasyon Çalışmaları

Kitozan-jel formülasyonu hazırlanırken glasiyel asetik asit, distile su ve kitozan kullanıldığı bir yönteme göre hazırlandı[210]. Kitozan öğütücüye konularak 5 dk öğütüldü ve 250 μm'lik elekten geçirilerek partikül büyüklüğü dağılımının dar olması sağlandı. Glasiyel asetik asit, kullanılacak olan suyun yarısına eklendi ve gerekli miktar kitozan asitli su içerisine ilave edilip baget yardımıyla yavaşça karıştırıldı. Kitozan şiştikten sonra suyun geri kalan kısmı eklendi, karıştırıldı. Oluşan hava kabarcıklarının çıkması için bir gece oda sıcaklığında bekletildi.

3.2.4.1.1. Kitozan-jel Formülasyonunda Kullanılan Bileşenlerin Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda, kitozan-jel formülasyonunun, vajina pH'sına uygun değerde olması için çeşitli glasiyel asetik asit oranları ve kullanımına uygun viskozitede olması için de çeşitli kitozan oranları denendi. Öncelikle %1, %0.5 ve %0.2 oranlarında glasiyel asetik asit oranları denendi. Farklı glasiyel asetik asit derişiminde üç farklı kitosana ait %1'lik ve %2'lik jeller hazırlandı ve bu jellerin pH'ları ölçüldü. Vajinal bölgede kullanılmak üzere hazırlanan kitosan jellerin pH'sının vajinal pH'ya, yani pH 4.5'e yakın olması gerektiği için bu değere en yakın pH'ya sahip olan jele ait glasiyel asetik asit oranının kullanılmasına karar verildi. Kullanılacak olan glasiyel asetik asit oranı belirlendikten sonra bu oranda glasiyel asetik asit içeren üç farklı kitosana ait toplam 15 farklı jel hazırlanmıştır. Jellerdeki kitosan derişimi kitosanın türüne ve viskozitesine göre değişmektedir. Tablo 2'de kitosan jel formülasyonuna ait bileşenlerin belirlenmesi çalışması sırasında hazırlanan ön formülasyonların glasiyel asetik asit oranları ve kitosan derişimleri verilmiştir.

Tablo 2. Kitosan jel formülasyonlarına ait bileşenlerin belirlenmesi çalışması sırasında hazırlanan ön formülasyonlar.

Kitosan Jel Ön Formülasyonları	Glasiyel Asetik Asit (GAA) Oranı(%)	Kitosan H Derişimi(%)	Kitosan M Derişimi(%)	Kitosan L Derişimi(%)
H1	0.5	0.5	-	-
H2	0.5	1	-	-
H3	1	1	-	-
H4	0.2	1	-	-
H5	0.2	2	-	-
H6	0.5	2	-	-
H7	0.7	2	-	-
H8	1	3	-	
M1	0.5	-	0.5	-
M2	0.5	-	1	-
M3	1	-	1	-
M4	0.2	-	1	-
M5	0.2	-	2	-
M6	0.5	-	2	-
M7	0.7	-	2	-
M8	1	-	3	-
L1	0.5	-	-	0.5
L2	0.5	-	-	1
L3	1	-	-	1
L4	0.7	-	-	1
L5	1	-	-	2
L6	0.2	-	-	2
L7	1	-	-	3
L8	1.5	-	-	4

Hazırlanan bu jellerin 8 farklı rpm'de viskoziteleri ölçüldü. Sonuçta %0.5-1 aralığında glasiyel asetik asit içeren üç farklı kitosan ile hazırlanmış jellere etkin madde ilave edilmesine karar verildi. Bu amaçla %1 CV içeren kitosan-jel formülasyonları hazırlandı. Gerekli miktar cidofovir tartıldı, kitosan jel hazırlanması sırasında asitli suda şişen kitosan üzerine ilave edilen suya cidofovir ilave edilmiştir. Öncelikle cidofovir suda ultrasonik banyoda çözülene kadar bekletildi sonra bu çözelti, kitosan jele ilave edildi ve bir süre de jel ultrasonik banyoda bekletildi. Böylece şeffaf, etkin madde içeren kitosan jel formülasyonu hazırlanmış oldu. Hazırlanan etkin maddeli kitosan jel formülasyonunun bileşenleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. CV-kitosan jel formülasyonunun bileşenleri

Cidofovirin-Kitosan Jel Formülasyonları	CV (%)	GAA Oranı (%)	Kitosan H Derişimi (%)	Kitosan M Derişimi (%)	Kitosan L Derişimi (%)
CV-KITH1	1	0.7	1	-	-
CV-KITH2	1	0.7	2	-	-
CV-KITH3	1	1	3	-	-
CV-KITM1	1	0.5	-	1	-
CV-KITM2	1	0.7	-	2	-
CV-KITM3	1	1	-	3	-
CV-KITL1	1	0.7	-	-	1
CV-KITL2	1	1	-	-	2
CV-KITL3	1	1			3

3.2.4.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Bizim çalışmamızda vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan jeller Pavelic[211] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre hazırlandı. Buna göre: %1 oranında polimer içeren jel hazırlamak amacı ile, 1g Carbopol 974P veya Polikarbofil, 88.5 g distile suda disperse edildi ve 800 rpm'de 60 dakika karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 10 g polietilen glikol 400 ilave edildi ve son olarak %10 NaOH çözeltisi damla damla ilave edilerek transparan jel oluşması sağlandı. Oluşan hava kabarcıklarının çıkması için +4 $^{\circ}$C'de 24 saat bekletildi. Aynı yöntem ile %2 oranında polimer içeren jeller hazırlanmıştır. Etkin maddeli jellerin hazırlanması sırasında ise cidofovir kullanılan distile suda çözülmüş ve diğer işlemlere devam edilmiştir. Bu formülasyonlarda kullanılan cidofovir oranı %0.5'dir. Formülasyonların ayrıntıları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Carbopol 974P ve Polikarbofil kullanılarak hazırlanan formülasyonların bileşenleri

Jel Formülasyonları	Carbopol 974P(g)	Polikarbofil (g)	PEG 400(g)	CV (%)	Distile Su(g)
C974P1	1	-	10	-	89
C974P2	2	-	10	-	88
CV-C974P1	1	-	10	0.5	88.5
CV-C974P2	2	-	10	0.5	87.5
POL1	-	1	10	-	89
POL2	-	2	10	-	88
CV-POL1	-	1	10	0.5	88.5
CV-POL2	-	2	10	0.5	87.5

3.2.4.3. HPMC Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Çalışmamızda, polimer oranları %1 ve %2 olacak şekilde, cidofovir içeren HPMC jel formülasyonları hazırlandı. Polimerler distile suda disperse edildi, 500 rpm'de 60 dakika karıştırıldı ve oluşan hava kabarcıklarının çıkması için +4°C'de 24 saat bekletildi. Yirmi gram olarak hazırlanan HPMC jel formülasyonunun bileşenleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. HPMC jel formülasyonunun bileşenleri

Jel Formülasyonları	HPMC K100M %	HPMC K15M %	Distile Su(g)	CV (%)
HPMCK100M1	1	-	20	-
HPMCK100M2	2	-	20	-
CV-HPMCK100M1	1	-	20	0.5
CV-HPMCK100M2	2	-	20	0.5
HPMCK15M1	-	1	20	-
HPMCK15M2	-	2	20	-
CV-HPMCK15M1	-	1	20	0.5
CV-HPMCK15M2	-	2	20	0.5

3.2.4.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Bizim çalışmamız sırasında poloksamer P407 (Lutrol® F127) ve poloksamer P188 (Lutrol® F68) ile çalışıldı ve soğukta hazırlama yöntemi[212] ile % 20 oranında polimer içeren jeller hazırlandı (Jeller P407 ve P188 olarak ifade edildi). Poloksamerlerin oranları değiştirilerek farklı jelleşme sıcaklığına sahip jeller hazırlanabilir. Böylece vücut sıcaklığında jelleşen polimer kombinasyonları bulunabilir. pH 4.5 fosfat tamponu, buzdolabında +4°C'ye getirildikten sonra magnetik karıştırıcı üzerindeki cam beher içine konuldu. Üzerine % 20 poloksamer 407 veya % 20 poloksamer 188 ilave edilerek, 10 dakika, sıcaklık +4°C'de sabit olacak şekilde karıştırıldı. Sıcaklığın sabit kalması için cam beherin etrafına buz bloklar yerleştirildi ve belli zamanlarda termometre ile sıcaklık kontrol edildi. Bir gece +4°C'de bekletildi. +4°C'de transparan, homojen, akışkan bir kütle elde edildi. Oda sıcaklığında jel kıvamına geldiği görüldü.

Çalışmamızın devamında poloksamer 407 içeren jele, biyoadezif etkinin artırılması amacıyla % 0.2 ve % 0.5 oranında HPMC ilave ederek,

formülasyon çalışmalarımıza devam ettik. Bu jellerden % 0.2 HPMC içeren poloksamer jel MP407, % 0.5 HPMC içeren jel ise HP407 olarak kodlanmıştır. Jellerin hazırlanmasında, yine soğukta hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle HPMC, fosfat tamponu içinde +4°C'de karıştırılmış, daha sonra üzerine yavaş yavaş poloksamer 407 ilave edilmiştir. 10 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece +4°C'de bekletildi. +4°C'de transparan, homojen, akışkan jeller elde edildi.

CV içeren jellerin hazırlanması sırasında, jel hazırlarken kullanılacak olan pH 4.5 fosfat tamponunun içine, istenilen konsantrasyona göre tartılan etkin madde ilave edildi ve çözünmesi sağlandı. Bu etkin madde içeren fosfat tamponuna, polimerler ilave edildi ve yukarda anlatılan yönteme göre jeller hazırlandı. Böylece etkin maddelerin homojen dağıldığı, transparan jeller elde edildi. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının bileşenleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının bileşenleri

Formülasyon	Poloksamer 407 %	Poloksamer 188 %	HPMC K100M%	CV%
P407	20	-	-	-
P188	-	20	-	-
MP407	20	-	0.2	-
HP407	20	-	0.5	-
CV-P407	20	-	-	0.1
CV-MP407	20	-	0.2	0.1
CV-HP407	20	-	0.5	0.1

3.2.5. Biyoadezif Jel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller

3.2.5.1. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonunda Fiziksel Görünüş

Jel formülasyonlarının fiziksel görünüşü, oda sıcaklığındaki renk ve transparan özelliği incelenerek değerlendirildi.

3.2.5.2. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonunun Akış Özelliklerinin ve Viskozitesinin İncelenmesi

Jel formülasyonlarının akış özellikleri ve viskozitesi 25.0±0.1°C'de Brookfield Programmable, DV-III viskozimetresinde tayin edildi.

3.2.5.3. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Jel Formülasyonlarının pH'sı

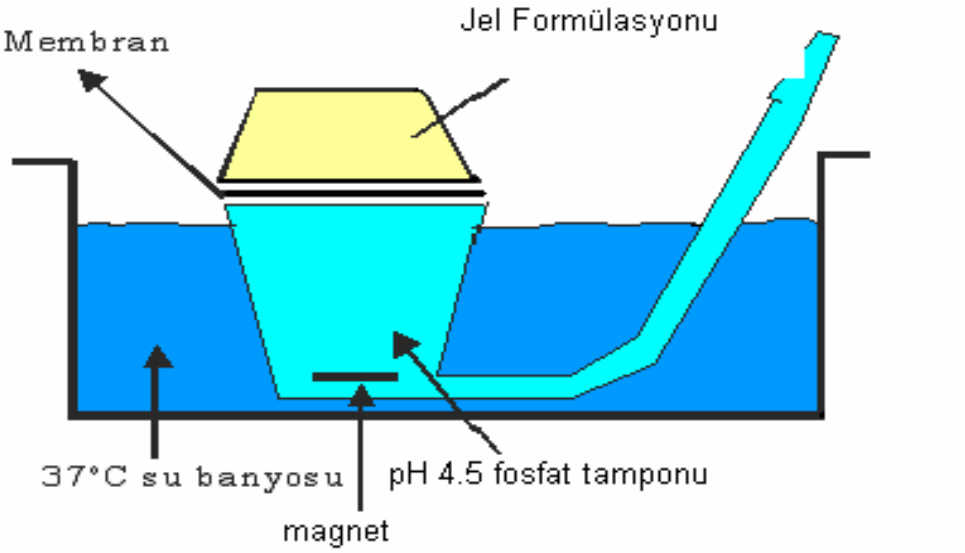
Jel formülasyonlarına ait pH değerleri pH-metre kullanılarak saptandı.

3.2.5.4. Etkin Madde Miktar Tayini

İçinde belli miktarda CV içeren jel formülasyonlarından, 10 mg etkin madde içeren jel tartılarak pH 4.5 fosfat tampon çözeltisine konuldu. Magnetik karıştırıcıda bir gün karışması sağlandıktan sonra, çözülmeleri için ultrasonik banyoda bekletildi ve uygun seyreltmeler yapılarak miktar tayini analizi yapıldı.

3.2.5.5. Etkin Madde İçeren Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Etkin maddenin diyaliz membrandan geçişinin incelenmesi için Franz difüzyon hücreleri kullanıldı. Şekil 9'da sistem şematik olarak gösterilmiştir. Hazırlanan jeller, enjektör yardımı ile terazi üzerinde belli miktarda tartılarak difüzyon hücresine yerleştirildi ve 12000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membrandan geçiş incelendi. Diyaliz membrandan etkin maddenin geçiş çalışmalarının Franz difüzyon hücrelerinde yapılmasının nedeni dokudan geçiş çalışmalarının da benzer bir yöntem olan Horizontal difüzyon ünitesinden yapılmış olmasıdır. Böylece sonuçlar karşılaştırılabilir olmuştur.



Şekil 9. Franz difüzyon hücresi

Kullanılan membran, yatay Franz difüzyon hücresine yerleştirildi. Üzerine (donör kısma), cidofovir içeren jeller yerleştirildi. Hücrenin alt kısmına (reseptör kompartmanına) ise pH 4.5 fosfat tamponu (≈ 2.5 ml) ve küçük magnetler konularak 6'lı magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Bu sistem de 37°C'lik su banyosu üzerine yerleştirildi. Şekilde difüzyon hücreleri görülmektedir. Geçiş bölgesinin alanı 1 cm^2'dir. Belli zaman aralıklarında örnekler alındı. Alınan örneklerden CV analizi spektrofotometrede 278.4 nm'de yapıldı. Sonuçlar standart doğru denkleminde yerine konularak diyaliz membrandan geçen etkin madde miktarı hesaplandı.

3.2.5.6. Biyoadezif Jel Formülasyonlarının Stabilite Çalışması

Sonuç formülasyon olarak seçilen jel formülasyonları üç ay süreyle 4°C/ortam nemi, 25°C/% 60 bağıl nem ve 40°C/% 75 bağıl nemde bekletilmiş ve görünüş, pH, viskozite ve miktar tayini gibi farmasötik karakterleri incelenerek stabilitesi değerlendirilmiştir.

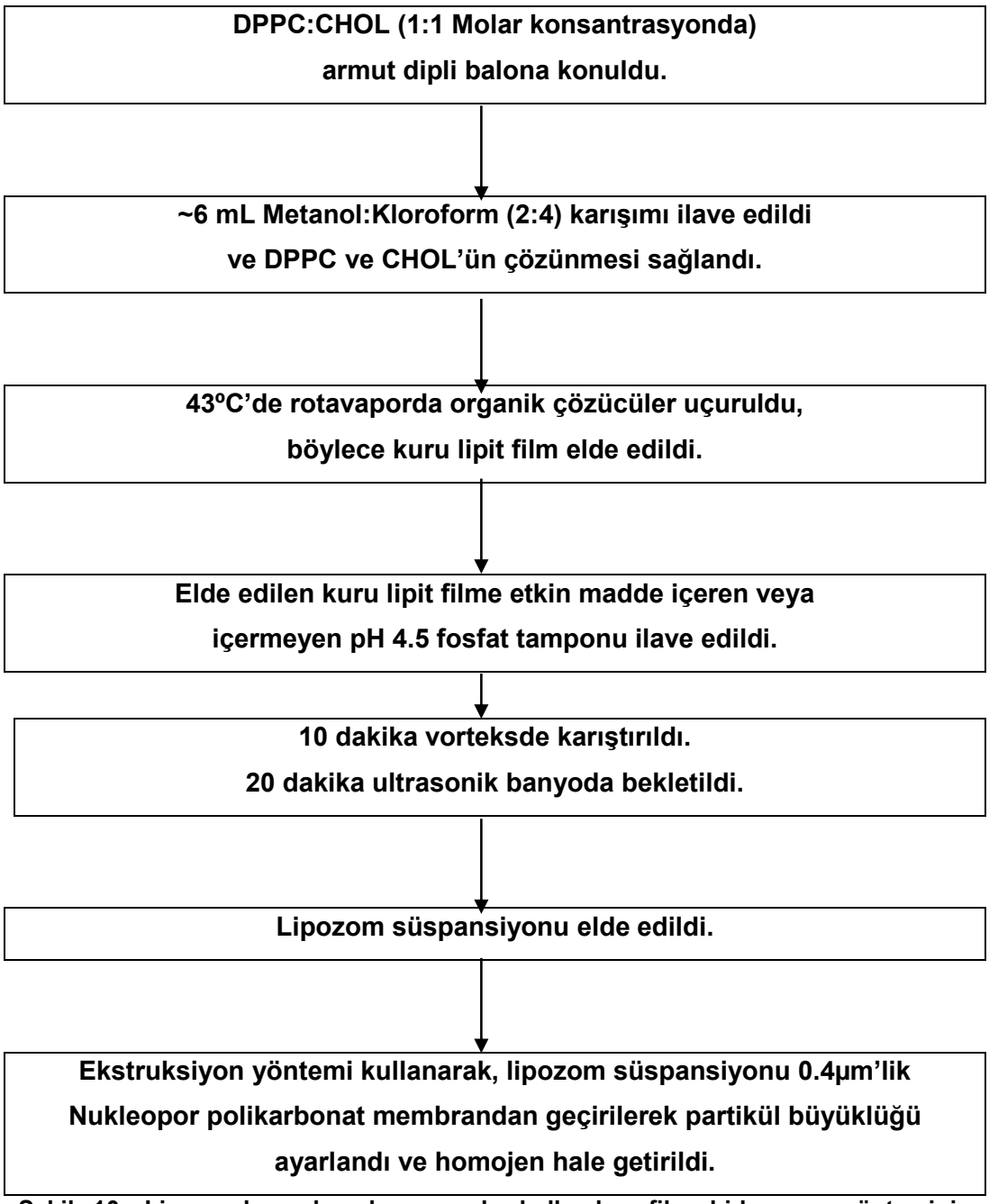
3.2.6. Lipozom Formülasyon Çalışmaları

Çalışmamız sırasında iki farklı yöntem kullanılarak lipozomlar hazırlandı. Bunlardan birincisi film-hidrasyon yöntemi ikicisi de poliol dilüsyon yöntemidir.

3.2.6.1. Film-Hidrasyon Yöntemi ile Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Çalışmamızda lipozom formülasyonları, fosfolipit olarak dipalmitoilfosfotidilkolin (DPPC) ve stabilite artırıcı olarak kolesterol (CHOL) kullanılarak film oluşturma yöntemi ile Şekil 10'da gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

Öncelikle etkin madde içermeyen lipozom formülasyonları hazırlandı. Lipozomları hazırlamada, vajinal uygulamaya uygun olması nedeniyle pH 4.5 fosfat tamponu kullanıldı. Lipozom hazırlanırken DPPC kloroform:methanol (4:2) karışımında çözüldü ve rotavaporda faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta (43°C), 30 dk vakum altında kurutuldu. Elde edilen ince film, fosfolipidin faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta pH 4.5 fosfat tamponu ile 5 dakika hidrate edildi. Hidratasyondan sonra 10 dakika boyunca vorteks uygulandı ve 20 dakika da ultrasonik banyoda bekletilerek MLV (çok tabakalı büyük veziküller=multilamellar large vesicles) tipi lipozom formülasyonu hazırlandı. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ekstruksiyon yöntemi kullanarak uygun büyüklüğe getirilmeye çalışıldı.



Şekil 10. Lipozomların hazırlanmasında kullanılan film hidrasyon yönteminin şematik gösterimi

Elektriksel yük kazandıran madde seçiminde hapsedilen etkin maddenin isoelektrik noktası dikkate alınmış ve en uygun madde olarak stearilamin (SA) seçilmiştir.

Çalışmamızın devamında, bu bilgilere dayanarak çeşitli molar oranlarda formülasyonlar denendi ve özellikleri belirlendi. Yine literatür

bilgisine dayanarak 26 mM total lipit oranına karşın 10 mM etkin madde oranı kullanıldı[112].

SA içeren lipozom formülasyonları Tablo 7'de ayrıntıları verildiği şekilde ve CV-FS1 ve CV-FS2 olarak adlandırıldı. CV-FS1 formülasyonunda yapılan incelemelerde partikül büyüklüğü dağılımının daha önceki formülasyonlara göre bozulduğu ve enkapsülasyon yüzdesinin çok düştüğü gözlendi. Bu sorunların giderilmesi için hazırlama işleminde değişiklikler yapıldı ve CV-FS2 formülasyonu hazırlandı.

CV-FS2 lipozomlarının hazırlanması aşamalarında (Şekil 10) ekstrüksiyon işleminden sonra, lipozom süspansiyonu bir tüp içinde sıvı azot içine atıldı ve donması beklendi.

Donma işlemi gerçekleştikten sonra lipozom süspansiyonunu içeren tüp 37°C'lik su banyosunda eritildi. Bu işlem birbiri ardına 5 defa tekrarlandı. Daha sonra santrifüj işlemine geçildi. Bu işlemin de 3 defa tekrarlanması sağlandı.

Formülasyon çalışmalarında hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Kullanılan kısaltmalar:

DPPC:Dipalmitoil fosfotidilkolin, **SA**: Stearilamin, **CHOL**: Kolesterol, **FM**: film yöntemi, **FT**: dondurup çözme, **CV**: cidofovir

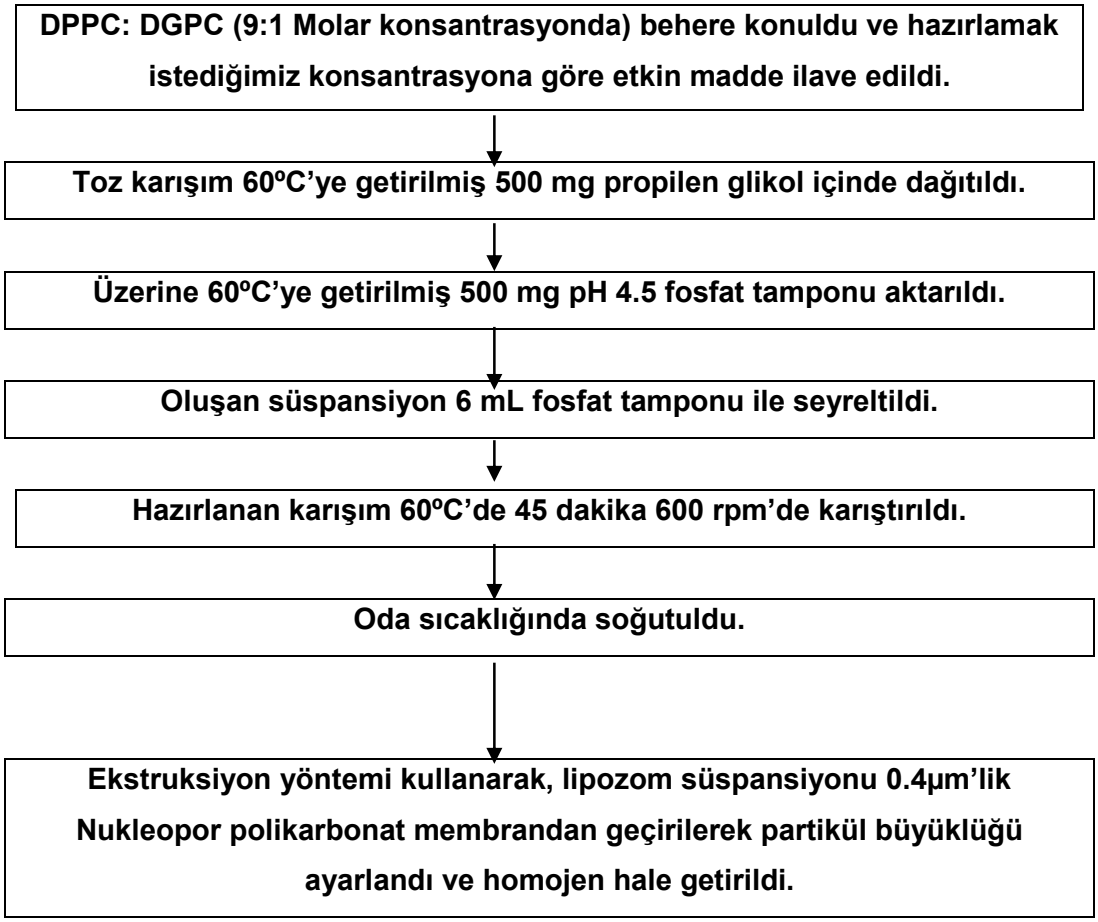
Tablo 7. Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri

Kodu	***CV (Molar oran)***	***Lipit Bileşimi***	***Lipit Molar Bileşim***	***Hazırlama Yöntemi***
F1	-	DPPC:CHOL	1:1	FM
CV-F2	0.5	DPPC:CHOL	1:1	FM
CV-FS1	0.5	DPPC:SA:CHOL	10:1:4	FM
CV-FS2	0.5	DPPC:SA:CHOL	10:1:4	FM + FT

3.2.6.2. Poliol Dilüsyon Yöntemi ile Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Bu yöntem ile fosfolipitler bir poliolün içinde, kullanılan lipitin yapısına göre gliserol veya propilen glikol içinde, 50-80ºC'de çözülür ve sulu faz aynı sıcaklıkta eklendi. Bu yöntem suda çözünürlüğü düşük fakat glikollerde çözünebilen etkin maddeler için uygun bir lipozom hazırlama yöntemidir[211].

Bu grup lipozom formülasyonları, fosfolipit olarak dipalmitoilfosfotidilkolin (DPPC) ve dipalmitoylglycerophosphocholine (DGPC) kullanılarak poliol dilüsyon yöntemi ile Şekil 11'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Lipozomlar hazırlanırken pH 4.5 fosfat tamponu kullanıldı. Etkin madde içeren ve içermeyen lipozom formülasyonları hazırlandı. DPPC:DGPC oranı 9:1 şeklinde kullanıldı. Bu karışıma etkin madde ilave edildi ve 60ºC'de 500 mg propilen glikol içinde disperse edildi. Üzerine 500 mg yine 60ºC'ye getirilmiş pH 4.5 fosfat tamponu ilave edildi. Lipitler ve etkin maddenin bu ortamda homojen bir şekilde disperse olduğu gözlendi. Daha sonra oluşan süspansiyon 6 mL fosfat tamponu ile seyreltildi. Karışım 600 rpm'de ve 60ºC'de 45 dakika karıştırıldı. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra ekstruksiyon işlemi yapıldı.



Şekil 11. Lipozomların hazırlanmasında kullanılan poliol dilüsyon yönteminin şematik gösterimi

Bu yöntem ile hazırlanan lipozomlarda da SA kullanılmış ve CV-PS1 formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı kötü olduğu için ve enkapsülasyon yüzdesi düştüğü için hazırlama işlemine dondurup çözme basamağı eklenerek yeni bir formülasyon (CV-PS2) hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar Tablo 8'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kısaltmalar:

DPPC:Dipalmitoil fosfotidilkolin, **DGPC**:Dipalmitoylglycerophosphocholine, **SA**: Stearilamin, **CHOL**: Kolesterol, **FT**: dondurup çözme, **PD**: poliol dilüsyon yöntemi, **CV**: cidofovir

Tablo 8. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri

Kodu	***CV (Molar Oran)***	***Bileşim***	***Lipit Molar Bileşim***	***Hazırlama Yöntemi***
P1	-	DPPC:DGPC	9:1	PD
CV-P2	0.5	DPPC:DGPC	9:1	PD
CV-PS1	0.5	DPPC:SA	9:3	PD
CV-PS2	0.5	DPPC:SA	9:3	PD + FT

3.2.7. Hazırlanan Lipozomların Karakterizasyonu

Hazırlanan lipozomların karakterize edilmesi amacıyla, partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, ve lipozom içine hapsedilen etkin madde miktarları incelendi. Ayrıca hazırlanan lipozomların stabilite çalışması için, 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında lipozomlar bekletildi ve belli sürelerde örnek alınarak yukarıda bahsedilen özellikler belirlendi.

3.2.7.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Partikül büyüklüğünü belirlemek için film yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için Laser-Diffraction Particle Sizer kullanıldı. Ölçüm, aletin küvet sisteminde distile su içinde lipozom süspansiyonlarının birkaç damlasının disperse edilmesi ile gerçekleştirildi. Dispersiyon ortamını seçerken lipozomların içinde çözünmediği ortam seçildi.

Çalışma etkin madde içeren ve içermeyen lipozomlar için yapıldı. Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ölçüldüğünde partikül büyüklüğü dağılımının homojen olmadığı görülmüştür. Bu nedenle partikül büyüklüğü dağılımını homojenize edebilmek için ekstruksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğünü belirlemek için ekstruksiyon işleminden önceki ölçümlerde Laser-Diffraction Particle Sizer, ektruksiyon işleminden sonraki ölçümler için Malvern Zeta Sizer Nanoseries kullanıldı. Ektruksiyon işlemi

uygulanmayan lipozomlar ekstruksiyon işlemi uygulanan lipozomlara göre daha büyüktür. Mikrometre boyutunda olan bu lipozomların büyüklüğü bölümümüzde bulunan Laser-Diffraction Particle Sizer ile ölçülebilmektedir. Ancak ekstruksiyon işlemi uygulanan lipozomların partikül büyüklüğü nanometre boyutunda olduğu için Laser-Diffraction Particle Sizer ile ölçülememiş ve bölümümüzde bulunan Malvern Zeta Sizer Nanoseries ile ölçülmüştür. Çalışma etkin madde içeren ve içermeyen lipozomlar için yapılmıştır.

Malvern Zeta Sizer cihazı, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle çalışmaktadır. Bu cihaz ile partikül büyüklüğü 0.6 ile 6000 nm aralığında ölçüm yapılabilmektedir. Ayrıca, partikül büyüklüğü 5 nm ile 10 µm arasında bulunan partiküllerin zeta potansiyel ölçümünde de kullanılabilmeltedir. Çalışmamızda stabilite deneyleri boyunca partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri “Malvern Zeta Sizer, ZEN 3600” ile ölçülmüştür. Ölçümler aletin küvet sisteminde, distile su içine lipozom formülasyonlarının disperse edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.2. Ekstruksiyon İşleminin Partikül Büyüklüğüne Etkisi

Ekstruksiyon işlemi, lipozomların partikül büyüklüğünü istenilen boyuta getirmek için kullanılmaktadır. Bu yöntemde lipozomlar değişik por genişliğine sahip nukleopor membranlardan geçirilmektedir.

Bizim çalışmamızda 0.4 µm por genişliğindeki nukleopor polikarbonat membran kullanılarak işlem yapılmıştır. Kullanılan membranlar öncelikle pH 4.5 fosfat tamponunda hidrate edildi ve mini-extruder aletine yerleştirildi. Süzme işlemi yapılmadan önce ekstruder aleti etüvde 50^{o}C’de 20 dakika bekletildi, bu şekilde ekstruksiyon işleminin hızlı ve kolay olması sağlandı. Ekstruksiyon işleminde en az 10 defa süzme işlemi yapılmasının yeterli olduğu belirtilmiştir. Çalışmada 11 defa ekstruksiyon işlemi yapıldı. Şekil 12’de mini-extruder aleti gösterilmiştir.



Şekil 12. Mini-extruder aleti

Şekilde görülen enjektörlerden birine lipozom süspansiyonu doldurulduktan sonra alete tam yatay olacak şekilde yerleştirilmesi gerekmektedir. Karşılıklı yatay olarak yerleştirilen enjektörlerden lipozom süspansiyonu bir taraftan diğerine geçirilmektedir. Bu geçişler sırasında lipozom süspansiyonu ortadaki metal kısımda bulunan membrandan geçmektedir.

3.2.7.3. Lipozomlarda Zeta Potansiyel Tayini

Zeta potansiyel, partikül yüzeyine yapışık olan tabaka ile nötr bölge arasındaki potansiyel farkıdır. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının ekstruksiyon yapıldıktan sonra ve stabilite ortamlarında zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Zeta potansiyel ölçümü Malvern Zeta Sizer Nanoseries ile yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri, lipozomların stabilitesinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır.

3.2.7.4. Lipozomların Işık Mikroskobu Görüntüleri

İn vivo çalışmada kullanılması düşünülen formülasyonun ekstruksiyon işlemi öncesi ve sonrasında görüntüleri Polarize Ataşmanlı LEICA DMEP adlı mikroskop ile görüntülenmiştir. Mikroskopta büyütme olarak x40 kullanılmıştır. Bu yöntemle ekstruksiyon işlemi sonucunda partikül büyüklüğünde oluşan değişim ve homojen lipozom partiküllerinin oluşup oluşmadığı incelenmiştir.

Polarize Ataşmanlı LEICA DMEP adlı mikroskop ile sadece film yöntemi ile hazırlanan lipozomlar görüntülenebilmiştir. Poliol dilüsyon

yöntemi ile hazırlanan lipozomların büyüklüğü nm boyutunda olduğu için ışık mikroskobunda görülememiş ve SEM görüntüsü çekilmiştir.

3.2.7.5. Lipozomların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Hazırlanan lipozomların yüzey görüntülerini ve genel görüntülerini incelemek amacıyla JSM-6400 SEM (Scanning Electron Microscopy) kullanıldı. Ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi merkez laboratuvarında gerçekleştirildi.

Karbon bant üzerine yapışmış olan lipozomların iletkenlik sağlaması için yaklaşık 30 µm kalınlığında altınla kaplanarak görüntülendi. Bu kaplamanın sağlanması için lipozomların kuru olması gerektiği için liyofilize edilerek veya oda sıcaklığında bekletilerek lipozomlar kurutuldu ve kaplanmaları sağlandı.

3.2.7.6. Lipozomların Yükleme Kapasitesinin Ölçülmesi

pH 4.5 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonları 20000 rpm de 1 saat süreyle santrifüjlenerek, lipozomların sulu çözeltiden ayırt edilmesi sağlandı. Sulu çözeltideki CV miktarı spektrofotometre ile tayin edildi. Ölçülen miktar, total etkin madde miktarından çıkarılarak, lipozomlarda tutulan etkin madde miktarı hesaplandı. Yükleme kapasitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{C_{total} - C_{sulu\,çözelti}}{C_{total}} \times 100$$

Lipozom formülasyonlarında CV'nin yükleme kapasitesi farklı bir yöntemle daha incelenmiştir. 50 µL lipozom süspansiyonu alınıp, fosfat tamponu ile 5 mL'ye tamamlandı ve disperse olması sağlandı. Üzerine 4 mL kloroform ilave edilerek ayırma hunisinde ekstre edildi. Böylece lipozom içine hapsedilmiş olan etkin madde, fosfat tamponunun bulunduğu

üstteki faza geçti, alttaki kloroformlu faz ayrıldı. Etkin maddelerin bulunduğu sulu faz gerekli seyreltmeler yapılarak analiz edildi.

3.2.7.7. Lipozomların Stabilite Çalışmaları

CV'nin film-hidrasyon ve poliol dilüsyon yöntemiyle hazırlanan lipozomlarının stabilitesini incelemek amacıyla farklı stabilite ortamlarında (4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde) belli zamanlarda örnek alınarak partikül büyüklüğü tayini, zeta potansiyel tayini ve etkin madde miktar tayini testleri daha önce anlatıldığı gibi yapıldı. 7, 14 21. 30. günlerde, 2. ve 3. aylarda lipozom formülasyonlarında ölçümler yapıldı.

3.2.8. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonları

Etkin madde içeren lipozomların daha önce hazırlanan jeller içinde dağıtılmasıyla vajinal uygulamada uzun süreli salım sağlanacağı düşünülen lipozom içeren jel formülasyonları hazırlandı. Hazırlama sırasında 1:1 oranında film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozom ve jel kullanıldı. Lipozomlar 20000 g de 1 saat santrifüjlendikten sonra çöken tabaka ile jeller 1:1(a/a) oranında karıştırıldı. Ancak poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü nm boyutunda olduğu için, tam olarak lipozomların çöktürülmesi sağlanamadı ve lipozom süspansiyonu ile jeller %10 (a/a) oranında karıştırıldı. Lipojel formülasyon bileşenleri Tablo 9'da verilmiştir.

Lipozom süspansiyonlarının jel içerisinde %10 oranında dağıtılmasının nedeni jelin viskozitesini ve reolojik özelliklerini değiştirmesine engel olmak içindir. Örneğin CV-F2KR formülasyonunda, film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-F2 lipozomu santrifüjlenmiş ve dibe çöken lipozomlar (susuz bir şekilde) Carbopol 974P jel içinde 1:1 oranında dağıtılmıştır. CV-P2-KR formülasyonunda ise, poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan CV-P2 lipozomları süspansiyon halinde Carbopol 974P jel içinde %10 oranında dağıtılmıştır. Sulu süspansiyon halindeki lipozomların jelin reolojik özelliklerini bozmaması için daha düşük oranda karışım hazırlanmıştır.

Kullanılan kısaltmalar:

KR: Carbopol 974P ile %2 oranında hazırlanan jel,

KITH3: Kitosan H ile hazırlanan %3 oranında jel

K100M: HPMC K100M CR ile %2 oranında hazırlanan jel,

P407: Poloksamer 407 ile %20 oranında hazırlanan jel,

CV-F2: Film yöntemi ile hazırlanan CV içeren lipozom formülasyonu,

CV-P2: Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan CV içeren lipozom formülasyonu,

CV-FS2: Film yöntemi ve dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan CV içeren lipozom formülasyonu,

CV-PS2: Poliol dilüsyon yöntemi ve dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan CV içeren lipozom formülasyonu

Tablo 9. Lipojel formülasyonlarının bileşenleri

Formülasyon Kodları	CV-F2 (%) a/a	CV-P2 (%) a/a	CV-FS2 (%) a/a	CV-PS2 (%) a/a	KR (%) a/a	KTH3 (%) a/a	K100M (%) a/a	P407 (%) a/a
CV-F2-KR	50	-	-	-	50	-	-	-
CV-F2-KITH3	50	-	-	-	-	50	-	-
CV-F2-K100M	50	-	-	-	-	-	50	-
CV-P2-KR	-	10	-	-	90	-	-	-
CV-P2-KITH3	-	10	-	-	-	90	-	-
CV-P2-K100M	-	10	-	-	-	-	90	-
CV-FS2-KR	-	-	10	-	90	-	-	-
CV-FS2-KITH3	-	-	10	-	-	90	-	-
CV-FS2-K100M	-	-	10	-	-	-	90	-
CV-FS2-P407	-	-	10	-	-	-	-	90
CV-PS2-KR	-	-	-	10	90	-	-	-
CV-PS2-KITH3	-	-	-	10	-	90	-	-
CV-PS2-K100M	-	-	-	10	-	-	90	-
CV-PS2-P407	-	-	-	10	-	-	-	90

3.2.8.1. Biyoadezif Lipojel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller

Jellerin diyaliz membrandan geçiş çalışması bölüm 3.2.5.5'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Ayrıca lipojellerin viskozite, akış özellikleri de bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi incelenmiştir.

3.2.9. MİKROKÜRE FORMÜLASYONLARI

Formülasyon çalışmalarımızın bu kısmında daha önce hazırladığımız biyoadezif vajinal jellerin içine konulmak üzere mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır. Böylece salımın daha kontrollü hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışmamızda mikroküre formülasyonlarının hazırlanmasında kitosan kullanılmıştır ve 5 farklı yöntem kullanarak CV'in kitosan mikroküreleri hazırlanmıştır. Kullanılan yöntemler şunlardır:

1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi
2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi
3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu Yöntemi
4. Kompleks Koaservasyon Yöntemi
5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon

Yapılan bütün kitosan mikroküre çalışmalarında Chitosan Highly-Viscous (Kitosan H) (Fluka, USA) kullanılmıştır.

3.2.9.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

CV içeren kitosan mikrokürelerinin hazırlanması için önce %1'lik glasiyel asetik asit içinde %1'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Etkin madde bu aşamada jel hazırlanırken kullanılan suya ilave edilmiştir. Sıvı parafin (50 mL) içerisine %2'lik olacak şekilde Tween 80 ilave edilmiş ve 2 saat manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de karıştırılmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltisinin 6 ml'si %2 Tween 80 içeren sıvı parafin içinde disperse edilmiş ve mekanik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmaya başlanmıştır. İki dakika sonra 1 mL %25'lik glutaraldehit çözeltisi ilave edilmiş, otuz dakika sonra aynı işlem tekrarlanmıştır. Karıştırma işlemi üç saat sürmüştür. Oluşan mikroküreler santrifüj edilerek ayrılmış, bir kez n-hekzan ve üç kez eter ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur.

CV yüklü kitosan mikrokürelerin E1 ön formülasyonunun emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmasındaki deney koşulları Tablo 10'da belirtilmiştir.

Tablo 10. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile kitosan mikroküre ön formülasyonlarının hazırlanmasında deney koşulları

PARAMATRE	E1 Ön Formülasyon Deney Koşulları
Etkin Madde	CV
Polimer	Kitosan, Fluka, Yüksek viskoziteli
Polimer Konsantrasyonu	%1
Polimer Çözücüsü	Glasiyel asetik asit (%1)
Yağ Fazı	Sıvı parafin
Yüzey Aktif Madde	Tween 80
Çapraz Bağlayıcı Madde ve Miktarı	Glutaraldehit (%25'lik sulu çözeltisi), 2 mL
Çapraz Bağlayıcı İlave Etme Zamanı	2. dk. ve 30. dk.
Karıştırma Hızı	500 rpm (3 saat)
Yıkama	Birkez n-hekzan, üç kez eter
Kurutma	Oda sıcaklığında

Hazırlama sırasında emülsiyon oluşturmada başarı sağlandı, ancak üç saatlik karıştırma süresinin sonlarına doğru emülsiyonun rengi beyazdan sarıya dönmeye başladı. Karıştırma bittikten sonra santrifüj yapıldı ve yıkama işlemine geçildi. Ancak yıkama işleminde tam anlamıyla başarı sağlanamadı. Partiküller birbirinden ayrılmadı ve polimer kütlesi şeklinde bir görüntü oluştu. Oda sıcaklığında kurutma işleminden sonra ışık mikroskobu ile partiküller incelenmeye çalışıldı.

Bu denemede başarılı olunamadığı için benzer bir yöntem ile kitosan mikroküresi hazırlayan Kumbar[213] ve arkadaşlarının kullandıkları yöntem denendi. Buna göre yine %1 glasiyel asetik asit içeren %1'lik kitosan çözeltisi hazırlandı. Polimer çözeltisi (10 mL) sıvı parafin (50 ml) içine ilave edilerek yüksek hızda, 10 000 rpm, Ultra Turrax ile karıştırıldı. Yağ içinde su emülsiyonu oluşumunu stabilize etmek için karışıma %1 Tween 80 ilave edildi. On dakika sonra emülsiyonun içindeki sulu fazı sertleştirerek küre oluşturmak amacıyla glutaraldehitin %40'lık çözeltisinden 1mL eklenmiştir. Bir saat daha 10 000 rpm'de Ultra Turrax'da karıştırıldıktan sonra manyetik karıştırıcıya alınarak 500 rpm'de 4 saat karıştırılmıştır. Oluşan yapı süzülerek ayrılmış ve yağ fazının uzaklaştırılması için n-hekzan ve su ile yıkanmıştır. Deney koşulları E2 mikroküre formülasyonu için Tablo 11'de belirtilmiştir.

Tablo 11. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile kitosan mikroküre formülasyonlarının hazırlanmasında deney koşulları

PARAMATRE	E2 Formülasyon Deney Koşulları
Etkin Madde	CV
Polimer	Kitosan, Fluka, Yüksek viskoziteli
Polimer Konsantrasyonu	%1
Polimer Çözücüsü	Glasiyel asetik asit (%1)
Yağ Fazı	Sıvı parafin
Yüzey Aktif Madde	Tween 80
Çapraz Bağlayıcı Madde ve Miktarı	Glutaraldehit (%40'lik sulu çözeltisi), 1 mL
Çapraz Bağlayıcı İlave Etme Zamanı	10. dk.
Karıştırma Hızı	500 rpm (4 saat)
Yıkama	Birkez n-hekzan, üç kez su
Kurutma	Oda sıcaklığında

İlk denememizde karşılaştığımız sorunlar ile bu yöntemde de karşılaştık, yağ fazı tam olarak uzaklaştırılamadı ve partiküller birbirinden ayrılıp küresel bir şekilde elde edilemedi.

3.2.9.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Bu yöntem ile kitosan mikroküreleri hazırlanırken, ters yüklü makro moleküller arasında kompleks oluşumundan yararlanılır. Tripolifosfat (TPP), katyonik kitosan ile elektrostatik olarak etkileşime girebilen bir poli-anyondur. Öncelikle kitosan, asidik çözücüde çözülür. Bu çözelti daha sonra damlatma yoluyla sabit bir karıştırma hızında, poli-anyonik TPP çözeltisine karıştırılır. Zıt yükler arasında kompleks oluşumuna bağlı olarak, kitosan iyonik olarak jelleşir ve küresel partiküller oluşur[214].

Bizim çalışmamızda öncelikle %1'lik glasiyel asetik asit çözeltisi içinde %1'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi hazırlanırken 2 saat manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmış ve 24 saat +4 °C'de bekletilmiştir. Böylece tam homojen kitosan çözeltisi elde edilmiştir.

Sonraki aşamada 10 mL kitosan çözeltisi sertleştirici çözeltiye damlatılmak üzere enjektöre çekilmiştir. Sertleştirici çözelti olarak tripolifosfatın (TPP) %1'lik çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL kitosan çözeltisi 0.45 mm çaplı insülin enjektöründen 100 rpm hızla karışmakta olan 100 ml

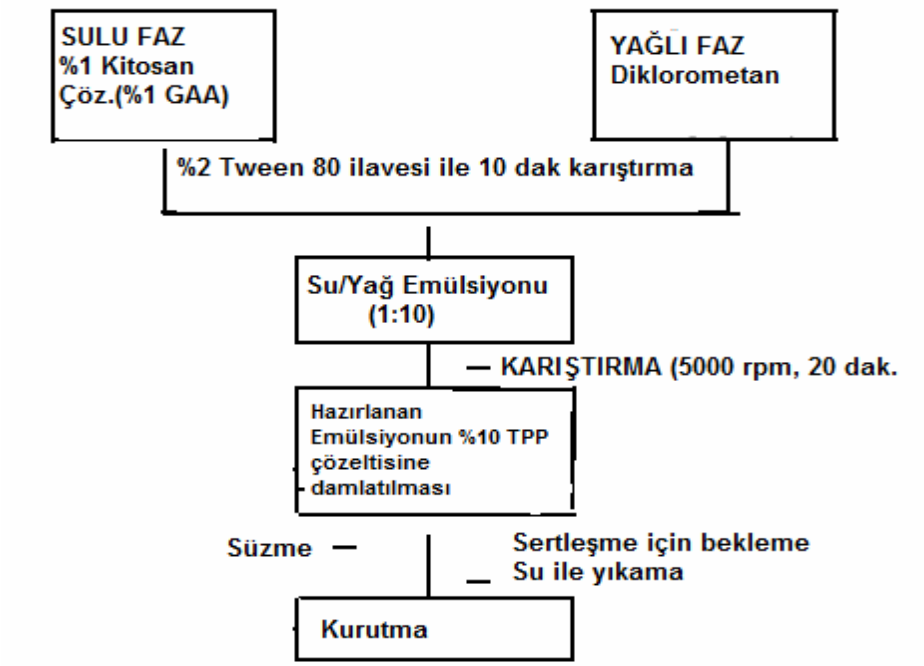
TPP çözeltisi içine damlatılarak 30 dakika süren karıştırma işleminden sonra filtre edilmiş ve 3 kez 20 mL distile su ile yıkanmıştır. Kurutma işlemi 37°C'lik etüvde 24 saat süreyle yapılmıştır ve sonuçta küresel yapıda mikroküreler elde edilmiştir. Etkin maddeli küreler hazırlanırken CV kitosan çözeltisi içine disperse edilmiş ve ultrasonik banyoda 5 dakika beklenmiştir. CV kitosan çözeltisinde çözünmüş ve homojen bir yapı oluşmuştur. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV-T1 kitosan mikrokürelerinin formülasyonlarının ayrıntıları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerin formülasyon içerikleri

	CV-T1 Formülasyonu
YÖNTEM	İyonotropik jelasyonu
CV Kons. (% a/a)	5
Polimer Kons. (% a/h)	1
Asetik Asit Kons. (% h/h)	1
TPP Kons (a/h)	1
Karıştırma Hızı (rpm)	100
İç/Dış Faz Oranı	10/100
Yıkama	3 kez 20 mL distile su ile
Kurutma	37°C'lik etüvde 24 saat

3.2.9.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Ko[215] ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yine sertleştirici olarak TPP çözeltisi kullanılmıştır. Bu yönteme göre mikrokürelerin oluşturulmasında öncelikle %1 glasiyel asetik asit içeren %1'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Surfaktan olarak %2 Tween 80 ilave edilmiş ve 10 dakika karıştırılmıştır. Karıştırmanın sonunda beyaz renkte bir yapı oluştuğu gözlenmiştir. Daha sonra yağ fazı ilave edilerek yağ/su (1:10) emülsiyonu oluşturulmuştur, bunun için 5000 rpm'de 20 dakika karıştırılmıştır. Oluşan emülsiyon %10 TPP içeren çözeltiye yine insülin enjektörü ile damlatılmıştır. Sertleşme süresi olarak 30 dakika beklendikten sonra küreler su ile yıkanmış ve 37°C'de kurutulmuştur. Yöntemin basamakları Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu yöntemi ile kitosan mikroküreleri hazırlanması

Etkin maddenin ilave edilmesi yine kitosan çözeltisinin içinde çözülmesi şeklinde olmuştur. Küresel mikroküreleri oluşumunun gözlendiği iyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan K1 formülasyonunun içeriği Tablo 13'de gösterilmişir.

Tablo 13. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikroküreleri formülasyon içerikleri

	CV-K1 Formülasyonu
YÖNTEM	İyonotropik emülsiyon jelasyonu
CV Kons. (% a/a)	5
Polimer Kons. (% a/h)	1
Asetik Asit Kons. (% h/h)	1
TPP Kons (a/h)	10
Karıştırma Hızı (rpm)	5000
Tween 80 (% a/a)	2
Diklorometan(yağlı faz) /Kitosan Çözeltisi (sulu faz)	1/10
Yıkama	3 kez 20 mL distile su ile
Kurutma	37°C'lik etüvde 24 saat

3.2.9.4. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikroküre lerinin Hazırlanması

Kompleks koaservasyon yöntemi ile kitosan mikroküre lerinin hazırlanmasında Bozkır[216] ve arkadaşlarının yaptığı çalışma esas alınmıştır. Buna göre %1 glasiyel asetik asit içeren %1-2 kitosan çözeltisi 55°C'de hazırlandı. Aynı sıcaklıkta CV içeren 50-100mM sodyum sülfat (Na_2SO_4) çözeltisi de başka bir yerde hazırlandı ve bu iki çözelti eşit miktarda karıştırılarak derhal 45 saniye süre ile vortekslendi. Hazırlanan formülasyonların kodları ve içerikleri Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri

FORMÜLASYON KODU	Kitosan Konsantrasyonu (%)	Na_2SO_4 Konsantrasyonu (mM)	Süre (s)	Mikroküre oluşup oluşmama durumu
CV-AS1	1	50	45	Oluştu
CV-AS2	1	50	60	Oluştu
CV-AS3	1	100	45	Oluştu
CV-AS4	1	100	60	Oluştu
CV-AS5	2	50	45	Oluşmadı
CV-AS6	2	50	60	Oluşmadı
CV-AS7	2	100	45	Oluştu
CV-AS8	2	100	60	Oluştu

3.2.9.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikroküre lerinin Hazırlanması

Bu süreç, kimyasal çapraz bağlanma sonrasında polimerin çökmesini içermektedir. Biz çalışmamızda Berthold[217] ve arkadaşlarının kullandığı yöntemi denedik. Kitosan oranını %0.25-0.50 arasında değiştirdiğimiz çalışmada %2 glasiyel asetik asit kullanarak kitosan çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti sonikatörün üzerinde karıştırıcıda 400 rpm'de karışırken üzerine %20 (a/h) konsantrasyonda Na_2SO_4, dakikada 5mL olacak şekilde damlatılarak ilave edildi. Na_2SO_4 ilavesi bitince 1 saat daha sonikatörde karıştırma işlemine devam edildi, daha sonra 15 dakika

3000 rpm'de santrifüjlenerek oluşan mikroküreler ayrıldı. Hazırlanan formülasyonların kodları ve içerikleri Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri

FORMÜLASYON KODU	Kitosan (%) Konsantrasyonu	Na2SO4 (mL)	Süre (dak)	Mikroküre oluşup oluşmama durumu
CV-BT1	0.25	2	10	Oluştu
CV-BT2	0.25	2	20	Oluştu
CV-BT3	0.25	4	10	Oluştu
CV-BT4	0.25	4	20	Oluştu
CV-BT5	0.50	2	10	Oluşmadı
CV-BT6	0.50	2	20	Oluşmadı
CV-BT7	0.50	4	10	Oluştu
CV-BT8	0.50	4	20	Oluştu

3.2.10. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu

3.2.10.1. Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği

Hazırlanan kitosan mikrokürelerden etkin madde miktar tayini için tartılan belli miktar kürenin içerdiği etkin madde miktarı bulunmuştur. Bunun için tartılan mikroküreler, 10 mL 0.1 N HCl çözeltisi içinde çözüldükten sonra etkin madde analizi yapılmıştır. Bizim daha önceki tüm çalışmalarımız pH 4.5 fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilmişti. Ancak kitosan mikrokürelerden miktar tayininin 0.1 N HCl ortamında yapılması gerektiği için etkin maddelerin yeniden kalibrasyonu yapılmış ve elde edilen denklem miktar tayininde kullanılmıştır.

Etkin maddelerin miktar tayini yapılmış ve sonuç işlem etkinliği şeklinde aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmıştır.

$$\text{Teorik etkin madde içeriği (a)} = \frac{\text{iç fazdaki etkin madde miktarı}}{\text{iç fazdaki total katı miktarı}} \times 100$$

$$\text{Ölçülen etkin madde içeriği (b)} = \frac{\text{ölçülen etkin madde miktarı}}{\text{ölçümdeki total katı miktarı}} \times 100$$

$$\text{İŞLEM ETKİNLİĞİ} = \frac{a}{b} \times 100$$

3.2.10.2. Hazırlanan Mikroküre Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

İyonotropik jelasyon yöntemi ve iyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklüğünün belirlenmesinde Laser-Diffraction Particle Sizer kullanıldı. Ölçüm, aletin küvet sisteminde distile su içinde kürelerin dağıtılması ile gerçekleştirildi. Dispersiyon ortamını seçerken mikrokürelerin içinde çözünmediği ortam seçildi.

Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ve kompleks koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklüğü ölçümünde ise Malvern Zeta Sizer Nanoseries kullanıldı. Hazırlanan bütün mikroküre formülasyonlarının zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Zeta potansiyel ölçümü Malvern Zeta Sizer Nanoseries ile yapılmıştır.

3.2.10.3. Mikrokürelerin Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Çalışma 3.2.7.4 ve 3.2.7.5.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Partikül büyüklüğü μm seviyesinde olan mikrokürelerin görüntüleri hem ışık mikroskobu hem de SEM ile alınmıştır. Ancak partikül büyüklüğü nm boyutunda olan kürelerin görüntüsü sadece SEM ile alınabilmiştir. SEM'de görüntü elde edilebilmesi için mikroküreler oda sıcaklığında kurutulmuş ve iletken olabilmesi için altın ile kaplanmıştır.

3.2.10.4. Etkin Madde İçeren Mikroküre Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.5.5.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Salım deneylerinde öncelikle hazırlanan mikrokürelerin süspansiyon halinde difüzyon deneyleri yapıldı bunun için 1:10 (mikroküre:su) oranında sulandırılan mikroküreler Franz hücrelerine yerleştirilerek etkin madde geçişleri incelendi.

3.2.11. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları

Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinden CV-T1 ve CV-K1 katı halde CV-AS4 ve CV-BT4 ise süspansiyon halinde daha önce hazırlanan jeller içinde dağıtılmıştır. Böylece vajinal uygulamada uzun süreli salım sağlanacağı düşünülen mikroküre içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır (Tablo 16). Bu sayede mikrokürelerin jel bir taşıyıcı içinde vajinaya uygulanabilirliği de sağlanmış oldu.

Kullanılan kısaltmalar:

KR: Carbopol 974P ile %2 oranında hazırlanan jel,
KITH3: Kitosan H ile hazırlanan %3 oranında jel
K100M: HPMC K100M CR ile %2 oranında hazırlanan jel,
CV-T1: İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren kitosan mikroküreleri.
CV-K1: İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan ve CV içeren kitosan mikroküreleri.
CV-AS4: Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan ve CV içeren kitosan mikroküreleri.
CV-BT4: Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan ve CV içeren kitosan mikroküreleri.

Tablo 16. Biyoadezif mikroküre-jel formülasyonlarının kodları (1:10 a/a karışım)

Formülasyon Kodları	CV-T1 (%) a/a	CV-K1 (%) a/a	CV-AS4 (%) a/a	CV-BT4 (%) a/a	CV-KR (%) a/a	CV-KIT (%) a/a	CV-K100M (%) a/a
CV-T1-KR	1	-	-	-	10	-	-
CV-T1-KITH3	1	-	-	-	-	10	-
CV-T1-K100M	1	-	-	-	-	-	10
CV-K1-KR	-	1	-	-	10	-	-
CV-K1-KITH3	-	1	-	-	-	10	-
CV-K1-K100M	-	1	-	-	-	-	10
CV-AS4-KR	-	-	1	-	10	-	-
CV-AS4-KITH3	-	-	1	-	-	10	-
CV-AS4-K100M	-	-	1	-	-	-	10
CV-BT4-KR	-	-	-	1	10	-	-
CV-BT4-KITH3	-	-	-	1	-	10	-
CV-BT4-K100M	-	-	-	1	-	-	10

3.2.11.1. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Farmasötik Kontrolleri

Hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarının kontrolleri (pH, viskozite, akış özellikleri, fiziksel görünüş ve diyaliz mebrandan salım) bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi incelenmiştir.

3.2.12. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik olarak Değerlendirilmesi

Geçiş çalışmalarında, zamana bağlı olarak diyaliz membrandan geçen yığılmalı etkin madde miktarı şeklinde elde edilen veriler grafige geçirildiğinde farklı şekillerde profiller elde edilmektedir. Bu profillerin doğrusallaştırılması etkin madde çıkış mekanizmalarının yorumlanması ve farklı formülasyonlar arasında karşılaştırma parametrelerinin elde edilmesi için verilere farklı varsayımlara dayanan matematiksel modeller uygulanmaktadır. Bizim çalışmamızda CV içeren formülasyonlardan diyaliz membrandan geçiş çalışması sonucunda elde edilen geçiş profilleri, kinetik açıdan sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetikleri uygulanarak değerlendirilmiştir.

3.2.13. Biyoadezif Formülasyonlarda Texture Profil Analizi (TPA) (Yapı Profil Analizi)

Jel formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesinde TA-XT*Plus* Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK) cihazı kullanıldı ve bu cihaza Resim 1'de de görülen penetrometre (batma ölçer, girinim ölçer) probu takılarak 37±0.5°C'de ölçümler yapıldı. Penetrometre, cihaza ait bir yazılım programı ile kontrol edilerek sonuçlar değerlendirildi.



Resim 1.TA-XT*Plus* Texture profil analiz cihazı ve penetrometre

Mekanik özellikleri belirlenecek olan jeller 25mL'lik beherlere konuldu ve jel yüksekliğinin 8 cm olmasına dikkat edildi. Daha sonra bu beherlerdeki jeller ultrasonik su banyosunda 20 dakika bekletildi. Böylece sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış oldu ve hava kabarcıklarının çıkması sağlandı. On mm çapındaki prob ile jellerin üzerine iki defa belirli oranda (2 mm/s kuvvet ile) ve belli derinlikte (15 mm) kompres=baskı uygulandı. Her periyotda iki kompres arasında 15 saniye olacak şekilde ayarlandı.

Ölçüm sonucunda elde edilen veriler, cihazın kendine ait olan *Texture Exponent* 2.0.6.0. yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

Etkin madde içermeyen ve içeren jel formülasyonlarının TPA diye kısaca söz edebileceğimiz yapı profil analizi yukarıda anlatıldığı gibi yapılmış ve jel sertliği, sıkışabilirliği, elastikiyeti, adezifliği ve kohezifliği incelenmiştir. Her çalışma 6 defa tekrarlanmıştır.

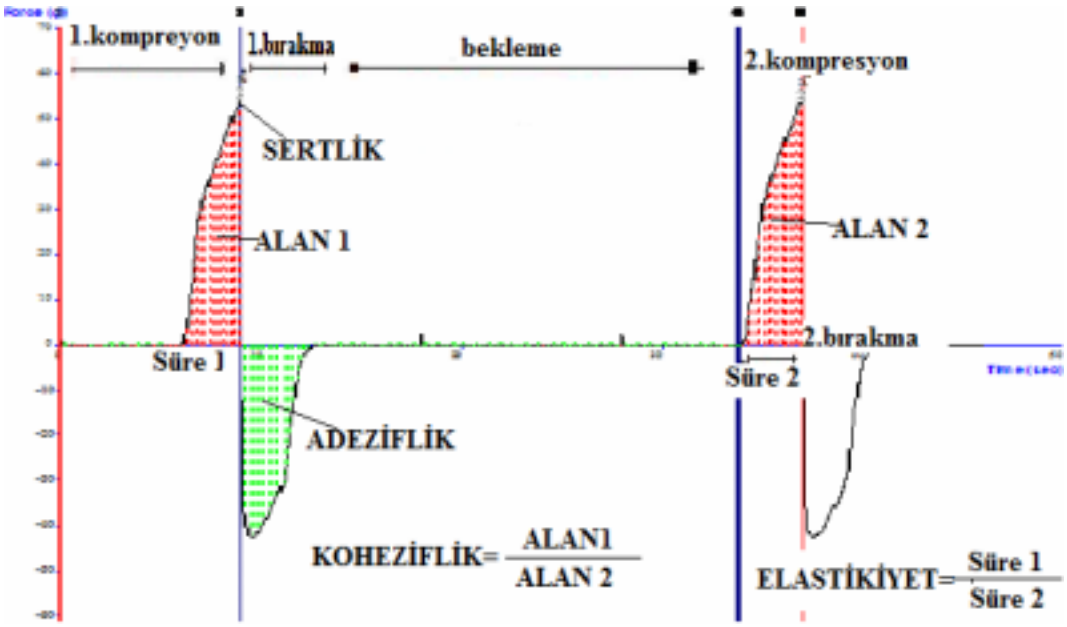
Sertlik (Hardness): Uygulanan belirli bir kuvvet sonucunda oluşan deformasyon olarak tanımlanır veya ilk kompres=baskı döngüsünün ait pikin maksimum gösterdiği kuvvettir (N) (Şekil 14).

Sıkışabilirlik(Compressibility): Probun ilk kompresyon döngüsünde ürünün biçiminin bozulması (deformasyonu) için gereken iş olarak tanımlanır (N.mm).

Adeziflik (Adhesiveness): İlk kompresyondaki negatif kuvvet alanı olarak tanımlanır ve probun yüzeyi ile jelin yüzeyi arasındaki çekici kuvveti yenmek için gereken işi temsil eder (N.mm) (Şekil 14).

Koheziflik (Cohesiveness): Birinci kompresyon döngüsündeki kuvvet-zaman eğrisi altında kalan alan ile ikinci kompresyon döngüsündeki eğri altında kalan alanın oranı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 14).

Elastikiyet (Elasticity): Birinci ve ikinci kompresyon döngülerindeki maksimum yapısal deformasyonun oluşması için gerekli sürelerin oranı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 14).



Şekil 14. Texture profil analizi, birinci ve ikinci kompresyon döngüsü grafiği

Deneyler daha önce belirlediğimiz koşullar altında yapıldı. CV içeren ve içermeyen jeller üzerinde yapılan ölçümler sonucunda elde edilen TPA profili belirlendi. Ayrıca Bölüm 3.8.2'de ayrıntıları anlatılan ve Tablo 9'da formülasyon içerikleri verilen lipojellerin ve Bölüm 3.2.11'de anlatılan Tablo 16'da da içerikleri belirtilen mikroküre içeren jellerin de TPA testleri yapılmıştır.

Üzerinde çalışılan jeller aşağıda belirtilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Mukoadezyon testleri yapılan jeller

KR	%2 Carbopol 974P içeren jel
K100M2	%2 HPMC K100M içeren jel
KIT H3	%3 Kitosan H içeren jel
HP407	**%**20 poloksamer 407 ve %0.5 HPMC K100M içeren jel
CV-KR	%1 CV içeren Carbopol jel
CV-KITH3	%1 CV içeren Kitosan H jel
CV-K100M2	%1 CV içeren HPMC K100M jel
CV-HP407	%1 CV içeren HPMC POL jel

3.2.14. Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmaları

Literatürde[52,94] yapılan benzer çalışmalar esas alınarak TA.XT.Plus Texture Analyser ile hazırladığımız biyoadezif formülasyonların mukoadezyon özellikleri belirlendi. Bunun için çalışmamıza özgü yöntem geliştirildi ve valide edildi.

Bu çalışmalar sırasında kopma kuvveti (F) ve yapılan adezyon işi (W) bulundu. Model mukoza olarak inek vajinal mukozası kullanıldı ve yöntemin tekrarlanabilir olup olmadığını anlamak için her ölçüm 6 kez tekrarlandı.

Çalışmamızda in vivo deneyler tavşan üzerinde yapılacağı için mukoadezyon çalışmalarının da tavşan vajinası kullanılarak yapılması düşünüldü. Ancak tavşan vajinası küçük olduğu için cihazın probunu (10 mm çap) tam olarak kaplamakta zorlandık. Her ölçüm 6 defa tekrarlandığında her defasında mukoza değiştirerek deney yaptık. Bu durumda bir örneğin ölçümü için 6 tavşan vajinası gerekiyordu. Bu koşulları sağlayamadığımız için, sonuçlar tekrarlanabilir olmadığı için ve yöntemin validasyonu tavşan vajinasında yapılmadığı için bütün çalışmalar için inek vajinal mukozası kullanılmıştır.

Mukoza farklı sıvıların içine daldırıldı ve vajinal sıvının özelliklerinin mukoadezyon testine etkisi incelenmeye çalışıldı. Ölçümler 37°C'de yapıldı ve prob hızı, probun uyguladığı kuvvet ile mukoza/örnek etkileşme süresi gibi parametreler değiştirilerek optimum ölçüm şartları bulunmaya çalışıldı ve yöntem valide edildi.

- **MODEL MUKOZA**: Koyun, sıçan, tavşan ve domuz gibi hayvanların vajinal mukozaları mukoadezyon testi için kullanılmaktadır. İnsan vajinal mukoza özelliklerine en benzer özellikte olan mukozanın inek vajinal mukozası olduğu bildirilmiştir[52]. Ayrıca inek vajinal mukozasının kolay bulunur olması ve yüzey alanının oldukça geniş olması da bir avantajdır. Bizim çalışmamızda da inek vajinal mukozası kullanıldı. Vajinal

mukoza inekten çıkarıldıktan hemen sonra %0.9'luk NaCl (NS) çözeltisi içinde -20 °C'de dondurulmuştur. Çalışma yapılana kadar bu şekilde saklanan mukoza çalışmadan 1 saat önce çözülmüştür.

- **DALDIRMA SIVISI:** Çalışmamızda farklı daldırma sıvılarının mukoadezyona etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan sıvılar NS (Serum fizyolojik), pH 4.5 fosfat tamponu (PB) ve müsin içeren ve içermeyen yapay vajinal sıvıdır (VFS). VFS içeriği Owen[14] ve arkadaşlarının kullandıkları sıvıya göre hazırlanmıştır. Buna göre: glukoz, 5; NaCl, 3.51; laktik asit, 2.00; domuz gastrik müsini (tip II), 1.50; potasyum hidroksit, 1.40; asetik asit, 1.00; üre, 0.4; kalsiyum hidroksit, 0.222; gliserol, 0.16; sığır serum albümini, 0.018 ve su ile 1 L'ye tamamlanır. Miktarların hepsi 1 litre için gram cinsinden verilmiştir. Maddeler tartıldıktan sonra manyetik karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırılmıştır. VFS biyokimyasal, reolojik ve mukoadezif özellikleri açısından vajinanın fizyolojik sıvısına benzerdir.

- **MUKOADEZYON ÖLÇÜMÜ**: Daha önce hazırladığımız biyoadezif vajinal formülasyonlarının inek vajinal mukozasına dokunduktan sonra ayrılırken oluşan kopma kuvveti ve bu sırada yapılan iş TA.XT.Plus Texture Analyser cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Teste başlamadan önce donmuş halde bulunan inek vajinası 37°C'de 20 dakika bekletildi. Tam erime gerçekleşmeden, henüz daha sertken mukozal yüzeyden 2 mm kalınlığında ve yaklaşık 10 mm çapında kesitler alındı. Bu kesitler siyanoakrilat yapısındaki bir yapıştırıcı ile proba yapıştırıldı, kuruması için 2 dakika beklendikten sonra 37°C'lik su banyosunda bulunan daldırma sıvısında (serum fizyolojik:NS, fosfat tamponu:PB, yapay vajinal sıvı:VFS veya müsin içeren yapay vajinal sıvı:VFS+müsin olabilir) 5 dakika bekletildi. Böylece hem sıcaklığı ayarlandı hem de

daldırma sıvısı ile muamele edildi. Jel ise probun belli bir hızla inerek dokunacağı yüzeye tek kat ve homojen olacak şekilde sürüldü. Jeller de su banyosunda bekletilerek sıcaklıkları 37°C'ye getirilmişti. Jelin sürülmesinde hava kabarcığı olmamasına özellikle dikkat edildi ve her seferinde aynı şekilde ve aynı kalınlıkta sürülmeye çalışıldı. Vajinal mukozayı taşıyan prob farklı hızlar denenerek (1, 2.5 ve 5 mm/saniye) jelin bulunduğu yüzeye dokundu ve bir süre bekletildi. Bu temas süresi 60, 150 ve 300 saniye olacak şekilde farklı süreler olarak çalışıldı. Bu süre boyunca probun jel yüzeye uygulayacağı kuvvet de 0.1, 0.2 ve 0.3 Newton olarak faklı kuvvetlerde denendi. Bu farklı denemeler sonucunda prob jelin yüzeyinden ayrılırken oluşan kopma kuvveti ve yapılan mukoadezyon işi alet tarafından ölçülerek hesapları yapılmıştır. Bu sonuçlar değerlendirilirken farklı test koşulları ve alete ait farklı parametrelerin hangisinin bizim çalışmamız için anlamlı olacağı tartışılmıştır.

- **FARKLI TEST KOŞULLARININ ETKİSİ:** Çalışmamız yapılırken kullanılan test koşulları ve alete ait parametreler Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. Mukoadezyon test koşulları

Test Koşulları ve Alete Ait Parametreler	Genel Kullanılan Değerler	Denenen Test Varyasyonları
Daldırma Sıvısı	**VFS**	**NS, PB, VFS+Müsin**
Prob Hızı (mm/sn)	**1.0**	**2.5 ve 5**
Probun Uyguladığı Kuvvet (N)	**0.2**	**0.1 ve 0.3**
Ölçüm Yapılan Örnek	**%2 Carbopol Jel**	**-**
Mukoza ile Örneğin Temas Süresi (sn)	**60**	**150 ve 300**

Çalışmalarımız 6 paralel deney şeklinde yapılmıştır. TA.XT.Plus Texture Analyser'ın yazılım programı bize kopma kuvvetini ve yapılan işi hesaplayarak vermektedir. Burada yapılan iş kuvvet-mesafe grafiğinde

eğri altında kalan alandan (AUC) hesaplanmaktadır, birimi N.mm'dir. Biz ayrıca mukoadezyon işini bulmak için aşağıdaki denklemi kullandık.

$$\text{MUKOADEZYON İŞİ} = \frac{\text{AUC}}{\pi r^2}$$

Πr^2= jel ile temas eden mukozal yüzeyin alanı

Tablo 19'da örnek olarak PB ortamında Carbopol jelin inek mukozasına yapışma kuvvetinin nasıl hesaplandığı gösterilmiştir. Diğer bütün ölçümlerimizde de aynı hesaplar yapılmıştır.

Tablo 19. TA.XT.Plus Texture Analyser cihazı tarafından yapılan örnek hesap

	Kuvvet 1	Alan= İş	Muco. İşi	Kuvvet 1	Alan= İş	Muco. İşi
	kg	kg.mm	AUC/ Πr^2	N	N.mm	AUC/ Πr^2
1. Ölçüm	0.02	0.016	0.012057272	0.201	0.158	0.119065561
2. Ölçüm	0.02	0.022	0.016578749	0.191	0.215	0.162019593
3. Ölçüm	0.019	0.018	0.013564431	0.187	0.179	0.134890731
4. Ölçüm	0.021	0.016	0.012057272	0.206	0.161	0.1213263
5. Ölçüm	0.019	0.019	0.014318011	0.187	0.189	0.142426526
6. Ölçüm	0.019	0.016	0.012057272	0.189	0.156	0.117558402
Ortalama	**0.020**	**0.018**	**0.013**	**0.194**	**0.176**	**0.133**
Standart Sapma	**0.001**	**0.002**	**0.002**	**0.008**	**0.023**	**0.017**
Bağıl Sapma	**4.152**	**13.466**	**13.466**	**4.157**	**13.049**	**13.049**
Standart Hata	**0.000**	**0.001**	**0.001**	**0.003**	**0.009**	**0.007**
Güven Sınırı	**0.001**	**0.002**	**0.001**	**0.007**	**0.019**	**0.014**

3.2.14.1. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Daldırma Sıvılarının Denenmesi

Farklı daldırma sıvılarının denendiği çalışmamızda test koşulları ve alet parametreleri Tablo 17'de gösterilen genel kullanılan değerlere göre seçilmiş sadece daldırma sıvıları değiştirilerek bulunan sonuçlar arasındaki farklılıklar değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ölçümler dört farklı sıvı kullanılarak yapılmıştır.

1. Serum fizyolojik
2. Fosfat tamponu pH 4.5
3. Vajinal sıvı
4. Müsin içeren vajinal sıvı

3.2.14.2. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Prob Hızlarının Denenmesi

Prob hızı olarak 1, 2.5 ve 5 mm/sn denenmiştir. Düşük prob hızı (1 mm/sn'nin altında) kullanılarak yapılan ölçümlerde değişkenliğin fazla olduğu literatürde belirtilmektedir[141].

3.2.14.3. Mukoadezyon Çalışmalarında Farklı Prob Kuvveti Uygulanarak Yapılan Çalışma

Carbopol jel üzerinde yaptığımız mukoadezyon çalışmamıza probun jel yüzeyine dokunduğunda uygulayacağı kuvveti belirlemek ile devam ettik. Bunun için 0.1, 0.2 ve 0.3 N'luk kuvvetler uygulanarak kuvvet-mesafe grafikleri elde edilmiştir.

3.2.14.4. Mukoadezyon Çalışmalarında Örneğin Farklı Temas Sürelerinin Değerlendirilmesi

Carbopol jel ile probun ucunda yapıştırılmış halde bulunan inek vajinal mukozasının temas süresi mukoadezyon parametrelerini doğrudan etkileyen bir parametredir. Biz çalışmamızda 60, 150 ve 300 saniye sürelerde çalıştık.

3.2.14.5. Etkin Madde İçeren ve İçermeyen Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyon Testleri

Deneyler daha önce belirlediğimiz koşullar altında yapıldı ve jeller probun dokunacağı yüzeye düzgün bir şekilde sürülerek gerçekleştirildi. CV içeren ve içermeyen jeller üzerinde yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kuvvet-mesafe grafikleri belirlendi.

Üzerinde çalışılan jeller aşağıda belirtilmiştir (Tablo 20).

Tablo 20. Mukoadezyon testleri yapılan jeller

KR	%2 Carbopol 974P içeren jel
K100M2	%2 HPMC K100M içeren jel
KITH3	%3 Kitosan H içeren jel
HPMC-POL	**%**20 poloksamer 407 ve %0.5 HPMC K100M içeren jel
CV-KR	%1 CV içeren Carbopol jel
CV-KITH3	%1 CV içeren Kitosan H jel
CV-HPMC	%1 CV içeren HPMC K100M jel
CV-HP407	%1 CV içeren HPMC POL jel

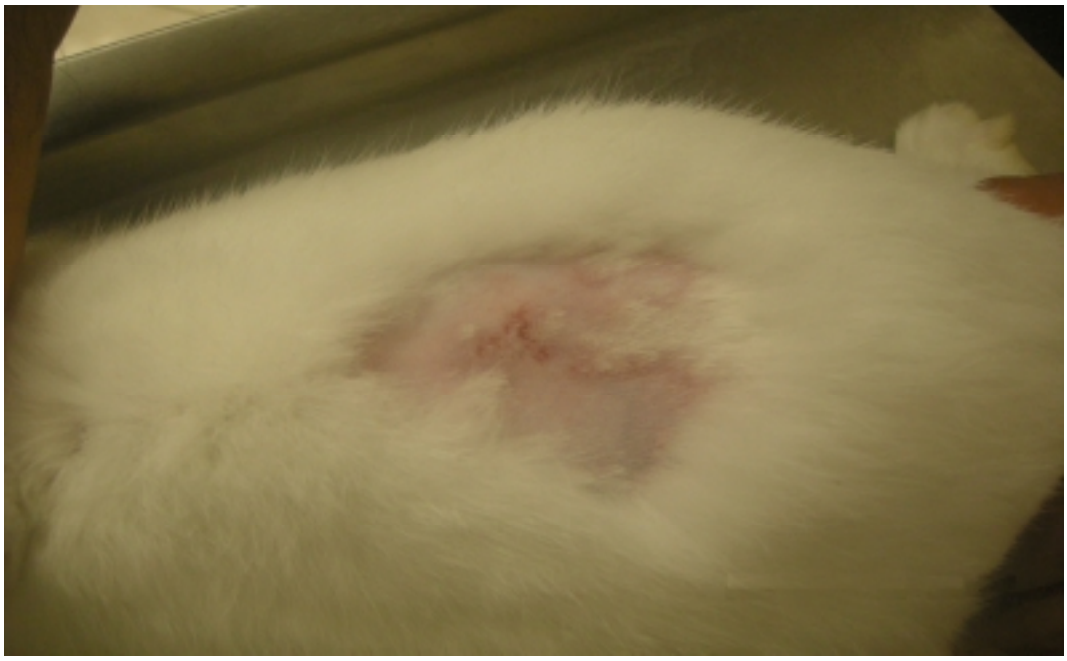
Ayrıca Bölüm 3.8.2'de ayrıntıları anlatılan ve Tablo 9'da formülasyon içerikleri verilen lipojellerin ve Bölüm 3.2.11'de anlatılıp Tablo 16'da da içerikleri belirtilen mikroküre içeren jellerin de mukoadezyon testleri yapılmıştır.

3.2.15. İn Vivo Çalışmalar

Tez çalışmamızda cidofovir ile hazırlanan ve in vitro çalışmalar sonucunda uygun olduğu belirlenen vajinal preparatların tavşanların genital bölgesindeki siğil veya lezyonlara lokal olarak uygulanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, tavşanlarda genital siğil oluşumuna neden olan virüsün (cottontail rabbit papillomavirus (CRPV)) temin edilmesinde zorluklar yaşandı. Gerek Amerika Birleşik Devletleri ve gerekse Avrupadan temin edilemedi. Daha sonra Fransa Pasteur Enstitüsünden CRPV genomunun ilk serisi temin edildi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'nda Doç.Dr. Gülendam Bozdayı tarafından aktif hale getirildi.

Bu işlem sırasında CRPV Plasmid transformasyonu ve konsantrasyon tayini yapıldı. Pasteur Enstitüsünden getirtilen plasmid (1µg/ml) $CaCl_2$ ile kompetent hale getirilmiş E.coli DH5α hücrelerine ısı şoku tekniği kullanılarak aktarıldı. Transforme bakterilerin seçimi için kanamisinli LB agara yayılarak 16 saat süreyle koloni oluşumu için beklenildi. Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden ortalama 12 adedi 2 mL sıvı besi yerine (Kanamisinli LB broth) alınarak 1 gece boyunca üretime terk edildi. Süre sonunda ticari plasmid izolasyon kiti kulanılarak (Genemark, Taiwan) bakterilerden plasmid izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen tüm plasmidler orijinal plazmid ile paralel olarak %0.8 agarozda yürütülerek karşılaştırıldı. Doğru klonlar tespit edildikten sonra bunlardan 2 tanesi yüksek hacimde üretilerek deneyde kullanılacak miktarda plasmid eldesi hedeflendi. Bu amaçla 500 mL LB broth (Kanamisin içeren) içine doğru klona ait bakteriler ekilerek 16 saat süreyle çalkalamalı inkubatörde kültüre alındı. Elde edilen nihai kültürden plasmid izolasyonu ticari bir kit (Maxiprep Plasmid Izolation, Sigma-Aldrich, USA) yardımıyla gerçekleştirildi. Bu kit ile yapılan izolasyon sonunda yaklaşık 3 mL hacimde DNA elde edildi. Kullanım miktarını tespit etmek için DNA konsantrasyonu picodrop (Picodrop Ltd, UK) ile ölçüldü.

Plazmid konsantrasyonunda belli seyreltmeler yapıldıktan sonra Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'inde 20 adet dişi Yeni Zelanda tavşanı sırtlarından virüs ile enfekte edilmişlerdir. Tavşanların sırtından enfekte edilmesinin amacı virüsün aktive olup olmadığının gözle test edilebilecek bir bölgede öncelikle denenmesidir. Bu işlem 6 hafta ara ile dört defa yapılmıştır. Tavşanların sırtı traş edildikten sonra tahriş edilmiş ve kızaran, kanamak üzere olan deriye virüs çözeltisi sürülmüştür (Resim 2). Siğil oluşması gözlenmemiştir. Bu nedenle hazırlanan formülasyonların etkinliklerinin hücre kültürü çalışmalarında tayin edilmesine karar verilmiştir. Hücre kültüründeki antiviral etkinlik tayini sığır herpes virüsü üzerinde yapılmıştır. CV, HPV ve HSV'ün oluşturduğu lezyonlarda etkili antiviral maddedir[162].



Resim 2. CRPV çözeltisi ile sırtından enfekte edilen tavşan resmi

Cidofovirin topik etkili jel formülasyonları ile yapılacak hayvan çalışmaları Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesine 9/11/2004 tarih ve 062-15520 sayılı karar ile, topik etkili biyoadezif vajinal tablet ve sc/intralezyonal uygulama için hazırlanan çözelti ile yapılan hayvan çalışmaları da 11/01/2005 tarih ve 05-405 sayılı karar ile uygun bulunmuştur.

3.2.16. Cidofovirin Sığır Herpes Virüsü Tip 1 (Bhv 1) Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Tayin Edilmesi İçin Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda CV ile hazırlanan biyoadezif vajinal formülasyonlardan in vivo çalışmaların sonunda vajinal uygulamada en başarılı olacağı düşünülen formülasyonun in vivo uygulaması için tavşanlarda siğil oluşturulmaya çalışılmıştır. İn vivo çalışmalarda temin edilen virüs ile tavşanlarda siğil oluşumu gözlenmemesi nedeniyle hazırladığımız CV içeren biyoadezif sistemlerin antiviral etkinliğinin, hücre kültürü çalışması ile kanıtlanması uygun görülmüştür.

Hücre kültürü çalışmalarına sığır herpes virüsü tip 1 (BHV 1) ile başlandı. Bu çalışma ile antiviral bir madde olan CV'in uygun taşıyıcı jel içinde BHV-1 üzerindeki antiviral etkinliğinin bulunması amaçlanmıştır.

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretimini ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen hücreler, vücut ısısında kültüre edilerek, vücudun normal fizyolojik durumunu taklit eden, besleyici sıvılarla (ortamlar) beslenerek in vitro sistemler olarak çoğaltılmaktadır[218].

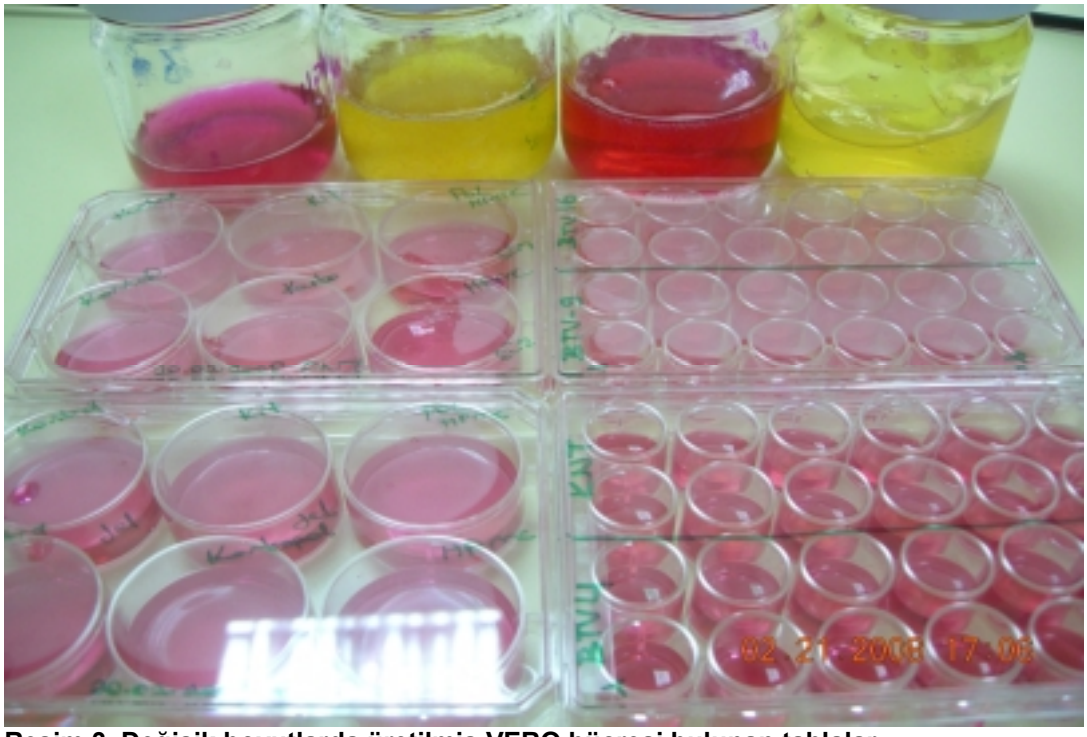
Öncelikle çalışmamızda hazırladığımız biyoadezif jellerin hücreler üzerinde toksik olup olmadığını anlamak için sitotoksisite deneyleri yapıldı. Bu deney için ISO 10993-5:1999'da tavsiye edilen VERO hücre hattı kullanıldı. Transformasyonla devamlılık karakteri kazandırılmış Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi orijinli olan VERO, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji ABD hücre koleksiyonundan temin edildi.

Hücre kültürü ile yapılan bütün çalışmalar Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.16.1. Hücrelerin İdamesi ve Subkültürü

Kültür ortamında kullanılmak üzere çözülen VERO hücrelerinin, kullanılacak düzeye çoğaltılmaları amacıyla, üretildikleri ortamdan daha büyük ve sayısal olarak daha çok ortama subkültürleri yapıldı. Bu amaçla kültür ortamındaki hücrenin üreme vasatı uzaklaştırılarak, hücre yüzeyi tripsin solüsyonu (Gibco, UK) ile birkaç kez yıkandı. Hücre yüzeyine tekrar aynı solüsyon ilave edilerek, hücrelerin flask zemininden ayrılması amacı ile 37°C'de 10 dakika beklendi. Zeminden ayrılan hücreler, hücre üretme vasatı olan %10 FDS (fötal dana serumu; Biochrom, Almanya) içeren DMEM (Dulbeco's Minimal Essential Medium; Brochrom, Almanya) içinde 200.000 hücre/mL olacak şekilde resüspanse edildikten sonra yeni kültür ortamına aktarılarak üremeleri amacıyla 37°C'lik %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı (Resim, 3).

Çalışmaların her aşaması, steril ünite içinde yapıldı. Çalıştığımız alanın sterilizasyonunda, ultraviole lambaları kullanıldı. Kullandığımız bütün solusyonların sterilite kontrolü, kanlı agar yöntemi ile yapıldı.



Resim 3. Değişik boyutlarda üretilmiş VERO hücresi bulunan tablalar

3.2.16.2. Dulbeco's Minimal Essential Medium (DMEM) İle Biyoadezif Jellerin Hazırlanması

Sitotoksisite çalışmalarında jellerin hücrelerin üzerine çözelti ve jel şeklinde uygulanmasına karar verildi. Bunun için öncelikle DMEM ile jel hazırlandı. Bu hazırlama şeklinde daha önce anlatılan jellerin hazırlanma tekniğinden hiç bir farkı yoktur sadece su veya tampon yerine DMEM kullanılmıştır. Carbopol, HPMC, Kitosan ve Poloksamer-HPMC karışımı ile DMEM ortamında daha önce kullanılan yöntemler ile jel hazırlandı (Resim 4).



Resim 4. DMEM kullanılarak hazırlanan jeller

3.2.16.3. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneyleri

DMEM ile hazırlanan biyoadezif jellerin olası sitotoksik etkilerini tesbit etmek amacı ile hazırlanan VERO hücre hattı üzerine jeller doğrudan uygulandı. Tek tabakalı VERO hücre hattının tam ortasına gelecek şekilde

4 faklı jel steril edildikten sonra enjektör yardımıyla hücre üzerine yerleştirildi.

DMEM ile hazırlanan jellerin doğrudan sitotoksisite testlerinde kullanılması amacıyla jeller steril petri kaplarına ince bir tabaka halinde yayıldı ve UV ışığı altında steril edildi. Örneklerin steril olup olmadığı, blood-base agar inokülasyonu ile gösterildi.

Hazırlanan tablalar 37°C'lik %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı ve sitotoksisite durumu başlangıçtan itibaren belli sürelerde izlendi. 48 saatin sonunda yaş/natif mikroskop muayenesi ile sitotoksisite durumu görüntülendi.

Hazırlanan jellerden bir miktar alınarak DMEM ile seyreltildi (1:10) ve homojen bir çözelti elde edilene kadar vortex ile karıştırıldı. Süzülerek steril hale getirildi ve sitotoksisite testlerinde kullanıldı.

Bu çalışmadan sonra elde edilen bulgular değerlendirildi ve uygulama şartlarını daha iyi taklit etmesi amacıyla jellerin VERO hücreleri üzerindeki sitotoksik karakterlerinin Agar Overlay Test Yöntemi ile de test edilmesine karar verildi.

3.2.16.4. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Agar Overlay Test Yöntemi ile Sitotoksisite Deneyleri

Test, ISO 7405:1997 ve ISO 10993-5:1999'da bildirilen yönteme göre yapıldı. Bu amaçla, 6 göz tablalarda %10 FDS içeren DMEM içinde 200000 hücre/mL olacak şekilde sulandırılan VERO hücrelerinden 5 ml hacimde konuldu. Hücrelerin çökmesi ve zemine tutunması için 30 dakika beklemeye bırakılan petri kutuları, süre sonunda 37°C'lik ve %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkubasyon sonucunda yapılan mikroskop kontrollerinde tek katlı (monolayer) hücre üremesi tespit edildi ve testte kullanıldı.

%2 oranında hazırlanarak otoklavda steril edilen hücre kültürü agarozu ve 2XDMEM'in sıcaklıkları su banyosu yardımı ile 42°C'ye ayarlandıktan sonra eşit hacimlerde karıştırıldı. Bu karışım, üzerindeki

vasatı tamamen aspire edilen VERO hücrelerinin üzerine 4 mL hacimde olacak şekilde yayıldı. Yarı katı vasat özelliğinde olan agarın, hücreler üzerinde donması için +4°C'de 20 dakika bekletildi. Daha sonra, her örnek için bir göz kullanılmak üzere, örnekler agarda perforasyon yapmadan yerleştirildi.

Örneklerin hazırlanması şu şekilde yapıldı: Hazırlanan jellerden bir miktar alınarak DMEM ile seyreltildi (1:10) ve homojen bir çözelti elde edilene kadar vortex ile karıştırıldı. Süzülerek steril hale getirildi ve sitotoksisite testlerinde kullanıldı.

Nemli ortamda ve %5 CO_2'li etüvde inkübe edilen sistem, hücresel toksisitenin izlenmesi için belli sürelerde mikroskobik ve makroskobik kontrollere tabii tutuldu. Tets sonunda o ana kadar gelişen toksisite bulgularının değerlendirilmesi amacı ile % 0.75 kristal viyole (Merck, Almanya) çözeltisi ile boyama işlemine tabii tutuldu.

3.2.16.4.1. Boyama ve Mikroskobik Değerlendirme

Agar overlay tekniği uygulanan sistemde hücresel düzeyde gelişen toksisitenin morfolojik özelliklerinin tespiti amacı ile kullanılan hücreler boyandı. Bu amaçla, hücreler üzerindeki gerek agar tabakası ve gerekse biyoadezif jel yapısındaki örnekler uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler %10 formaldehit içinde bir gece süreyle oda sıcaklığında fikse edildi. Yüzeyleri distile su ile bir kaç kez yıkandıktan sonra fikse olan hücreler, %0.75 (a/h) Kristal Viyole (Merck, Almanya) ile 20 dakika süreyle boyandı. Boya fazlasının distile su ile uzaklaştırılmasını takiben hücre kültürü mikroskobunda (Eclipse 150, Nikon, Japan) incelenerek hücre bazında toksisite belirtileri arandı.

3.2.16.5. Cidofovirin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneyleri

Etkin madde olarak antiviral etkinliğini inceleyeceğimiz CV'in hücrelere sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile VERO hücrelerinin üretildiği 24 göz tablada %1 konsantrasyondan başlamak suretiyle 10^{-6}'ya

kadar seyreltme yapıldı. Cidofovir DMEM'de %1 oranında çözüldü ve 0.2 µm membran filtreden süzülerek kullanıldı. İnokulasyon sonrası 48 saatin sonunda sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için %0.75 kristal viyole çözeltisi ile boyama işlemine tabii tutuldu, işlem bölüm 3.2.14.4.1'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.16.6. Cidofovirin Antiviral Aktivite Tayini

3.2.16.6.1. Çalışmada Kullanılan Virüs

Çalışmamızda HSV'ye benzer olarak kabul edilen sığır herpes virüs Tip1 (BHV-1) kullanılmıştır. Söz konusu virüs özellikle laboratuvar uygulamaları sırasında nozokomiyal (hastane enfeksiyonları) enfeksiyonların önüne geçmek amacıyla tercih edildi.

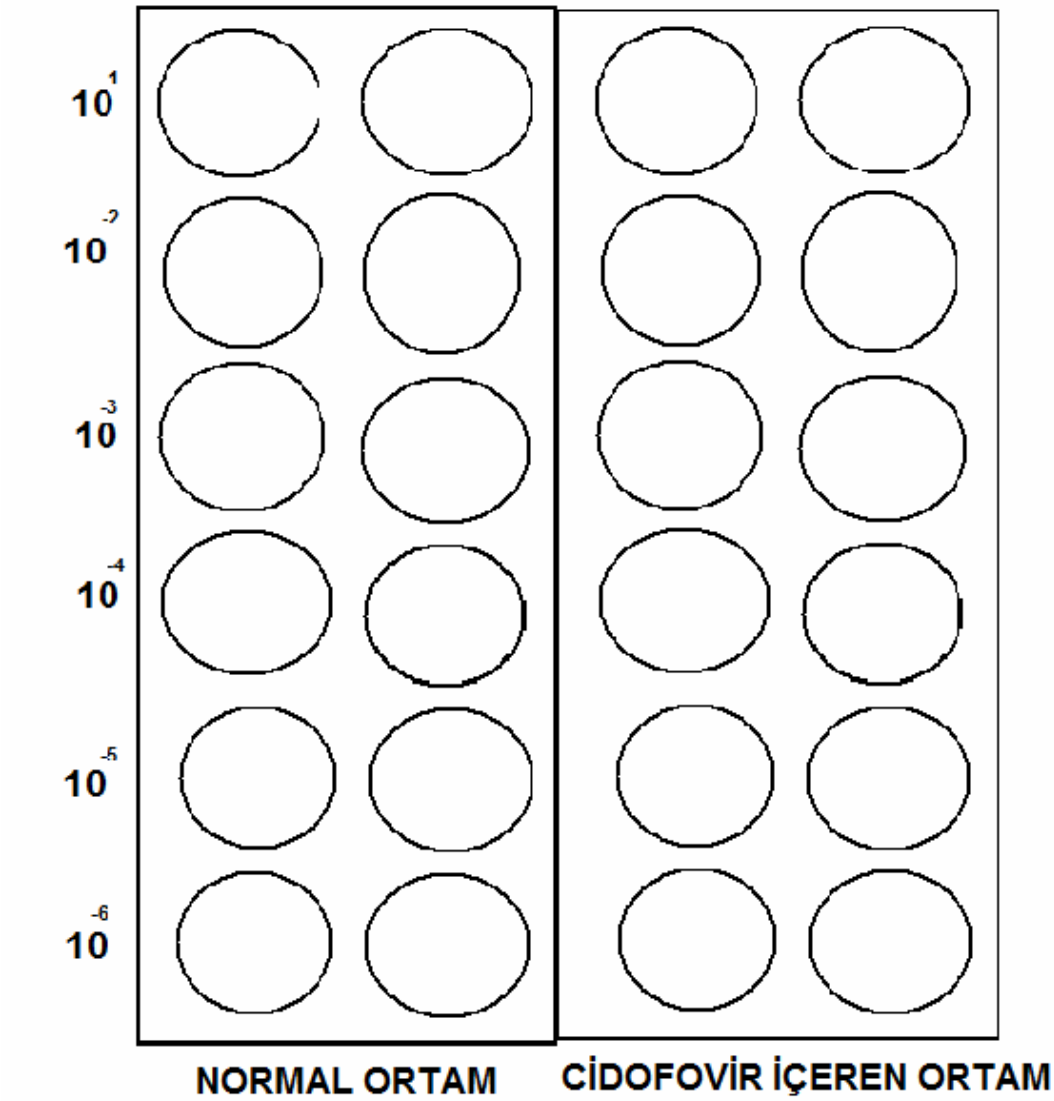
3.2.16.6.2. Antiviral Aktivite Tayini

BHV-1 DMEM içinde 10 katlı olacak şekilde (1 mL virus + 9 mL DMEM) 6 basamak sulandırıldı ve 24 saat öncesinde 24 kuyucuklu tablalarda kültüre edilen VERO hücre hatları üzerine inokule edildi. İnokulasyon rejimi her sulandırma basamağında 4 adet tabla kuyucuğuna 0.2 mL olacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 14).

1 saat süreyle 37°C'de inkube edilen hücrelere viral partiküllerin adsorbsiyonu sağlandı. Süre sonunda tabla gözlerine, verdikleri virüs sulandırmalar dökülmeksizin özel olarak hazırlanan yaklaşık 1.5 mL hacimde ilave edildi. Visköz ortamlar aşağıdaki şekilde hazırlandı.

NORMAL ORTAM	CV İÇEREN ORTAM
DMEM	DMEM
%1.6 (w/v) CMC	%1.6 (w/v) HPMC
	10^{-3} Cidofovir konsantrasyonu

Bu ortamların test sistemine uygulanması Şekil 15'de gösterildiği gibi olmuştur.



Şekil 15. Tablalarda virüs sulandırma basamakları

3.3. YÖNTEM (Oksibütinine ait yöntem)

Çalışmamızın ikinci bölümünde oksibütinin (OXB) ile yapılan çalışmalara yer verilmiştir. Sistemik etkili olan OXB ile lokal etkili olan CV etkin maddeleri üzerinde aynı fizikokimyasal incelemeler yapılmış ve aynı yöntemler kullanılarak biyoadezif vajinal formülasyonlar hazırlanmıştır.

OXB ile yapılan çalışmalar, bu bölümde anlatılacak ve CV ile ortak olan kısımlar o bölüme atıf yapılarak belirtilecektir.

3.3.1. In Vitro Çalışmalar

3.3.1.1. Oksibütinin Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

3.3.1.1.1.Etkin Maddelerin Erime Noktası Tayini

Oksibütininin erime noktası tayini Elektrotermal 9200 aleti ile bölüm 3.2.1.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3.1.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi

Partikül büyüklüğünü belirlemek için Laser-Diffraction Particle Sizer kullanıldı ve ölçüm bölüm 3.2.1.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Oksibütinin ölçümü için küvet sistemi kullanıldı ve dispersiyon ortamı olarak pH 7 fosfat tamponu seçildi.

3.3.1.1.3. IR Spektrumu

Oksibütininin FT-IR spektrumu bölüm 3.2.1.2.3'de anlatıldığı gibi alındı.

3.3.1.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

OXB'in tek başına ve polimer karışımları ile DSC termogramları bölüm 3.2.1.2.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.3.1.1.5. UV Spektrumu

Oksibütininin analiz yöntemine ait literatür taraması yapıldı. Varma[219] ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada UV spektrofotometresinde bir yöntem geliştirildiği ve valide edildiği görülmüştür. Bu yönteme göre, 15 mL oksibütinin içeren örnek üzerine 5 mL pikrik asit çözeltisi ve 10 mL kloroform ilave edilmiş ve mekanik karıştırıcıda 2 dakika 50 devir/dak'da karıştırılmıştır. Pikrik asit çözeltisinin hazırlanışı: 100mg pikrik asit, 14.5 mg anhidr sodyum asetat, 20 ml glasiyal asetik asit, 480 ml demineralize su içerisinde çözülmüştür. Kloroform tabakası ayrılmış ve UV spektrofotometresinde 200-500 nm arasında tarama yapılmıştır. Literatürdeki verilere göre 344 nm de maksimum absorbans elde edilmiştir.

Biz de çalışmamızda aynı yöntemi denedik. Spektrofotometrede (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu) aldığımız sonuçlara göre oksibütininin maksimum absorbans verdiği dalga boyu saptanamadı. 208 ve 240 nm'lerde pikler elde edildi, ancak oksibütinine ait olup olmadığından emin olunamadı. Yöntem valide edilemedi ve çalışmalara HPLC ile devam edilmesine karar verildi.

3.3.1.1.6. Oksibütininin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayin Yöntemi, Standart Doğrunun Hazırlanması ve Validasyon

3.3.1.1.6.1. Oksibütininin HPLC ile Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

İn-vitro çalışmalarda spektrofotometrik yöntem yerine daha hassas bir HPLC yönteminin kullanılmasına ihtiyaç duyuldu. Yöntemin yapılacak çok sayıda deney ve çalışma göz önüne alındığında ekstraksiyon içermeyen bir yöntem olması, maliyet ve zaman açısından özellikle istendi. Bu nedenle oksibütininin HPLC ile miktar tayini için öncelikle literatür taraması yapıldı ve dört farklı yöntem denendi.

Bunlardan ilki Wolfson[220] ve arkadaşlarının kullandığı yöntemdi. İn vitro çalışmalarda örnek sayısı fazla olacağı için oksibütinin pikinin alıkonulma zamanı kısa olan yöntem olduğu için denendi.

Yöntemin detayları:

Kolon: Lichrosorb C18 (reverse phase), 5 µm, 150 mmx4.6 mm

Mobil faz: (65:35) Asetonitril: %0.1 (a/h) ortofosforik asit (pH 2,5)

Akış debisi: 1.6 ml / dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Bastırma (attenuation): 2

Eşik seviyesi (threshold): 2

Dalga boyu: 220 nm

Oksibütinin pikinin alıkonma zamanı: ~ 1.1 dakika

Chsp: 0.5

Pk wide: 0.04

Literatürdeki bilgiye göre oksibütinine ait pik 1.71. dakikada çıkmalıdır. Bizim çalışmamızda 0.9-1.1. dakikada bir pik bulundu, ancak oksibütinine ait olup olmadığı anlaşılamadı. Değişen konsantrasyonlarda oksibütinin hazırlandığında pik hep aynı kaldı. 40 dakika beklendi ve başka pik elde edilemediği için bu yöntem başarısız kabul edildi.

Daha sonra Varma[219] ve arkadaşlarının yaptığı yöntem denendi ancak oksibütinine ait pik tam olarak belirlenemedi.

Nicoli[221] ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise oksibütinine ait pikin yüksekliği oksibütininin konsantrasyonu değiştiğinde belirgin bir değişikliğe uğramadı.

Son olarak Massoud[222] ve arkadaşlarının kullandığı yöntemi denedik. Bu yöntem Nicoli ve arkadaşlarının kullandığı yönteme benzemektedir, ancak dalga boyu ve akış debisi farklıdır.

Yöntemin detayları:

Kolon: Lichrosorb C18 (reverse phase), 5 µm, 150 mmx4.6 mm

Mobil faz: Asetonitril : Su : 1M Amonyum asetat (85:13:2)(pH'sı asetik asit ile 7'ye ayarladı.)

Akış debisi: 0.5 ml / dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Bastırma (attenuation): 2

Eşik seviyesi (threshold): 2

Dalga boyu: 235 nm

Oksibütinin pikinin alıkonma zamanı: ~ 15-16 dakika

Chsp: 0.5

Pk wide: 0.04

Bu yöntem ile oksibütinin piki 15-16. dakikalarda belirgin olarak elde edilmiştir. Konsantrasyon değişimine karşı pik yüksekliği duyarlıdır. Öncelikle mobil faz enjekte edildi sonra mobil fazda oksibütinin belli konsantrasyonlarda çözülerek enjekte edildi ve pikler karşılaştırıldı. Aynı işlemler % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponunda tekrarlandı, çünkü tampon piki çok yoğun bir şekilde çıkıyordu, bu yoğunluğu azaltmak için tampon % 4 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.3.1.1.6.2. HPLC ile Oksibütininin %4'lük pH 4.5 Fosfat Tamponundaki Kalibrasyon Denkleminin Elde Edilmesi

Oksibütininin, % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponunda, çeşitli derişimlerde çözeltileri hazırlanarak HPLC'ye enjekte edildi ve dedektör cevapları elde edildi, derişime karşı pik yüksekliği regresyona tabi tutuldu. Sonuçta doğru denklemi elde edildi.

3.3.1.1.6.3. HPLC ile Oksibütininin %4'lük pH 4.5 Fosfat Tamponundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu

3.3.1.1.6.3.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery)

Bölüm 3.2.1.3.2.1'de anlatılan spektrofotometrik yöntemin validasyonu gibi yapılmıştır. Kalibrasyon denkleminde, bulunan piklerin yüksekliği yerine konularak konsantrasyonları hesaplandı. Geri elde edilen miktar hesaplandı ve gerekli istatiksel hesaplar yapıldı.

3.3.1.1.6.3.2. Kesinlik

Deneyiçi Kesinlik: Oksibütininin % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponunda 8 µg/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden ard arda 10 enjeksiyon yapıldı, elde edilen pik yüksekliklerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, aritmetik ortalamanın standart hatası ve bağıl sapma hesaplandı. Bağıl sapmanın % 2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

Deneylerarası Kesinlik: Oksibütininin % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponunda 8 µg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC'de birbirini takip eden 3 gün içinde 3 kez ölçüldü. Elde dilen pik yüksekliklerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart hatası ve bağıl sapması hesaplandı.

3.3.1.1.6.3.3. Özgünlük, Seçicilik

Bölüm 3.2.1.3.2.3.'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3.1.1.6.3.4. Doğrusallık

Bölüm 3.2.1.3.2.4'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3.1.1.6.3.5. Duyarlılık

Bu değer pratikte elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimidir. Kalibrasyon doğrusunun eğiminden hesaplandı.

3.3.1.1.6.3.6. Saptama Sınırı

Analizlerde elde edilen piklerdeki gürültü sinyalinin 5 katına karşılık gelen konsantrasyondur.

3.3.1.1.6.3.7. Duyarlılık Sınırı

Analizlerde elde edilen piklerdeki gürültü sinyalinin 10 katına karşılık gelen konsantrasyondur.

3.3.1.1.6.3.8. Stabilite

Deney şartlarında oksibütininin stabilitesini incelemek amacı ile 16 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan örneklerin 24, 48 ve 72. saatlerde 235 nm de HPLC'deki pik yükseklikleri elde edildi.

3.3.1.2. Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon çalışmalarımızda amaç OXB etkin maddesi ile biyoadezif kontrollü salım yapan vajinal jel formülasyonları geliştirmek ve in vitro kontrolleri yapıldıktan sonra in vivo değerlendirilmesinin yapılmasıdır.

OXB'in vajinaya uygulanmak üzere çeşitli jel ve mikropartiküler formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar şöyle sıralanabilir:

1. Biyoadezif Jel Formülasyonları
2. Biyoadezif Lipozom-Jel Formülasyonları:
3. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları:

3.3.1.2.1. OXB-Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmaları

3.3.1.2.1.1. OXB-Kitosan Jel Formülasyon Çalışmaları

Kitozan-jel formülasyonu hazırlanırken bölüm 3.2.4'de anlatılan çalışmalar yapıldı.

Öncelikle kitosan jel formülasyonunda kullanılan polimer ve glasiyel asetik asit oranlarının belirlendiği çalışma yapıldı. Farmasötik karakterleri belirlenen jellerden vajinal uygulama için uygun olacağı düşünülen jeller OXB ile de hazırlandı. Bu amaçla % 1 OXB içeren kitosan-jel formülasyonları hazırlandı. OXB'li kitosan jel formülasyonunun bileşenleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. OXB-kitosan jel formülasyonunun bileşenleri

Oksibütinin-Kitosan Jel Formülasyonları	OXB (%)	GAA Oranı (%)	Kitosan H Derişimi (%)	Kitosan M Derişimi (%)	Kitosan L Derişimi (%)
OXB-KITH1	1	0.7	1	-	-
OXB-KITH2	1	0.7	2	-	-
OXB-KITH3	1	1	3	-	-
OXB-KITM1	1	0.5	-	1	-
OXB-KITM2	1	0.7	-	2	-
OXB-KITM3	1	1	-	3	-
OXB-KITL1	1	0.7	-	-	1
OXB-KITL2	1	1	-	-	2
OXB-KITL3	1	1			3

3.3.1.2.1.2. OXB-Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

OXB'in Carbopol ve polikarbofil ile jellerinin hazırlanması sırasında bazı problemler ile karşılaşıldı. Etkin madde ilavesi ile jel yapısının bozulduğu ve su gibi akıcı olduğu ve bulanık bir hal aldığı görülmüştür. Geçimsizlik nedeniyle bu grup jeller OXB ile hazırlanamamıştır.

3.3.1.2.1.3. OXB-HPMC Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

OXB içeren HPMC jellerin hazırlanması bölüm 3.2.4.3'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Yirmi gram olarak hazırlanan HPMC jel formülasyonlarının bileşenleri Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. OXB-HPMC jel formülasyonlarının bileşenleri

Jel Formülasyonları	HPMC K100M %	HPMC K15M %	Distile Su(g)	OXB (%)
OXB-HPMCK100M1	1	-	20	0.5
OXB-HPMCK100M2	2	-	20	0.5
OXB-HPMCK15M1	-	1	20	0.5
OXB-HPMCK15M2	-	2	20	0.5

3.3.1.2.1.4. OXB-Poloksamer Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

OXB içeren poloksamer jeller bölüm 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Poloksamer 407 kullanılarak hazırlanan OXB jel formülasyonlarının bileşenleri Tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 23. OXB-Poloksamer 407 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının bileşenleri

Formülasyon	Poloksamer 407 %	HPMC K100M%	OXB%
OXB-P407	20	-	0.1
OXB-MP407	20	0.2	0.1
OXB-HP407	20	0.5	0.1

3.3.1.2.1.5. Biyoadezif Jel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller

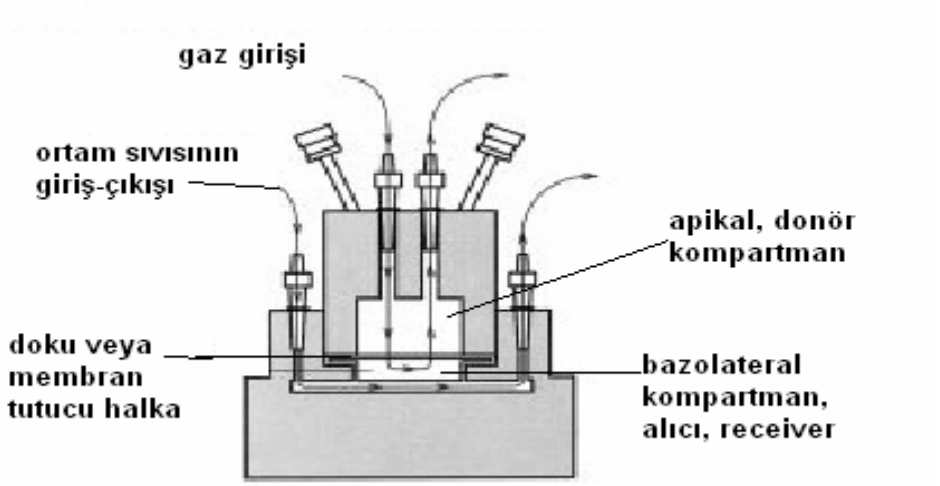
OXB içeren jellerde yapılan kontroller; fiziksel görünüş, akış özellikleri ve viskozite, pH, miktar tayini ve Franz difüzyon hücresinden geçiş çalışmaları bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Miktar tayini ve geçiş çalışmalarından alınan örneklerin analizi OXB için HPLC ile 235 nm'de yapıldı. Sonuçlar standart doğru denkleminde yerine konularak diyaliz membrandan geçen etkin madde miktarı hesaplandı.

3.3.1.2.1.6. Biyoadezif Jel Formülasyonlarının Stabilite Çalışması

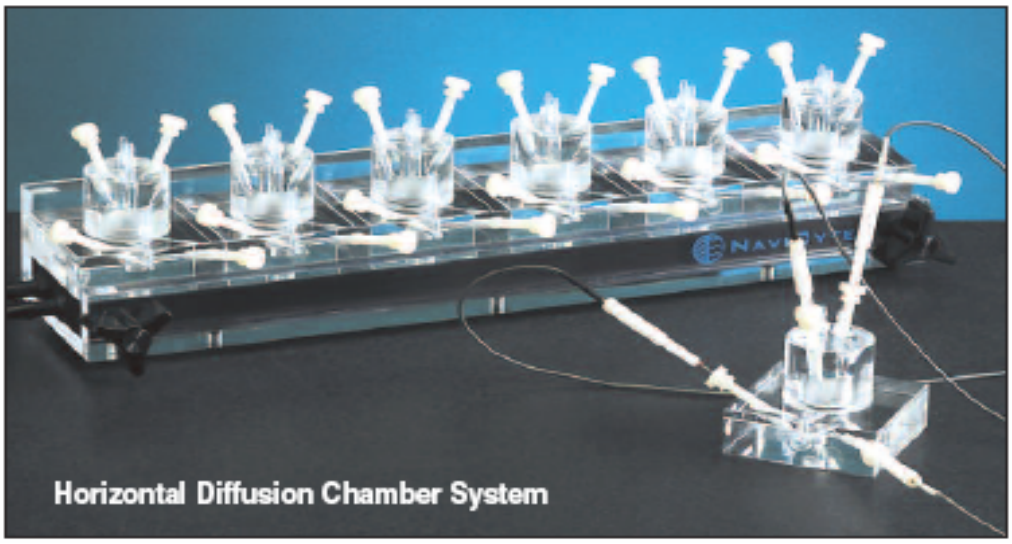
Sonuç formülasyon olarak seçilen jel formülasyonları üç ay süreyle 4°C/ortam nemi, 25°C/% 60 bağıl nem ve 40°C/% 75 bağıl nemde bekletilmiş ve görünüş, pH, viskozite ve miktar tayini gibi farmasötik karakterleri incelenerek stabilitesi değerlendirilmiştir.

3.3.1.2.1.7. Oksibütinin İçeren Jel Formülasyonların Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmaları

OXB formülasyonlarının tavşan vajinal mukozal dokusundan geçişlerinde Horizontal Difüzyon Ünitesi kullanıldı (Şekil 16). Şekilde apikal ve bazolateral kompartmanların arasına tavşan vajina mukozal dokusu yerleştirildi. Tavşanlar uygun anestesik karışımı ile (ketamin HCl ve ksilazine) öldürüldükten sonra vajinal dokuları çıkarıldı ve difüzyon çalışmasında kullanılmak üzere uygun şartlarda –20°C'de saklandı. Difüzyon sisteminin (Şekil 17) sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı.



Şekil 16. Horizontal difüzyon ünitesinde apikal ve bazolateral kompartmanlar



Şekil 17. Horizontal difüzyon ünitesi

Geçiş çalışmaları apikalden (donör) bazolateral (alıcı=receiver) kompartmana doğru yapıldı. Apikal kompartmana OXB içeren belli miktarda jel konuldu. Hücrelerin canlı kalması için % 95 O_2- % 5 CO_2 içeren karbojen gazı kullanıldı. Belli zamanlarda (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24, 36, 48. saatler) bazolateral kompartmandan 1 mL örnek alındı. Ortam hacmini sabit tutmak için bazolateral kompartmana her örnek alımından sonra 1 mL pH 4.5 fosfat tamponu ilave edildi. Örnekler HPLC ile analiz edildi ve elde edilen geçiş profillerinde kinetik değerlendirme yapıldı. Sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modelleri incelendi.

3.3.1.2.2. OXB-Lipozom Formülasyon Çalışmaları

OXB ile çalışmamız sırasında CV ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi iki farklı yöntem kullanılarak lipozomlar hazırlandı. Bunlardan birincisi film-hidrasyon yöntemi ikicisi de poliol dilüsyon yöntemidir.

OXB lipozomlarının hazırlanması bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Film yöntemi ile hazırlanan OXB-lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri Tablo 24'de gösterilmiştir.

Kullanılan kısaltmalar:

DPPC:Dipalmitoil fosfotidilkolin, **SA**: Stearilamin, **CHOL**: Kolesterol, **FM**:film yöntemi, **FT**: dondurup çözme, **OXB**: oksibütinin

Tablo 24. Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri

Kodu	OXB (Molar oran)	Lipit Bileşimi	Lipit Molar Bileşim	Hazırlama Yöntemi
F1	-	DPPC:CHOL	1:1	FM
OXB-F2	0.5	DPPC:CHOL	1:1	FM
OXB-FS1	0.5	DPPC:SA:CHOL	10:1:4	FM
OXB-FS2	0.5	DPPC:SA:CHOL	10:1:4	FM + FT

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların formülasyon kodları ve bileşenleri ise Tablo 25'de verilmiştir.

Kullanılan kısaltmalar:

DPPC:Dipalmitoil fosfotidilkolin, **DGPC**:Dipalmitoylglycerophosphocholine, **SA**: Stearilamin, **CHOL**: Kolesterol, **FT**: dondurup çözme, **PD**: poliol dilüsyon yöntemi, **OXB**: oksibütinin

Tablo 25. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri

Kodu	OXB (Molar Oran)	Bileşim	Lipit Molar Bileşim	Hazırlama Yöntemi
P1				
OXB-P2	0.5	DPPC:DGPC	9:1	PD
OXB-PS1	0.5	DPPC:SA	9:3	PD
OXB-PS2	0.5	DPPC:SA	9:3	PD + FT

3.3.1.2.2.1. Hazırlanan Lipozomların Karakterizasyonu

Hazırlanan OXB-lipozomların karakterize edilmesi amacıyla, partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, mikroskop/SEM görüntüsü ve lipozom içine hapsedilen etkin madde miktarları bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi incelendi.

3.3.1.2.2.2. Lipozomların Stabilite Çalışmaları

OXB'in film-hidrasyon ve poliol dilüsyon yöntemiyle hazırlanan lipozomlarının stabilitesini incelemek amacıyla farklı stabilite ortamlarında (4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde) belli zamanlarda örnek alınarak partikül büyüklüğü tayini, zeta potansiyel tayini ve etkin madde miktar tayini testleri daha önce anlatıldığı gibi yapıldı. 7, 14 21. 30. günlerde, 2. ve 3. aylarda lipozom formülasyonlarında ölçümler yapıldı.

3.3.1.2.3. OXB-Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonları

Etkin madde içeren lipozomların daha önce hazırlanan jeller içinde dağıtılmasıyla vajinal uygulamada uzun süreli salım sağlanacağı düşünülen lipozom içeren jel formülasyonları hazırlandı. Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmada OXB ile Tablo 26'da bileşenleri verilen lipojeller hazırlandı. Lipojeller hazırlanırken farmasötik karakterleri en uygun olan FS2 ve PS2 lipozomları jellerin içine ilave edilmiştir.

Kullanılan kısaltmalar:

KR: Carbopol 974P ile %2 oranında hazırlanan jel,

KITH3: Kitosan H ile hazırlanan %3 oranında jel

K100M: HPMC K100M CR ile %2 oranında hazırlanan jel,

P407: Poloksamer 407 ile %20 oranında hazırlanan jel,

0XB-FS2: Film yöntemi ve dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan OXB içeren lipozom formülasyonu,

OXB-PS2: Poliol dilüsyon yöntemi ve dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan OXB içeren lipozom formülasyonu

Tablo 26. Lipojel formülasyonlarının bileşenleri

Formülasyon Kodları	K2 (%) a/a	T2 (%) a/a	KS2 (%) a/a	TS2 (%) a/a	KITH3 (%) a/a	K100M (%) a/a	P407 (%) a/a
OXB-FS2-KITH3	-	-	10	-	90	-	-
OXB-FS2-K100M	-	-	10	-	-	90	-
OXB-FS2-P407	-	-	10	-	-	-	90
OXB-PS2-KITH3	-	-	-	10	90	-	-
OXB-PS2-K100M	-	-	-	10	-	90	-
OXB-PS2-P407	-	-	-	10	-	-	90

3.3.1.2.3.1. Biyoadezif Lipojel Formülasyonlarında Yapılan Kontroller

Jellerin diyaliz membrandan geçiş çalışması bölüm 3.2.5.5'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Ayrıca lipojellerin viskozite, akış özellikleri de bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi incelenmiştir.

3.3.1.2.4. OXB-Mikroküre Formülasyonları

Formülasyon çalışmalarımızın bu kısmında daha önce hazırladığımız biyoadezif vajinal jellerin içine konulmak üzere OXB içeren mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır. Böylece salımın daha kontrollü hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışma bölüm 3.2.9'da anlatıldığı gibi yapılmış ve özellikleri incelenmiştir.

5.1.2.4.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.9.1'de anlatılan şekilde hazırlanan ve ayrıntıları Tablo 10'da (sadece etkin madde değişmiştir) verilen OXB mikroküre lerinin bu yöntem ile hazırlanmasında başarı sağlanamadı. Çalışmanın devamında, deney koşulları Tablo 11'de verilen yöntem ile OXB mikroküresi hazırlanmaya çalışıldı. İlk denememizde karşılaştığımız sorunlar ile bu yöntemde de karşılaştık, yağ fazı tam olarak uzaklaştırılamadı ve partiküller birbirinden ayrılıp küresel bir şekilde elde edilemedi.

3.3.1.2.4.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Çalışma bölüm 3.2.9.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. OXB-T1 kitosan mikrokürelerinin formülasyonlarının ayrıntıları Tablo 12'de verilmiştir.

3.3.1.2.4.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyonu Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.9.3'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda hazırlanan OXB-K1 formülasyonunun ayrıntıları Tablo 13'de anlatılmıştır.

3.3.1.2.4.4.Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.9.4'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmanın sonucunda Tablo 27'de ayrıntıları verilen OXB-mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır. OXB konsantrasyonu % 1 olarak kullanılmıştır.

Tablo 27. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri

FORMÜLASYON KODU	Kitosan Konsantrasyonu (%)	Na_2SO_4 Konsantrasyonu (mM)	Süre (s)	Mikroküre oluşup oluşmama durumu
OXB-AS1	1	50	45	Oluştu
OXB-AS2	1	50	60	Oluştu
OXB-AS3	1	100	45	Oluştu
OXB-AS4	1	100	60	Oluştu
OXB-AS5	2	50	45	Oluşmadı
OXB-AS6	2	50	60	Oluşmadı
OXB-AS7	2	100	45	Oluştu
OXB-AS8	2	100	60	Oluştu

3.3.1.2.4.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.9.5'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmanın sonunda Tablo 28'de içerikleri verilen formülasyonlar hazırlanmıştır. OXB konsantrasyonu %1'dir.

Tablo 28. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve içerikleri

FORMÜLASYON KODU	Kitosan (%) Konsantrasyonu	Na2SO4 (mL)	Süre (dak)	Mikroküre oluşup oluşmama durumu
OXB-BT1	0.25	2	10	Oluştu
OXB-BT2	0.25	2	20	Oluştu
OXB-BT3	0.25	4	10	Oluştu
OXB-BT4	0.25	4	20	Oluştu
OXB-BT5	0.50	2	10	Oluşmadı
OXB-BT6	0.50	2	20	Oluşmadı
OXB-BT7	0.50	4	10	Oluştu
OXB-BT8	0.50	4	20	Oluştu

3.3.1.2.4.6. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu

Bölüm 3.2.10'da ayrıntıları verilen mikroküre karakterizasyonlarından aşağıda belirtilen özellikleri incelenmiştir.

- Etkin madde miktar tayini ve işlem etkinliği
- Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli
- Franz difüzyon hücresinden geçiş

3.3.1.2.5. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonları

Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinden OXB-T1 ve OXB-K1 katı halde OXB-AS4 ve OXB-BT4 ise süspansiyon halinde daha önce hazırlanan jeller içinde dağıtılmıştır. Böylece vajinal uygulamada uzun süreli salım sağlanacağı düşünülen mikroküre içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır (Tablo 29). Bu sayede mikrokürelerin jel bir taşıyıcı içinde vajinaya uygulanabilirliği de sağlanmış oldu.

Kullanılan kısaltmalar:

KR: Carbopol 974P ile %2 oranında hazırlanan jel
KITH3: Kitosan H ile hazırlanan %3 oranında jel
K100M: HPMC K100M CR ile %2 oranında hazırlanan jel
P407: Poloksamer 407 ile %20 oranında hazırlanan jel
OXB-T1: İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan OXB içeren kitosan mikroküreleri.
OXB-K1: İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan ve OXB içeren kitosan mikroküreleri.
OXB-AS4: Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan ve OXB içeren kitosan mikroküreleri.
OXB-BT4: Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan ve OXB içeren kitosan mikroküreleri.

Tablo 29. Biyoadezif mikroküre-jel formülasyonlarının kodları (1:10 a/a karışım)

Formülasyon Kodları	T1 (%) a/a	K1 (%) a/a	AS4 (%) a/a	BT4 (%) a/a	KT (%) a/a	K100M (%) a/a	P407 (%) a/a
OXB-T1-KITH3	1	-	-	-	10	-	-
OXB-T1-K100M	1	-	-	-	-	10	-
OXB-T1-P407	1	-	-	-	-	-	10
OXB-K1-KITH3	-	1	-	-	10	-	-
OXB-K1-K100M	-	1	-	-	-	10	-
OXB-K1-P407	-	1	-	-	-	-	10
OXB-AS4-KITH3	-	-	1	-	10	-	-
OXB-AS4-K100M	-	-	1	-	-	10	-
OXB-AS4-P407	-	-	1	-	-	-	10
OXB-BT4-KITH3	-	-	-	1	10	-	-
OXB-BT4-K100M	-	-	-	1	-	10	-
OXB-BT4-P407	-	-	-	1	-	-	10

3.3.1.2.5.1. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Farmasötik Kontrolleri

Hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarının kontrolleri (pH, viskozite, akış özellikleri, fiziksel görünüş ve diyaliz mebrandan salım) bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi incelenmiştir.

3.3.1.3. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik olarak Değerlendirilmesi

Hazırlanan OXB içeren formülasyonlardan diyaliz membrandan geçiş çalışması sonucunda elde edilen geçiş profilleri, kinetik açıdan sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetikleri uygulanarak incelendi.

3.3.1.4. Oksibütinin İçeren Biyoadezif Formülasyonlarda Texture Profil Analizi ve Mukoadezyon Çalışmaları

Çalışmalar bölüm 3.2.12 ve 3.2.13'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Tablo 34'da belirtilen OXB formülasyonlarının ölçümleri yapılmıştır.

Ayrıca Bölüm 5.1.2.3'de ayrıntıları anlatılan ve Tablo 26'da formülasyon içerikleri verilen lipojeller ile Bölüm 5.1.2.5'de anlatılan Tablo 30'da de içerikleri belirtilen mikroküre içeren jellerin de TPA testleri yapılmıştır.

Tablo 30. TPA ve Mukoadezyon testleri yapılan OXB içeren jeller

OXB-KITH3	%1 OXB içeren Kitosan H (%3) jel
OXB-K100M2	%1 OXB içeren HPMC K100M (%2) jel
OXB-HP407	%1 OXB içeren HPMC POL (%0.5-%20) jel

3.3.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR

Oksibütininin ile yapılacak hayvan çalışmaları Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesine G.Ü.ET-04.032 kod numarası ve 061-15519 sayılı karar ile uygun bulunmuştur.

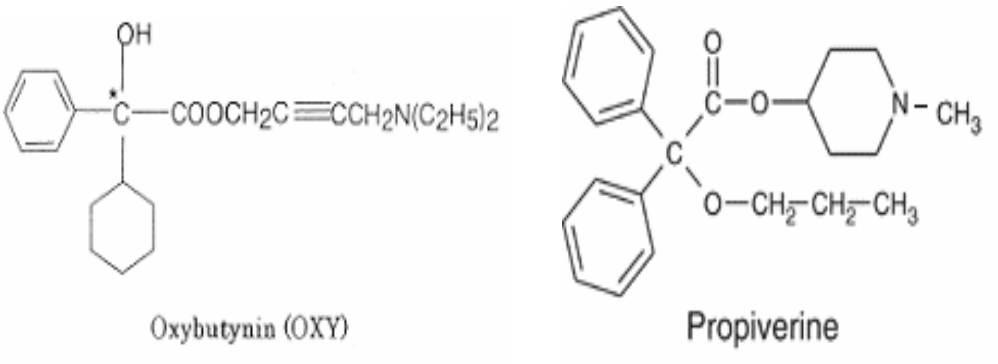
3.3.2.1. Oksibütininin Tavşan Serumdan HPLC Yöntemi ile Analizi

3.3.2.1.1. Örnek Hazırlama ve Kullanılan Yöntem

Oksibütininin tavşan serumdan HPLC yöntemi ile analizi için önce literatür taraması yapıldı. Moassoud[223] ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve insan idrar torbasından ekstraksiyon uygulanarak oksibütinin analizinin yapıldığı yöntemde başarılı olundu.

Mobil faz: %85 asetonitril, %13 su, %2 1M amonyum asetat (pH asetik asit ile 7'ye ayarlandı).

Serumdan analiz için Propiverine HCL (PVP) ve Cetrinizine internal standart olarak denendi. En uygun PVP bulundu. PVP ile kalibrasyon yapıldı. OXB'nin ve PVP'nin kimyasal yapıları Şekil 18'de verilmiştir.

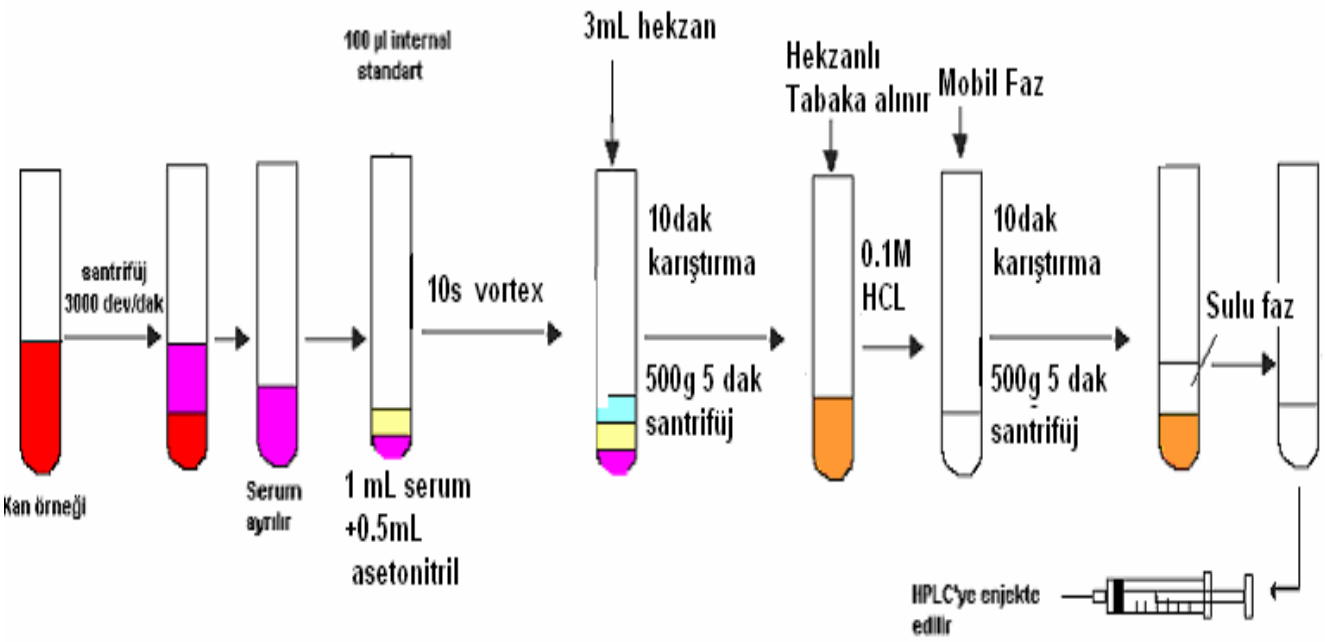


Şekil 18. Oksibütinin ve Propiverine ait kimyasal yapılar

Ekstraksiyon Yöntemi: 1 mL serum üzerine 0.5 mL asetonitril ilave edildi ve 10 saniye vorteksde karıştırıldı. Bu karışımın(1.5 mL) üzerine 3 mL n-

Hekzan ilave edildi ve horizontal karıştırma ile 10 dakika karıştırıldı. 500 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hekzanlı tabaka alındı. Bu tabakanın her mL'sine 0.12 mL 0.1M HCL ilave edildi ve 10 dakika daha yavaş bir şekilde horizontal karıştırma yapıldı. Karışım tekrar 500 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sulu tabaka ayrıldı ve mobil faz ile seyreltilerek analizi yapıldı.

Eğer hemen analiz yapılamayacaksa örnek –20 C°'de saklandı. Şekil 19'da örnek hazırlama yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 19. İn vivo çalışmada kan örneğinden ekstraksiyon ile örnek hazırlama yöntemi

Kullanılan HPLC koşulları

Kolon: Waters Spherisorb, 5 µm, ODS2, 250 mmx 4.6 cm

Mobil faz: %85 asetonitril, %13 su, %2 1M amonyum asetat (pH asetik asit ile 7'ye ayarlandı).

Akış debisi: 1 ml / dk

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Bastırma (attenuation): 2

Eşik seviyesi (threshold): 2

Dalga boyu: 235 nm

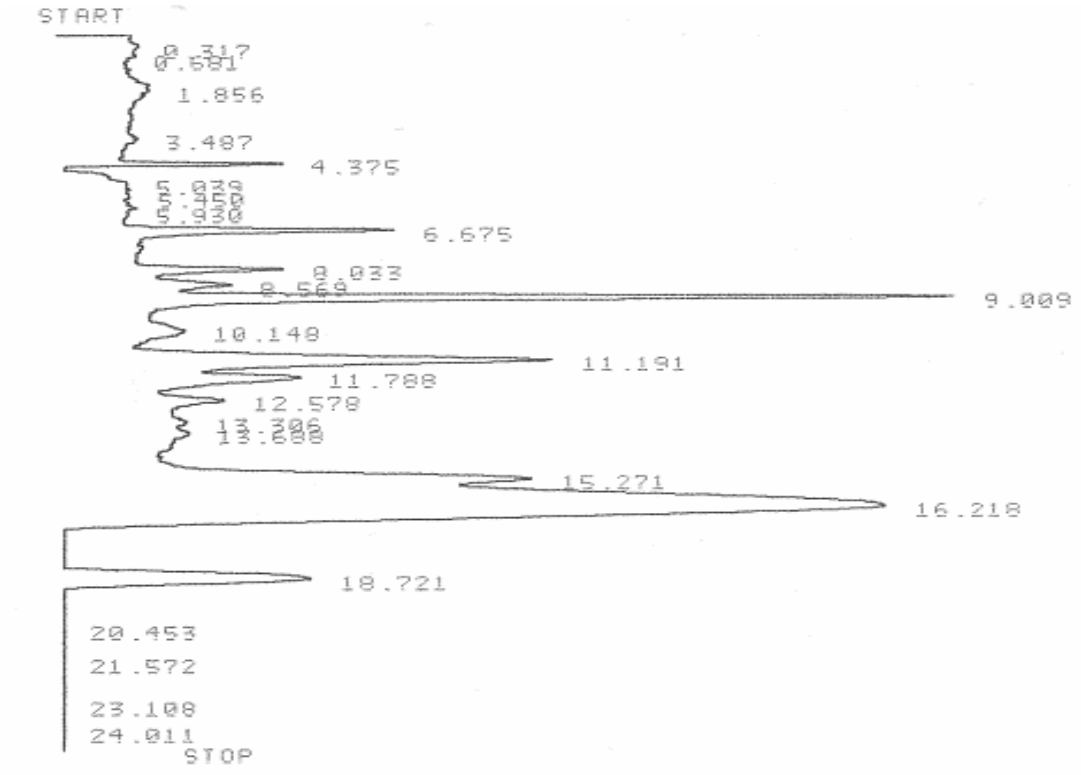
Oksibütinin pikinin alıkonma zamanı: ~14-15 dakika

Propiverin pikinin alıkonma zamanı: ~4-5 dakika

Chsp: 0.5

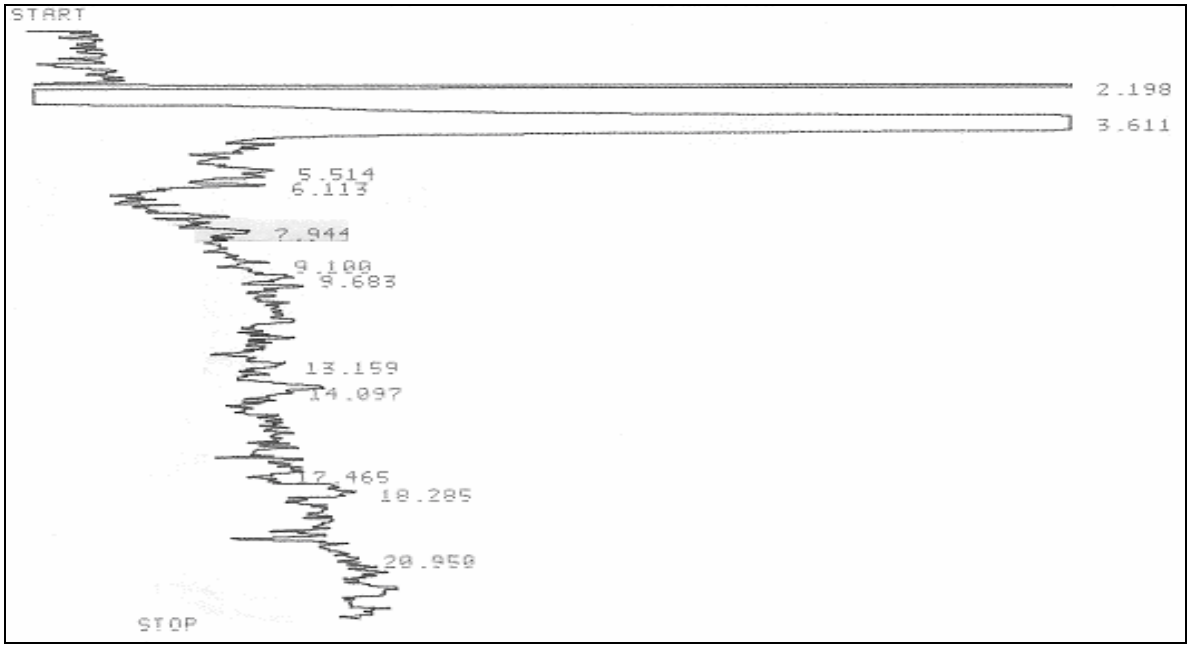
Pk wide: 0.5

Ekstraksiyon uygulamadan önce tavşan serumu HPLC'ye enjekte edildiğinde Şekil 20'deki kromatogram elde edildi. Ekstraksiyon uygulandıktan sonra etkin madde içermeyen serumun HPLC'de yukarda anlatılan yöntem uygulanarak elde edilen kromatogramı Şekil 21'de gösterilmiştir. Daha sonra OXB içeren seruma aynı işlem uygulandı ve OXB piki ~14. dakika civarında saptandı (Şekil 22). İnternal standart olarak seçilen propiverinin piki ise ekstraksiyon sonunda 5. dakikada elde edildi (Şekil 23). İnternal standart ve etkin maddenin birlikte, serumdan ektraksiyon sonucunda kromotogramı da başarı ile elde edildi (Şekil 24) ve kalibrasyon çalışmasına geçildi.



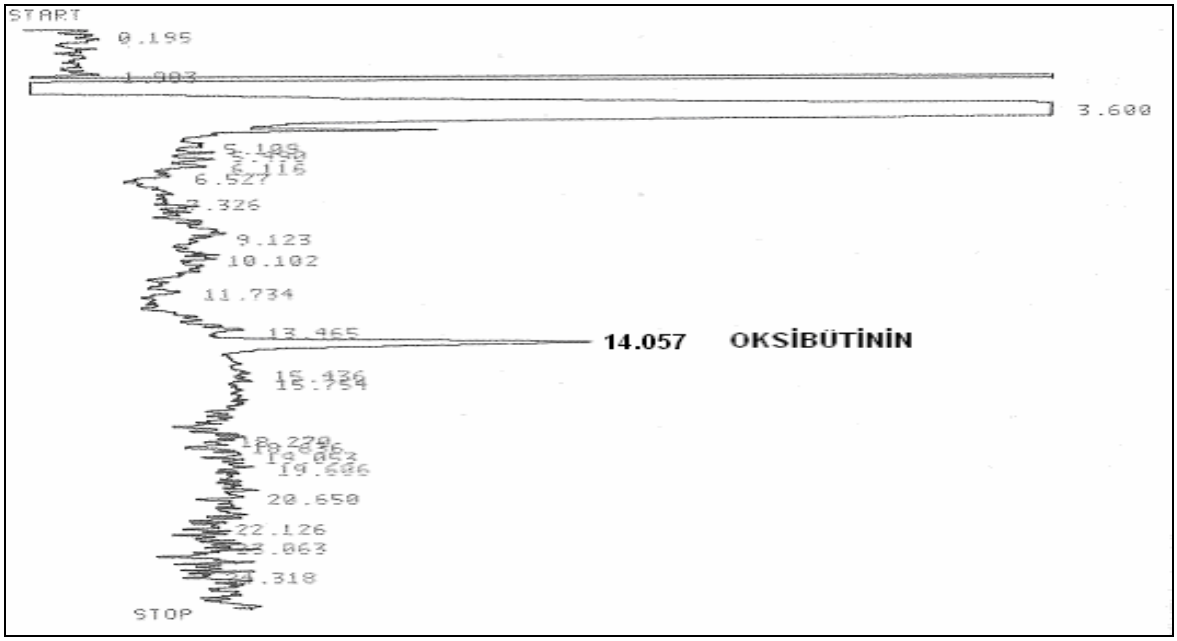
Şekil 20. Ekstraksiyon işleminden önce tavşan serumunun kromotogramı

Kromotogramda çok fazla pik olduğu için etkin maddeye ait olan pik anlaşılamamış ve ekstraksiyon işleminin yapılmasına karar verilmiştir.

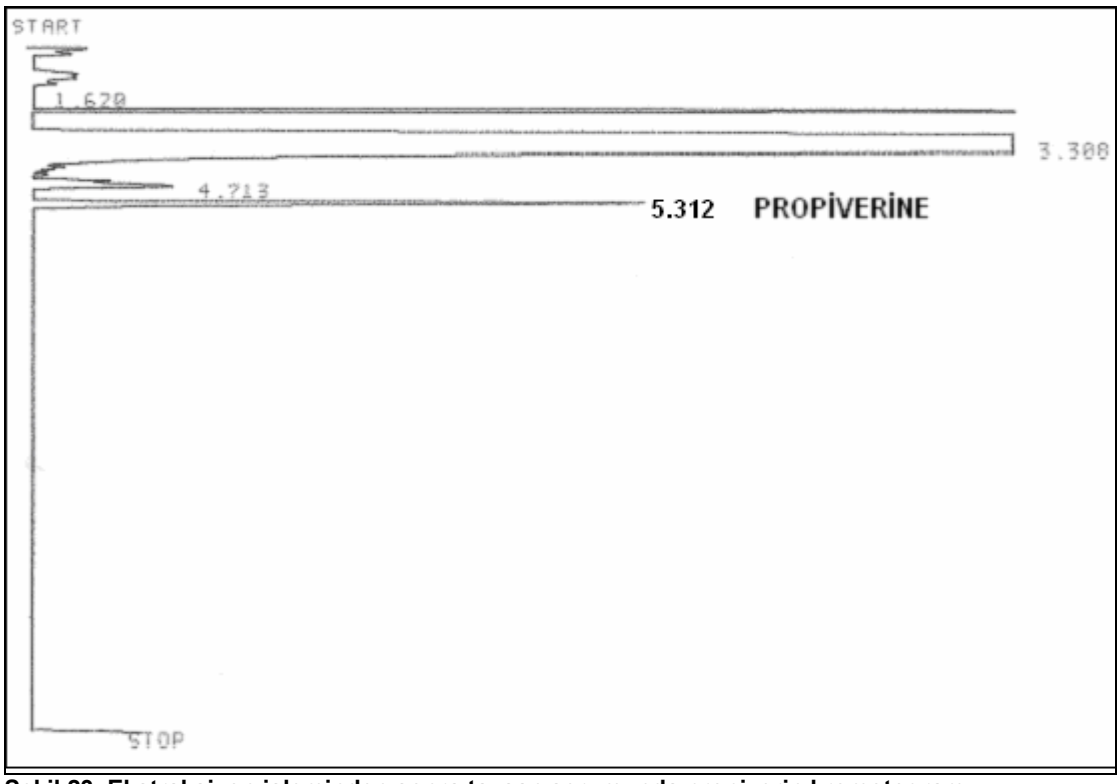


Şekil 21. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunun kromotogramı

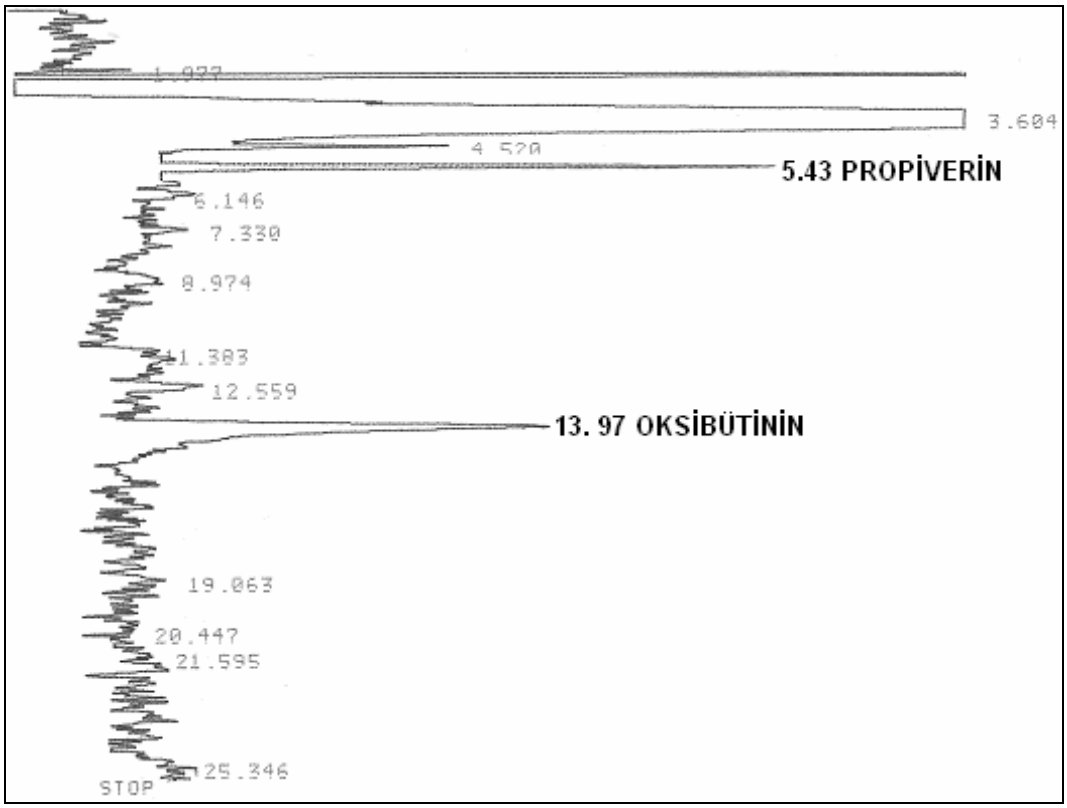
Ekstraksiyon işleminden sonra seruma ait pik sayısı azaltılmıştır. HPLC'de çalışılırken zaman ilerledikçe kolonun mobil faza daha çok şartlandığı ve base line'nın daha düzgün çıktığı gözlenmiştir.



Şekil 22. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumda OXB kromotogramı



Şekil 23. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunda propiverin kromotogramı



Şekil 24. Ekstraksiyon işleminden sonra tavşan serumunda propiverin ve oksibütinin kromotogramı

3.3.2.1.2. HPLC Yöntemi Kullanılarak Oksibütininin Tavşan Serumunda Standart Doğru Denkleminin Hazırlanması

Standart doğru denklemi hazırlanırken, oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponunda, 100 µg/ml konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler serum ile seyreltilerek hazırlanmış ve daha sonra örnek hazırlama prosedürüne göre HPLC'de analiz edilmiş, derişimlere karşılık gelen pikler elde edilmişti. Bu piklerin yükseklikleri ile OXB/internal standart derişim oranına doğrusal regresyon uygulanıp, gerekli hesaplamalar yapılarak standart doğru denklemi elde edilmiştir.

3.3.2.1.3. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu

3.3.2.1.3.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery)

Geri elde çalışmaları etkin madde miktarının %80'ini, %100'ünü ve %120'sini kapsayan miktarlarda üç ayrı tavşan serumundan yapıldı.

OXB'nin boş serum ile 20 ng/ml konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı ve % 100 kabul edildi. 16 ve 24 ng/ml konsantrasyonda OXB içeren serumlar da hazırlanarak ekstraksiyon işlemi uygulandı. Daha sonra bu örneklerin HPLC ile analizleri yapılarak elde edilen piklerin yükseklikleri bulundu. Buradan geri elde edilen miktarlar hesaplandı ve standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven sınırları hesaplandı.

$$\text{Geri Elde (\% Bağıl Sapma)} = \frac{(\text{Ölçülen Miktar} - \text{Konulan Miktar})}{\text{Konulan Miktar}} \times 100$$

Sonuçların ortalaması alınarak % geri elde edilen miktarlar bulundu. % 2'den daha az sapma görüldüğü için sonuçlar uygun bulundu.

3.3.2.1.3.2. Kesinlik

***Deneyiçi Kesinlik*:** OXB'nin tavşan serumunda 28 ng/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden ard arda 10 enjeksiyon yapıldı, elde edilen pik yüksekliklerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapma ve bağıl sapma hesaplandı.

Deneylerarası Kesinlik: OXB'nin tavşan serumunda 28 ng/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC'de birbirini takip eden 3 gün içinde 3 kez ölçüldü. Elde edilen pik yüksekliklerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapma ve bağıl sapması hesaplandı.

3.3.2.1.3.3. Doğrusallık

Bölüm 5.2.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçülen pik yüksekliklerine karşı konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirip, standart doğru denklemi bulundu. Söz konusu konsantrasyon aralığında regresyon denkleminin doğrusallığı hesaplandı (0.999) ve kanıtlandı.

3.3.2.1.3.4. Özgünlük, Seçicilik

Yöntemin, ekstraksiyonda kullanılan bileşiklerden etkilenip etkilenmediği HPLC kromotogramları incelenerek değerlendirildi. Bu amaçla OXB içermeyen tavşan serumunun ekstraksiyonu yapıldı ve HPLC kromotogramı incelendi.

3.3.2.1.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

OXB'nin tavşan serumundaki miktar tayininde kullanılan standart doğrunun hazırlanmasında kullanılan en küçük derişim olan 4 ng/mL ve farklı olarak 2 ng/mL'lik örnekler hazırlandı. HPLC ile analizleri yapıldı. Bu örnekler arasında istenilen doğruluğu sağlayan derişim saptandı ve analitik yöntemin kantitatif tayin sınırı (duyarlılık sınırı) bulundu. Ayrıca

derişimlerin kromatogram üzerinde oluşturdukları sinyal/gürültü oranları incelenerek saptama sınırı saptandı.

3.3.2.1.3.6. Stabilite

Deney şartlarında oksibütininin stabilitesini incelemek amacı ile 28 ng/ml konsantrasyonda hazırlanan örneklerin 48 saat boyunca belli zamanlarda 235 nm de HPLC'deki pik yükseklikleri elde edildi.

3.3.2.2. Oksibütininin İn Vivo Tavşan Deneyleri

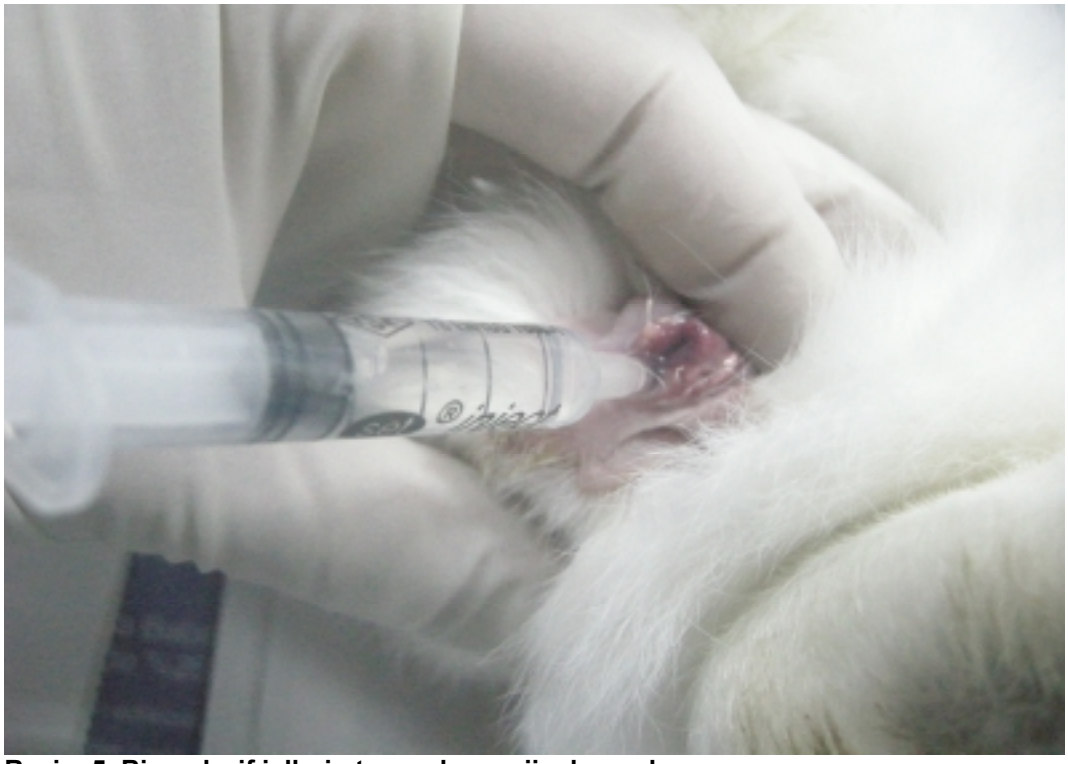
3.3.2.2.1. İn Vivo Deney Tasarımı

- İn vivo çalışmaların amacı geliştirdiğimiz OXB vajinal jel formülasyonlarının biyoyararlılığını incelemek ve piyasada bulunan ve hemen salım yapan tablet formülasyonu ile biyoyararlanım karşılaştırması yapmaktır.
- Deneylerde Yeni Zelanda cinsi, 2-3 kg ağırlığında, dişi tavşanlar kullanıldı.
- Hayvanların üreme döneminde olmamasına dikkat edildi.
- Tavşanlar çalışmanın yapılmasından bir önceki gün fakültemizdeki hayvan laboratuvarına getirildi ve deneyin başlamasından bir gece önce aç bırakıldı.
- Dört farklı grup oluşturuldu ve her grupta 6 tavşan ile çalışıldı.

- **1. GRUP UYGULAMA:** Biyoadezif OXB-K100M2 formülasyonu (10 mg OXB içeren, yaklaşık 1.5mL jel) aplikatör yardımı ile 6 adet tavşana vajinal olarak bir kez uygulandı (Resim 5).
- **2. GRUP UYGULAMA**: Geliştirilmiş olan biyoadezif OXB-KITH3 formülasyonu (10 mg OXB içeren, yaklaşık 1.5mL jel) aplikatör yardımı ile 6 adet tavşana vajinal olarak bir kez uygulandı.
- **3. GRUP UYGULAMA:** OXB'nin ülkemizde piyasada bulunan Üropan (5 mg OXB içeriyor) isimli hemen salım yapan tableti gavaj yöntemi kullanılarak 6 adet tavşana 5mL su ile içirildi. 24 saatte bir adet

Üropan tablet tavşanlara verildi. Yani 48 saat süren çalışma sonunda her tavşana 10mg dozda OXB verilmiş oldu. Bu uygulamanın amacı oral hemen salan tablet ile kontrollü salım yapan vajinal jellerin biyoyararlanımının karşılaştırılmasıdır.

- **4. GRUP UYGULAMA:** OXB içeren pH 4.5 fosfat tamponu (10 mg OXB içeren, yaklaşık 1.5 mL sulu çözelti) aplikatör yardımı ile 6 adet tavşana vajinal olarak bir kez uygulandı.
- **KONTROL GRUBU:** Hiç bir ilaç uygulaması ve vajinal uygulama yapılmayan tavşanların bulunduğu grup. Histoloji çalışmalarının değerlendirilebilmesi için oluşturulmuştur.
- **ÖRNEK ALMA SÜRELERİ:** 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36 ve 48. saatlerde örnek alındı. Hayvanlardan yaklaşık 2mL kan sodyum sitratlı tüplere alınmıştır (Resim 6, 7). Tavşanlardan belli zamanlarda kan alınacağı için kulak venlerine intraket takıldı. Böylece hayvanlara her örnek alınması sırasında yeniden damar yolu açmak için iğne batırılmasına gerek kalmadı. Kanlar alındıktan hemen sonra 3000 g'de beş dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serumlar analiz edilinceye kadar –20°C'de saklandı. Analiz yapılacağı zaman oda sıcaklığına getirilen serumlara ekstraksiyon işlemi uygulandı ve OXB'nin miktar tayini HPLC'de yapıldı.
- Daha sonra farmakokinetik hesaplamalar ile oksibütininin biyoyararlanımı hesaplanmıştır.



Resim 5. Biyoadezif jellerin tavşanlara vajinal uygulaması



Resim 6. Tavşanların kulak venlerine intraket takılması



Resim 7. Tavşanların kulak venlerinden kan alınması

3.3.2.2.2. Farmakokinetik Analiz

İn vivo çalışma sonucunda zamana karşı kan OXB konsantrasyonları elde edildi bu değerler grafiğe geçirilerek eğri altında kalan (AUC) alan trapez yöntemi ile hesaplandı, C_{max} ve t_{max} değerleri belirlendi. Ayrıca hesaplamalar için NCOMP bilgisayar programı da kullanılmıştır.

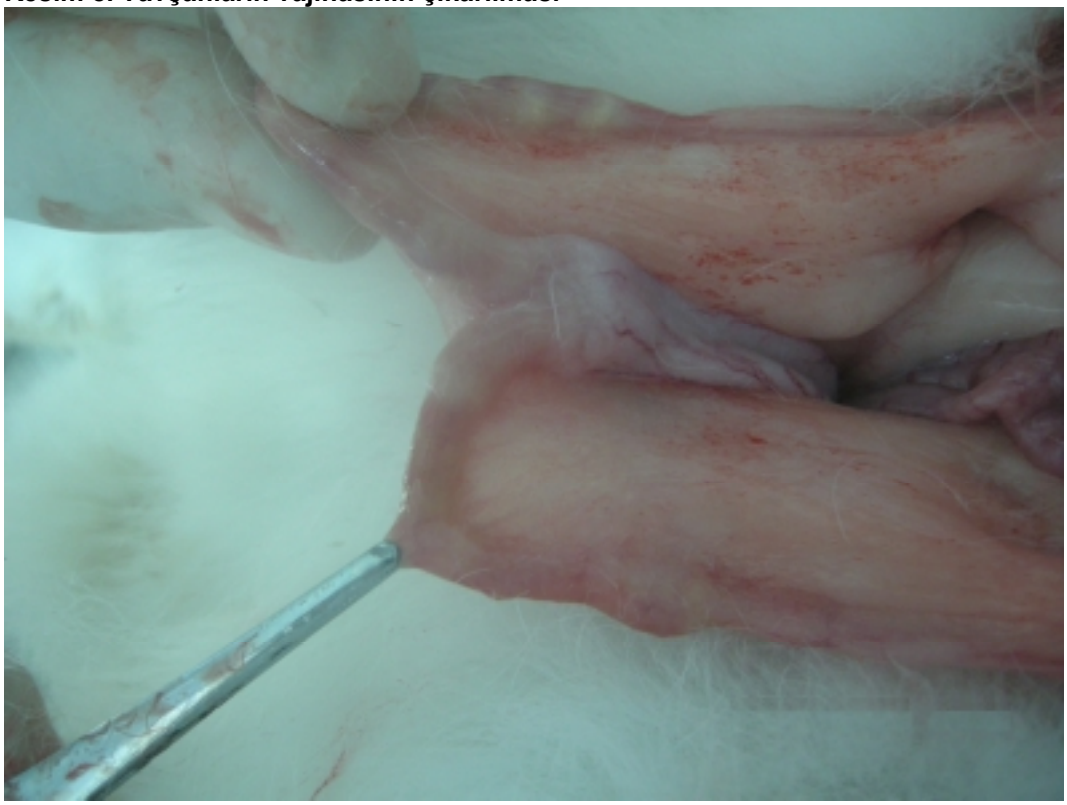
3.3.2.2.3. Tavşan Vajinal Dokularının Histolojik Açıdan İncelenmesi

İn vivo deney tasarımında bulunan gruplardan;

- Hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubundaki tavşanların,
- Vajinal OXB çözeltisi uygulanan tavşanların,
- Vajinal OXB-HPMCK100M2 jel uygulanan tavşanların ,
- Vajinal OXB-KITH3 jel uygulanan tavşanların 48 saatin sonunda anestezi altında vajinaları çıkarıldı (Resin 8 ve 9).



Resim 8. Tavşanların vajinasının çıkarılması



Resim 9. Tavşanların vajinasının çıkarılması

Çıkarılan vajina örnekleri 0.1 M fosfat tamponlu %2.5'lik glutaraldehit (pH 7.4) tespit çözeltisine konuldu. Bir miktar sertleştikten sonra 1 mm^3'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1 M fosfat tamponlu %2.5'lik glutaraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edilmiştir. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmiyum tetraoksite etkin bırakılarak ikinci tespit yapılmıştır. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlanmıştır. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile blok haline getirilmişlerdir. 56°C'lik etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. İşaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EXO LS10 STEEM transmission elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilmiştir ve bulguları yansıtan uygun büyültmelerde resimlendirilmiştir.

3.3.2.2.4. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etki Çalışması

İn vivo çalışmamızda, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubundaki tavşanların, oral Üropan tablet uygulanan tavşanların, vajinal OXB-HPMCK100M2 jel ve vajinal OXB-KITH3 jel uygulanan tavşanların hedef organlardan biri olan çene altı tükürük bezlerinde oksidatif etki araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), total nitrik oksit (Total Nox) değerleri belirlenmiştir. Dokuda glutatyon tayini için modifiye Ellman yöntemi, MDA tayini için Casini Yöntemi ve Total Nox tayini için Griess metodu kullanılmıştır[i].

[i] Bu çalışma Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR (Cidofovire ait bulgular)

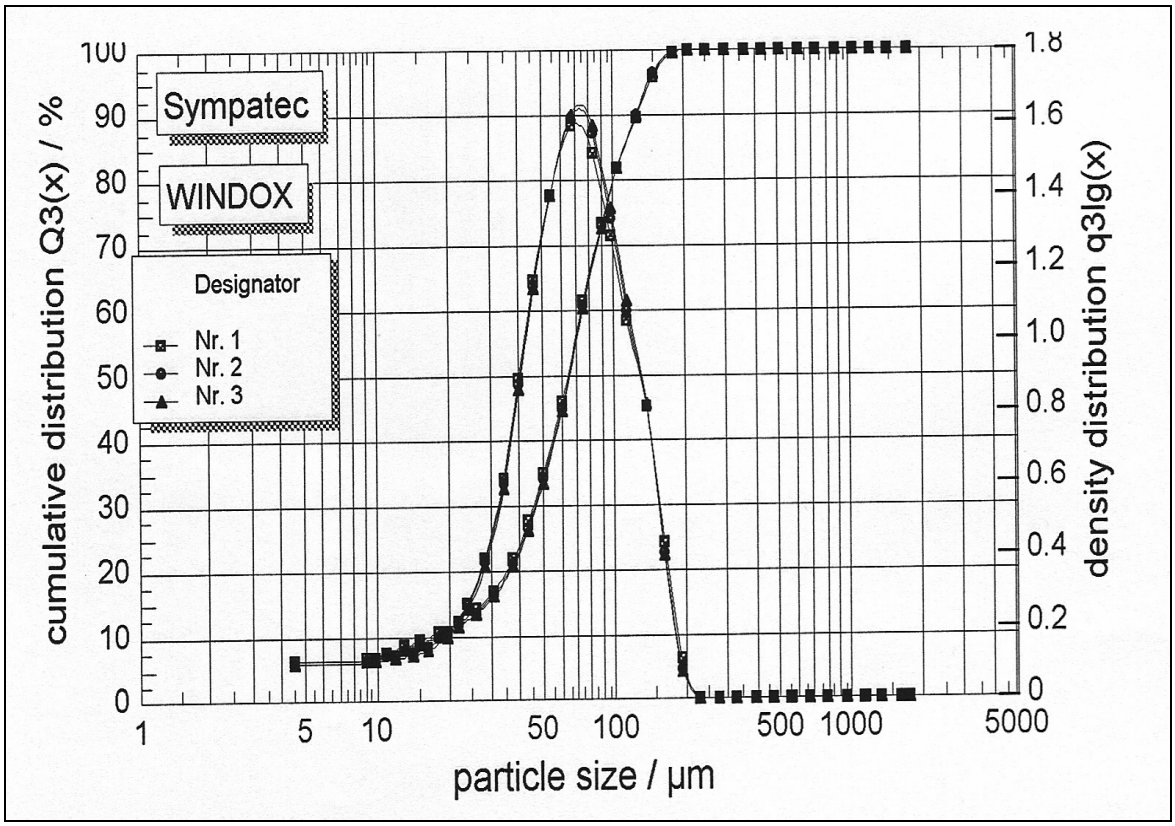
4.1. Cidofovirin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

4.1.1. Erime Noktası Tayini

Cidofovirin erime noktası 290.7 ± 0.8°C. % bağıl sapması 0.160 olarak bulunmuştur.

4.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi

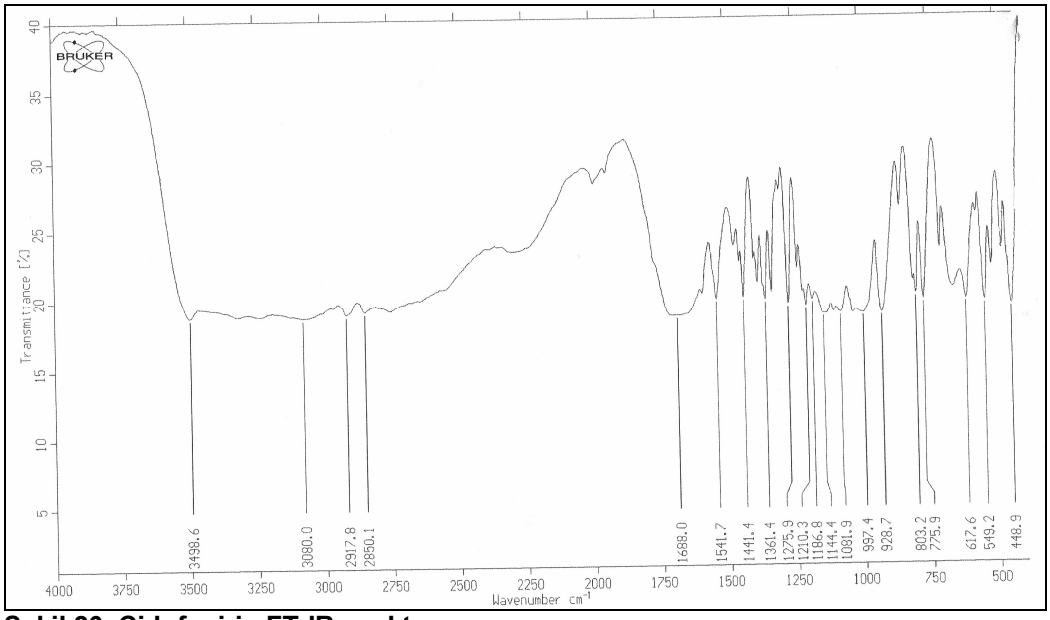
CV'nin partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 25'de gösterilmiştir. Buna göre CV'in ortalama partikül büyüklüğü 64.92±1.08 µm olarak bulunmuştur.



Şekil 25. Cidofovirin partikül büyüklüğü dağılımı

4.1.3. IR Spektrumu

CV'e ait FT-IR spektrumları Şekil 26'da gösterilmiştir.

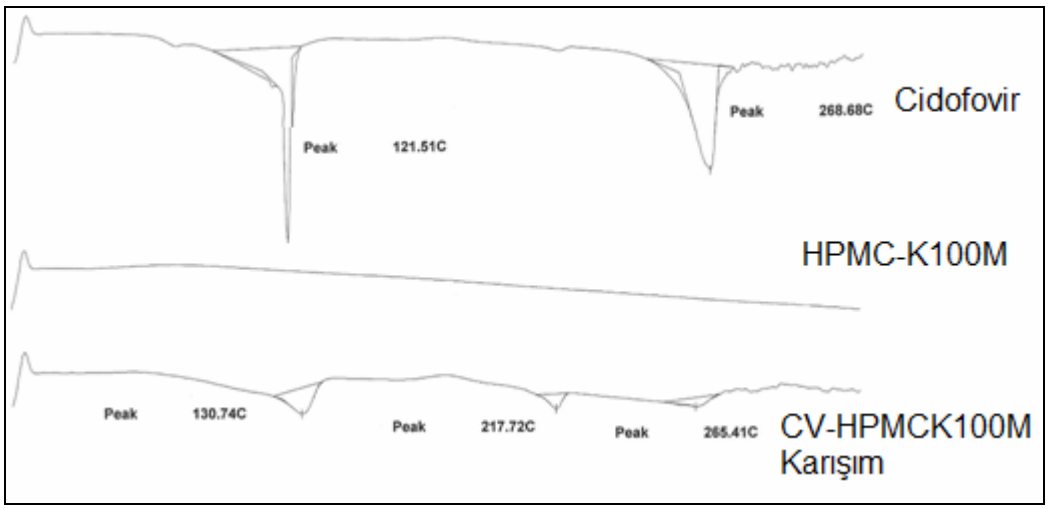


Şekil 26. Cidofovirin FT-IR spekturumu

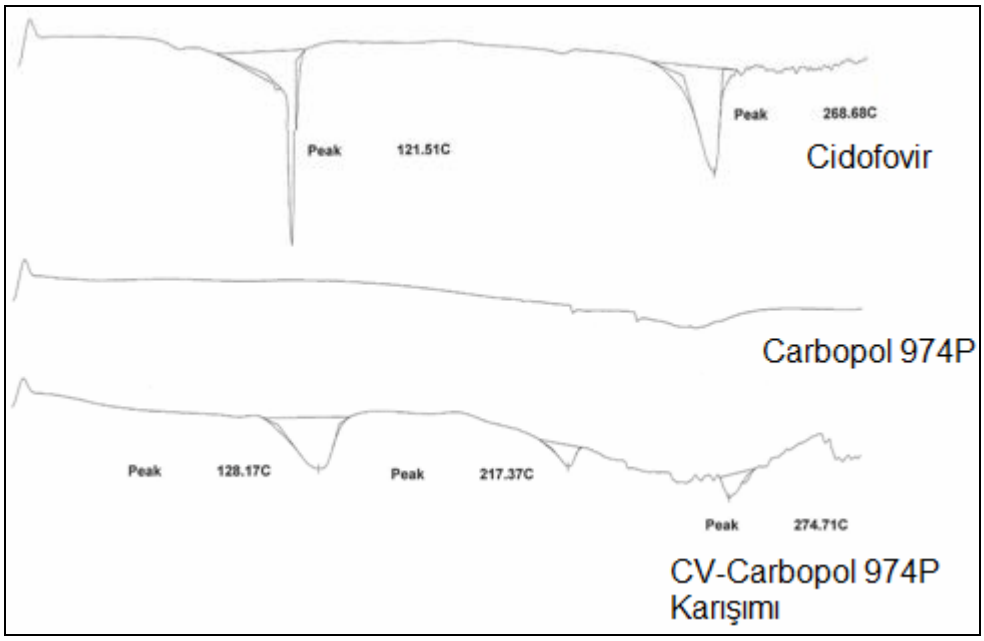
4.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, Bölüm 3.2.1.2.4'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. CV'e ilişkin termogramı Şekil 27'de verilmiştir ve 268 °C'de elde edilen endotermik pik CV'nin erime noktasını göstermektedir.

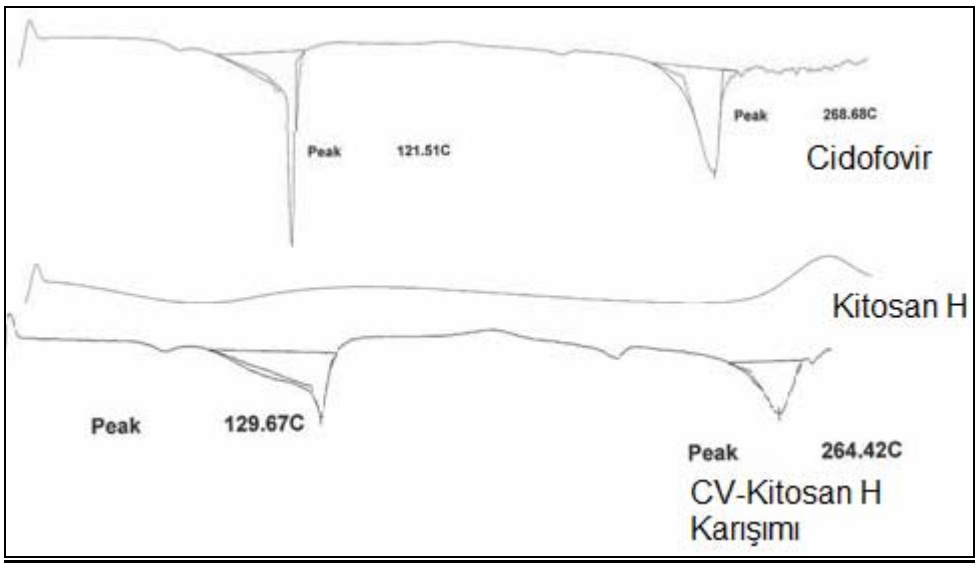
Jel formülasyon çalışmalarımızda en çok kullanılan polimerler (KITH3 ve C974P) ve sonuç formülasyonda kullandığımız polimerin (HPMCK100M) yalnız ve CV ile 1:1 oranında karışımlarının termogramları çekilmiştir. Şekil 27-29'daki termogramlarda polimerler ile CV arasında herhangi bir etkileşme olmadığı görülmektedir.



Şekil 27. Cidofovirin, HPMCK100M polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı



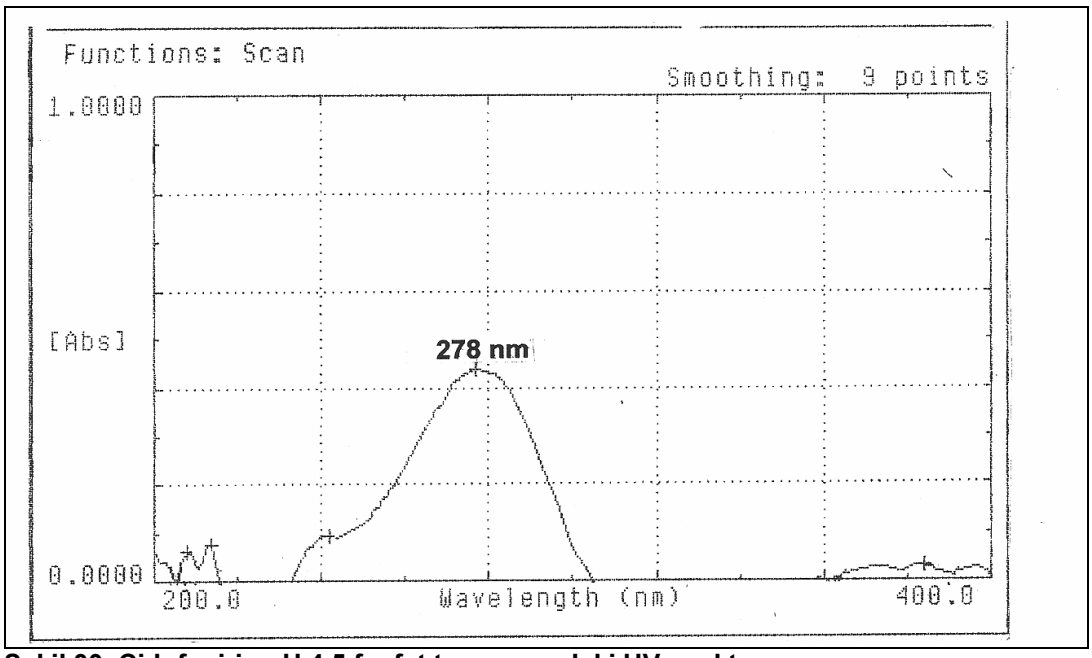
Şekil 28. Cidofovirin, Carbopol 974P polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı



Şekil 29. Cidofovirin, Kitosan H polimerinin ve bunların fiziksel karışımlarının DSC termogramı

4.1.5. UV Spektrumu

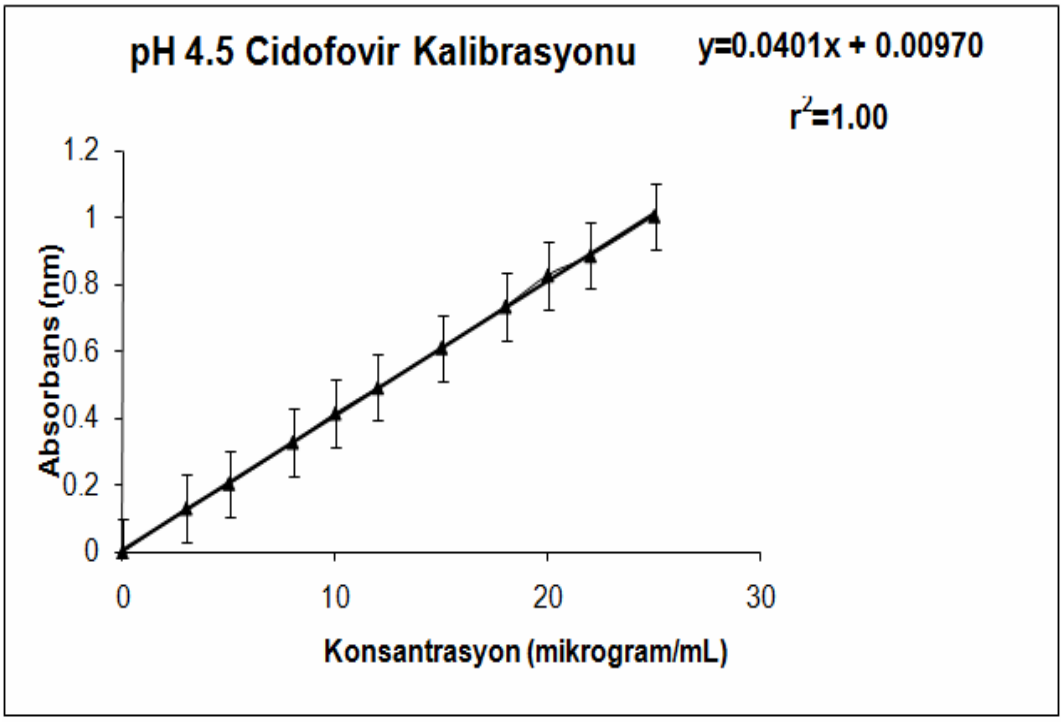
Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponundaki UV spektrumu Şekil 30'da gösterilmiştir. Buna göre cidofovirin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 278 nm'dir.



Şekil 30. Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponundaki UV spektrumu

4.1.6.Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

Cidofovirin standart doğrusunun hazırlanması Bölüm 3.2.1.3.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şekil 31'de pH 4.5'deki standart doğru görülmektedir. Standart doğruya ait parametreler ise Tablo 31'de verilmiştir.



Şekil 31. Cidofovirin pH 4.5 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu

Tablo 31. Cidofovirin pH 4.5'deki kalibrasyon parametreleri (n=3)

Eğim ± GA	0.0401 ± 0.0020
Kesişim ± GA	0.00970± 0.00120
Korelasyon Katsayısı (r)	0.999 ± 0.003
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.999 ± 0.005

4.1.6.1. Cidofovirin Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Yönteminin Validasyonu

4.1.6.1.1. Doğruluk (accuracy) ve ve Gerielde (recovery)

Cidofovirin geri elde sonuçları Tablo 32'da gösterilmiştir.

Tablo 32. Cidofovirin geri elde ile hesaplanan madde miktarı sonuçları

Cidofovir-Kitosan Jel Formülasyonları	%1 Cidofovir Kitosan-Jel İçindeki Etkin Madde Miktarı (mg)	Hesapla Bulunan Cidofovir Miktarı (mg) ± Güven Sınırı	% Bağıl Sapma	% Geri elde
%80 Cidofovir İçeren Formülasyon	8	8.24±0.09	0.613	103
%100 Cidofovir İçeren Formülasyon	10	10.07±0.57	0.491	101
%120 Cidofovir İçeren Formülasyon	12	11.98±0.01	0.0682	99.8

4.1.6.1.2. Tekrar Edilebilirlik

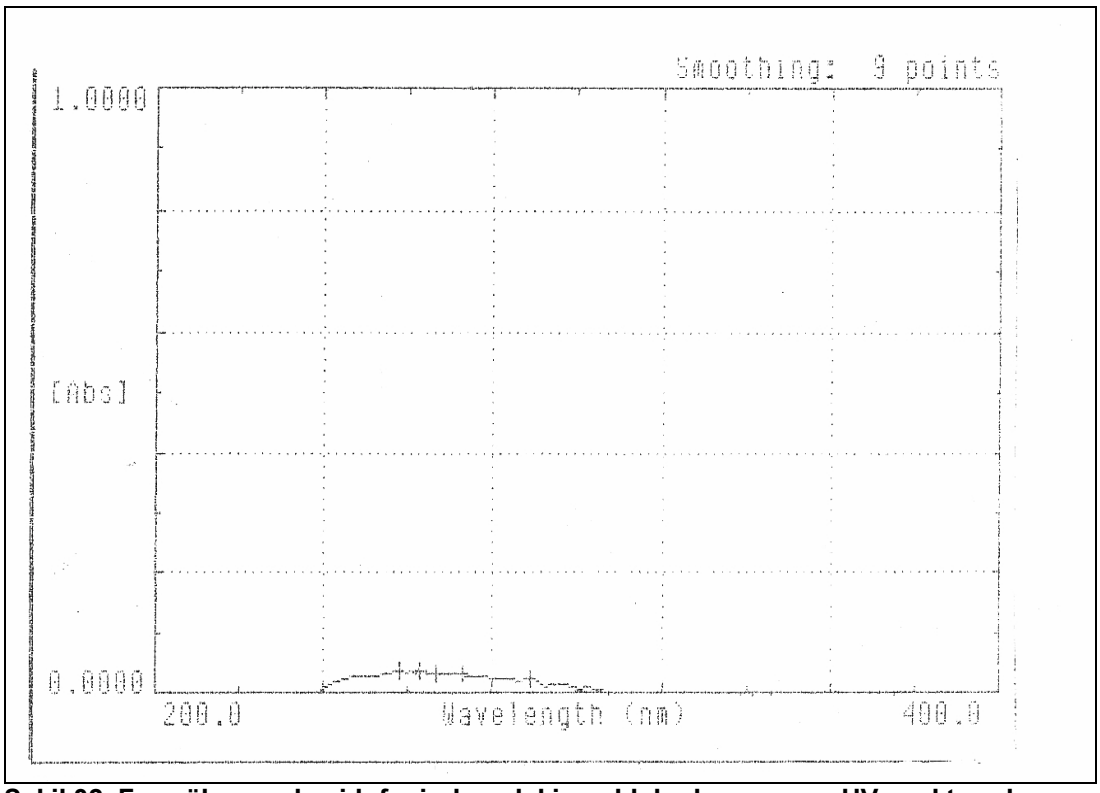
Etkin maddeye ait tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 33'de verilmiştir.

Tablo 33. Tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek No	%1 Cidofovir Kitosan-Jel İçindeki Etkin Madde Miktarı (mg)	Hesapla Bulunan Cidofovir Miktarı (mg)
1	10	9.30
2	10	9.38
3	10	9.34
4	10	9.30
5	10	9.35
6	10	9.45
7	10	9.49
8	10	9.36
9	10	9.48
10	10	9.50
Ortalama		**9.40**
Standart Sapma		**0.08**
Bağıl Sapma		**0.82**
Güven Sınırı		**±0.04**

4.1.6.1.3. Özgünlük, Seçicilik (specificity, selectivity)

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenen yapıyı analiz ettiğini kanıtlamak için formülasyona giren cidofovir dışındaki bileşenlerin 200-400 nm dalga boyları arası taranarak spektrumları incelendi. Bu yardımcı maddelerin herhangi bir pik vermediği görüldü. Yöntem etkin maddeye özgü bulunmuştur (Şekil 32).



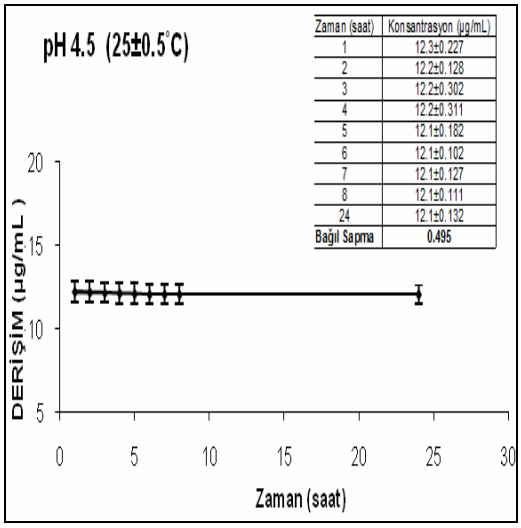
Şekil 32. Formülasyonda cidofovir dışındaki maddeler karışımının UV spektrumları

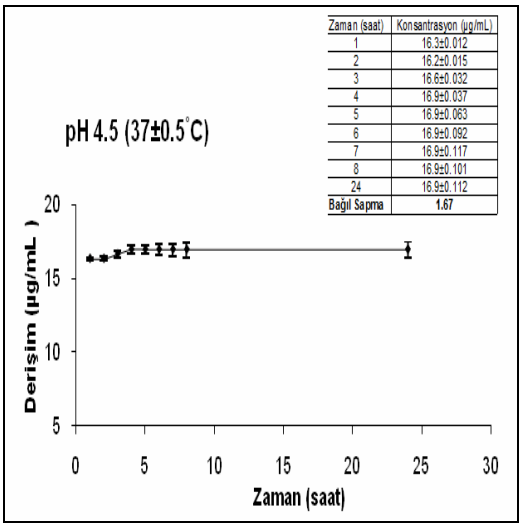
4.1.6.1.4. Doğrusallık (linearity)

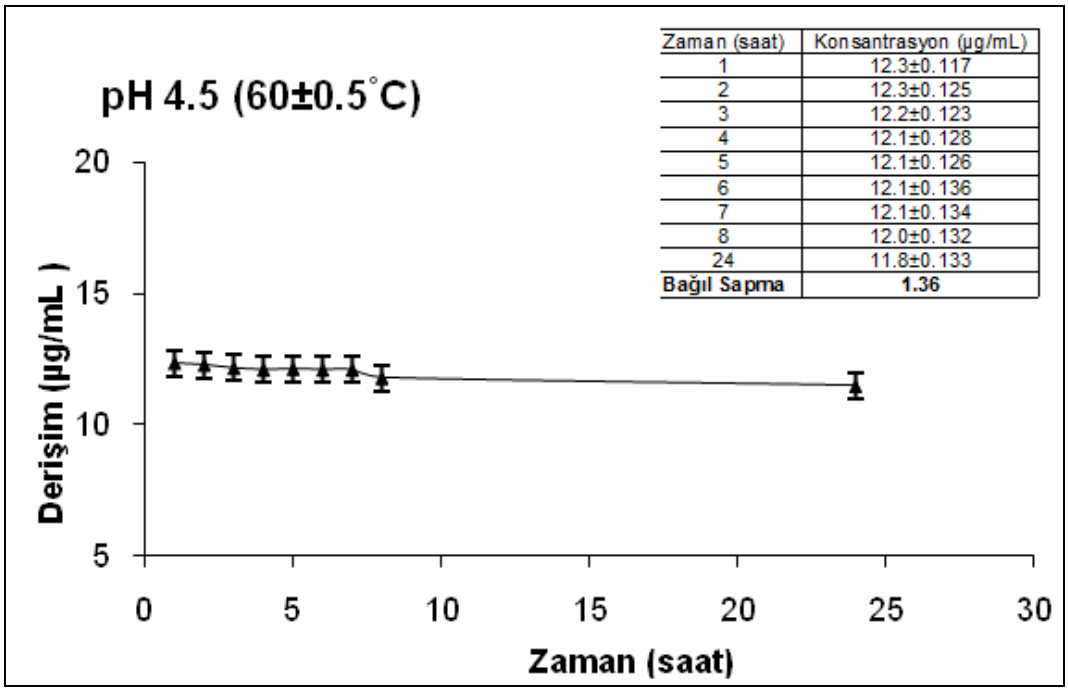
Bölüm 3.2.1.3.2.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Derişime karşı, ölçülen ortalama absorbans değerleri grafiklendi. Daha sonra gerekli matematiksel işlemler yapılarak (doğrusal regresyon) standart doğru denklemleri çıkartıldı. Bu denklemlerin r^2'leri hesaplandı. Söz konusu konsantrasyon aralığında hesaplanan regresyon denkleminin doğrusallıkları hesaplanmış ve kanıtlanmıştır (Şekil 31).

4.1.6.1.5. Stabilite (stability)

Cidofovirin çözünme ortamındaki stabilitesini izlemek için, Bölüm 3.2.1.3.2.5'de anlatıldığı gibi yapılan deneyler sonucunda, absorbans değerlerinde ve spektrumlarında bir değişiklik görülmemiştir. Şekil 33'de pH 4.5 fosfat tamponunda 24 saat süreyle izlenen zaman derişim grafikleri görülmektedir.







Şekil 33. Cidofovirin stabilitesi

4.2. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar

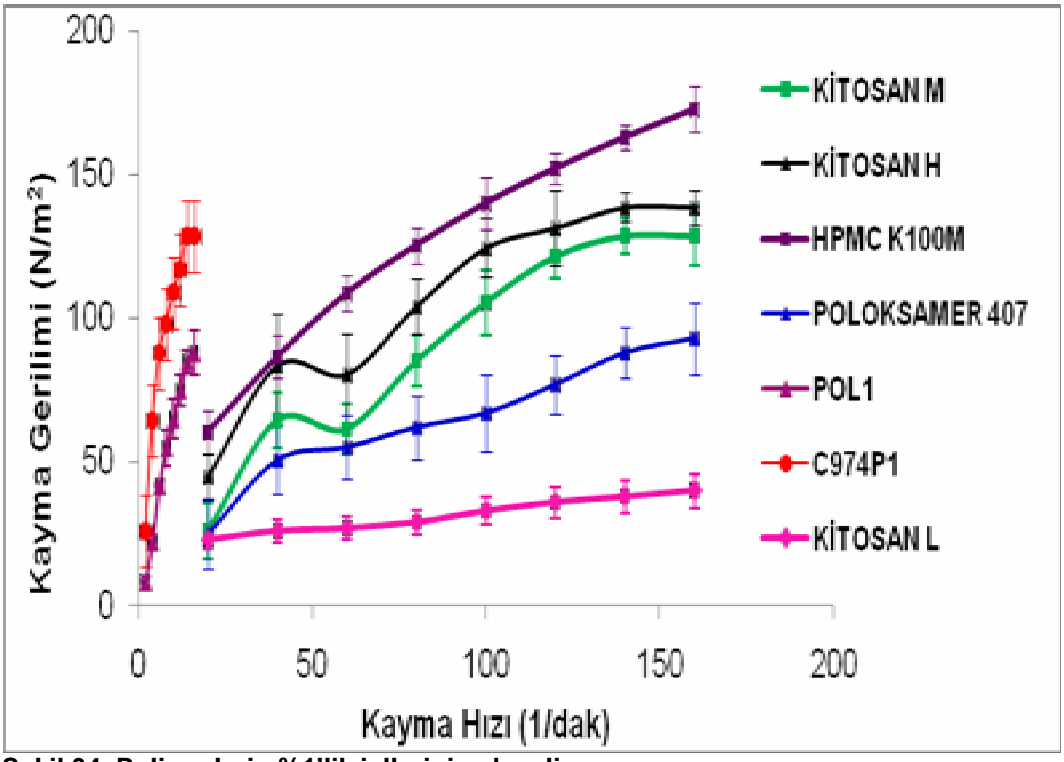
4.2.1. Polimerlerin pH'sı, Viskozite Değerleri ve Akış Özellikleri

Çalışmada kullanılan polimerlerin sudaki %1'lik jellerinin viskozluk ve pH değeri Tablo 34'de görülmektedir. Çalışmada sonuçların karşılaştırılabilir olması için aynı spindle ve aynı rpm'de ölçüm yapılmaya çalışılmıştır. Ancak viskozitesi yüksek olan jeller 20 rpm'de ölçülememiştir. Brookfield Programmable, DV-III viskozimetresinde Carbopol ve polikarbofilin %1'lik jellerinin 10-80 rpm arasında viskozitesi, cihazın % Torque değeri 110'nu aştığı için hep aynı değeri vermektedir. Bu nedenle çok viskoz olan jellerin viskozitesi ölçülürken rpm değerleri düşürülmüştür. Poloksamer 188 ile hazırlanan jel ise 37°C'de jelleşme göstermediği için özellikleri belirlenememiştir.

Tablo 34. Polimerlerin viskozite ve pH değerleri

Polimer	pH	Spindle	rpm	Viskozite (cP)
Kitosan H	5.78	52	20	650±8
Kitosan M	5.44	52	20	350± 5
Kitosan L	5.12	52	20	333±12
Carbopol 974P	4.30	52	2	855± 8
Polikarbofil	2.99	52	2	795±9
HPMC K100M CR	5.76	52	20	638±5
HPMC K15M CR	5.73	52	20	620± 5
Poloksamer 188	-	-	-	-
Poloksamer 407	5.01	52	20	472± 7

Polimerlerin sudaki %1'lik çözeltilerinin akış özelliklerinin saptanmasında, kayma gerilimine karşı (x), hız gradienti (Deformasyon değişim oranı) (y) grafiğe geçirildiğinde, aralarındaki ilişkinin doğrusal olmadığı görülmüştür. Polimerlerin %1'lik jelinin reolojik özelliklerine ait grafikler Şekil 34'de gösterilmiştir.



Şekil 34. Polimerlerin %1'lik jellerinin akış diyagramı

4.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1.1. Kitosan-Jel Formülasyonuna Ait Bulgular

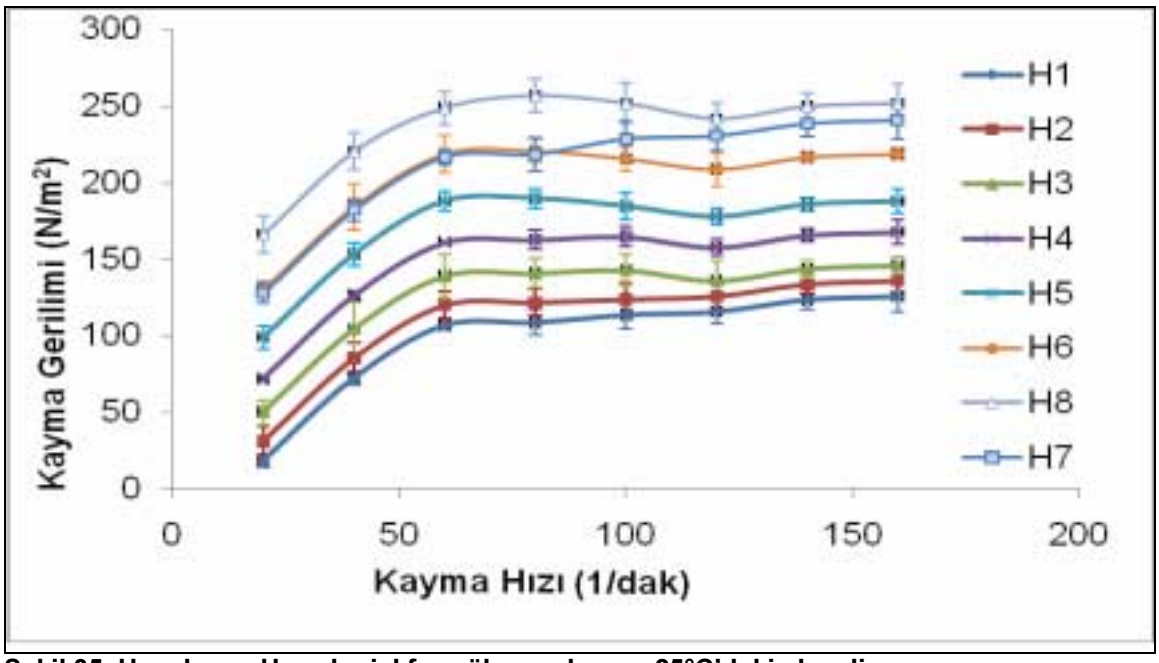
4.3.1.1.1. Etkin Madde İçermeyen Kitosan-Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Farklı glasiyel asetik asit ve kitosan oranlarına sahip jellerin pH değerleri ve viskozite değerleri Tablo 35'de verilmiştir. Viskozite ölçümleri Spindle No:52 ile 20 rpm'de yapılmıştır. Jellerin pH'sı vajinal uygulama için uygundur.

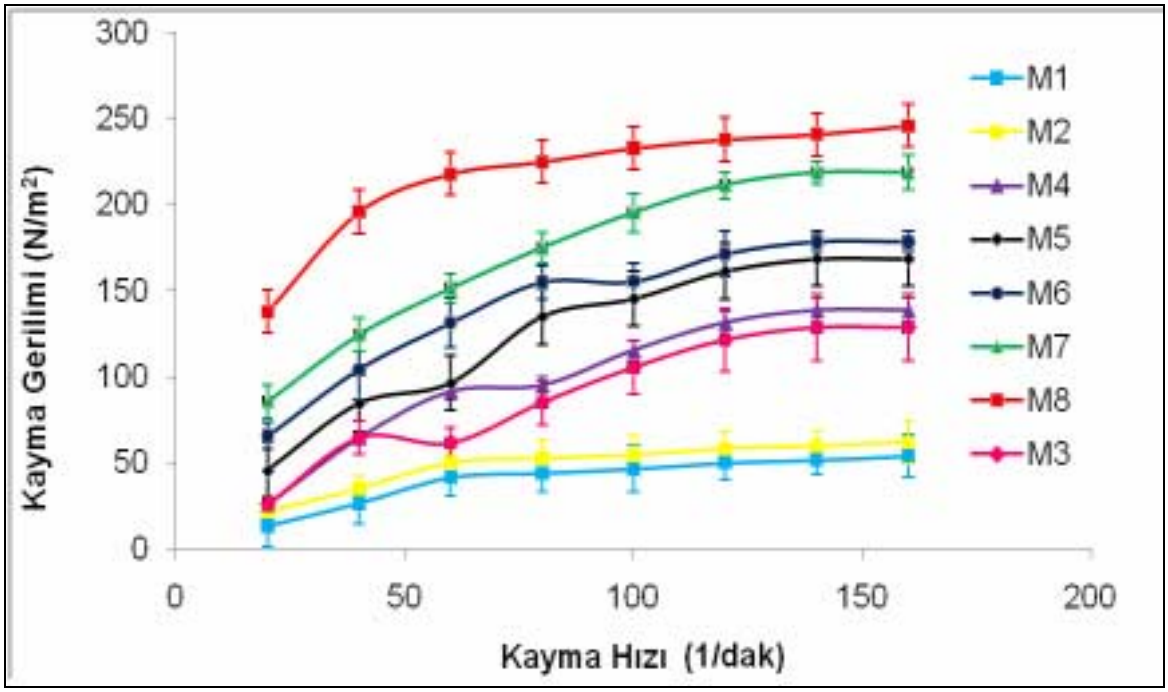
Tablo 35. Farklı glasiyel asetik asit ve kitosan oranlarına sahip etkin madde içermeyen jellerin pH ve viskozite değerleri

Kitosan Jel Formülasyonları	pH	Viskozite (cP)
H1	4.00	555±4
H2	4.33	624±6
H3	4.12	650±8
H4	5.08	1125±10
H5	5.75	1794±7
H6	4.64	3004±7
H7	4.15	4982±10
H8	4.62	6471±10
M1	3.03	311±5
M2	4.23	389±4
M3	3.73	399±5
M4	5.19	558±2
M5	5.79	1284±11
M6	4.26	1123±11
M7	4.56	1032±8
M8	4.81	4924±6
L1	3.89	211±3
L2	4.57	324±4
L3	4.25	332±12
L4	4.16	453±8
L5	4.44	1007±9
L6	4.98	1194±4
L7	4.60	2136±4
L8	4.58	3875±7

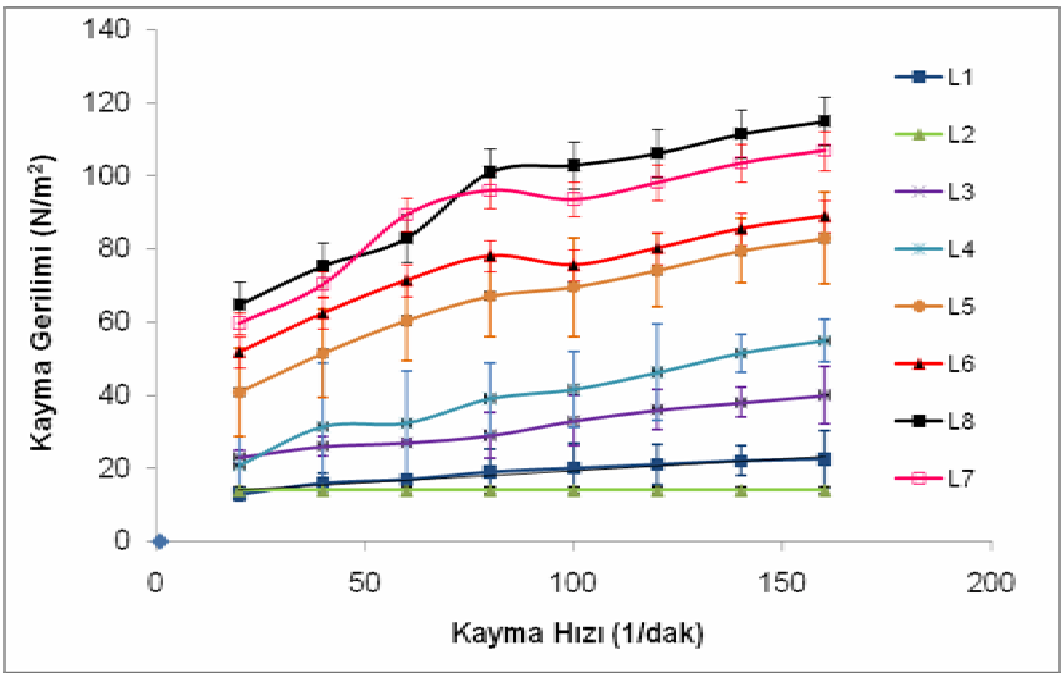
Formülasyonlara ait akış özelliğinin saptanmasında, Brookfield viskozimetresinde 25±0.1°C'de 8 farklı rpm'de ölçüm yapılarak diyagram oluşturulmuştur (Şekil 35-37). Reogramlardan anlaşıldığı üzere bütün jellerin Newtonian olmayan akış tipinden psödoplastik akışa uydukları görülmektedir.



Şekil 35. Hazırlanan H grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı



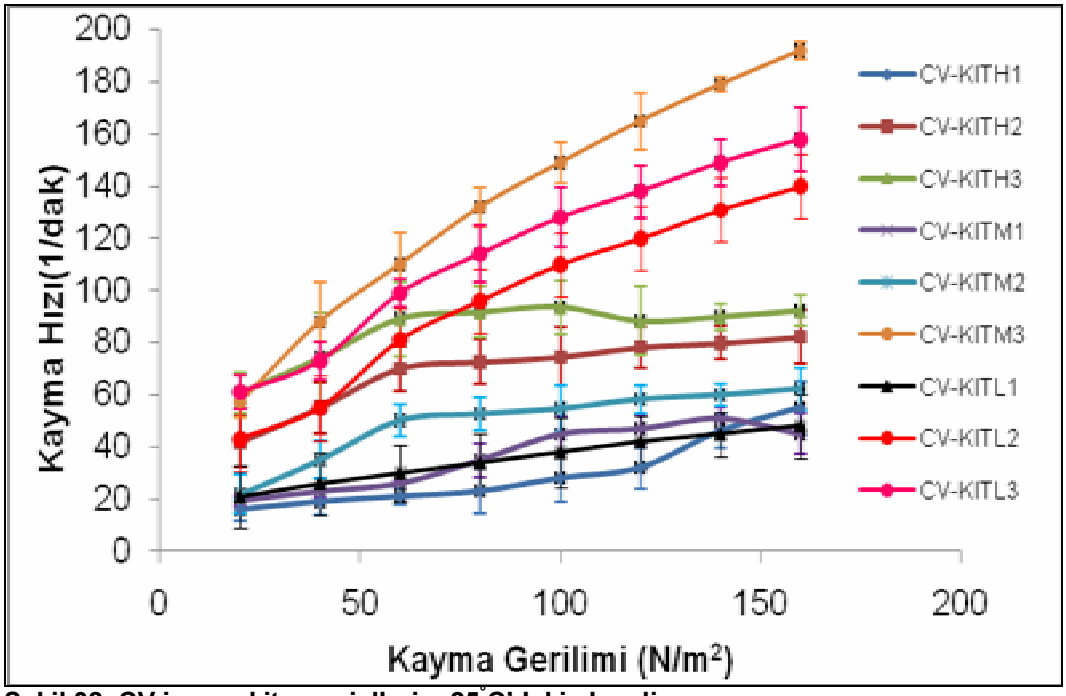
Şekil 36. Hazırlanan M grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı



Şekil 37. Hazırlanan L grubu jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı

4.3.1.1.2. Etkin Madde İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 3'de formülasyon kodları ve içerikleri belirtilen CV içeren kitosan jellerin akış özelliği incelenmiş ve Şekil 38'de akış grafikleri gösterilmiştir. Jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri saptanmıştır.



Şekil 38. CV içeren kitosan jellerin 25°C'deki akış diyagramı

Kitosan ile hazırlanan ve etkin madde içeren bütün formülasyonların şeffaf görüntüde oldukları belirlendi. %3 polimer içeren jellerin fiziksel görüntüsü, sürülebilirliği ve sürüldüğü yerde kalış süresi daha iyi olduğu için bu formülasyonlar üzerinden çalışmaya devam edildi. Etkin madde içeren %3'lük kitosan jellerin viskozite, pH ve miktar tayini değerleri Tablo 36'da gösterilmiştir.

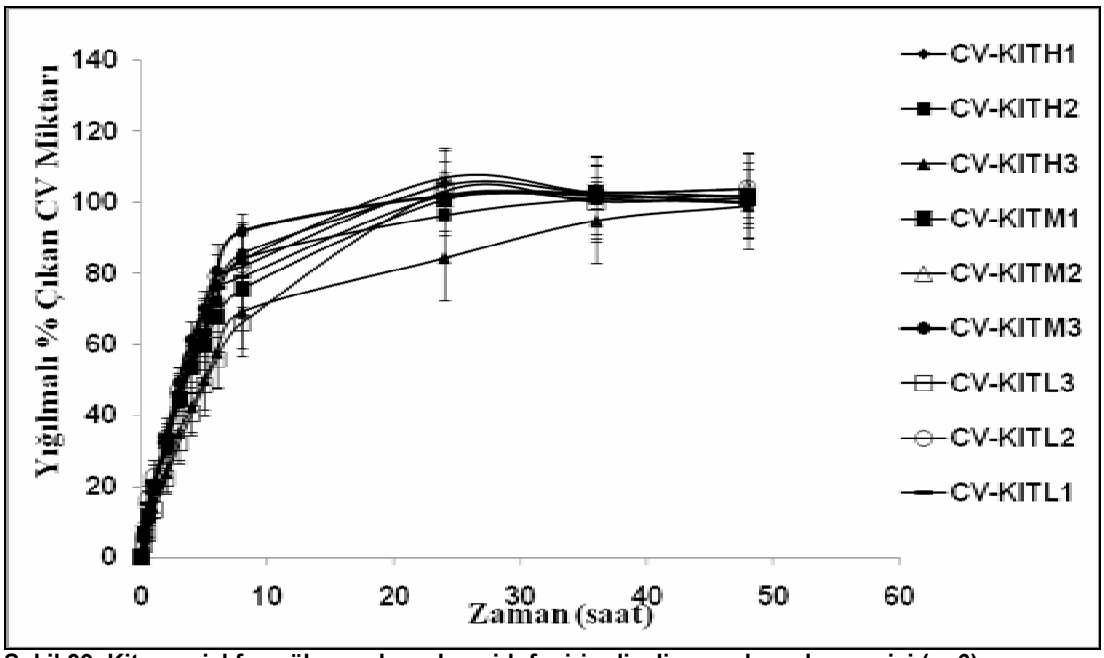
Tablo 36. Cidofovir içeren %3'lük kitosan jellerin özellikleri

Cidofovir Kitosan jel Form.	CV-KITH3	CV-KITM3	CV-KITL3
Miktar Tayini	10.2±0.0 mg/mL	10.2±0.1 mg/mL	10.5±0.1 mg/mL
Viskozite (cP)	517±8	354±5	315±6
rpm	20	20	20
Spindle No	52	52	52
pH	4.42	4.32	3.93

4.3.1.1.3. CV İçeren Kitosan-Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.5.5'de anlatıldığı şekilde pH 4.5 fosfat tamponunda yapılan, 12000 Daltondan küçük moleküllere geçirgen olan membrandan kitosan jel formülasyonlarının etkin madde salım deneyine ait profiller Şekil 39'da verilmiştir.

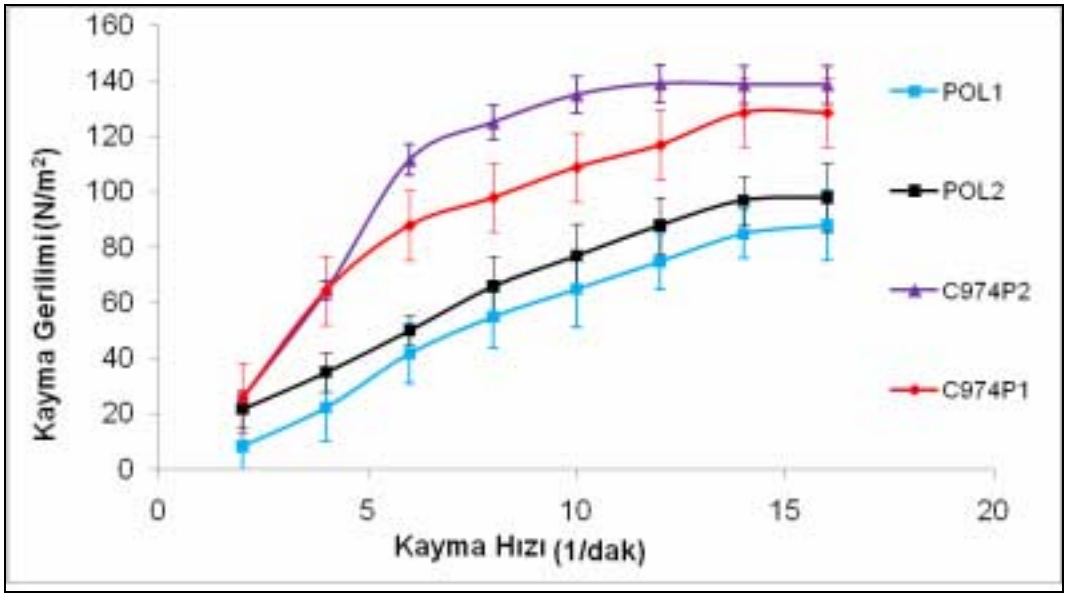
Salım profili incelendiğinde, pH 4.5'da 8 saat saat sonunda CV-KITH2 ve CV-KITH3 jel dışındaki jellerden, salımın % 80'in üzerinde olduğu ve amaçlanan konrollü salımı sağlayamadıkları gözlenmiştir. CV-KITH3 ise 8 saatin sonunda % 69.2±2.5, 24 saatin sonunda ise % 84.7±3.1 ve 48 saatin sonunda % 99.3±1.2 salım yapmıştır.



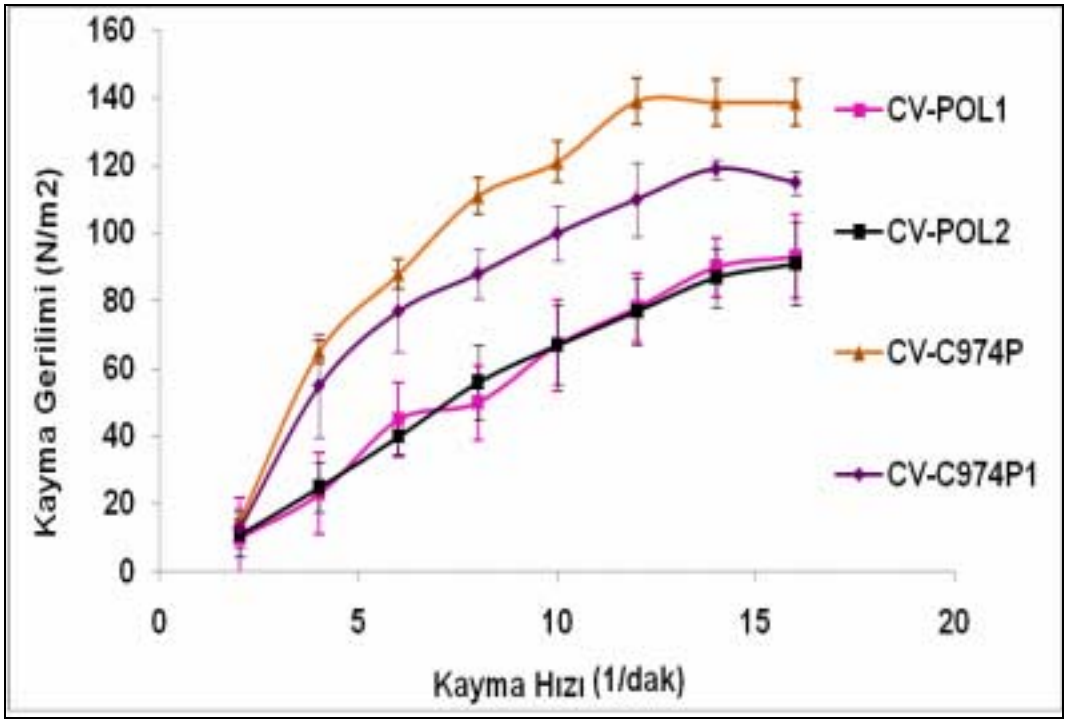
Şekil 39. Kitosan jel formülasyonlarından cidofovirin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

4.3.1.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonuna Ait Bulgular

Tablo 4'de içerikleri verilen formülasyonlara ait akış özelliğinin saptanmasında, Brookfield viskozimetresi kullanıldı ve 25±0.1±°C'de 8 farklı rpm'de ölçüm yapılarak akış diyagramları oluşturuldu. CV içermeyen jellerin akış diyagramı Şekil 40'da, CV içeren jellerin akış diyagramı Şekil 41'de gösterilmiştir. Diyagramlara göre jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri saptanmıştır.



Şekil 40. CV içermeyen Carbopol 974P ve polikarbofil jellerin akış diyagramı



Şekil 41. CV içeren Carbopol 974P ve polikarbofil jellerin akış diyagramı

Hazırlanan jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Farklı jel formülasyonlarının viskoziteleri 2 rpm'de Spindle No 52 ile ölçüm yapılmıştır. Jellerin pH değerleri, viskozite değerleri ve miktar tayini sonuçları Tablo 37'de verilmiştir.

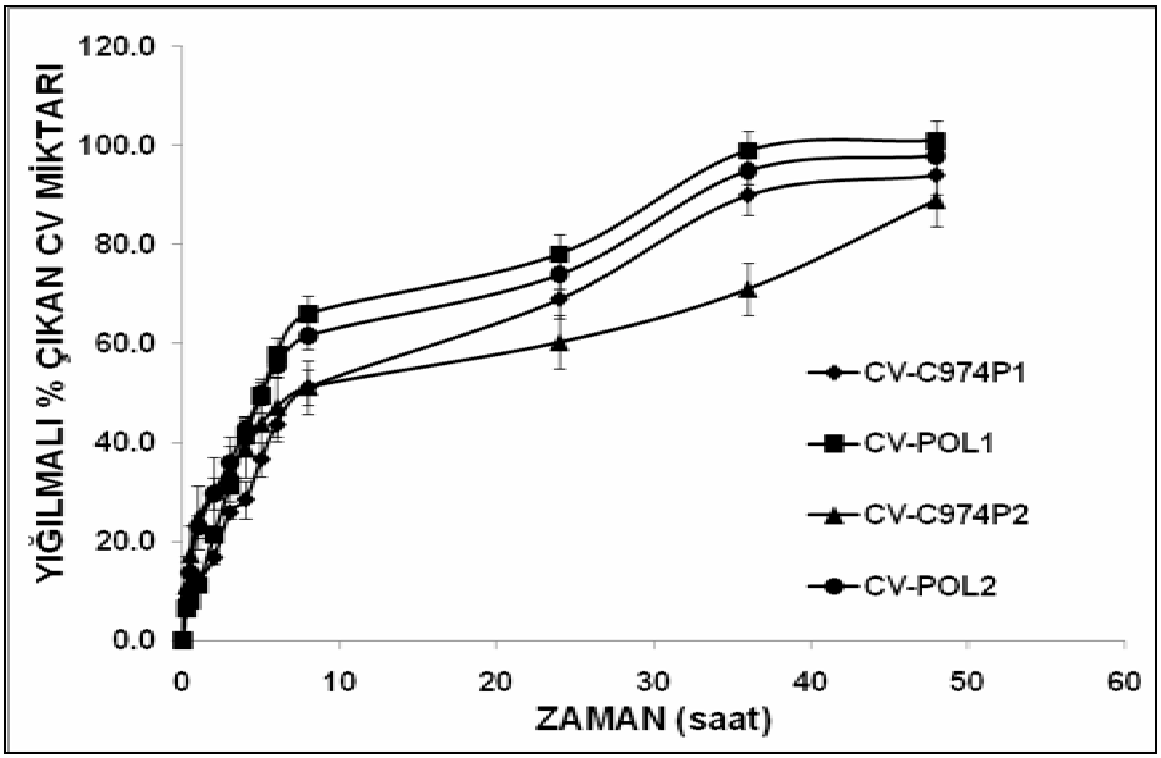
Tablo 37. Farklı jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları

Jel Formülasyonları	Miktar Tayini	pH	Viskozite (cP)
C974P1	-	4.56	854±8
C974P2	-	4.27	1673±15
CV-C974P1	10.3±0.1 mg/mL	4.82	798±9
CV-C974P2	10.2±0.0 mg/mL	4.72	1498±11
POL1	-	4.85	795±9
POL2	-	4.25	1256±14
CV-POL1	10.0±0.2 mg/mL	4.97	671±12
CV-POL2	10.2±0.1 mg/mL	4.72	1165±5

C974P2 formülasyonunun viskozitesi en yüksektir. Böylece vajinaya uygulandığında kalış süresinin artacağı ve salımın daha kontrollü olacağı düşünülmüştür.

4.3.1.2.1. CV İçeren Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Franz difüzyon hücrelerinden geçiş çalışması sonucu elde edilen salım profilleri Şekil 42'da verilmiştir.

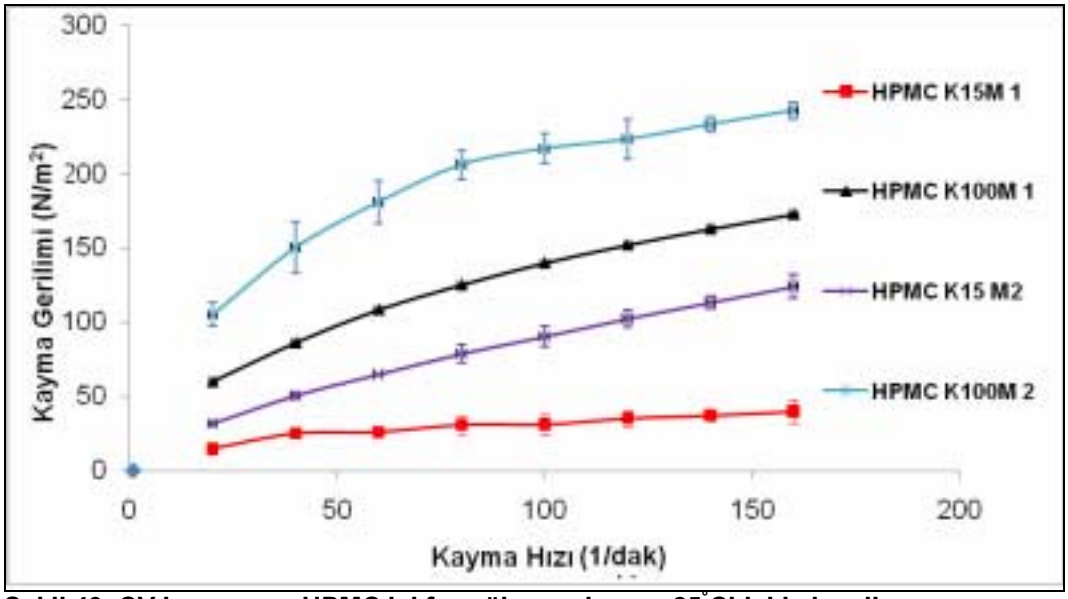


Şekil 42. Carbopol ve polikarbofil jel formülasyonlarından CV'in diyaliz membrandan geçişi (n=6)

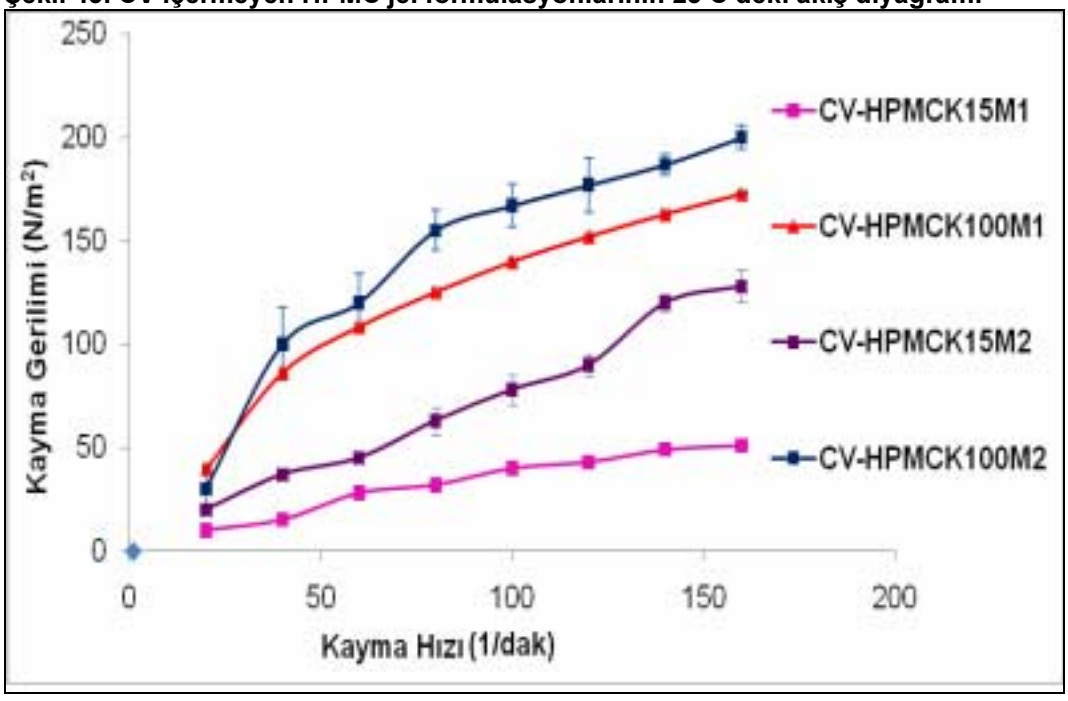
Sekiz saatin, 24 saatin ve 48 saatin sonunda en az salım CV-C974P2 formülasyonunda olmuştur (% 51.2±3.8, % 60.3±2.4, % 89.3±1.9). CV-POL2 formülasyonunun salım profiline bakıldığında ilk sekiz saatte, 24. saatte ve 48 saatin sonunda salınan CV miktarı % 61.7±2.5, % 74.0±4.1, ve % 98.3±1.3 olarak bulunmuştur. En çok salım yapan formülasyon ise CV-POL1 formülasyonu olmuştur, 8 saatin sonunda % 66.0±2.1, 24. saatin sonunda %78.1±3.3 ve 48. saatin sonunda da % 101±5 oranında salım görülmüştür.

4.3.1.3. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 5'de içerikleri verilen jellerin kontrolleri yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir. Jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri saptanmıştır. Şekil 43 ve 44'de CV içermeyen ve içeren HPMC jellerin akış diyagramları gösterilmiştir.



Şekil 43. CV içermeyen HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı



Şekil 44. CV içeren HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı

Hazırlanan HPMC jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Farklı jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri (20 rpm'de Spindle No 52 ile ölçülmüştür) ve miktar tayini sonuçları Tablo 38'de verilmiştir. Miktar tayini çalışmasında jellerin başlangıçta içerdikleri etkin madde miktarı 10 mg'dır.

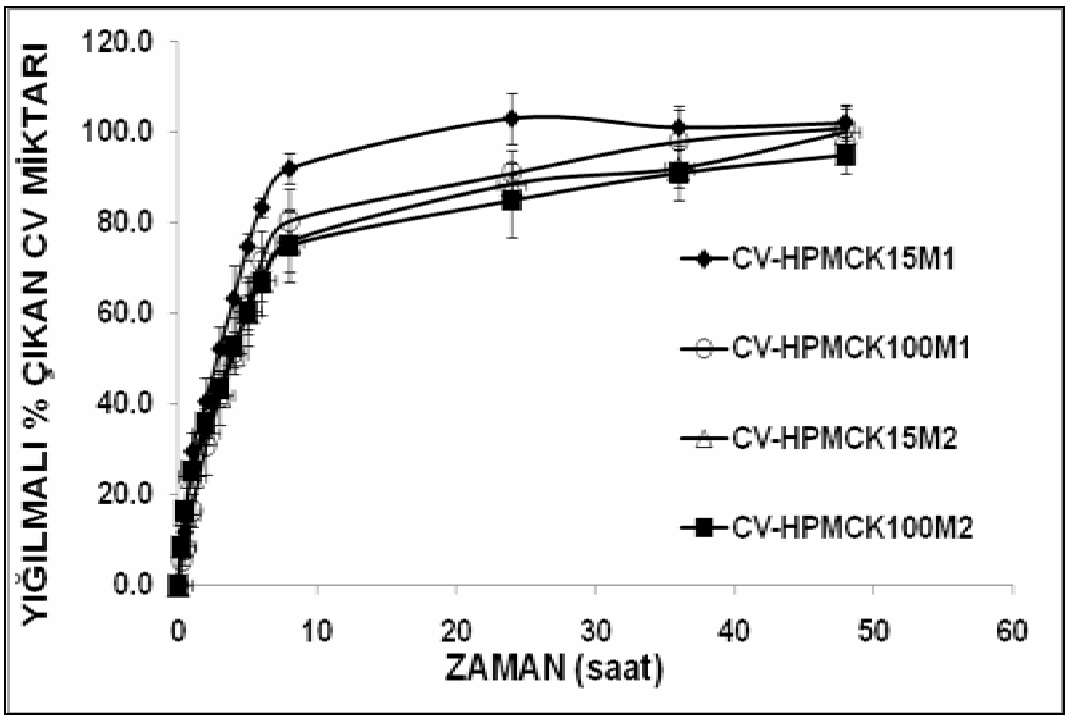
Tablo 38. HPMC jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları

Jel Formülasyonları	Miktar Tayini	pH	Viskozite (cP)
HPMCK100M1	-	4.38	637±6
HPMCK100M2	-	6.54	1143±10
CV-HPMCK100M1	10.1±0.0 mg/mL	4.22	621±4
CV-HPMCK100M2	10.1±0.1 mg/mL	4.18	1087±7
HPMCK15M1	-	4.21	619±6
HPMCK15M2	-	5.17	1098±12
CV-HPMCK15M1	10.2±0.1 mg/mL	4.19	589±3
CV-HPMCK15M2	10.2±0.2 mg/mL	4.21	981±11

CV-HPMCK100M2 formülasyonunun viskozite değeri en yüksek bulunmuştur.

4.3.1.3.1. CV İçeren HPMC Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Franz difüzyon hücrelerinden geçiş çalışması sonucu elde edilen grafikler Şekil 45'de verilmiştir.



Şekil 45. CV içeren HPMC jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6)

CV içeren jellerden 48 saaatin sonunda en az salım yapan formülasyon CV-HPMCK100M2 olmuştur ve % 95.0±1.8 salım gerçekleşmiştir. Bu formülasyon için ilk sekiz saate bakıldığında salımın % 75.0±2.2, 24. satte ise salımın % 85.0±4.1 olduğu gözlenmiştir (Şekil 45).

4.3.1.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 6'da içerikleri verilen jellerin kontrolleri yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

Jellerin özellikleri oda sıcaklığında incelenmiştir.

4.3.1.4.1. Poloksamer Jellerde Jelleşme Sıcaklığı ($T_{sol-jel}$)

Su banyosunda, magnetik karıştırıcı üzerinde cam beher içine +4°C'de bekleyen P407 veya P188 jelden 10 mL konuldu. Su banyosunun sıcaklığı kademeli olarak artırıldı ve magnetin artık dönemeyeceği kadar jelleşme olduğunda sıcaklık kaydedildi. Çalışma üç defa tekrarlandı. Formülasyonların jelleşme sıcaklıkları Tablo 39'da verilmiştir.

Tablo 39. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının jelleşme sıcaklığı

Formülasyon	$T_{sol\text{-}jel}$ 1	$T_{sol\text{-}jel}$ 2	$T_{sol\text{-}jel}$ 3
P407	25°C	24°C	25°C
P188	37°C'de jelleşme gözlenmedi	37°C'de jelleşme gözlenmedi	37°C'de jelleşme gözlenmedi
HP407	26°C	26°C	26°C
MP407	25°C	25°C	25°C
CV-P407	25°C	25°C	25°C
CV-MP407	25°C	24°C	25°C
CV-HP407	27°C	26°C	26°C

P188'in jelleşme sıcaklığı uygun olmadığı için daha sonraki çalışmalarda devam edilmedi.

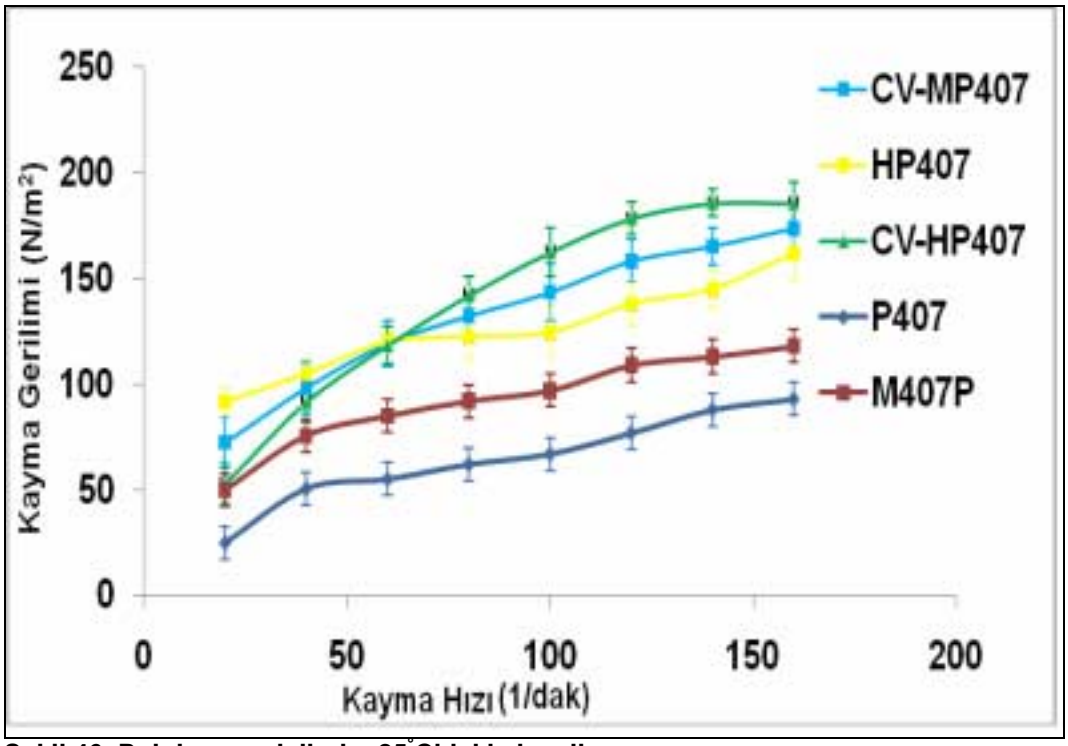
4.3.1.4.2. Poloksamer Jellerin Fiziksel Görünüşleri, pH'sı, Viskozitesi ve Akış Özellikleri

Jellerin fiziksel görünüşü, oda sıcaklığındaki renk ve şeffaflık özelliği incelenerek değerlendirildi. pH değerleri ise pH-metre kullanılarak saptandı. Hazırlanan jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Jellerin özellikleri Tablo 40'da verilmiştir. Viskozite ölçümü 20 rpm'de ve Spindle No 52 kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 40. CV içermeyen ve içeren poloksamer jellerin viskozite değerleri

FORMÜLASYON KODLARI	pH	Viskozite (cP)
P407	5.01	472±8
MP407	4.93	842±12
HP407	5.08	1058±5
CV-P407	5.03	447±4
CV-MP407	5.01	654±11
CV-HP407	5.05	967±14

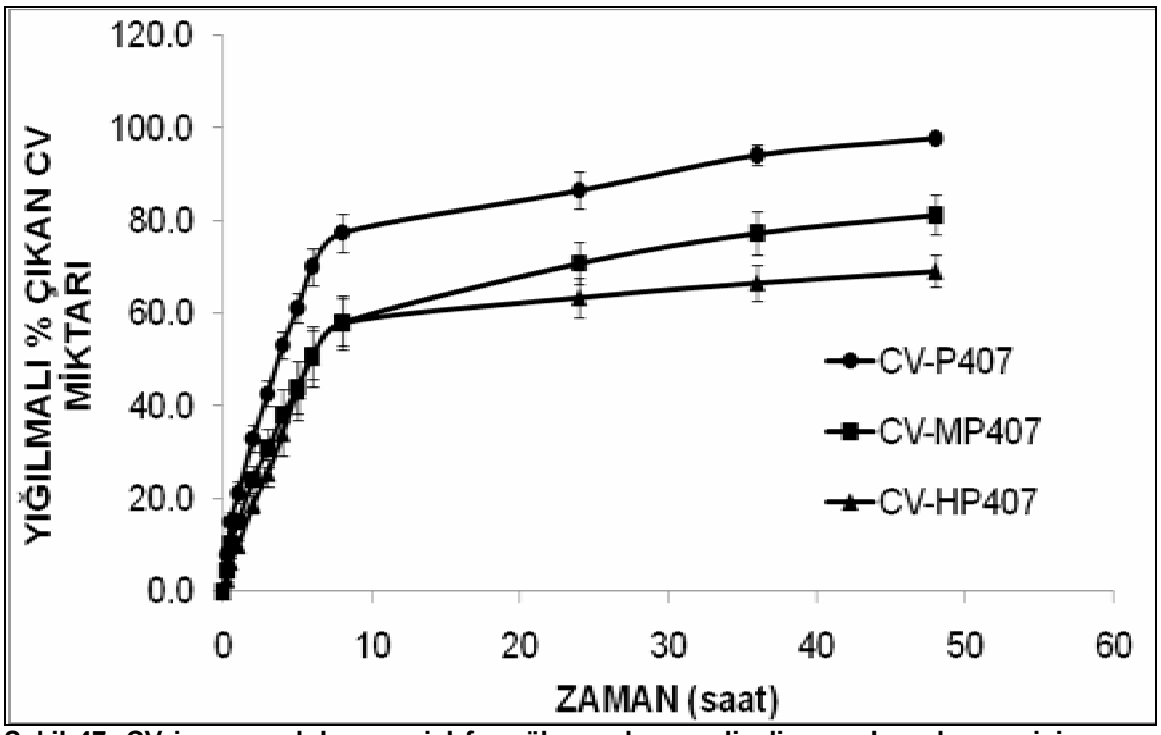
Vajinal uygulama için hazırlanmış olan jel formülasyonlarının pH değerleri uygundur. Jellerin akış özelliklerinin saptanmasında, kayma gerilimine karşı (x), hız gradienti (Deformasyon değişim oranı) (y) grafiğe geçirildiğinde, aralarındaki ilişkinin doğrusal olmadığı görülmüştür. Jellerin psödoplastik akış özelliği gösterdiği görülmüştür. Jellerin reolojik özelliklerine ait grafik Şekil 46'da gösterilmiştir.



Şekil 46. Poloksamer jellerin 25°C'deki akış diyagramı

4.3.1.4.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Hazırlanan Polaksamer jellerden 0.5 g, terazinin üzerinde tartılarak Franz difüzyon hücrelerine yerleştirildi. 12000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membrandan geçiş incelendi. Şekil 47'de CV'in diyaliz membrandan salım profili görülmektedir. Buna göre CV-HP407 formülasyonundan salım 8 saatin sonunda % 58.0±5.8, bu değer 24 saat sonunda % 63.5±4.3 ve 48 saatin sonunda % 69.2±3.4 olmuştur. Bu sonuçlara göre CV-HP407 formülasyonunun oldukça kontrollü salım yaptığını söyleyebiliriz.



Şekil 47. CV içeren poloksamer jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6)

4.3.1.5. Jel Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.5.7'de anlatıldığı gibi yapılan stabilite çalışmaları üç ay süreyle 4°C/ortam nem, 25°C/% 60 bağıl nem ve 40°C/% 75 bağıl nem ortamlarında yapılmıştır. Farklı polimerler ile hazırlanan jel formülasyon gruplarından sonuç formülasyonlar seçilerek bu formülasyonlar üzerinde stabilite testleri yapılmıştır. Adı geçen formülasyonlar şöyle sıralanabilir:

CV-KITH3: Kitosan H ile hazırlanmış % 3 oranında polimer ve %1 oranında CV içeren jel formülasyonu

CV-C974P2: Carbopol 974P ile hazırlanmış % 2 oranında polimer ve %1 oranında CV içeren jel formülasyonu

CV-HPMCK100M2: HPMC K100M ile hazırlanmış % 2 oranında polimer ve %1 oranında CV içeren jel formülasyonu

CV-HP407: Poloksamer 407P (% 20) ve HPMC K100M (% 0.5) kullanılarak hazırlanan ve % 1 oranında CV içeren jel formülasyonu

Sonuç formülasyonlar üzerinde yapılan stabilite deneylerine ait bulgular Tablo 41-44'de gösterilmiştir.

Tablo 41. CV-KITH3 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	CV-KITH3 Başlangıç	CV-KITH3 1. ay	CV-KITH3 2.ay	CV-KITH3 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**CV-KITH3 Başlangıç**	**CV-KITH3 1. ay**	**CV-KITH3 2.ay**	**CV-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	4.42	4.47	4.45	4.43
25°C/%60 bağıl nem	4.42	4.40	4.51	4.48
40°C/%75 bağıl nem	4.42	5.24	5.75	6.03
Viskozite (cP)	**CV-KITH3 Başlangıç**	**CV-KITH3 1. ay**	**CV-KITH3 2.ay**	**CV-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	517±8	519±5	523±9	517±8
25°C/%60 bağıl nem	517±8	526±7	515±4	518±8
40°C/%75 bağıl nem	517±8	458±2	449±6	437±8
Miktar Tayini (mg/mL)	**CV-KITH3 Başlangıç**	**CV-KITH3 1. ay**	**CV-KITH3 2.ay**	**CV-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.12±0.12	5.15±0.21	5.08±0.23	5.10±0.10
25°C/%60 bağıl nem	5.12±0.11	5.17±0.13	5.16±0.32	5.15±0.52
40°C/%75 bağıl nem	5.12±0.14	4.82±0.31	4.78±0.60	4.67±0.31

Tablo 42. CV-C974P2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	CV-C974P Başlangıç	CV-C974P 1. ay	CV-C974P 2.ay	CV-C974P 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**CV-C974P Başlangıç**	**CV-C974P 1. ay**	**CV-C974P 2.ay**	**CV-C974P 3.ay**
4°C/ortam nemi	4.72	4.78	4.74	4.71
25°C/%60 bağıl nem	4.72	4.75	4.79	4.78
40°C/%75 bağıl nem	4.72	6.09	6.11	6.28
Viskozite (cP)	**CV-C974P Başlangıç**	**CV-C974P 1. ay**	**CV-C974P 2.ay**	**CV-C974P 3.ay**
4°C/ortam nemi	1498±11	1493±12	1501±17	1518±19
25°C/%60 bağıl nem	1498±11	1507±14	1504±16	1523±13
40°C/%75 bağıl nem	1498±11	1362±12	1349±15	1352±10
Miktar Tayini (mg/mL)	**CV-C974P Başlangıç**	**CV-C974P 1. ay**	**CV-C974P 2.ay**	**CV-C974P 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.03±0.21	5.05±0.11	5.04±0.30	5.04±0.23
25°C/%60 bağıl nem	5.03±0.23	5.09±0.13	5.03±0.31	5.05±0.70
40°C/%75 bağıl nem	5.03±0.24	4.64±0.34	4.55±0.54	4.37±0.84

Tablo 43. CV-HPMCK100M2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	CV-HPMCK100M2 Başlangıç	CV-HPMCK100M2 1. ay	CV-HPMCK100M2 2.ay	CV-HPMCK100M2 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**CV-HPMCK100M2 Başlangıç**	**CV-HPMCK100M2 1. ay**	**CV-HPMCK100M2 2.ay**	**CV-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	4.18	4.16	4.14	4.21
25°C/%60 bağıl nem	4.18	4.19	4.19	4.18
40°C/%75 bağıl nem	4.18	5.69	5.71	5.77
Viskozite (cP)	**CV-HPMCK100M2 Başlangıç**	**CV-HPMCK100M2 1. ay**	**CV-HPMCK100M2 2.ay**	**CV-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	1087±7	1083±15	1083±11	1078±19
25°C/%60 bağıl nem	1087±7	1098±17	1091±10	1053±13
40°C/%75 bağıl nem	1087±7	952±12	941±11	952±10
Miktar Tayini (mg/mL)	**CV-HPMCK100M2 Başlangıç**	**CV-HPMCK100M2 1. ay**	**CV-HPMCK100M2 2.ay**	**CV-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.01±0.11	5.02±0.30	5.02±0.31	5.02±0.11
25°C/%60 bağıl nem	5.01±0.14	5.04±0.32	5.03±0.34	5.03±0.41
40°C/%75 bağıl nem	5.01±0.10	4.88±0.34	4.63±0.80	4.61±0.64

Tablo 44. CV-HP407 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	CV-HP407 Başlangıç	CV-HP407 1. ay	CV-HP407 2.ay	CV-HP407 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**CV-HP407 Başlangıç**	**CV-HP407 1. ay**	**CV-HP407 2.ay**	**CV-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.05	5.06	5.11	5.08
25°C/%60 bağıl nem	5.05	5.08	5.13	5.10
40°C/%75 bağıl nem	5.05	6.35	6.78	6.83
Viskozite (cP)	**CV-HP407 Başlangıç**	**CV-HP407 1. ay**	**CV-HP407 2.ay**	**CV-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	967±14	974±16	970±10	972±15
25°C/%60 bağıl nem	967±14	960±10	956±11	959±11
40°C/%75 bağıl nem	967±14	885±19	879±13	880±14
Miktar Tayini (mg/mL)	**CV-HP407 Başlangıç**	**CV-HP407 1. ay**	**CV-HP407 2.ay**	**CV-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.10±0.21	5.12±0.21	5.11±0.11	5.13±0.50
25°C/%60 bağıl nem	5.10±0.23	5.10±0.30	5.09±0.43	5.12±0.62
40°C/%75 bağıl nem	5.10±0.24	4.81±0.43	4.73±0.12	4.56±0.44

Sonuç formülasyon olarak seçilen jellerin stabilite testleri sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde:

- ✶ Bütün formülasyonların her üç saklama koşulunda da 3 ay boyunca şeffaf görüntüsünü kaybetmediği görülmüştür.
- ✶ Bu formülasyonların pH değerlerine bakıldığında, başlangıçtaki değere göre özellikle 4°C'de ve 25°C saklanan jellerin pH değerinde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$). Ancak 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jel formülasyonlarının pH değerlerindeki artış anlamlıdır (t-test, $p<0.05$).
- ✶ Jellerin viskozite değerleri değerlendirildiğinde yine 4°C'de ve 25°C'de saklanan jellerin viskozitesinde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$), ancak 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jelllerin viskozite değeri başlangıca göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (t-test, $p<0.05$).
- ✶ Miktar tayini testi değerlendirildiğinde ise sadece 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jellerin içindeki CV miktarındaki azalmanın anlamlı olduğu bulunmuştur (t-test, $p<0.05$), diğer saklama koşullarında bekletilen jellerde ise etkin madde miktarı açısından anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$).

Stabilite testlerinin sonucunda vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan ve CV içeren biyoadezif jellerin oda sıcaklığında ve 4°C'de stabil olduğu özelliklerinin değişmediği ancak 40°C/%75 bağıl nem ortamında stabil olmadığı bulunmuştur.

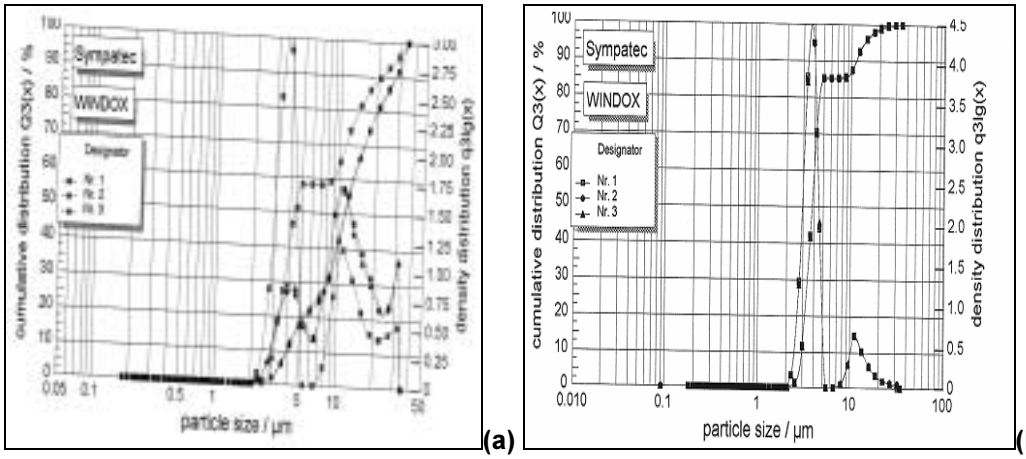
4.3.2. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.6'da hazırlanma yöntemleri anlatılan toplam 8 adet lipozom formülasyonunun karakterizasyon çalışması birlikte yapılmıştır.

4.3.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular

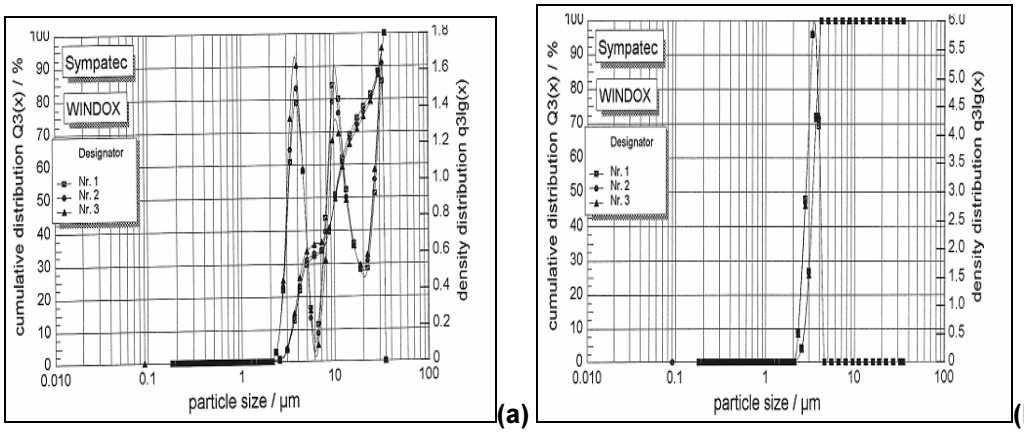
Çalışmamızda ekstruksiyon yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçülmüştür.

- Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan ve etkin madde içermeyen F1 lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden önce ve sonraki partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 48'de gösterilmiştir.



Şekil 48. F1 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki(b) partikül büyüklüğü dağılımı.

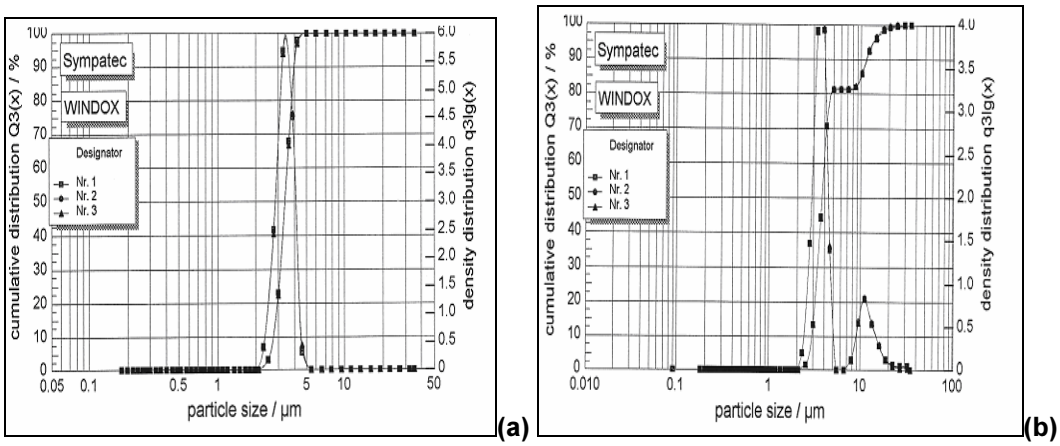
- CV içeren, film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-F2 lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden önceki (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 49'da gösterilmiştir.



Şekil 49. CV-F2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı.

Şekil 48 ve 49'da görüldüğü gibi film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü dağılımı homojen değildir. Bu durumun etkin maddenin lipozomlardan salımını etkileyerek, düzensizleştireceği ve bu nedenle tekrarlanabilir olmayacağı düşünülerek ekstruksiyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem lipozomların belli bir partikül büyüklüğü olan membrandan geçirilmesi ile yapılmaktadır. Lipozomlar membranın bir tarafından diğer tarafına 11 defa geçirilmiştir. Böylece partikül dağılımı küçülmüş ve homojen hale getirilmiştir. Lipozomların ekstruksiyon işleminden önce ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 10 µm civarındayken ekstruksiyon işleminden sonra bu değer ~3 µm civarına düşmüştür (Tablo 31).

- Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve etkin madde içermeyen P1 (a) ve etkin madde içeren CV-P2 (b) lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden önceki partikül büyüklüğü dağılımı Laser-Diffraction Particle Sizer ile ölçülmüş ve dağılım Şekil 50'de gösterilmiştir.



Şekil 50. P1 (a) ve CV-P2 (b) lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önceki partikül büyüklüğü dağılımı.

Bu yöntem ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü dağılımı ekstruksiyon işleminin öncesinde ve sonrasında oldukça dar bir aralıkta olup son derece homojendir. Ekstruksiyon işleminden önce lipozomların ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 3 µm civarındayken ekstruksiyon yapıldıktan sonra lipozomların partikül büyüklüğü nm boyutuna inmiştir. Partikül büyüklüğündeki değişmenin lipozom jel formülasyonunun farmasötik özelliklerini etkileyeceği ve etkin madde salımını değiştireceği düşünülmektedir.

- Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve etkin madde içermeyen P1 ve etkin madde içeren CV-P2 lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden sonraki partikül büyüklüğü nm boyutunda olduğu için dağılım Malvern Zeta Sizer ile ölçülmüş ve Tablo 49'da gösterilmiştir.

- Hazırlanan lipozom formülasyonlarının hepsinin partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve polidispersite indeksler (PI) Tablo 45'de verilmiştir.

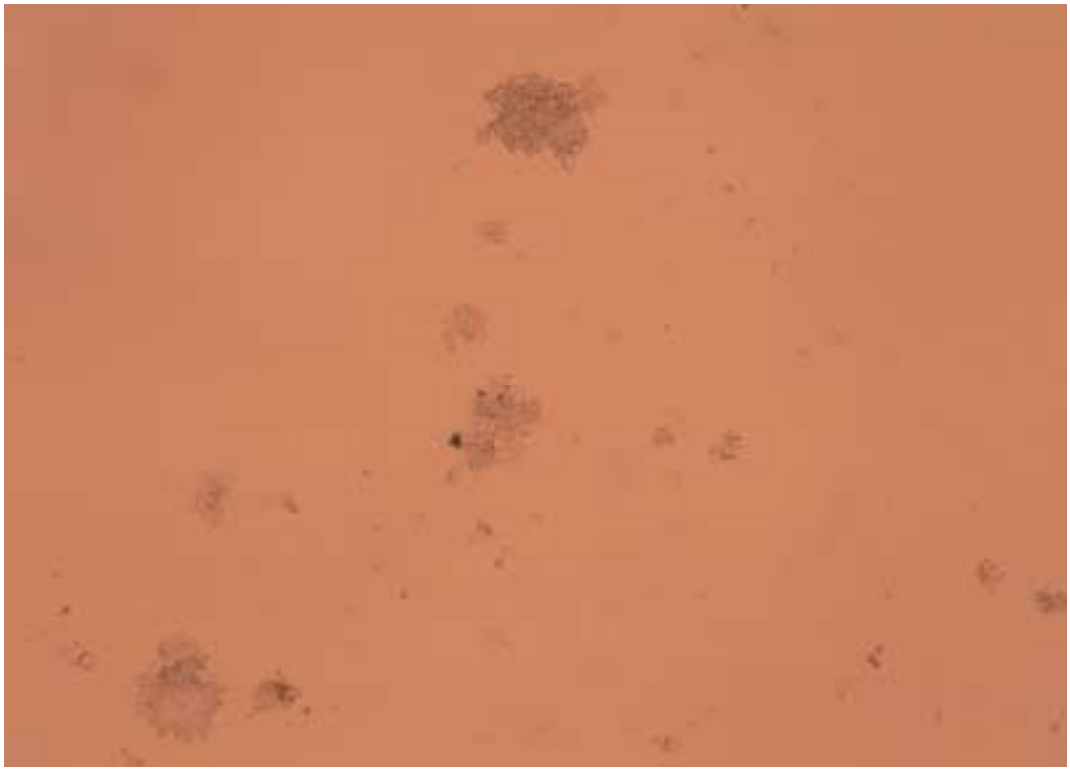
Tablo 45. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri

	Ekstruksiyondan Önce			Ekstruksiyondan Sonra		
	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ	POLİDİSTERSİTE INDEKS	ZETA POTANSİYELİ	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ	POLİDİSPERSİTE INDEKS	ZETA POTANSİYELİ
F1	10.1 ± 0.1 µm	0.154 ± 0.034	-8.86 ±0.73 mV	3.78±0.32 µm	0.126 ± 0.051	-8.72 ±0.48 mV
CV-F2	10.3 ± 0.2 µm	0.171 ± 0.054	-5.51±0.18 mV	3.91±0.09 µm	0.163 ± 0.032	-5.16±0.23 mV
P1	3.22±0.08 µm	0.123 ± 0.045	-0.475 ±0.045 mV	286.2 ±0.8 nm	0.118 ± 0.067	-0.522 ±0.171 mV
CV-P2	3.37±0.32 µm	0.149 ± 0.025	-0.585±0.765 mV	298.7±0.9 nm	0.138 ± 0.056	-0.488±0.354 mV
CV-FS1	27.4±0.2 µm	0.856 ± 0.092	47.12±3.19 mV	9.35±0.25 µm	0.487 ± 0.082	49.32±2.49 mV
CV-FS2	12.3±0.2 µm	0.412 ± 0.087	55.24±10.1 mV	3.97±0.02 µm	0.317 ± 0.061	53.16±1.81 mV
CV-PS1	2.15±0.3 µm	0.963 ± 0.077	2.88±0.215 mV	326±9 nm	0.761 ± 0.083	2.54±0.405 mV
CV-PS2	2.76±0.44 µm	0.276 ± 0.013	33.43±2.61 mV	315±5 nm	0.219 ± 0.063	30.83±2.79 mV

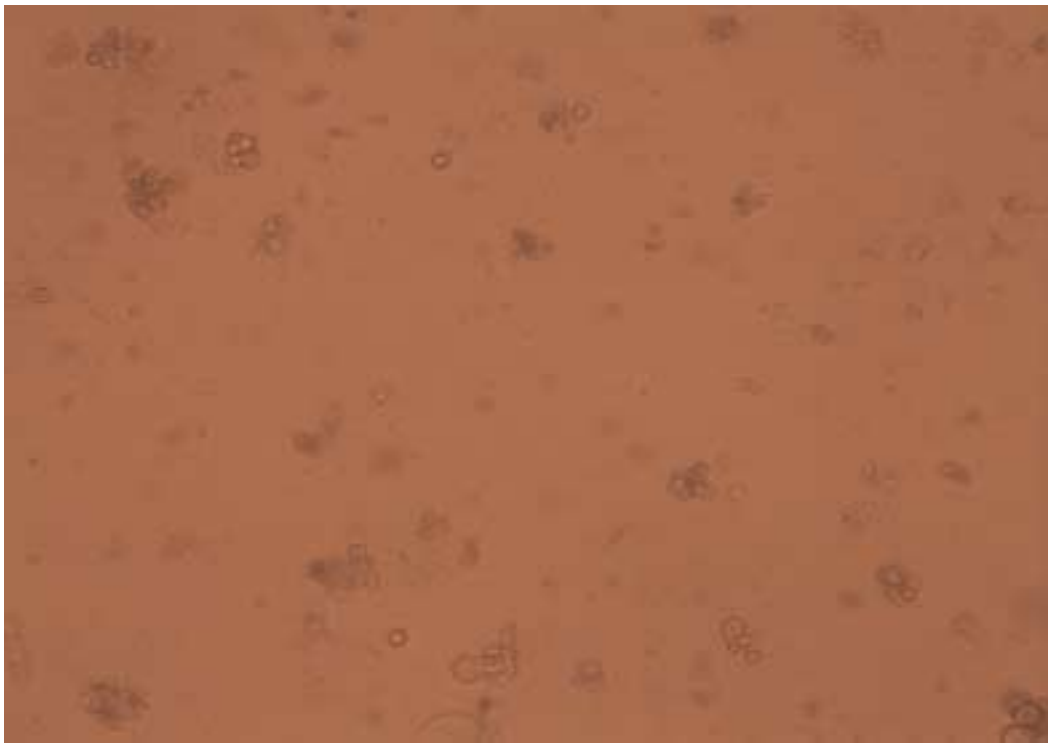
Lipozomların zeta potansiyellerine bakıldığında stearilamin (SA) içermeyen lipozomların zeta potansiyelinin negatif, SA içerenlerin ise pozitif olduğu görülmektedir. SA içeren lipozomların zeta potansiyellerinin istenildiği gibi dar homojen bir aralıkta ve pozitif değerde oldukları görülmektedir.

4.3.2.2. Lipozomların Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntülerine Ait Bulgular

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan F1 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işlemi öncesi ve sonrası ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 51a ve 51b'de gösterilmiştir.



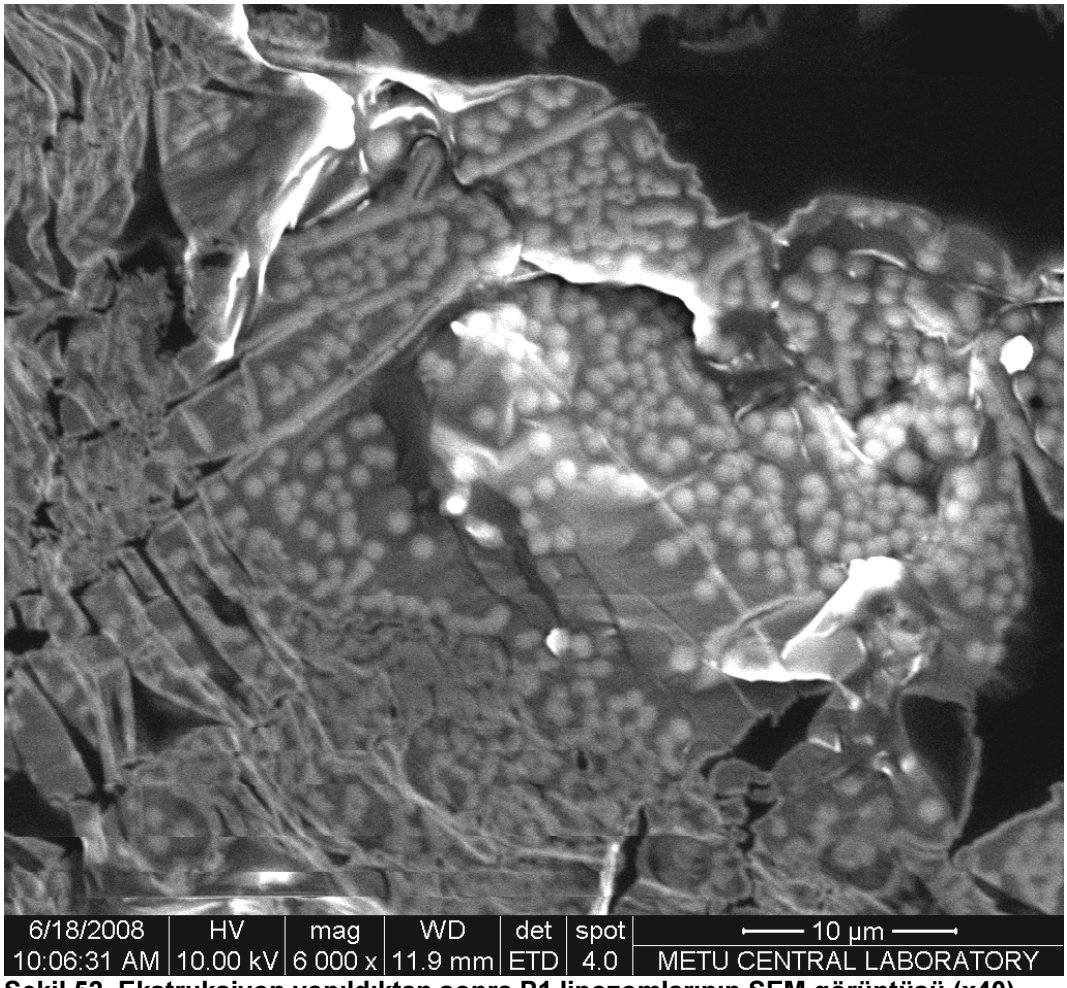
Şekil 51a. Ekstruksiyon yapılmadan önce F1 lipozomlarının ışık mikroskobu görüntüsü (x40)



Şekil 51b. Ekstruksiyon yapıldıktan sonra F1 lipozomlarının ışık mikroskobu görüntüsü (x60)

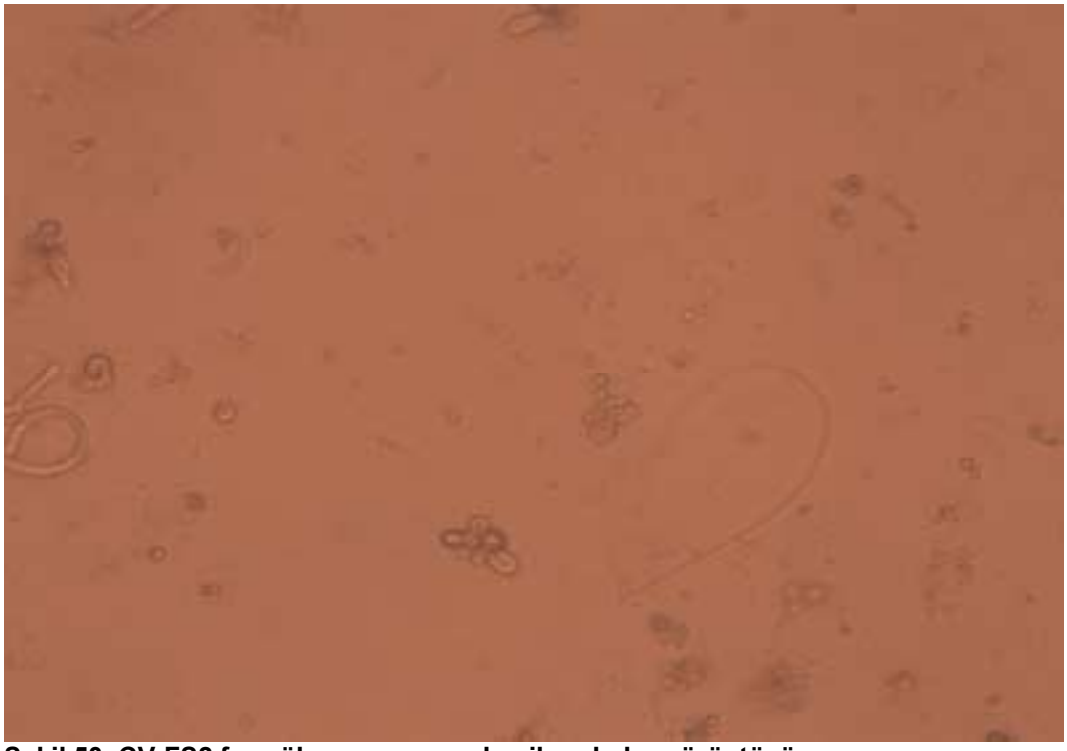
F1 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntülerinden hazırlanan lipozomların çok tabakalı lipozom oldukları anlaşılmıştır. Lipozomların çok tabakalı olması, ilacı tabakalarının arasına alması ve ilacı yavaş salması açısından avantaj oluşturacağı düşünülmektedir.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar nm boyutunda oldukları için mikroskop görüntüleri elde edilememiştir. SEM görüntüleri çekilmiştir. P1 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işlemi sonrasında SEM görüntüsü Şekil 52'de gösterilmiştir. SEM görüntüleme çalışmaları ODTÜ merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

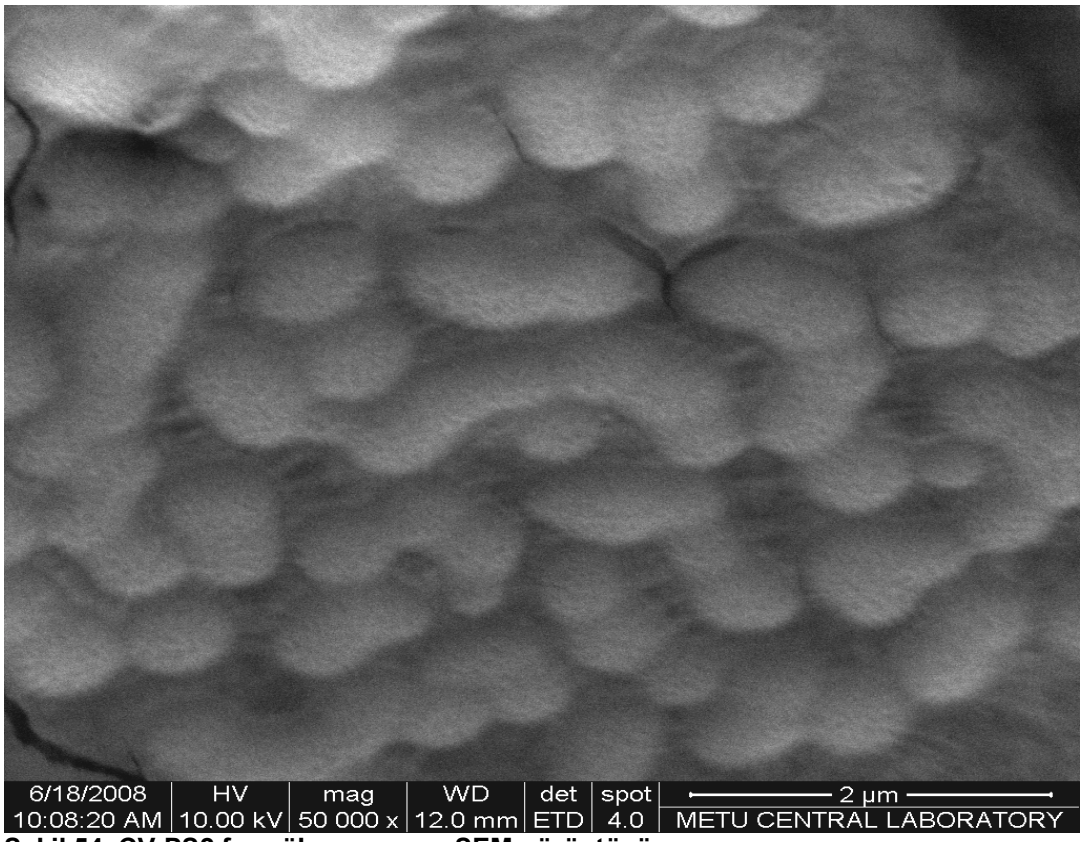


Şekil 52. Ekstruksiyon yapıldıktan sonra P1 lipozomlarının SEM görüntüsü (x40)

CV içeren CV-FS2 lipozomunun görüntüleri polarize ataşmanlı LEICA DMEP adlı mikroskop ile, CV-PS2 lipozomunun görüntüsü de SEM ile alınmıştır (Şekil 53-54).



Şekil 53. CV-FS2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü



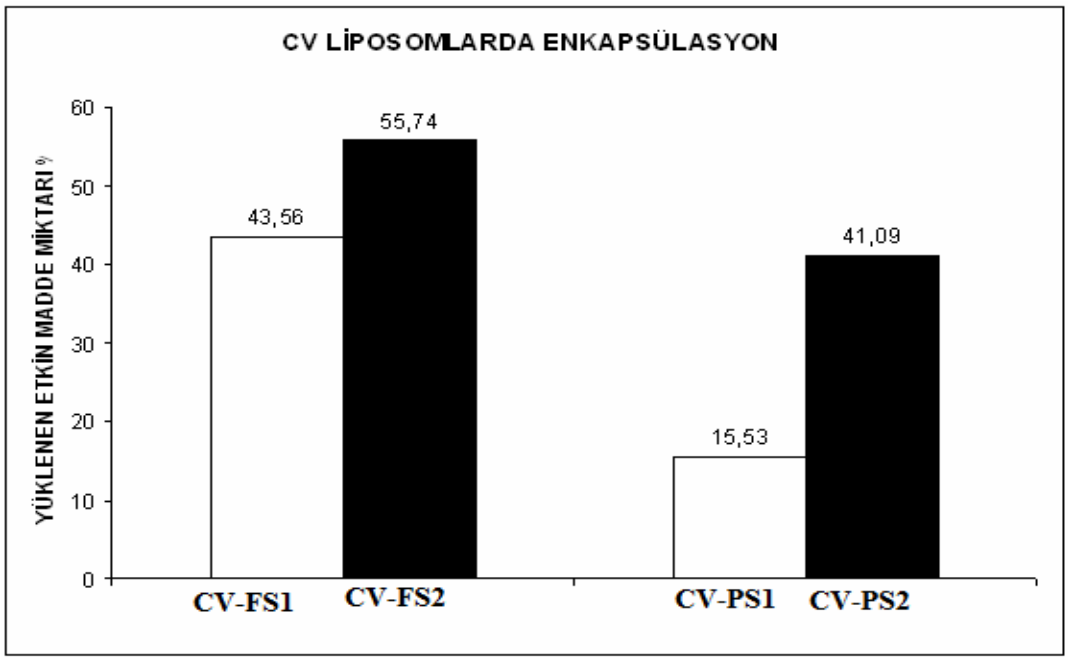
Şekil 54. CV-PS2 formülasyonunun SEM görüntüsü

4.3.2.3. Lipozomların Yükleme Kapasitesine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.7.6'da anlatıldığı gibi yapılan çalışmanın sonunda cidofovirin film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-F2 lipozomlarının içinde tutulma oranı yapılan iki farklı miktar tayini yöntemi ile % 52.4±3.7 ve % 53.2±2.9 olarak bulunmuştur. Lipozomlar içine hapsedilen etkin madde miktarı kullanılan lipidin tip ve bileşimine, maddenin partisyon katsayısına ve lipozomların hazırlama yöntemlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Aynı çalışma CV-P2 lipozomu için yapıldığında cidofovirin lipozom içinde tutulma oranı % 24.7±1.2 ve % 26.4±1.9'dur. Poliol dilüsyon yönteminin film-hidrasyon yöntemine göre daha düşük yükleme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Daha sonra yapılan çalışmalarda lipozom bileşenlerinin molar oranları değiştirilmiş ve hazırlama yöntemine dondurarak çözme aşaması ilave edilmiştir. Bu değişiklikler sonucunda oluşan CV-FS1, CV-FS2, CV-PS1 ve CV-PS2 formülasyonlarının yükleme kapasitesi sonuçları Şekil 55'de verilmiştir.



Şekil 55. CV içeren CV-FS1, CV-FS2, CV-PS1 ve CV-PS2 lipozomlarında % yükleme kapasitesi

Hazırlama işleminde dondurarak çözme aşaması bulunan CV-FS2 ve CV-PS2 lipozom formülasyonlarımızın yükleme kapasitesi CV-FS1 ve CV-PS1'e göre daha yüksektir. Bu sonuca göre hazırlama aşamasında dondurup çözme basamağının eklenmesi ile yükleme kapasitesi kısmen artırılmıştır.

4.3.2.4. Lipozomların Stabilitesine Ait Bulgular

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan F1(boş lipozom) ve CV-F2 (CV içeren lipozom) lipozomlarının partikül büyüklüğünün ve zeta potansiyelinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla, lipozomlar farklı saklama koşullarında (4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde) 3 ay bekletilmiş ve partikül büyüklüğü ile zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Sonuçları Tablo 46'da verilmiştir.

Tablo 46. F1 ve CV-F2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışması boyunca ölçülen partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	F1 1.Gün	F1 7.Gün	F1 14.Gün	F1 21.Gün	F1 1.Ay	F1 2.Ay	F1 3.Ay
4°C/ortam nemi	3.78±0.11	3.81±0.22	3.85±0.30	3.84±0.05	3.78±0.15	3.88±0.55	3.84±0.14
25°C/%60 bağıl nem	3.78±0.32	3.77±0.13	3.75±0.12	3.84±0.08	3.91±0.83	4.05±0.02	4.24±0.18
40°C/%75 bağıl nem	3.78±0.10	3.81±0.21	3.87±0.11	3.85±0.06	3.98±0.21	4.27±0.31	4.55±0.16
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	**CV-F2 1.Gün**	**CV-F2 7.Gün**	**CV-F2 14.Gün**	**CV-F2 21.Gün**	**CV-F2 1.Ay**	**CV-F2 2.Ay**	**CV-F2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	3.31±0.04	3.33±0.02	3.35±0.21	3.36±0.05	3.43±0.62	3.45±0.81	3.46±0.09
25°C/%60 bağıl nem	3.31±0.09	3.35±0.04	3.38±0.13	3.41±0.07	3.55±0.08	3.98±0.03	4.01±0.09
40°C/%75 bağıl nem	3.31±0.05	3.4±0.01	3.39±0.19	3.42±0.04	3.68±0.08	4.19±0.29	4.42±0.05
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**F1 1.Gün**	**F1 7.Gün**	**F1 14.Gün**	**F1 21.Gün**	**F1 1.Ay**	**F1 2.Ay**	**F1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	-8.72 ±0.73	-10.42±0.71	-10.0±0.64	-10.3±0.47	-10.1±0.11	-9.03±0.74	-10.1±0.27
25°C/%60 bağıl nem	-8.72 ±0.73	-7.96 ±0.63	-19.24±0.37	-23.38±0.36	-17.2 ±0.33	-19.36±0.57	-22.44±0.33
40°C/%75 bağıl nem	-8.72 ±0.73	-20.71±0.84	-25.99±0.12	-27.62±0.63	-23.1±0.18	-35.32±0.42	-40.12±0.73
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-F2 1.Gün**	**CV-F2 7.Gün**	**CV-F2 14.Gün**	**CV-F2 21.Gün**	**CV-F2 1.Ay**	**CV-F2 2.Ay**	**CV-F2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	-5.16±0.18	-6.32±0.59	-6.94±0.73	-7.19±0.53	-7.52±0.19	-7.44±0.77	-7.59±0.19
25°C/%60 bağıl nem	-5.16±0.18	-8.63±0.23	-12.16±0.92	-14.15±0.12	-13.1±0.73	-14.26±0.22	-14.48±0.72
40°C/%75 bağıl nem	-5.16±0.18	-11.69±0.18	-19.31±0.79	-22.51±0.39	-26.7±0.54	-29.62±0.19	-33.92±0.56

F1 ve CV-F2 formülasyonlarının partikül büyüklüğü ölçümü değerlerine ve güven aralığı verilerine bakıldığında, partiküllerin oldukça homojen ve birbirine yakın büyüklükte olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle 4°C'de saklanan lipozomların partikül büyüklüğünde 3 ayın sonunda anlamlı bir artış gözlenmemiştir (t-test, p>0.05). Aynı şekilde lipozomların zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde 4°C/ortam nemi ve 25°C/%60 bağıl nem içeren ortamlarda zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişme bulunamamıştır (t-test, p>0.05), ancak 40°C/%75 bağıl nemde içeren ortamda saklanan F1 ve CV-F2 lipozomlarının zeta potansiyel değerlerindeki değişim anlamlıdır (t-test, p<0.05).

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan P1(boş lipozom) ve CV-P2 (CV içeren lipozom) lipozom formülasyonlarının aynı ortamlarda yapılan stabilite çalışmasının sonunda bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Tablo 47'de verilmiştir.

Tablo 47. P1 ve CV-P2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	**P1 1.Gün**	**P1 7.Gün**	**P1 14.Gün**	**P1 21.Gün**	**P1 1.Ay**	**P1 2.Ay**	**P1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	286.2±0.8	281.0±0.3	289.4±0.7	288.4±0.5	283.2±0.3	290.1±0.5	293.1±0.0
25°C/%60 bağıl nem	286.2±0.8	277.7±0.5	278.6±0.3	294.3±0.9	299.1±0.8	305.6±0.0	324.2±0.8
40°C/%75 bağıl nem	286.2±0.8	288.1±0.4	287.9±0.1	295.8±0.4	308.2±0.4	327±0.21	355.1±0.6
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	**CV-P2 1.Gün**	**CV-P2 7.Gün**	**CV-P2 14.Gün**	**CV-P2 21.Gün**	**CV-P2 1.Ay**	**CV-P2 2.Ay**	**CV-P2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	251.7±0.9	260.6±0.6	258.1±0.2	256.4±0.0	253.2±0.3	255.1±0.2	357.6±0.1
25°C/%60 bağıl nem	251.7±0.9	230.8±0.2	225.3±0.3	225.8±0.0	255.4±0.0	278.1±0.0	391.2±0.1
40°C/%75 bağıl nem	251.7±0.9	229.5±0.4	225.9±0.1	228.7±0.4	268.3±0.8	286.1±0.2	402.1±0.2
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**P1 1.Gün**	**P1 7.Gün**	**P1 14.Gün**	**P1 21.Gün**	**P1 1.Ay**	**P1 2.Ay**	**P1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	-0.475 ±0.045	-0.42±0.11	-1.00±0.03	-1.03±0.65	-1.02±0.19	-1.03±0.64	-1.08±0.77
25°C/%60 bağıl nem	-0.475 ±0.045	-0.52 ±0.69	-0.547±0.98	-0.88±1.13	-0.76±0.13	-0.96±0.37	-1.04±0.13
40°C/%75 bağıl nem	-0.475 ±0.045	-0.67±0.26	-1.04±0.76	-1.84±0.13	-1.82±0.18	-1.92±0.52	-2.12±0.48
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-P2 1.Gün**	**CV-P2 7.Gün**	**CV-P2 14.Gün**	**CV-P2 21.Gün**	**CV-P2 1.Ay**	**CV-P2 2.Ay**	**CV-P2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	-0.585±0.765	-0.84±0.72	-0.811±0.454	-0.917±0.981	-0.981±0.193	-1.04±0.47	-1.58±0.39
25°C/%60 bağıl nem	-0.585±0.765	-0.643±1.542	-0.757±0.821	-0.626±0.293	-0.753±0.932	-0.809±0.023	-0.818±0.223
40°C/%75 bağıl nem	-0.585±0.765	-1.18±0.33	-1.31±0.79	-2.51±0.65	-2.79±0.44	-3.02±0.09	-3.72±0.36

P1 ve CV-P2 formülasyonlarının partikül büyüklüğü ölçümü değerlerine bakıldığında ve hesaplanan P değerleri incelendiğinde her üç sıcaklıkta da tüm lipozomların partikül büyüklüğünde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme yoktur (t-test, $p>0.05$). P1 ve CV-P2 lipozom formülasyonlarının zeta potansiyelleri, stabilite çalışması sonucunda, 40°C'de saklanan P1 formülasyonunda ve 25°C ile 40°C'de saklanan CV-P2 formülasyonunda anlamlı değişme göstermektedir (t-test, $p<0.05$).

Film-hidrasyon yöntemi ile farklı lipit oranları kullanılarak hazırlanan CV-FS1 ve yine farklı lipit oranına sahip ayrıca dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan CV-FS2'nin stabilite çalışmasında bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 48'de verilmiştir.

Tablo 48. CV-FS1 ve CV-FS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	CV-FS1 1.Gün	CV-FS1 7.Gün	CV-FS1 14.Gün	CV-FS1 21.Gün	CV-FS1 1.Ay	CV-FS1 2.Ay	CV-FS1 3.Ay
4°C/ortam nemi	9.35±0.25	9.88±0.65	9.76±0.76	9.45±0.06	9.42±0.12	9.88±0.05	9.94±0.04
25°C/%60 bağıl nem	9.35±0.25	9.92±0.33	9.95±0.87	9.44±0.05	9.98±0.13	9.93±0.01	9.66±0.16
40°C/%75 bağıl nem	9.35±0.25	9.69±0.32	9.87±0.91	9.97±0.03	9.98±0.11	9.91±0.11	10.02±0.06
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	**CV-FS2 1.Gün**	**CV-FS2 7.Gün**	**CV-FS2 14.Gün**	**CV-FS2 21.Gün**	**CV-FS2 1.Ay**	**CV-FS2 2.Ay**	**CV-FS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	3.97±0.02	3.83±0.06	4.07±0.11	4.16±0.07	4.13±0.22	4.15±0.21	4.16±0.05
25°C/%60 bağıl nem	3.97±0.02	4.05±0.03	4.18±0.03	4.31±0.04	4.25±0.06	4.28±0.06	4.31±0.04
40°C/%75 bağıl nem	3.97±0.02	4.08±0.02	4.29±0.09	4.42±0.06	4.48±0.11	4.59±0.09	4.65±0.03
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-FS1 1.Gün**	**CV-FS1 7.Gün**	**CV-FS1 14.Gün**	**CV-FS1 21.Gün**	**CV-FS1 1.Ay**	**CV-FS1 2.Ay**	**CV-FS1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	49.32 ±2.49	49.22±0.41	49.21±0.24	49.30±0.37	49.11±0.19	49.04±0.53	49.03±0.39
25°C/%60 bağıl nem	49.32 ±2.49	49.26±0.43	49.24±0.17	49.28±0.30	49.16 ±0.23	49.08±0.65	49.04±0.37
40°C/%75 bağıl nem	49.32 ±2.49	49.17±0.36	49.39±0.02	49.12±0.13	49.02±0.08	48.89±0.19	48.32±0.13
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-FS2 1.Gün**	**CV-FS2 7.Gün**	**CV-FS2 14.Gün**	**CV-FS2 21.Gün**	**CV-FS2 1.Ay**	**CV-FS2 2.Ay**	**CV-FS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	53.16±11.82	53.02±0.28	52.97±0.09	52.89±0.13	52.79±0.67	52.23±0.45	52.19±0.29
25°C/%60 bağıl nem	53.16±11.83	53.03±0.19	52.87±0.12	52.75±0.02	52.63±0.13	52.56±0.12	52.35±0.62
40°C/%75 bağıl nem	53.16±11.84	52.98±0.08	52.77±0.14	52.55±0.46	51.92±0.87	51.68±0.32	51.12±0.26

CV-FS1 ve CV-FS2 lipozom formülasyolarının farklı saklama koşullarında partikül büyüklüğü incelendiğinde ve P değeri

hesaplandığında bütün değerlerin 0.05'den büyük olduğu bulunmuştur (test, p>0.05), yani partikül büyüklüğündeki değişme anlamlı değildir.

Poliol-dilüsyon yöntemi ile farklı lipit oranları kullanılarak hazırlanan CV-PS1 ve yine farklı lipit oranına sahip ayrıca dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan CV-PS2'nin stabilite çalışmasında bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 49'da verilmiştir.

Tablo 49. CV-PS1 ve CV-PS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV).

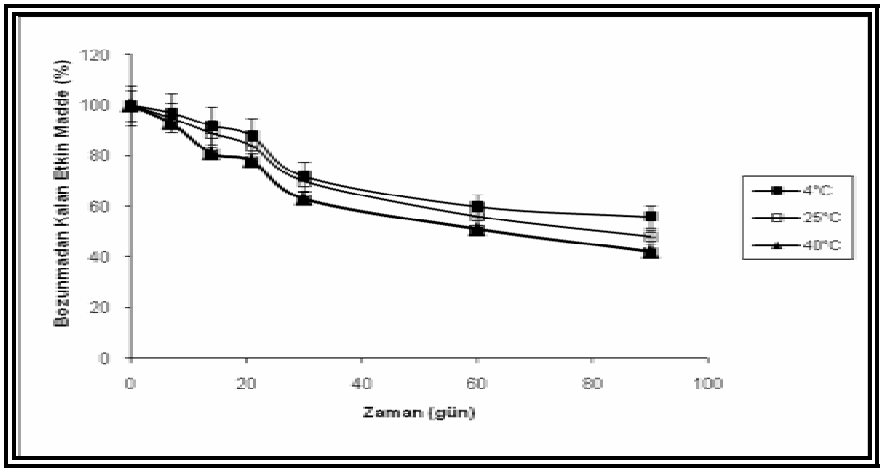
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	CV-PS1 1.Gün	CV-PS1 7.Gün	CV-PS1 14.Gün	CV-PS1 21.Gün	CV-PS1 1.Ay	CV-PS1 2.Ay	CV-PS1 3.Ay
4°C/ortam nemi	326±9	328±7	330±9	331±5	332±5	331±5	330±4
25°C/%60 bağıl nem	326±9	325±6	327±6	329±8	330±3	329±2	330±8
40°C/%75 bağıl nem	326±9	342±9	355±5	362±6	371±4	383±5	398±6
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	**CV-PS2 1.Gün**	**CV-PS2 7.Gün**	**CV-PS2 14.Gün**	**CV-PS2 21.Gün**	**CV-PS2 1.Ay**	**CV-PS2 2.Ay**	**CV-PS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	315±5	313±2	315±1	316±5	313±2	318±8	316±9
25°C/%60 bağıl nem	315±5	315±4	318±3	317±7	320±8	322±3	322±9
40°C/%75 bağıl nem	315±5	311±1	313±9	312±4	315±8	316±9	317±5
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-PS1 1.Gün**	**CV-PS1 7.Gün**	**CV-PS1 14.Gün**	**CV-PS1 21.Gün**	**CV-PS1 1.Ay**	**CV-PS1 2.Ay**	**CV-PS1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	2.54 ±0.405	2.52±0.55	2.51±0.15	2.54±0.25	2.55±0.25	2.51±0.21	2.56±0.17
25°C/%60 bağıl nem	2.54 ±0.405	2.56 ±0.69	2.59±0.32	2.61±0.42	2.58 ±0.19	2.57±0.17	2.62±0.32
40°C/%75 bağıl nem	2.54 ±0.405	2.57±0.48	2.61±0.44	2.57±0.82	2.61±0.41	2.59±0.22	2.62±0.21
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**CV-PS2 1.Gün**	**CV-PS2 7.Gün**	**CV-PS2 14.Gün**	**CV-PS2 21.Gün**	**CV-PS2 1.Ay**	**CV-PS2 2.Ay**	**CV-PS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	30.83±2.79	30.15±1.54	30.14±0.54	30.19±0.76	30.25±0.65	30.42±0.52	30.59±0.15
25°C/%60 bağıl nem	30.83±2.79	30.63±0.76	30.55±0.45	30.61±0.37	30.66±0.93	30.76±0.62	30.98±0.12
40°C/%75 bağıl nem	30.83±2.79	30.77±0.89	30.81±0.66	30.01±0.54	30.26±0.94	30.62±0.29	30.92±0.96

CV-PS1 ve CV-PS2 formülasyonlarının stabilite çalışmalarında da zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü özellikleri açısından 3 ay boyunca anlamlı bir değişme olmadığı bulunmuştur (t-test, p>0.05). Lipozom formülasyonların stabilitesi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde en stabil formülasyonlar CV-PS1 ve CV-PS2 bulunmuştur.

Stabilite çalışmalarında lipozomların içinde bozulmadan kalan etkin maddenin miktar tayini de yapılmış ve etkin maddenin miktarındaki

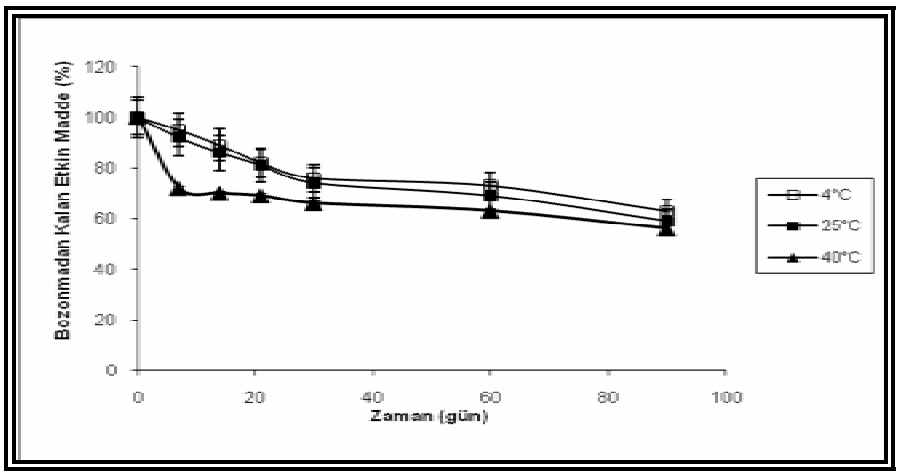
değişmeye bağlı olarak determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenmiştir. Elde edilen profiller kinetik açıdan incelenerek, lipozom formülasyonundaki etkin maddelerin bozunma kinetikleri belirlenmiştir.

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-F2 lipozomlarının içindeki CV miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zamana göre değişimi Şekil 56'da gösterilmiştir.



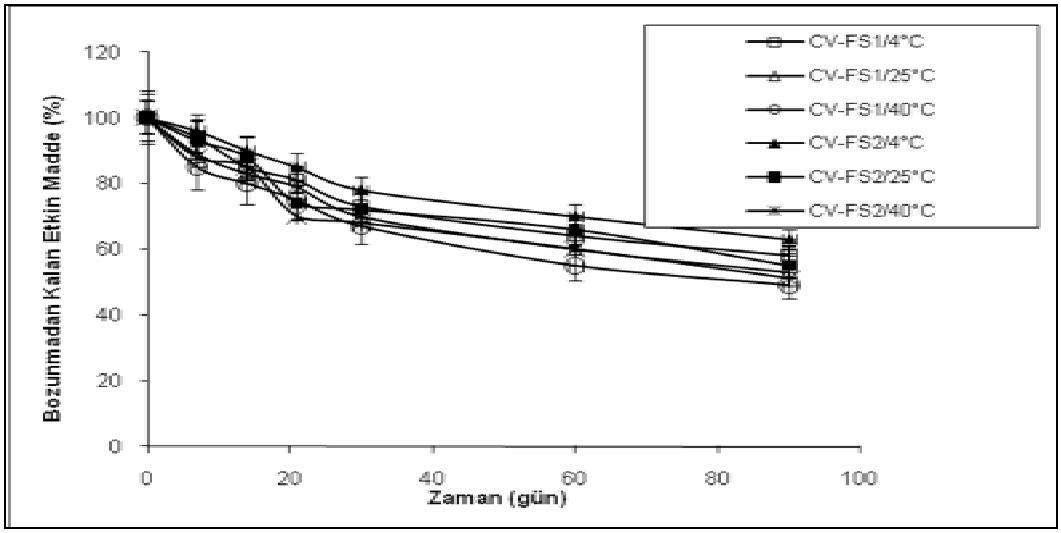
Şekil 56. Stabilite çalışmalarında CV-F2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi

Poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan, CV-P2 lipozomların içindeki CV miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zaman göre değişimi Şekil 57'de gösterilmiştir.



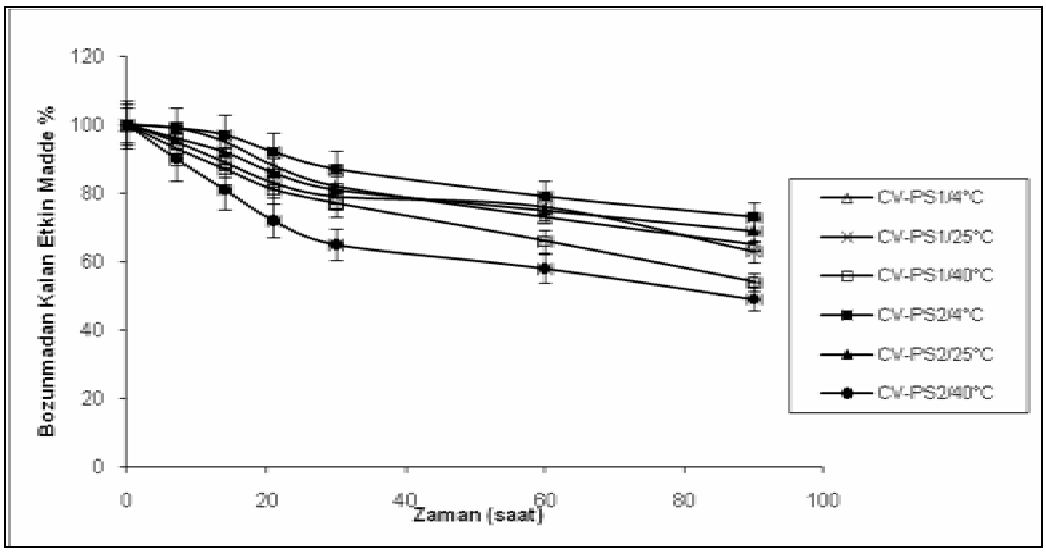
Şekil 57. Stabilite çalışmalarında CV-P2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan, fakat farklı lipit molar oranlarına sahip CV-FS1 ve dondurup çözme metodu ile hazırlanan CV-FS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zaman göre değişimi Şekil 58'de gösterilmiştir



Şekil 58. Stabilite çalışmalarında CV-FS1 ve CV-FS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi

Poliol-dilüsyon ile hazırlanan fakat farklı lipit molar oranlarına sahip CV-PS1 ve dondurup çözme metodu ile hazırlanan CV-PS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zamana göre değişimi Şekil 59'da gösterilmiştir



Şekil 59. Stabilite çalışmalarında CV-PS1 ve CV-PS2 lipozomlarının içindeki CV miktarının zamana göre değişimi

Stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen kinetik hesaplar film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için Tablo 50'de, poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için Tablo 51'de gösterilmiştir.

Tablo 50. CV-F2, CV-FS1 ve CV-FS2 lipozom formülasyonlarındaki CV stabilitesine ait parametreler

Reakiyon Derecesi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C_0)	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
CV-F2	**CV-F2**	**CV-F2**	**CV-F2**	**CV-F2**	**CV-F2**
Sıfır Derece	4	0.5290	97.5	0.9038	9223
	25	0.5979	96.4	0.9398	11295
	40	0.6337	92.7	0.9082	12063
Birinci Derece	4	0.0071	4.5918	0.9282	43136
	25	0.0085	4.5887	0.9702	40229
	40	0.0097	4.5510	0.9600	35876
İkinci Derece	4	$4X10^{-2}$	0.0099	0.9475	45136
	25	0.0001	0.0098	0.9872	44322
	40	0.0002	0.0101	0.9881	39601
CV-FS1	**CV-FS1**	**CV-FS1**	**CV-FS1**	**CV-FS1**	**CV-FS1**
Sıfır Derece	4	0.4487	93.5	0.8935	6143
	25	0.4838	91.6	0.9004	6829
	40	0.5117	89.2	0.8784	7379
Birinci Derece	4	0.0060	4.5452	0.9347	41026
	25	0.0067	4.5276	0.9475	38205
	40	0.0075	4.5019	0.9382	35261
İkinci Derece	4	$5X10^{-8}$	0.0105	0.9659	45398
	25	$4X10^{-2}$	0.0106	0.979	42344
	40	0.0001	0.0109	0.9767	39146
CV-FS2	**CV-FS2**	**CV-FS2**	**CV-FS2**	**CV-FS2**	**CV-FS2**
Sıfır Derece	4	0.4052	95.99	0.9281	5221
	25	0.4599	92.87	0.8615	6479
	40	0.4882	90.05	0.8420	6979
Birinci Derece	4	0.0051	4.5710	0.9564	44798
	25	0.0062	4.5386	0.9079	40125
	40	0.0069	4.5077	0.9018	36661
İkinci Derece	4	$5X10^{-7}$	0.0102	0.9774	49482
	25	$4X10^{-9}$	0.0105	0.9415	44422
	40	0.0001	0.0109	0.9465	40674

Bozunma reaksiyon kinetikleri incelenen ve uyum ölçütleri belirlenen film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanmış lipozomların içindeki CV'in ikinci derece kinetikle bozunduğu bulunmuştur. Üç ayın sonunda 4°C'de saklanan CV-F2, CV-FS1 ve CV-FS2 lipozomları içinde bozunmadan kalan CV miktarı sırasıyla % 56, % 58 ve % 63 olarak bulunmuştur. Ancak 40°C'de saklanan lipozomları içinde 3 ay sonunda kalan CV miktarı % 42, % 49 ve % 51'dir.

Tablo 51. CV'in CV-P2, CV-PS1 ve CV-PS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler

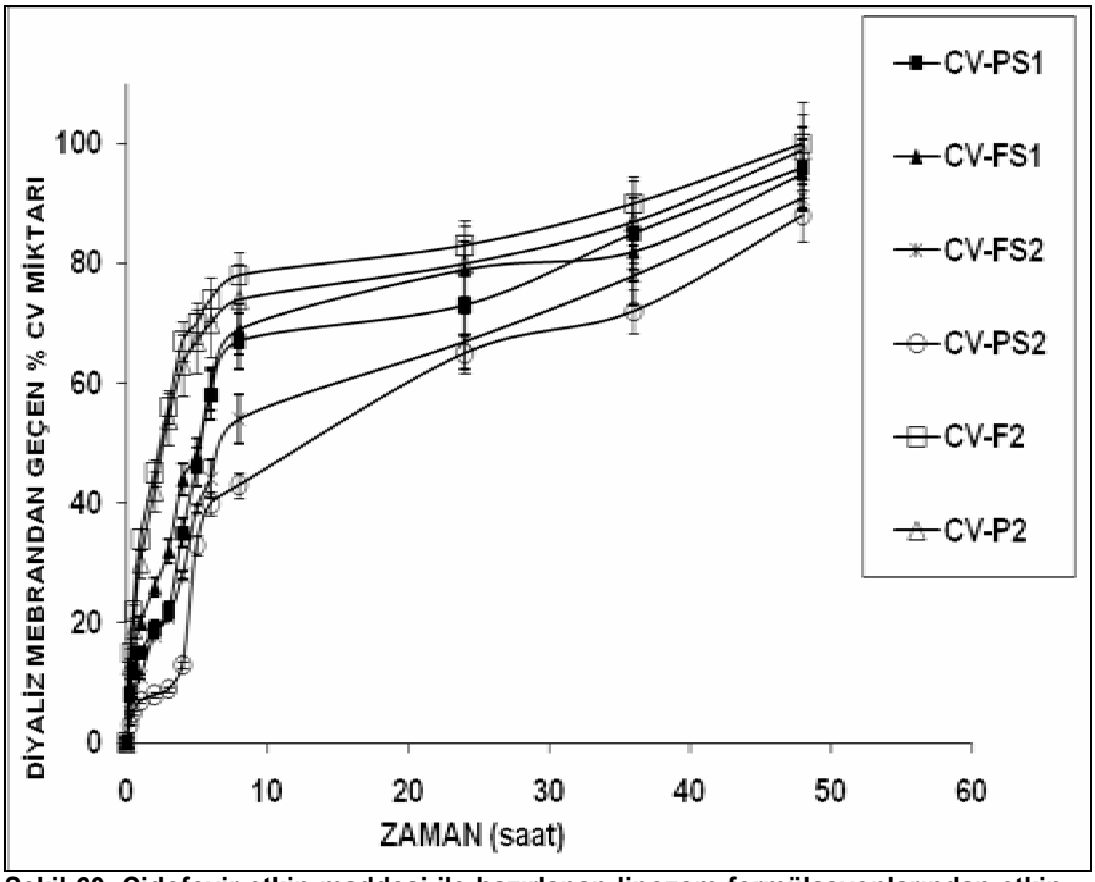
Reakiyon Derecesi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C_0)	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
CV-P2	**CV-P2**	**CV-P2**	**CV-P2**	**CV-P2**	**CV-P2**
Sıfır Derece	4	0.3791	94.565	0.8821	4537
	25	0.4119	93.207	0.8990	5135
	40	0.3198	80.999	0.5502	3119
Birinci Derece	4	0.0048	4.5545	0.9154	44068
	25	0.0054	4.5416	0.9378	41659
	40	0.0044	4.3869	0.6399	32390
İkinci Derece	4	$5X10^{-6}$	0.0104	0.9404	48731
	25	$4X10^{-7}$	0.0105	0.9639	46127
	40	$5X10^{-6}$	0.0125	0.7297	36293
CV-PS1	**CV-PS1**	**CV-PS1**	**CV-PS1**	**CV-PS1**	**CV-PS1**
Sıfır Derece	4	0.4053	98.852	0.9533	5514
	25	0.3681	95.245	0.9082	4294
	40	0.4798	94.931	0.9589	6996
Birinci Derece	4	0.0050	4.6014	0.9728	47950
	25	0.0046	4.5628	0.9327	45063
	40	0.0065	4.5668	0.9852	41596
İkinci Derece	4	$5X10^{-6}$	0.0099	0.9858	52836
	25	$4X10^{-6}$	0.0103	0.9456	49808
	40	$5X10^{-9}$	0.0102	0.993	45968
CV-PS2	**CV-PS2**	**CV-PS2**	**CV-PS2**	**CV-PS2**	**CV-PS2**
Sıfır Derece	4	0.3173	99.635	0.965	3489
	25	0.3348	96.189	0.9142	3640
	40	0.5151	89.907	0.8516	7720
Birinci Derece	4	0.0037	4.6062	0.9765	51585
	25	0.0041	4.5702	0.9396	47099
	40	0.0074	4.5074	0.9147	35892
İkinci Derece	4	$5X10^{-4}$	0.0099	0.985	56794
	25	$4X10^{-5}$	0.0103	0.9605	52010
	40	0.0001	0.0108	0.9599	39815

Uyum ölçütlerine göre poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların içindeki CV tüm saklama koşullarında ikinci derece kinetikle bozunmuştur. Üç ayın sonunda 4°C'de saklanan CV-P2, CV-PS1 ve CV-PS2 lipozomları içinde bozunmadan kalan CV miktarı sırasıyla % 63, % 65 ve % 73'dür. Bu değerler 40°C'de % 56, % 54 ve % 49 olarak bulunmuştur.

Bütün lipozomların bozunma özellikleri değerlendirildiğinde CV-PS2 lipozom formülasyonun en stabil formülasyon olduğu saptanmıştır.

4.3.2.5. Lipozom Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Hazırlanan lipozomlardan belli miktar tartılarak 12000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membrandan geçiş incelendi. Belli zaman aralıklarında örnekler alındı. Alınan örneklerden CV'in analizi spektrofotometrede 278.4 nm'de yapıldı. Sonuçlar standart doğru denkleminde yerine konularak diyaliz membrandan geçen etkin madde miktarı hesaplandı (Şekil 60).

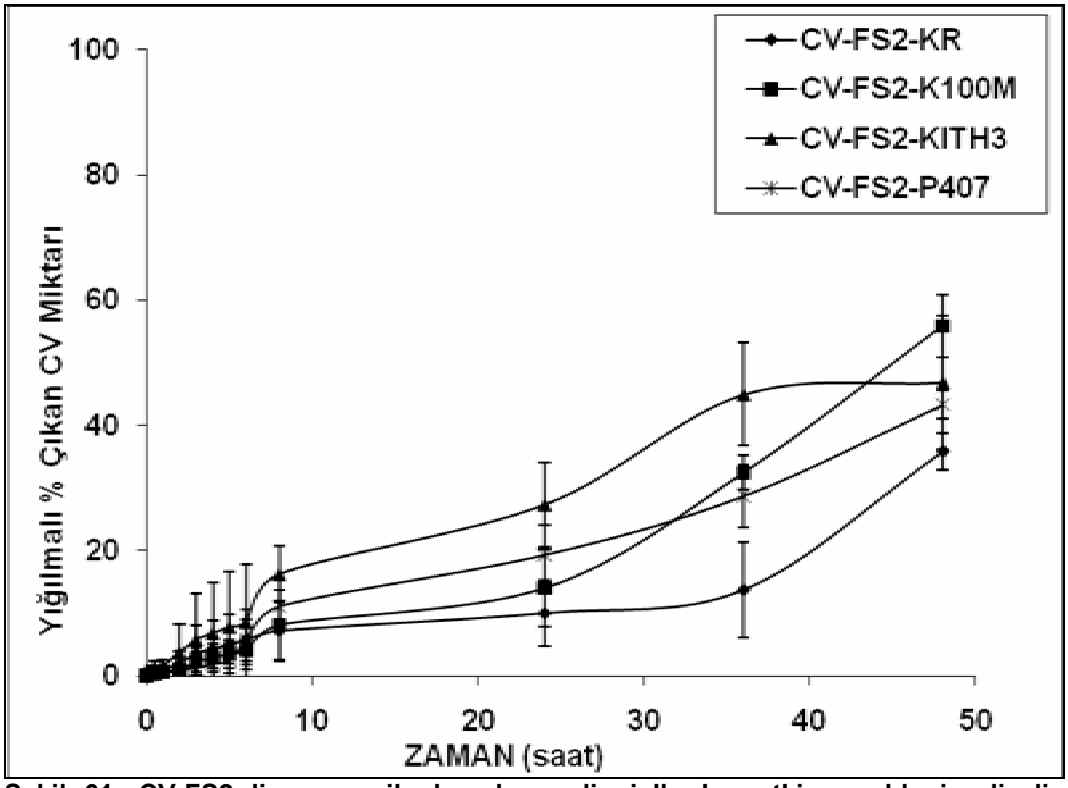


Şekil 60. Cidofovir etkin maddesi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarından etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Profilden de anlaşılacağı gibi 48 saatin sonunda lipozomlar içindeki etkin maddenin tamamına yakını salınmıştır. En az salım yapan formülasyon 48 saatin sonunda % 88.3±2.03 CV salan CV-PS2 lipozom formülasyonudur.

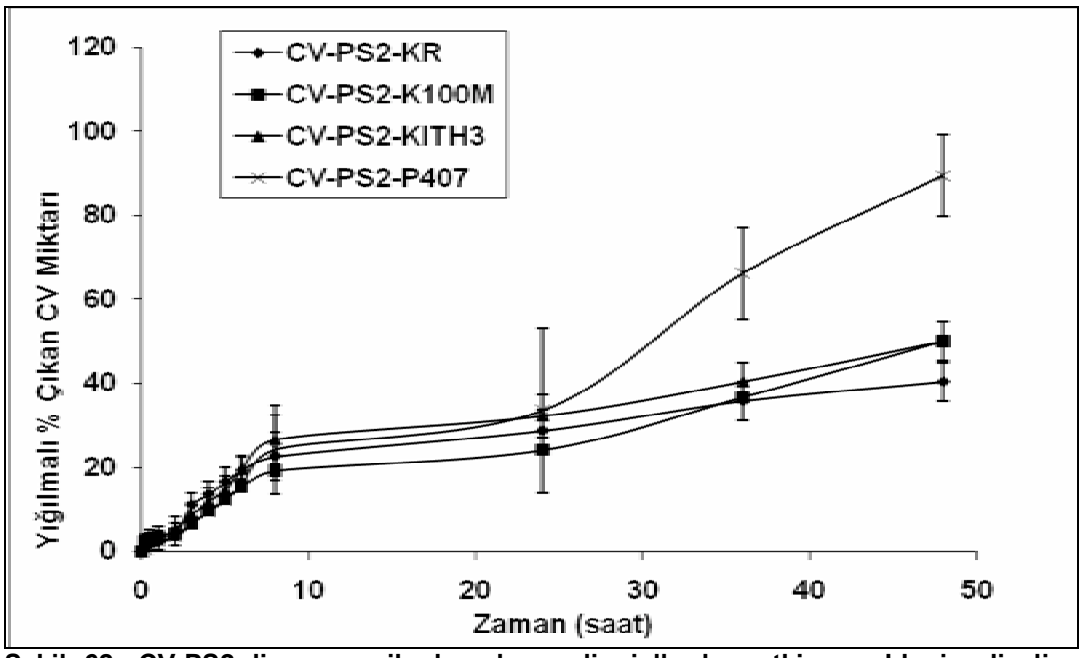
4.3.2.6. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.8'de kodları verilen lipojeller CV-FS2 ve CV-PS2 lipozomlarını taşımaktadır. Taşıyıcı olarak daha önce üzerinde çalıştığımız Carbopol, kitosan, HPMC, poloksamer jel kullanılmıştır. CV-FS2 ve CV-PS2 lipozomu içeren lipojellerden CV salım profilleri Şekil 61 ve 62'de verilmiştir.



Şekil 61. CV-FS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipojellerden salımın oldukça azaldığını ve kontrollü salımın sağlandığını görmekteyiz. Özellikle Carbopol ile hazırlanan lipojellerden salımın 48 saatin sonunda % 35.8±4.2 olduğu bulunmuştur. CV-FS2-K100M formülasyonundan ise ilk 8 saatin sonunda % 16.3±3.6 olduğu 48 saatin sonunda da % 55.9±5.2 olduğu bulunmuştur.



Şekil 62. CV-PS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipojellerden de salımın azaldığı ve en az salımın 48 saatin sonunda % 40.4±3.6 ile Carbopol içeren formülasyon olduğu bulunmuştur. Poloksamer jel kullanılarak hazırlanan CV-PS2-P407 formülasyonu ilk sekiz saatte % 24.3±5.2 salım yapmış ancak bu değerin 48 saatin sonunda % 89.4±5.3 olduğu bulunmuştur. Bu lipojellerin viskozite ve akış özellikleri de incelenmiştir. Bütün jellerin pseudo plastik akış gösterdiği belirlenmiş ve vizkozite değerleri Tablo 52'de verilmiştir. Buna göre içine lipozom konulmuş biyoadezif vajinal jellerin, lipozom taşımayan jellere göre viskozitesinde düşme gözlenmiştir.

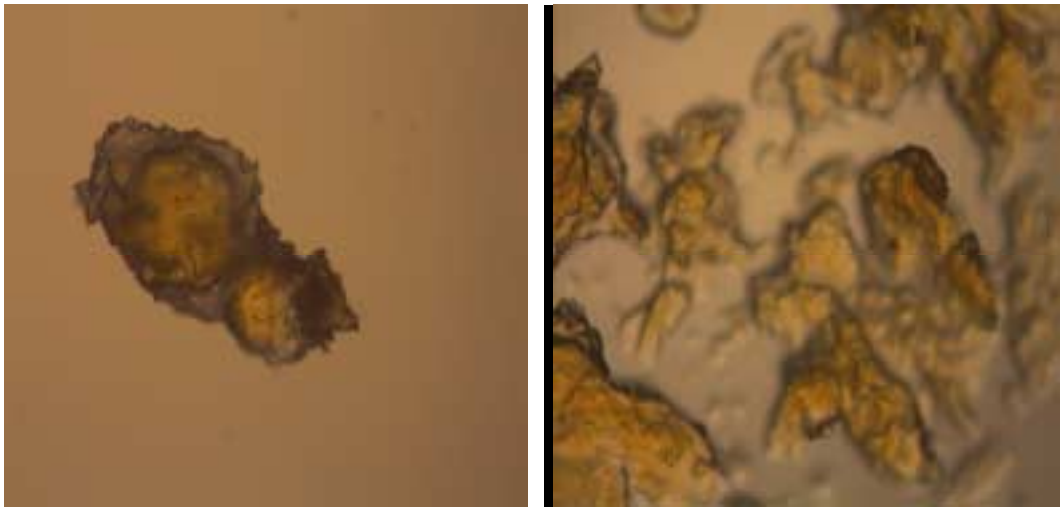
Tablo 52. Lipojellerin viskozite değerleri

	Viskozite (cP)	rpm	Spindle No
CV-FS2-KR	1165±18	2	52
CV-FS2-KITH3	483±7	20	52
CV-FS2-K100M	973±9	20	52
CV-FS2-P407	917±6	20	52
CV-PS2-KR	957±13	2	52
CV-PS2-KT	398±4	20	52
CV-PS2-K100M	795±10	20	52
CV-PS2-P407	716±11	20	52

4.3.3. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulgular

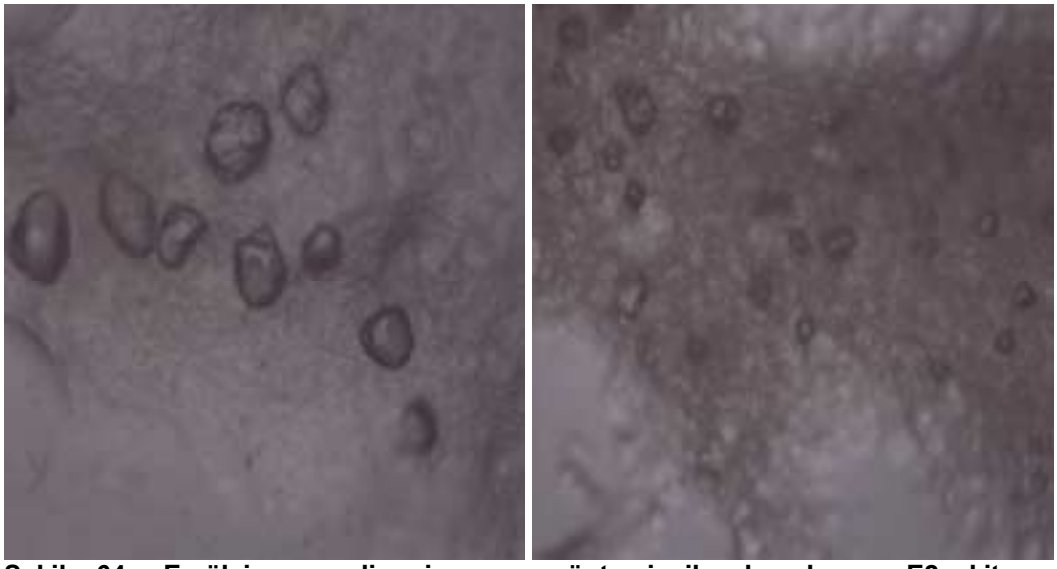
4.3.3.1. Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

Hazırlama sırasında emülsiyon oluşturmada başarı sağlandı, karıştırma bittikten sonra santrifüj yapıldı ve yıkama işlemine geçildi. Ancak yıkama işleminde tam anlamıyla başarı sağlanamadı. Partiküller birbirinden ayrılmadı ve polimer kütlesi şeklinde bir görüntü oluştu. Oda sıcaklığında kurutma işleminden sonra ışık mikroskobu ile E1 formülasyonuna ait partiküller incelenmeye çalışıldı (Şekil 63). Partiküllerin tam küresel şekilde oluşmadığı ve çok az partikül oluştuğu gözlendi.



Şekil 63. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan E1 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)

Bu denemede başarılı olunamadığı için benzer bir yöntem denendi. İlk denememizde karşılaştığımız sorunlar ile bu yöntemde de karşılaştık, yağ fazı tam olarak uzaklaştırılamadı ve partiküller birbirinden ayrılıp küresel bir şekilde elde edilemedi (Şekil 64).

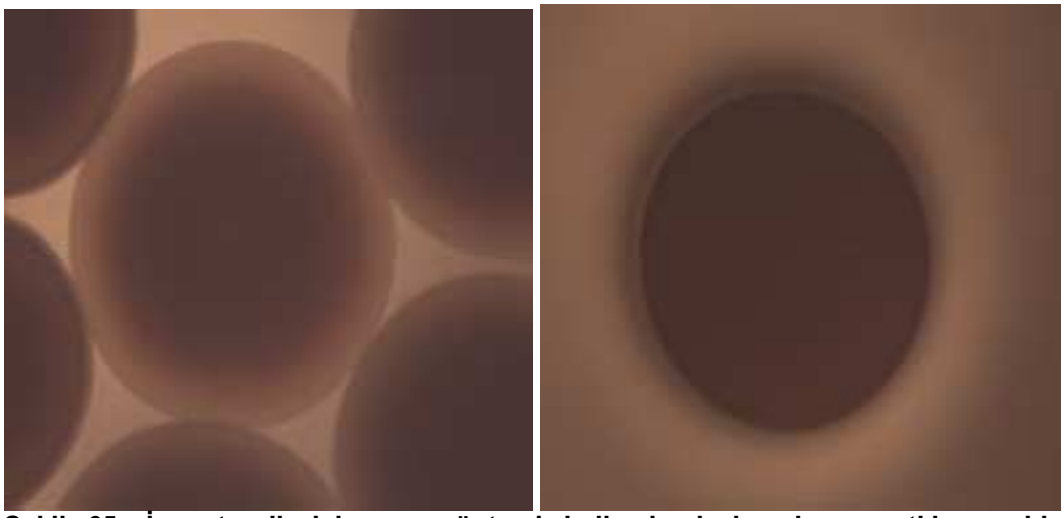


Şekil 64. Emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan E2 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)

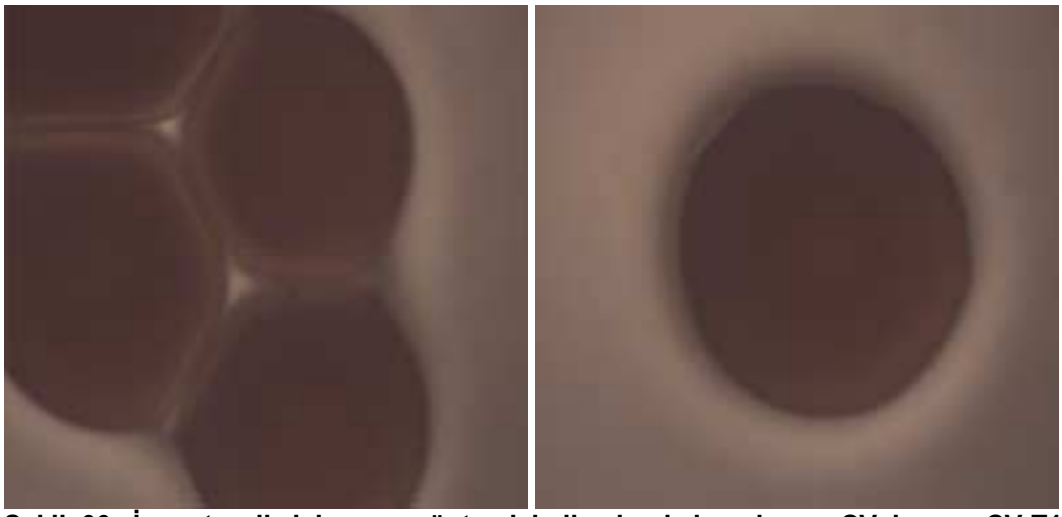
Partikül oluşumunda başarı sağlanamadığı için bu grup mikroküre çalışmasına devam edilmedi.

4.3.3.2. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

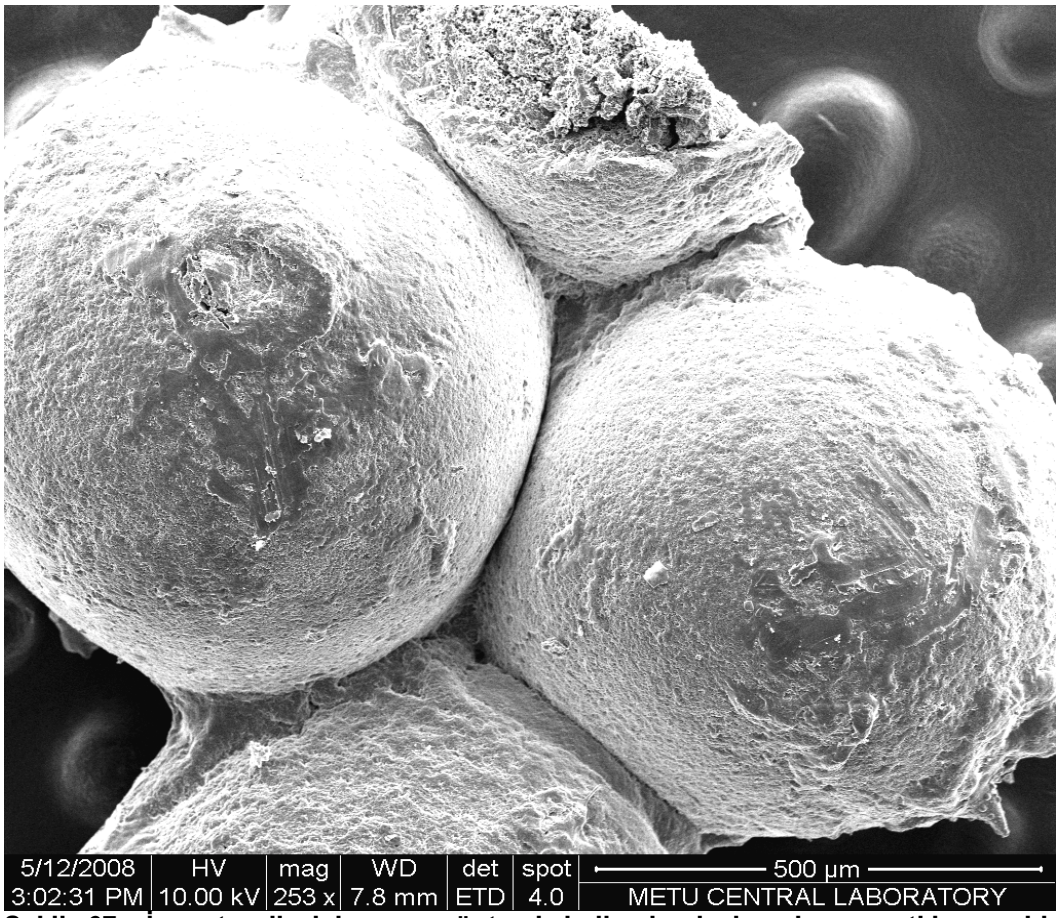
Bu yöntem ile elde edilen CV-T1 mikrokürelerinin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 65 ve 66'da verilmiştir. SEM görüntüleri ise Şekil 67 ve 68'de verilmiştir.



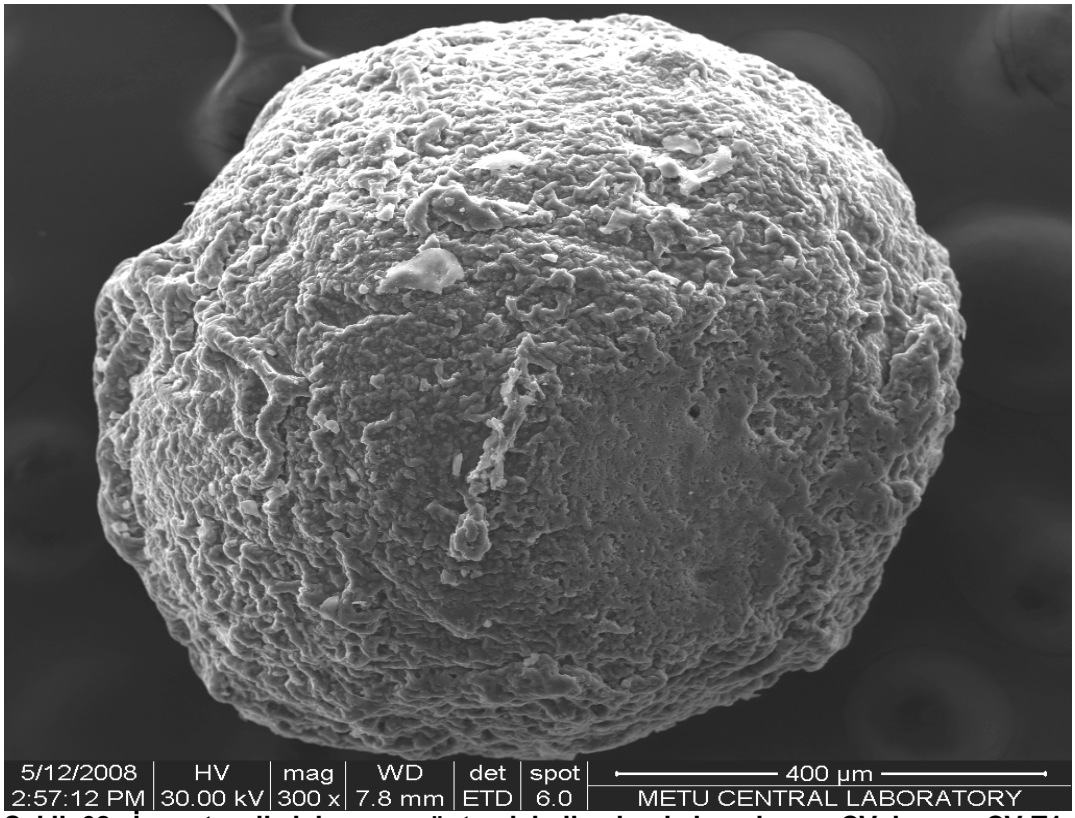
Şekil 65. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)



Şekil 66. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-T1 kitosan mikrokürelerinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)



Şekil 67. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

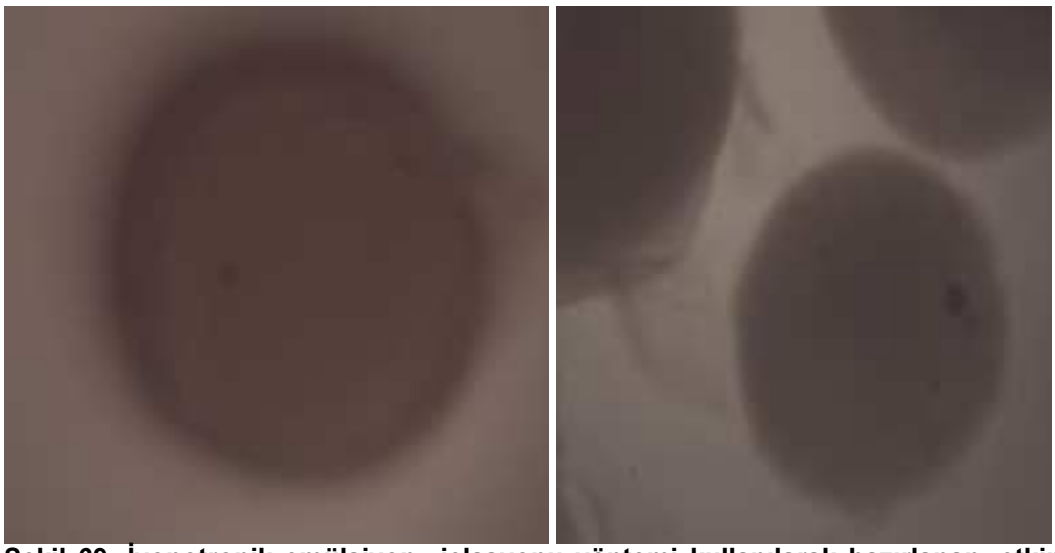


Şekil 68. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-T1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

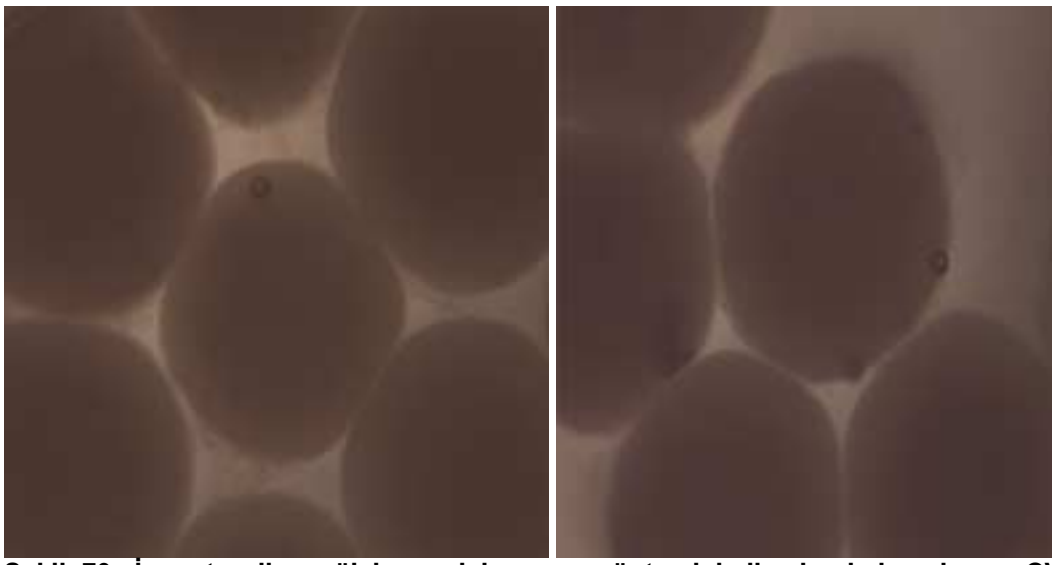
Bu yöntem ile hazırlanan formülasyonların küresel olduğu görülmüş ve mikroküre formülasyonları üzerinde yapılan kontrollere geçilmiştir.

4.3.3.3. İyonotropik Emülsiyon Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

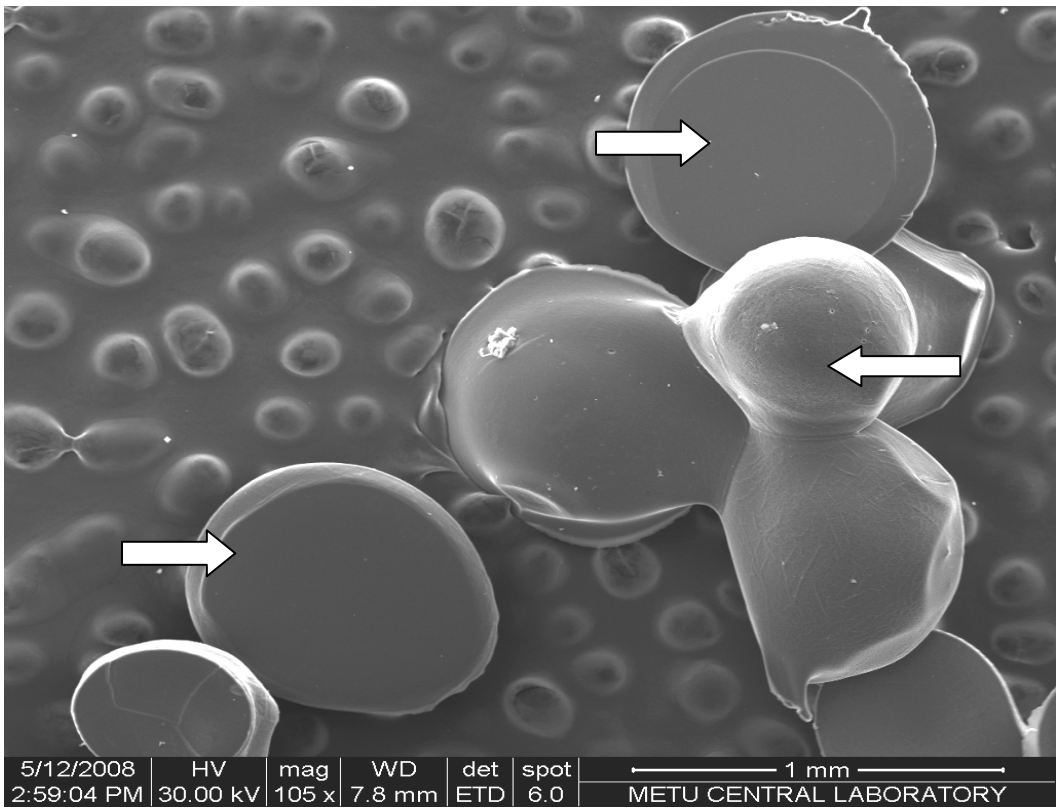
Bu yöntemle hazırlanan kürelerin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 69 ve 70'de, SEM görüntüleri ise Şekil 71 ve 72'de verilmiştir.



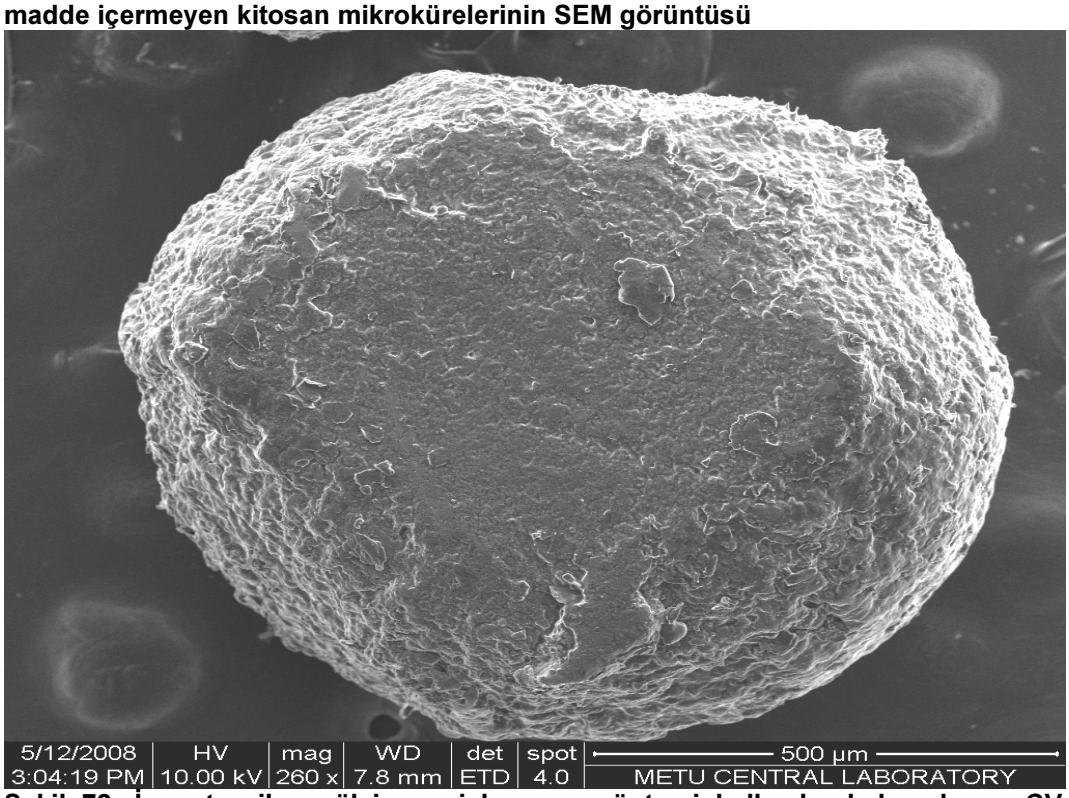
Şekil 69. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)



Şekil 70. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-K1 kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)



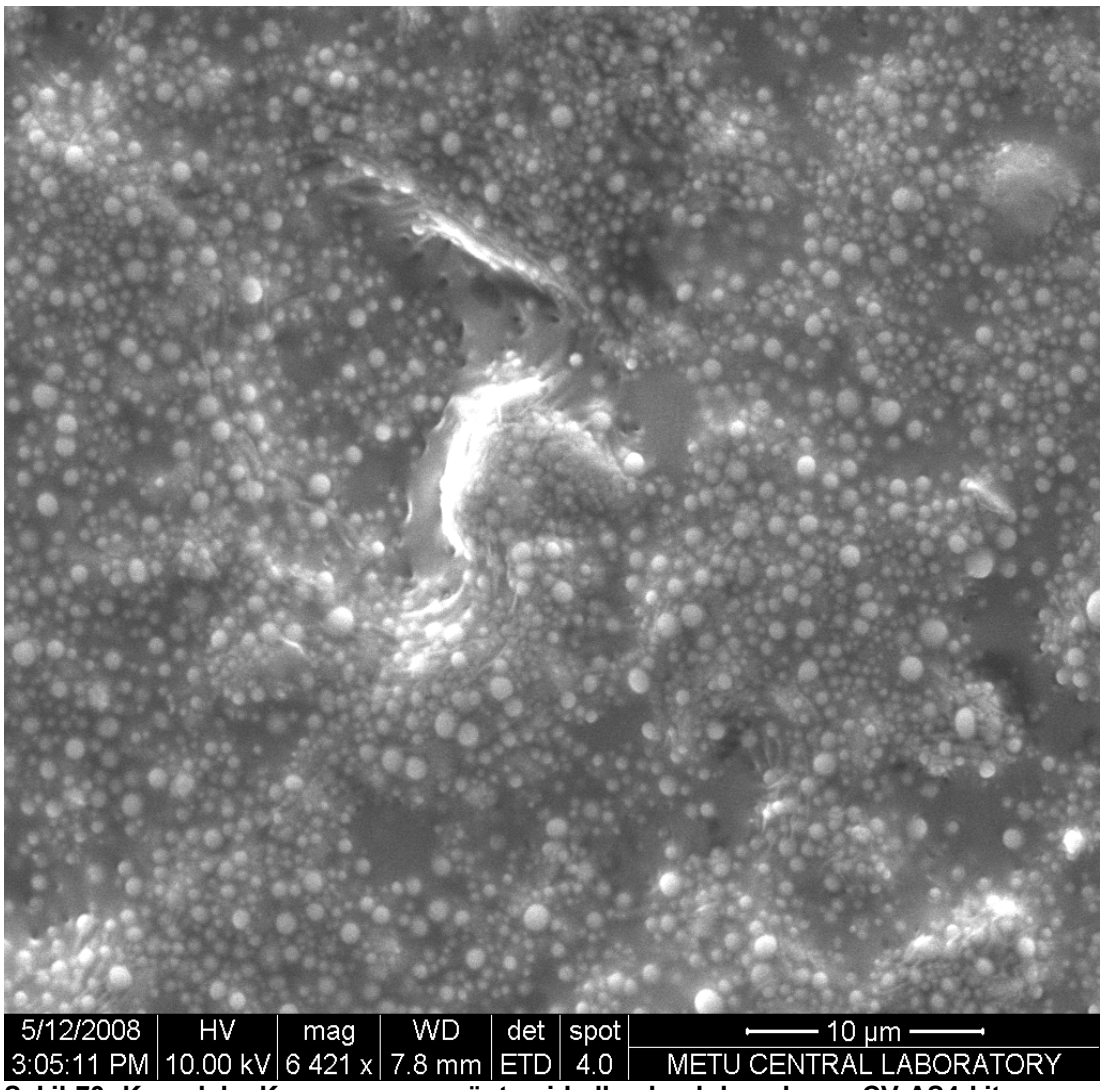
Şekil 71. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, etkin madde içermeyen kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü



Şekil 72. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan CV içeren CV-K1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

4.3.3.4. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

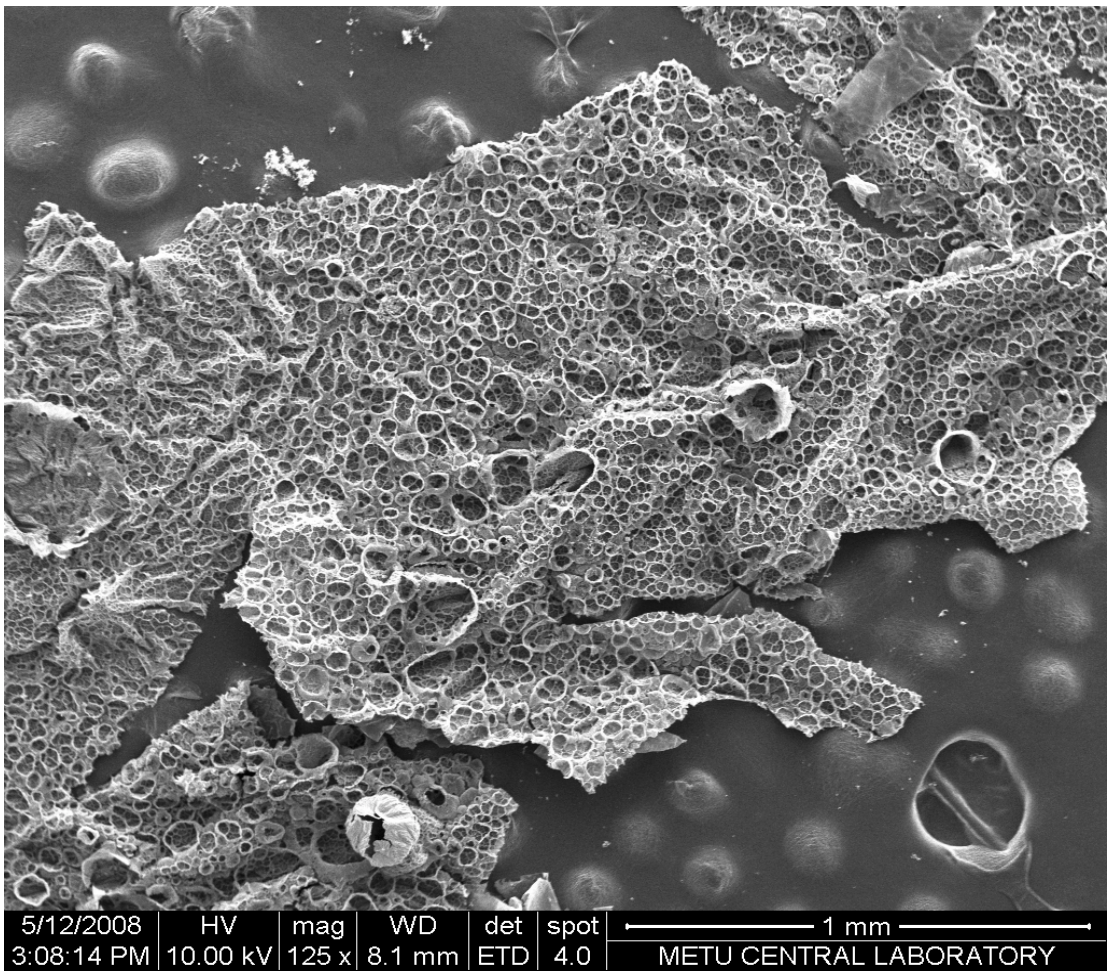
Hazırlama sırasında CV-AS4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre formülasyonu olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi (Şekil 73).



Şekil 73. Kompleks Koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV-AS4 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

4.3.3.5. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

Hazırlama sırasında CV-BT4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi (Şekil 74).



Şekil 74. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan CV-BT4 kitosan mikro- partiküllerinin SEM görüntüsü

4.3.3.6. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu

4.3.3.6.1. Hazırlanan Mikrokürelerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği

Bölüm 3.2.10.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 53'de verilmiştir.

Tablo 53. Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinin formülasyon içerikleri

KOD	Teorik Etkin mad. Miktarı %	Ölçülen Etkin Mad. Miktarı %	İŞLEM ETKİNLİĞİ %
CV-T1	5	3.68±0.02	73.5
CV-K1	5	3.29±0.04	65.8
CV-AS4	5	2.23±0.06	44.6
CV-BT4	5	2.76±0.08	55.2

4.3.3.6.2. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Mikrokürelerin partikül büyüklüğü ölçümü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sonuçları Tablo 54'de verilmiştir.

Tablo 54. Hazırlanan kitosan mikrokürelerin ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel (mV)

Formülasyonlar	Partikül Büyüklğü	Polidispersite Indeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
CV-T1	858±3 µm	0.567±0.083	6.34
CV-K1	828±5 µm	0.498±0.061	-12.65
CV-AS4	639±2 nm	0.276±0.018	-8.27
CV-BT4	831±4 nm	0.324±0.092	-11.87

4.3.3.7. Mikrokürelere-Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.3.3.7.1. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Akış Özellikleri

Hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarının viskozite ve akış özellikleri de incelenmiştir. Bütün mikroküre-jellerin pseudo plastik akış gösterdiği belirlenmiş ve vizkozite değerleri Tablo 55'de verilmiştir. Buna göre içine mikroküre ilave edilmiş biyoadezif vajinal jellerin viskozitesinde düşme gözlenmiştir.

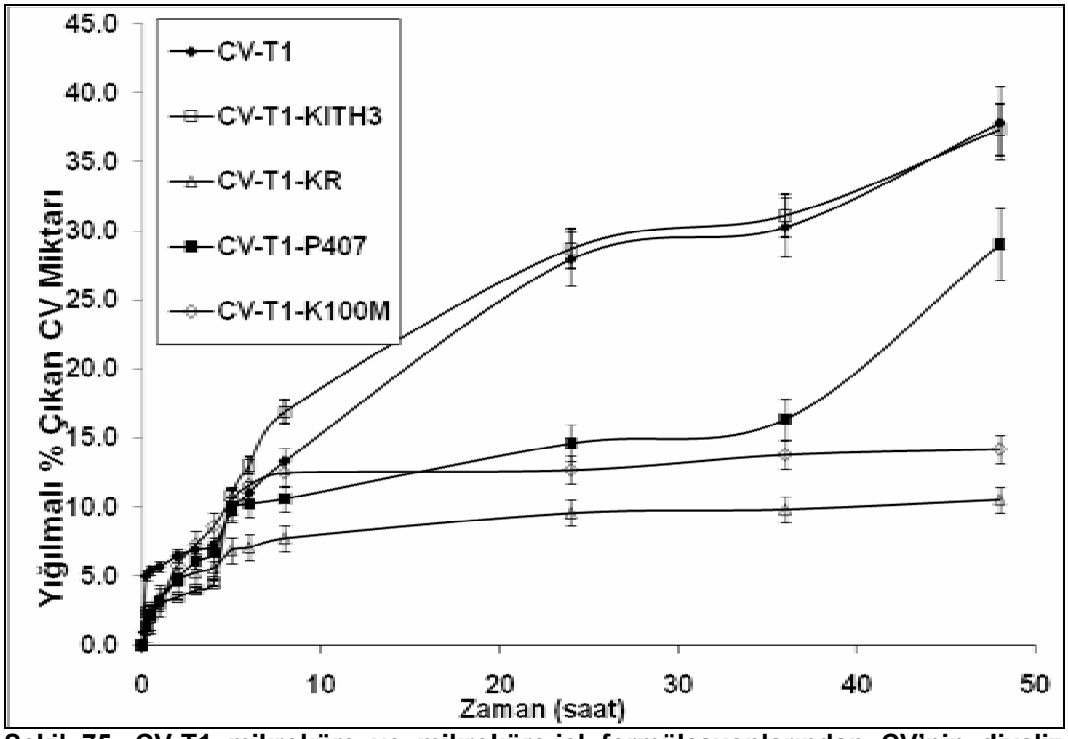
Tablo 55. Mikroküre içeren jellerin viskozite değerleri

	Viskozite (cP)	rpm	Spindle No
CV-T1-KR	1276±19	2	52
CV-T1-KITH3	507±5	20	52
CV-T1-K100M	1097±9	20	52
CV-K1-KR	1255±11	2	52
CV-K1-KITH3	521±8	20	52
CV-K1-K100M	1109±6	20	52
CV-AS4-KR	911±13	2	52
CV-AS4-KITH3	355±5	20	52
CV-AS4-K100M	896±10	20	52
CV-BT4-KR	956±8	2	52
CV-BT4-KITH3	384±7	20	52
CV-BT4-K100M	759±6	20	52

4.3.3.7.2. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular

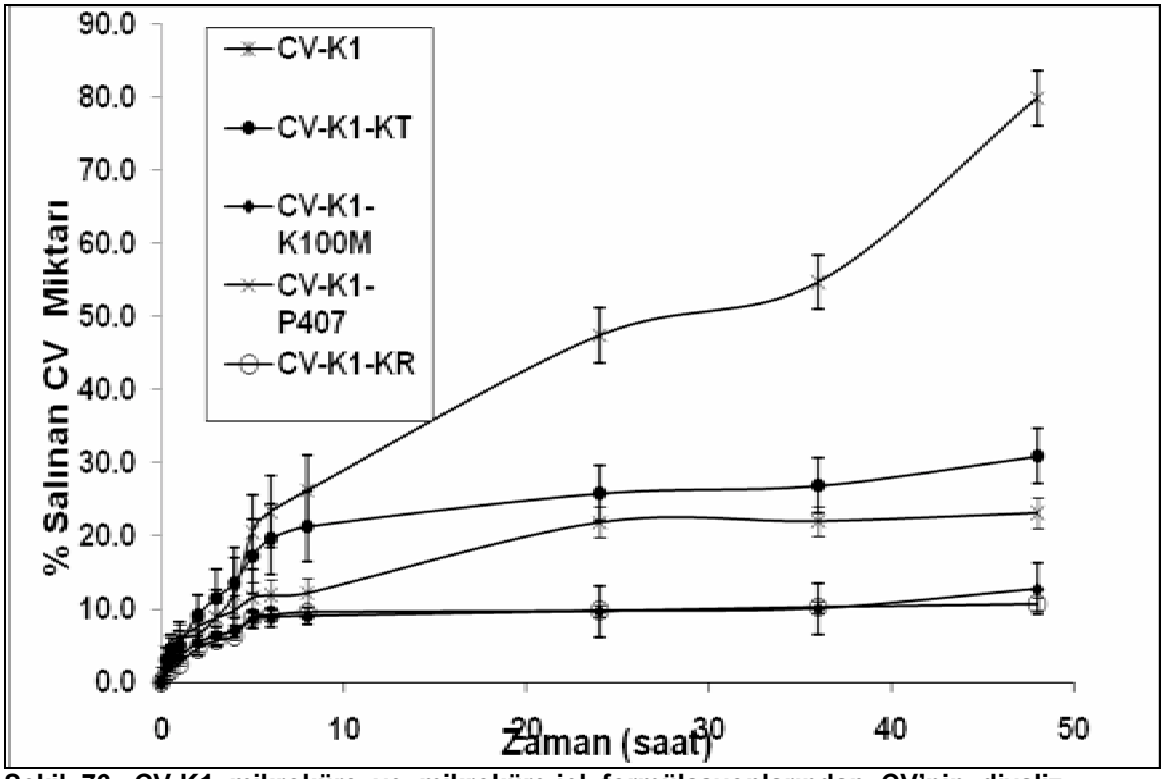
Tablo 16'da formülasyon kodları ve içerikleri verilen mikroküre-jel formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 75-78'de verilmiştir.

Şekil 75'de CV-T1 grubu mikrokürelerin salım profilleri görülmektedir. CV-T1 mikroküresi süspansiyon halinde 8. saatin sonunda % 13.3±1.4, 24. saatin sonunda % 28.0±1.6 ve 48. saatin sonunda % 37.8±1.9 oranında salım yapmıştır. Profilden de anlaşıldığı gibi CV-T1 mikroküresinin süspansiyon halindeki salımına en yakın salımı CV-T1-KITH3 (kitosan jel içinde CV-T1 kitosan mikroküreleri olan formülasyon) formülasyonu vermiştir. Buna göre CV-T1-KITH3 formülasyonu 8, 24 ve 48. saatlerin sonunda % 16.9±2.1, % 28.7±1.1 ve % 37.3±1.2 oranında salım yapmıştır. CV-T1 formülasyonu ile CV-T1-KITH3 formülasyonunun salımı benzerdir. Bu grup mikroküre-jel formülasyonlarından en az salımı 48 saatin sonunda % 10.5±1.5 oranında salım yapan CV-T1-KR formülasyonudur.



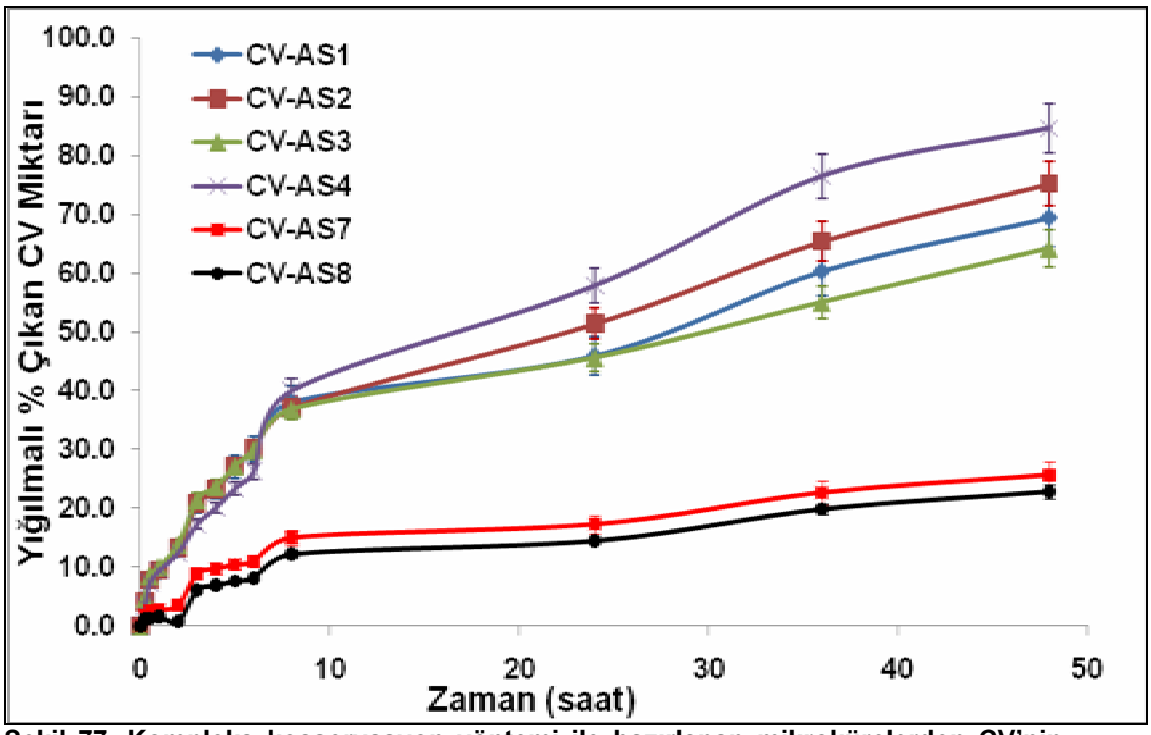
Şekil 75. CV-T1 mikroküre ve mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Şekil 76'de CV-K1 grubu mikroküre lerin salım profilleri görülmektedir. CV-K1 mikroküresi süspansiyon halinde 8. saatin sonunda % 26.2±0.8, 24. saatin sonunda % 47.4±1.1 ve 48. saatin sonunda % 79.9±1.5 oranında salım yapmıştır. Jel içindeki CV-K1 mikrokürelerinden salıma bakıldığında ise 48 saatin sonunda en fazla salımı CV-K1-KITH3 formülasyonu (% 30.9±1.7), en az salımı da CV-K1-KITH3 formülasyonu (% 11.7±1.6) yapmıştır.



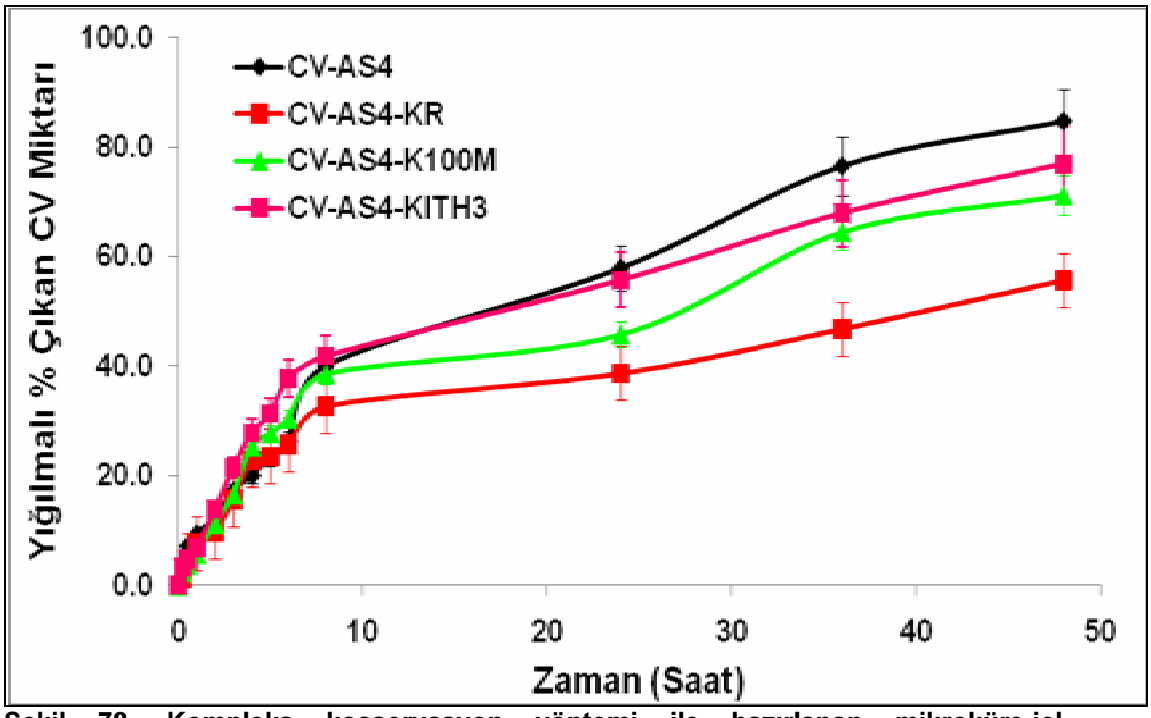
Şekil 76. CV-K1 mikroküre ve mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan 8 farklı mikroküre formülasyonlarından 6 tanesinde mikroküre oluşumu gözlenmiştir (CV-AS1, CV-AS2, CV-AS3, CV-AS4, CV-AS7 ve CV-AS8) (Tablo 14). Bu mikrokürelerin süspansiyon halinde diyaliz membrandan geçiş profilleri Şekil 77'de gösterilmiştir. En fazla salımı yapan CV-AS4 formülasyonu 48 saatin sonunda % 84.6±1.4 oranında salım yapmıştır ve mikroküre-jel formülasyonlarının hazırlanması için seçilmiştir.



Şekil 77. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

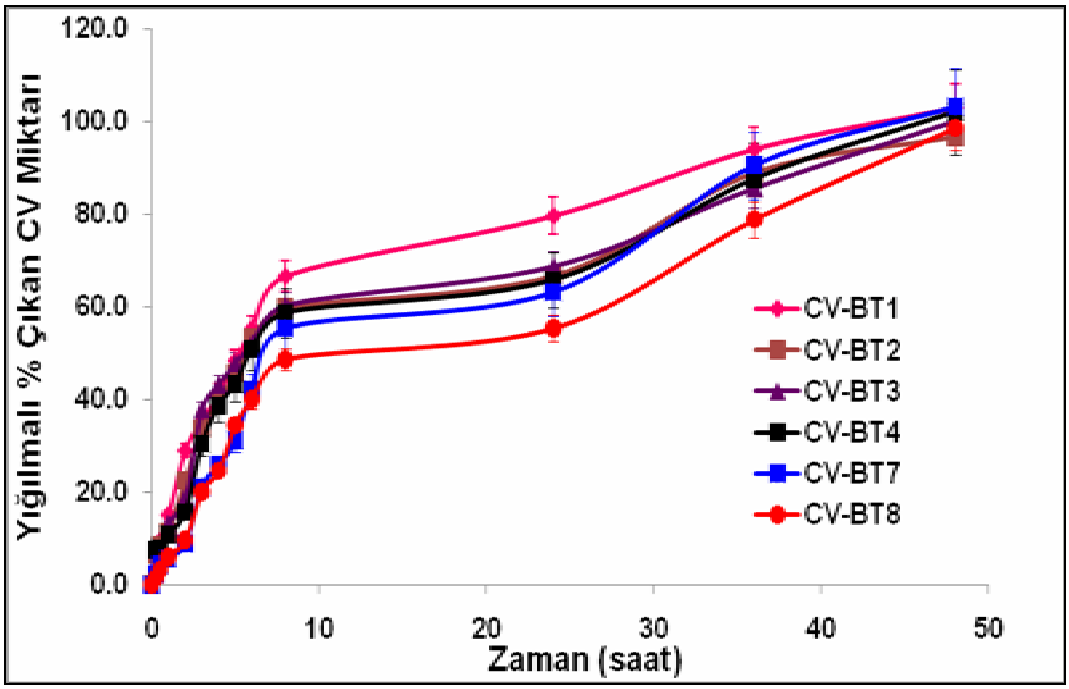
CV-AS4 ile kazırlanan mikroküre jel formülasyonlarının içerikleri Tablo 16'da verilmiş ve diyaliz memrandan geçiş profilleri Şekil 78'de gösterilmiştir.



Şekil 78. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

CV-AS4-KR formülasyonu 48 saatin sonunda en az salım (%55.7±1.9) yapan formülasyon olurken CV-AS4-KITH3 formülasyonu en yüksek salımı (%76.9±3.2) yapmıştır.

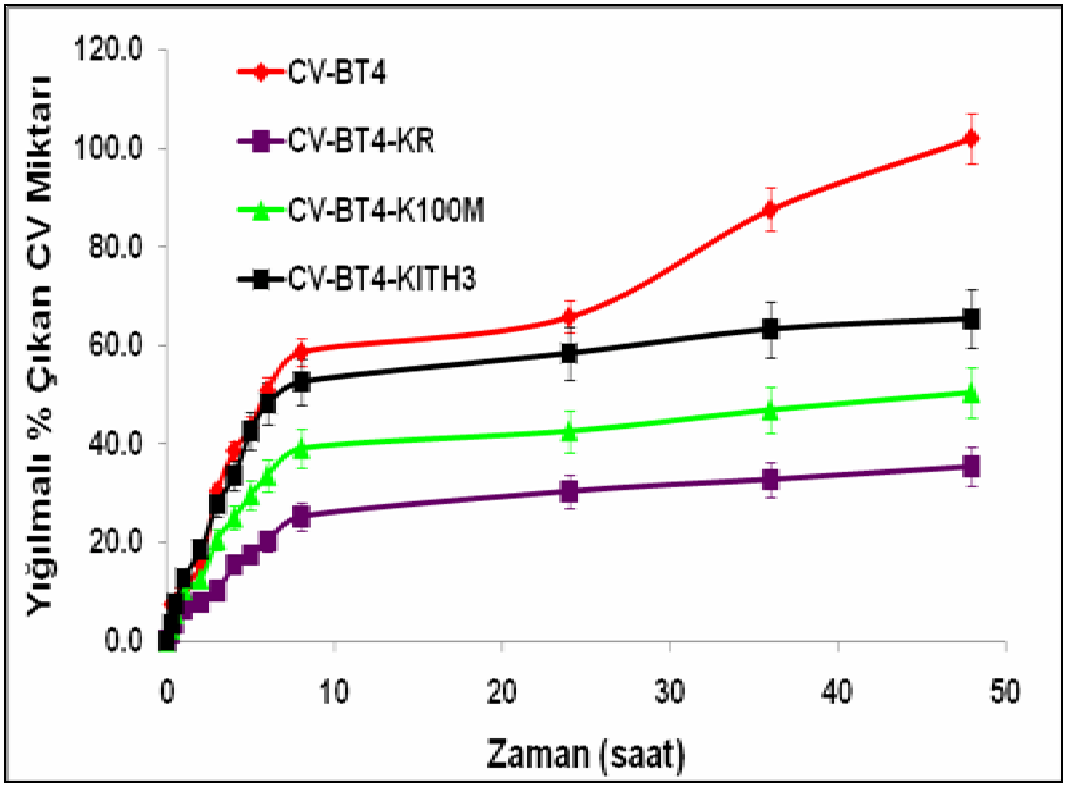
Mikroküre formülasyonlarında son olarak sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan BT grubu mikroküreler üzerinde çalışılmıştır. Bu mikrokürelerin süspansiyon halinde diyaliz membrandan geçiş profilleri Şekil 79'da gösterilmiştir. Mikroküreler süspansiyonlarının hepsi 48 saatin sonunda CV'in yaklaşık % 100'ünü salmışlardır. Bu nedenle işlem etkinliği en yüksek olan CV-BT4 formülasyonu mikroküre-jel formülasyonlarında kullanılmak üzere şeçilmiştir.



Şekil 79. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

CV-BT4 mikroküresi süspansiyon halinde vajinaya uygulanamayacağı için bir jel içinde taşınması gerekmektedir. Bu nedenle ile hazırlanan mikrokürelerin daha önce üzerinde çalıştığımız jeller ile mikroküre jel formülasyonları hazırlanmış ve içerikleri Tablo 16'da verilmiştir. Mikroküre jellerin diyaliz memrandan geçiş profilleri Şekil 80'de gösterilmiş ve profiller CV-BT4 mikroküre süspansiyonunun profili ile

karşılaştırılmıştır. Buna göre en az salım yapan CV-BT4-KR formülasyonu 48 saatin sonundaki salım %35.4±4.1 olmuştur. En fazla salım yapan CV-BT4-KITH3 formülasyonu ise 48 saatin sonunda %65.4±2.6 oranında CV salmıştır. Profilden de anlaşıldığı gibi jel içindeki mikrpkürelerden salım mikrokürelerin süspansiyon halindeki salımından oldukça azdır.



Şekil 80. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jellerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Mikroküre-jeller ile yapılan diyaliz membrandan geçiş çalışmalarının sonunda 48 saat süresince CV miktarınının % 100'ünü salan bir formülasyon olmamıştır. Bu nedenle vajinal uygulanacak ve iki gün süre ile kontollü salım yapacak formülasyona ulaşılamamıştır.

4.4. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi

CV içeren tüm formülasyonlara ait in vitro geçiş verilerinin kinetik değerlendirme sonuçları Tablo 56'da verilmektedir. Kinetik değerlendirme için sıfır derece, birinci derece ve Higuchi salım kinetik modelleri incelenmiştir.

Tablo 56. Hazırlanan CV içeren formülasyonların diyaliz membrandan geçiş verilerinin kinetik incelemesi.

JEL FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
0.Derece				1.Derece			Q√t (Higuchi)		
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
CV-C974P1	1.876	0.868	11.8	0.044	0.612	0.580	14.3	0.978	4.82
CV-C974P2	1.407	0.781	12.02	0.029	0.583	0.402	11.04	0.931	6.75
CV-POL1	1.976	0.772	17.4	0.043	0.503	0.710	15.6	0.930	9.64
CV-POL2	1.785	0.778	15.4	0.035	0.510	0.569	14.1	0.940	7.98
CV-HPMCK15M1	1.766	0.527	27.0	0.031	0.341	0.718	15.3	0.764	19.1
CV-HPMCK15M2	1.741	0.658	20.3	0.032	0.440	0.603	14.4	0.866	12.7
CV-HPMCK100M1	1.880	0.637	22.9	0.039	0.385	0.824	15.6	0.846	14.9
CV-HPMCK100M2	1.631	0.628	20.3	0.030	0.412	0.603	13.6	0.846	13.1
CVKITH1	1.957	0.603	25.6	0.037	0.382	0.787	16.4	0.824	17.1
CVKITH2	1.907	0.631	23.6	0.037	0.398	0.759	15.9	0.844	15.3
CVKITH3	1.925	0.737	18.6	0.044	0.431	0.838	15.4	0.915	10.6
CVKITM1	1.942	0.671	22.0	0.036	0.424	0.703	16.0	0.878	13.4
CVKITM2	1.955	0.622	24.7	0.036	0.391	0.750	16.3	0.840	16.0
CVKITM3	1.876	0.868	11.8	0.036	0.331	0.860	15.8	0.771	19.4
CVKITL1	1.869	0.617	23.8	0.036	0.370	0.772	15.6	0.837	15.5
CVKITL2	1.914	0.619	24.3	0.034	0.391	0.709	16.01	0.838	15.8
CVKITL3	2.115	0.754	19.5	0.047	0.461	0.842	16.8	0.923	10.9
CV-P407	1.869	0.617	23.8	0.033	0.417	0.639	14.3	0.845	13.8
CV-MP407	1.724	0.631	21.3	0.037	0.442	0.696	12.2	0.903	9.03
CV-HP407	1.509	0.711	15.5	0.041	0.377	0.873	10.8	0.826	11.2
LİPOZOM FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
CV-F2	1.48	0.545	21.8	0.024	0.394	0.484	12.7	0.774	15.4
CV-P2	1.496	0.572	20.9	0.025	0.399	0.518	12.7	0.794	14.5
CV-FS1	1.66	0.714	17.0	0.033	0.522	0.527	13.4	0.897	10.2
CV-FS2	1.74	0.830	12.7	0.044	0.560	0.650	13.4	0.958	6.34
CV-PS1	1.78	0.752	16.5	0.039	0.548	0.590	14.1	0.906	10.2
CV-PS2	1.79	0.866	11.4	0.057	0.604	0.765	1.79	0.866	11.4
CV-FS2-KR	0.575	0.866	3.66	0.064	0.706	0.680	3.93	0.885	3.63
CV-FS2-K100M	1.04	0.949	3.90	0.095	0.767	0.863	6.99	0.958	3.15
CV-FS2-KITH3	1.04	0.968	3.05	0.070	0.686	0.786	7.43	0.970	2.39
CV-FS2-P407	0.869	0.983	1.82	0.093	0.737	0.920	6.02	0.993	1.18
CV-PS2-KR	0.804	0.827	5.94	0.055	0.477	0.961	6.20	0.951	3.16
CV-PS2-K100M	0.940	0.947	3.61	0.054	0.703	0.581	6.80	0.959	3.16
CV-PS2-KITH3	0.982	0.887	5.66	0.055	0.581	0.773	7.37	0.967	3.05
CV-PS2-P407	1.77	0.976	4.44	0.077	0.672	0.894	12.4	0.982	8.07

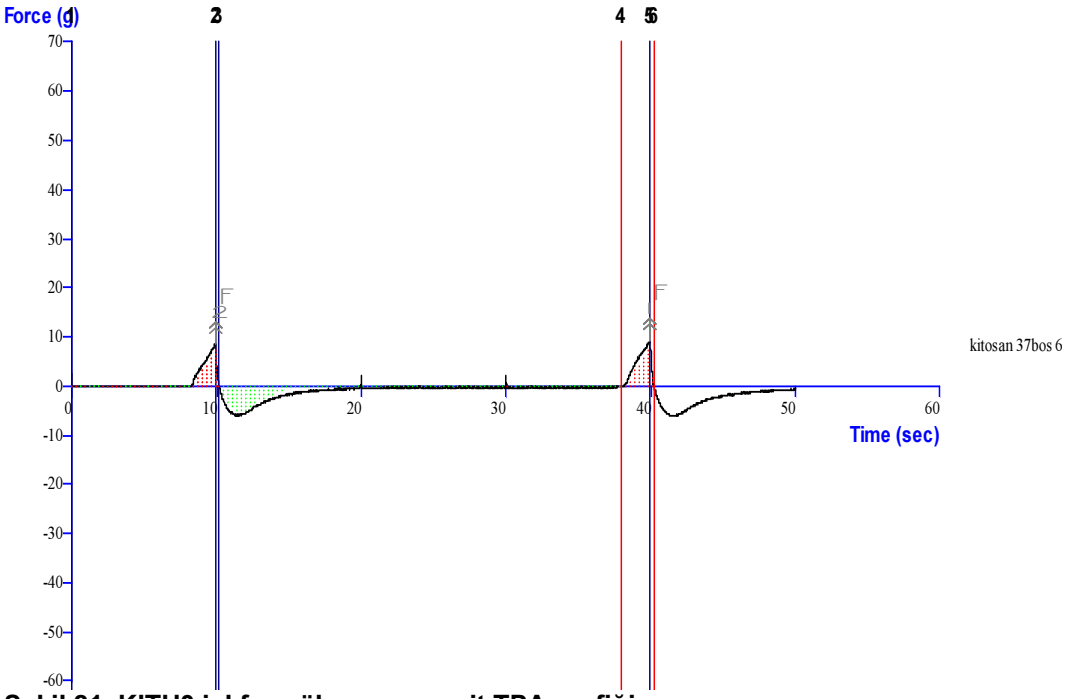
MİKROKÜRE FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
Form.No	**kr^0**	**r^2**	**RSH**	**kr^1**	**r^2**	**RSH**	**k**	**r^2**	**RSH**
CV-T1	0.732	0.956	2.54	0.043	0.880	0.261	5.31	0.974	1.94
CV-T1-KR	0.172	0.631	2.13	0.027	0.423	0.531	1.44	0.850	1.36
CV-T1-KT	0.778	0.913	3.89	0.055	0.711	0.584	5.75	0.963	2.52
CV-T1-K100M	0.239	0.523	3.69	0.032	0.331	0.746	2.06	0.755	2.65
CV-T1-P407	0.477	0.880	2.85	0.044	0.618	0.576	3.51	0.922	2.29
CV-K1	1.520	0.958	5.13	0.055	0.749	0.524	11.0	0.966	4.60
CV-K1-KR	0.546	0.707	5.68	0.035	0.489	0.588	4.41	0.894	3.41
CV-K1-KT	0.434	0.804	3.47	0.033	0.607	0.444	3.41	0.956	1.63
CV-K1-K100M	0.184	0.583	2.52	0.024	0.432	0.463	1.55	0.795	1.77
CV-K1-P407	0.175	0.483	2.92	0.029	0.330	0.691	1.53	0.718	2.16
CV-AS1	1.30	0.864	8.31	0.042	0.583	0.590	9.91	0.974	3.63
CV-AS2	1.44	0.896	7.95	0.044	0.614	0.579	10.9	0.989	2.54
CV-AS3	1.17	0.837	8.32	0.038	0.581	0.541	9.03	0.967	3.73
CV-AS4	1.73	0.932	7.52	0.050	0.668	0.588	12.8	0.990	2.93
CV-AS7	0.483	0.833	3.49	0.043	0.557	0.637	3.72	0.954	1.82
CV-AS8	0.453	0.875	2.76	0.055	0.538	0.840	3.41	0.959	1.59
CV-AS4-KR	1.04	0.814	7.99	0.046	0.448	0.847	8.04	0.950	4.16
CV-AS4-KITH3	1.49	0.836	10.7	0.047	0.515	0.755	11.5	0.964	5.01
CV-AS4-K100M	1.40	0.857	9.23	0.051	0.531	0.799	10.7	0.964	4.60
CV-BT1	1.93	0.778	16.6	0.041	0.477	0.706	15.2	0.939	8.69
CV-BT2	1.79	0.780	15.4	0.041	0.498	0.679	14.1	0.931	8.58
CV-BT3	1.81	0.768	16.1	0.043	0.440	0.811	14.3	0.922	9.32
CV-BT4	1.89	0.817	14.4	0.043	0.545	0.652	14.6	0.944	7.99
CV-BT7	2.08	0.881	12.3	0.058	0.541	0.892	15.6	0.962	6.95
CV-BT8	1.89	0.878	11.4	0.058	0.496	0.978	14.2	0.958	6.69
CV-BT4-KR	0.678	0.741	6.48	0.042	0.464	0.741	5.42	0.914	3.73
CV-BT4-K100M	0.910	0.657	10.6	0.037	0.400	0.762	7.48	0.858	6.83
CV-BT4-KITH3	1.19	0.617	15.1	0.037	0.382	0.777	9.91	0.830	10.1

kr^0: Sıfır derece hız sabiti (mg/s), kr^1: Birinci derece hız sabiti, k: çözünme sabiti ($mg.cm^{-2}.s^{-1/2}$), r^2: determinasyon katsayısı, RSH: Regresyonun satandart hatası

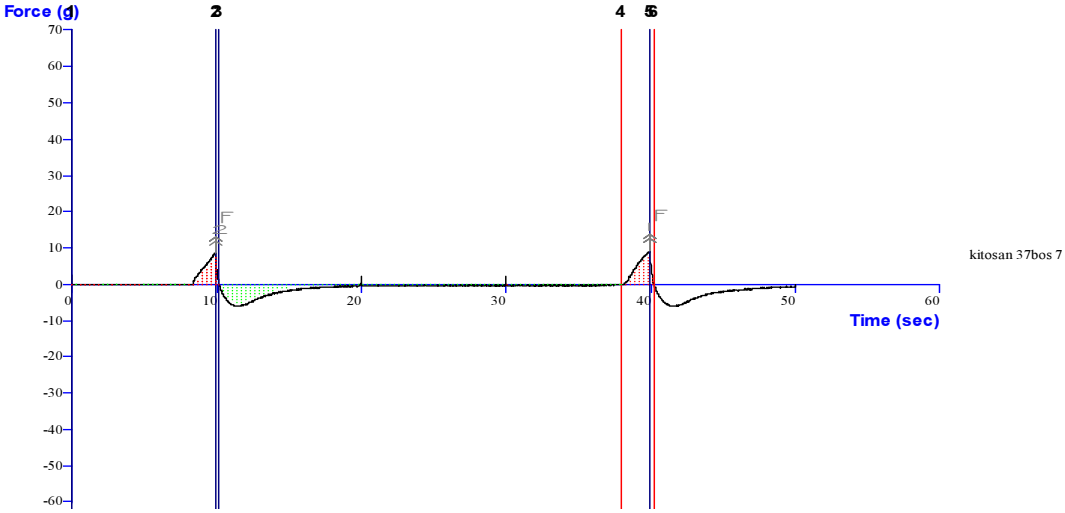
4.5. Biyoadezif Jellerin Texture Profil Analizi'ne (TPA) Ait Bulgular

Vajinaya uygulanacak yarı katı ilaç şekillerinin geliştirilmesinde dikkat edilecek en önemli parametre ilacın vajinada kalış süresidir. Biz de çalışmamızda vajinaya uygulanacak biyoadezif jellerin geliştirilmesi sırasında jellerin mekanik özelliklerini belirleyerek optimum formülasyona ulaşmaya çalıştık.

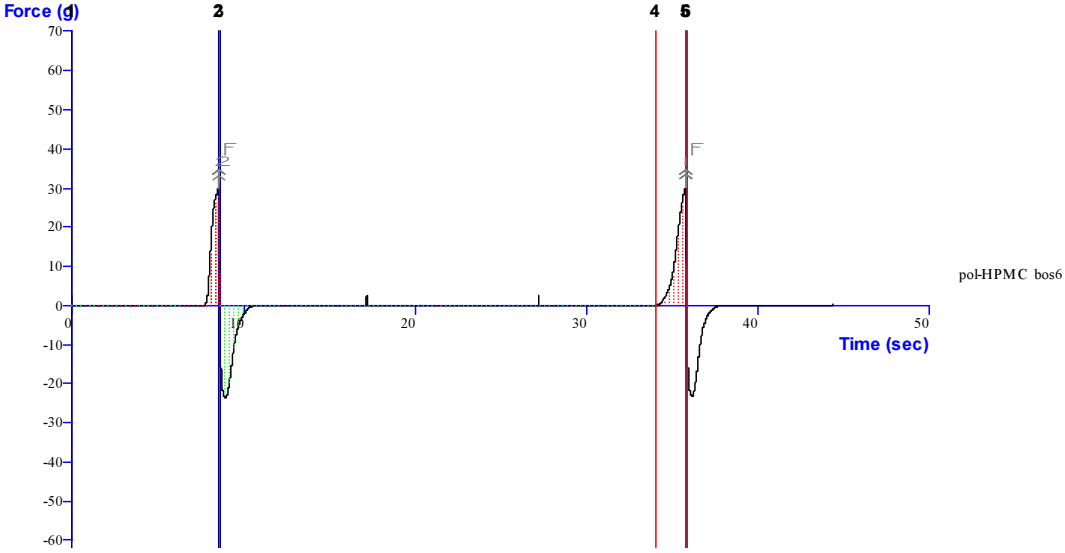
Bölüm 3.2.12'de anlatıldığı gibi yapılan TPA testleri sonucunda jellerin sertlik, sıkışabilirlik, elastiklik, adezyon ve kohezyon özellikleri, Tablo 17'de belirtilen etkin madde içeren ve içermeyen jeller için, TPA grafiklerinden belirlendi (Şekil 81-88). Ayrıca jellerin, lipojellerin ve mikroküre içeren jellerin mekanik özellikleri hesaplandı ve Tablo 57'de ifade edildi.



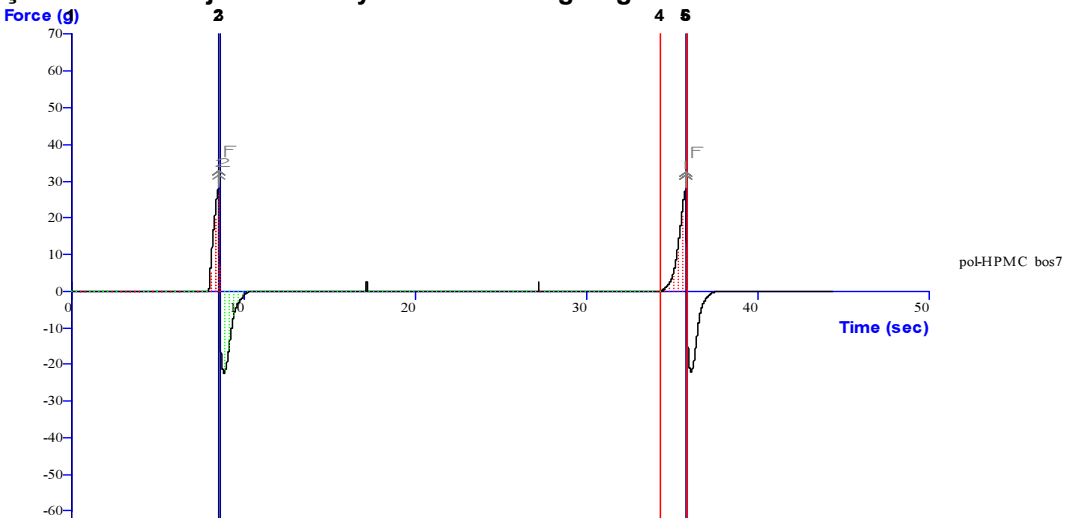
Şekil 81. KITH3 jel formülasyonuna ait TPA grafiği



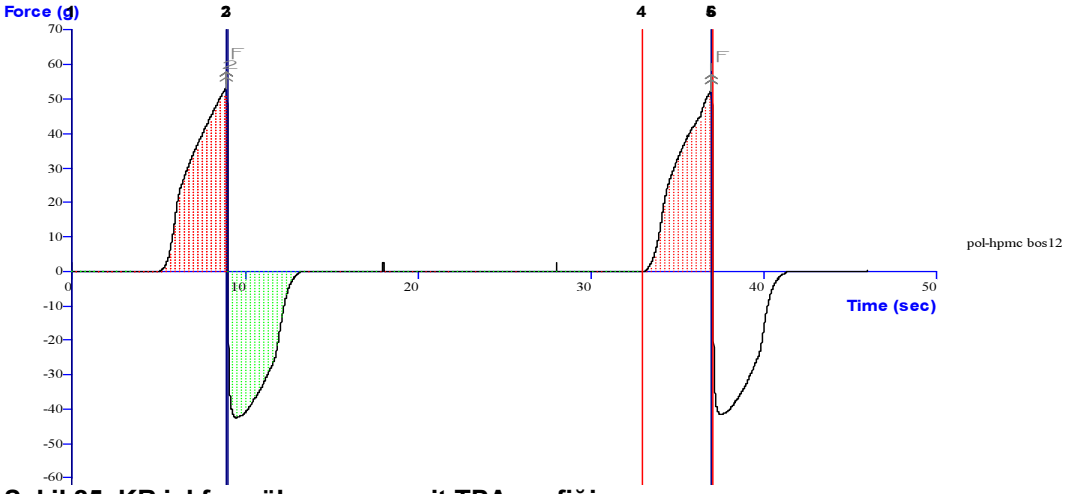
Şekil 82. CV-KITH3 jel formülasyonuna ait TPA grafiği



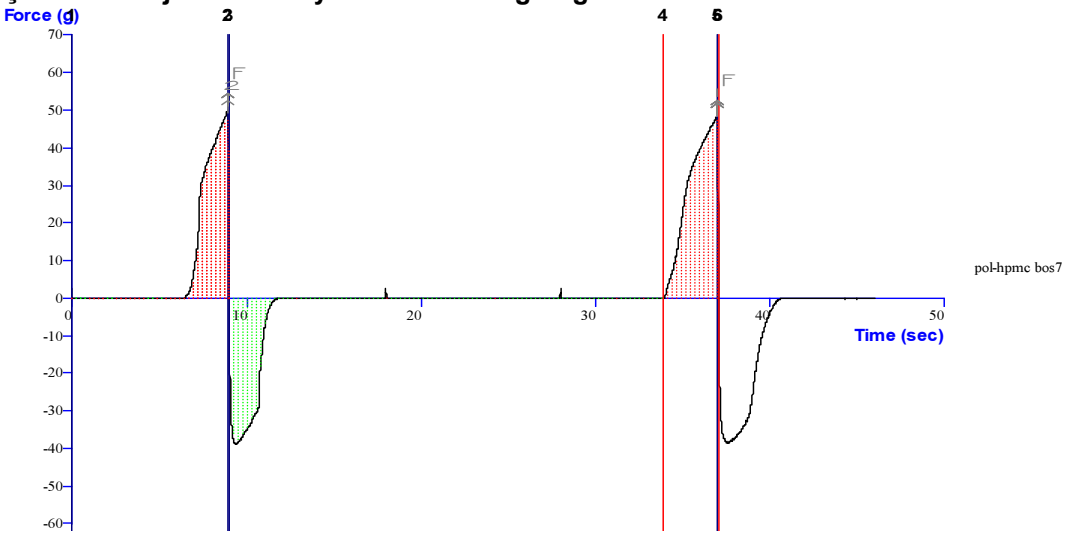
Şekil 83. HP407 jel formülasyonuna ait TPA grafiği



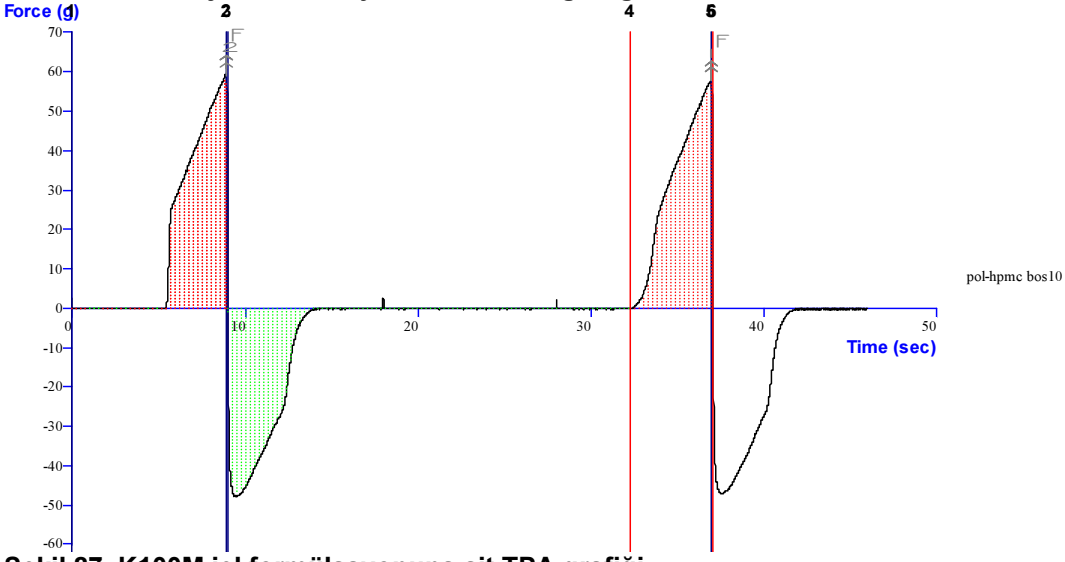
Şekil 84. CV-HP407 jel formülasyonuna ait TPA grafiği



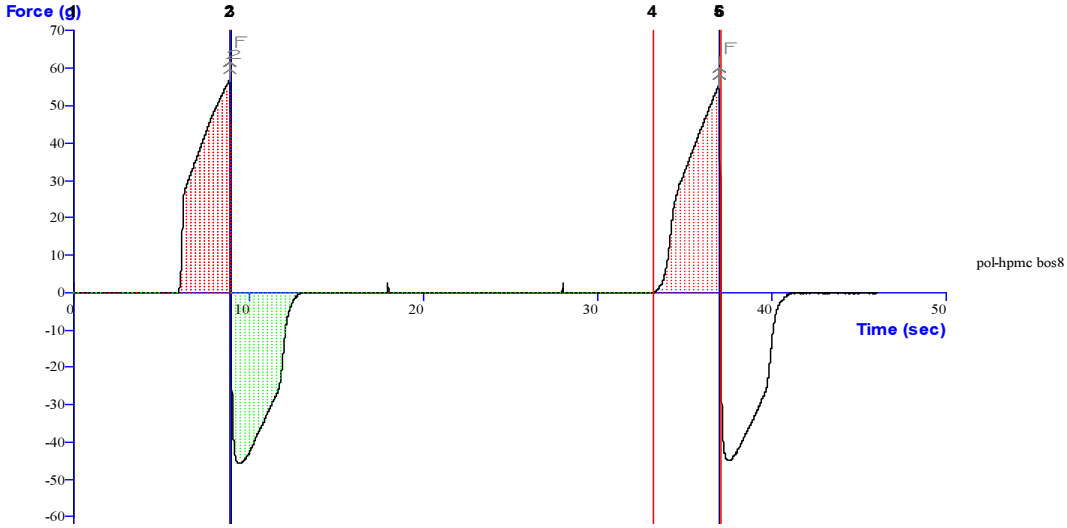
Şekil 85. KR jel formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 86. CV-KR jel formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 87. K100M jel formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 88. CV-K100M jel formülasyonuna ait TPA grafiği

Tablo 57. Hazırlanan biyoadezif jel, lipojel ve mikroküre içeren jel formülasyonlarının mekanik özellikleri (n=6)

Formülasyon	Sertlik (N)	Sıkışabilirlik (N.mm)	Adeziflik (N.mm)	Koheziflik	Elastikiyet
		JEL FORMÜLASYONLARI			
KITH3	0.074±0.002	0.546±0.068	0.205±0.049	0.864±0.044	0.759±0.068
CV-KITH3	0.084±0.008	0.618±0.062	0.188±0.036	0.826±0.059	0.727±0.049
HP407	0.328±0.027	1.35±0.675	0.463±0.109	0.876±0.018	0.795±0.033
CV-HP407	0.356±0.018	1.40±0.349	0.429±0.081	0.847±0.178	0.774±0.038
KR	0.573±0.168	2.27±0.496	1.33±0.429	0.917±0.081	0.917±0.059
CV-KR	0.591±0.105	2.32±0.188	1.13±0.316	0.901±0.027	0.895±0.038
K100M	0.847±0.087	3.74±0.261	2.65±0.621	1.02±0.007	1.07±0.057
CV-K100M	0.886±0.106	3.89±0.352	2.02±0.328	0.989±0.029	0.908±0.071
		LİPOJEL FORMÜLASYONLARI			
CV-FS2-KITH3	0.127±0.018	1.19±0.059	0.102±0.034	0.652±0.038	0.682±0.017
CV-FS2-KR	0.629±0.027	2.98±0.017	0.485±0.038	0.719±0.041	0.802±0.026
CV-FS2-K100M	0.937±0.033	4.01±0.024	1.24±0.021	0.806±0.063	0.916±0.038
CV-FS2-HP407	0.539±0.041	1.79±0.066	0.165±0.058	0.543±0.079	0.694±0.049
CV-PS2-KITH3	0.239±0.054	1.24±0.038	0.168±0.039	0.706±0.018	0.716±0.091
CV-PS2-KR	0.653±0.032	3.01±0.043	1.03±0.061	0.858±0.044	0.849±0.082
CV-PS2-K100M	0.913±0.059	3.98±0.035	1.98±0.067	0.936±0.052	0.973±0.073
CV-PS2-HP407	0.573±0.120	1.35±0.087	0.25±0.073	0.695±0.055	0.728±0.064
		MİKROKÜRE-JEL FORMÜLASYONLARI			
CV-T1-KITH3	0.263±0.072	1.37±0.038	0.075±0.062	0.453±0.013	0.513±0.043
CV-T1-KR	0.756±0.061	3.37±0.084	0.205±0.011	0.611±0.035	0.659±0.019
CV-T1-K100M	1.08±0.083	4.03±0.019	0.783±0.045	0.851±0.072	0.792±0.022
CV-K1-KITH3	0.285±0.015	1.40±0.017	0.089±0.041	0.488±0.036	0.534±0.032
CV-K1-KR	0.782±0.094	3.55±0.021	0.254±0.023	0.669±0.052	0.702±0.017

CV-K1-K100M	1.16±0.026	4.17±0.032	0.865±0.047	0.917±0.026	0.827±0.024
CV-AS4-KITH3	0.081±0.045	0.701±0.019	0.199±0.026	0.781±0.018	0.726±0.029
CV-AS4-KR	0.596±0.034	2.46±0.022	1.196±0.031	0.854±0.031	0.902±0.071
CV-AS4-K100M	0.874±0.023	3.86±0.026	2.33±0.016	0.942±0.033	0.981±0.031
CV-BT4-KT	0.087±0.037	0.715±0.043	0.185±0.058	0.753±0.038	0.713±0.054
CV-BT4-KR	0.614±0.048	2.57±0.084	1.17±0.024	0.846±0.036	0.891±0.031
CV-BT4-K100M	0.886±0.059	3.96±0.047	2.27±0.011	0.972±0.027	0.937±0.028

Sertlik ve sıkışabilirlik değerleri, jele etkin madde ilavesi, lipozom ilavesi veya mikroküre ilavesi ile, boş jellere göre belirgin bir şekilde artmıştır (t-test, $p<0.05$). Ancak diğer değerlerin (adeziflik, koheziflik ve elastikiyet) jele ilave edilen etkin madde, lipozom veya mikroküreden sonra azaldığı görülmektedir.

CV içeren jellerin boş jellere göre adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerlerindeki düşüş anlamlıdır (t-test, $p<0.05$).

Lipojellerin değerlendirmesi de boş jellere göre yapıldığında yine adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerlerindeki düşüş anlamlıdır (t-test, $p<0.05$). Ancak jellere katı halde ilave edilen FS2 lipozomları ile hazırlanan lipojellerin değerleri, jellere süspansiyon halinde ilave edilen ve daha küçük partikül boyutuna sahip olan PS2 lipozomları ile hazırlanan lipojellerden daha düşüktür (t-test, $p<0.05$).

Aynı değerlendirme mikroküreler için de yapılabilir. CV-T1 grubu ve CV-K1 grubu mikroküreler, jellere katı halde ilave edildikleri için ve partikül büyüklükleri diğer mikroküre gruplarından büyük olduğu için boş jellere göre ve CV-AS4, CV-BT4 mikroküreleri ilave edilen jellere göre daha düşük adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri göstermişlerdir (t-test, $p<0.05$).

CV-AS4 ve CV-BT4 grubu mikroküreler nm boyutundadır ve jellere süspansiyon şeklinde ilave edilmişlerdir. Bu nedenle CV-T1 ve CV-K1 grubu mikroküre içeren jellere göre adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri anlamlı şekilde daha yüksektir (t-test, $p<0.05$). Bu grup mikroküre-jeller boş jeller ile kıyaslandığında ise anlamlı şekilde daha

düşük adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri göstermişlerdir (t-test, $p<0.05$).

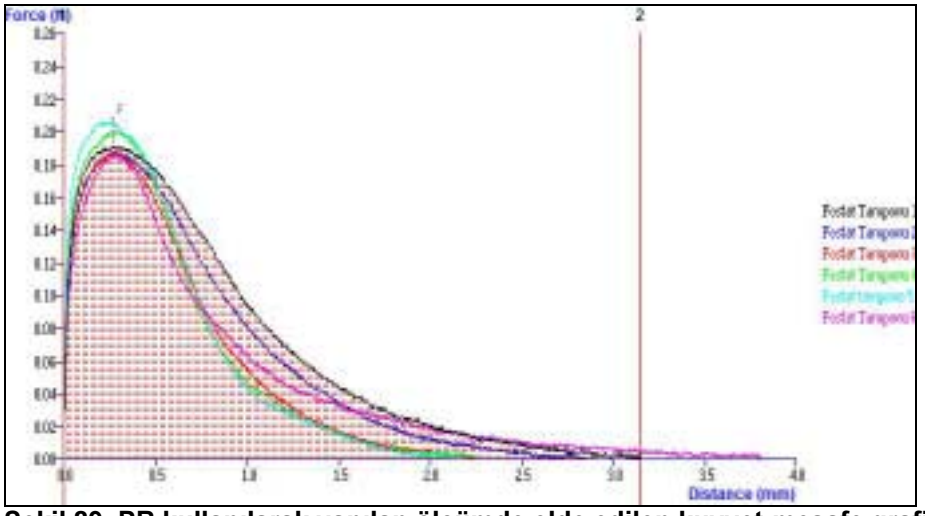
Mukoadezyon özelliğinin değerlendirilmesinde adezyon, kohezyon kuvvetleri ile elastikiyetin büyük olması beklenir. Büyük oldukları durumlarda formülasyonun vajinada kalış süresi uzar. Bu açıdan değerlendirdiğimizde üzerinde çalıştığımız ilaç şekillerinden (jel, lipojel ve mikroküre-jel) jellerin diğerlerinden daha yüksek adezyon, kohezyon ve elastikiyet değeri gösterdiği bulunmuştur (t-test, $p<0.05$).

Jeller kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise, HPMC jelin adezyon, kohezyon ve elastikiyeti diğer jellerden anlamlı bir şekilde fazladır (t-test, $p<0.05$). Hazırladığımız jelleri mekanik özellikleri en iyi olandan kötüye doğru sıralarsak HPMC>KR>HPMC-POL>KT şeklinde olduğunu görüyoruz. Bu durumda mekanik özellikleri açısından en düşük formülasyon kitosan jel formülasyonudur.

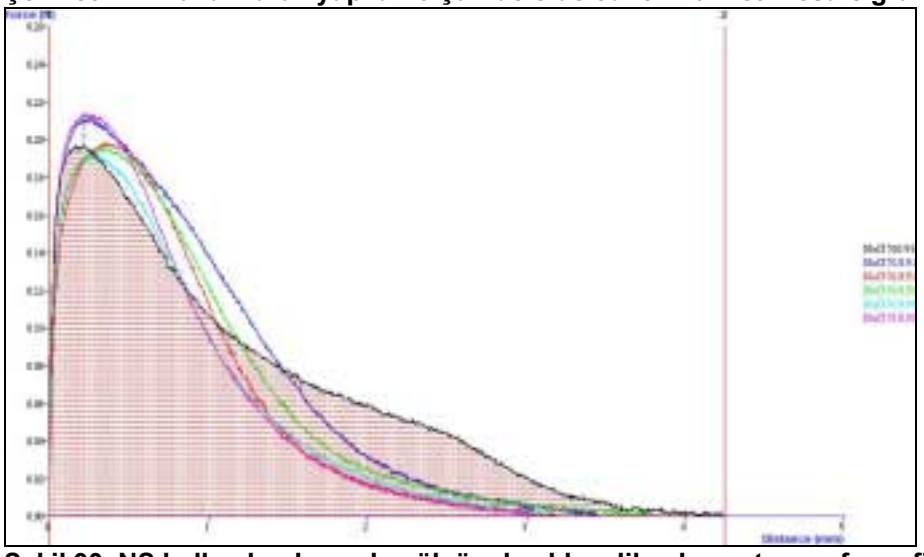
4.6. Vajinal Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.6.1. Farklı Daldırma Sıvılarının Denenmesine Ait Bulgular

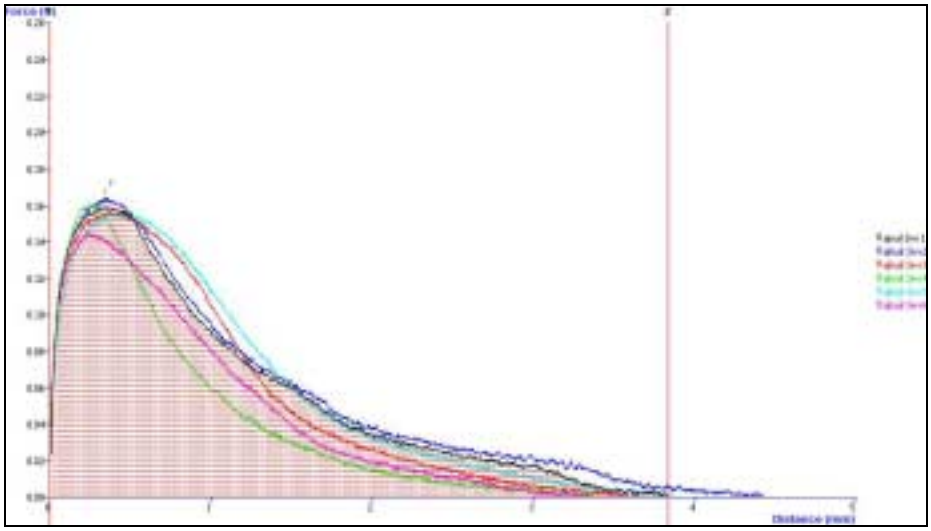
Farklı daldırma sıvılarının denendiği çalışmamızda test koşulları ve alet parametreleri Bölüm 3.2.12'de anlatılmıştır. Dört farklı sıvıda yapılan ölçümler kuvvet-uzaklık grafiği şeklinde elde edilmiştir (Şekil 89-92)



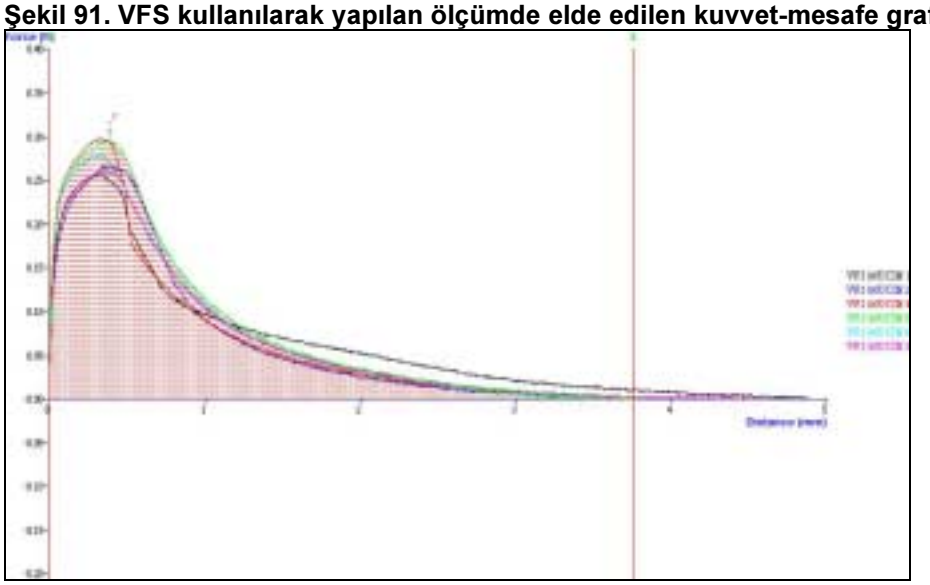
Şekil 89. PB kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 90. NS kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 91. VFS kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 92. VFS+müsin kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği

Bu grafiklerde ölçülen değerlerin hesapları sonucunda bulunan değerler Tablo 58'de gösterilmiştir.

Tablo 58. Farklı daldırma sıvılarda yapılan mukoadezyon ölçümünün sonuçları

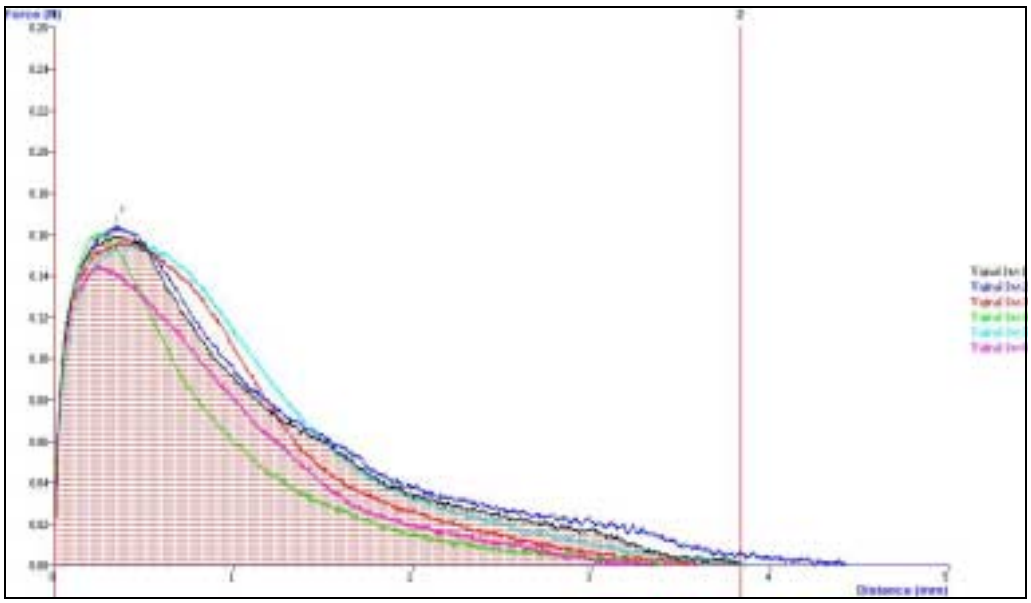
	PB	NS	VFS	VFS MUCIN
KUVVET (N)	0.194±0.007	0.202±0.008	0.199±0.008	0.276±0.015
İŞ (N.mm)	0.176±0.019	0.245±0.024	0.179±0.014	0.287±0.016
MUKOADEZYON İŞİ (mj/cm^2)	0.133±0.014	0.185±0.018	0.138±0.021	0.216±0.012

Bu sonuçlara göre kullanılan ortamlar arasındaki farkın en iyi şekilde görülmesini mukoadezyon işinin hesaplanması ile görebildik. Bu

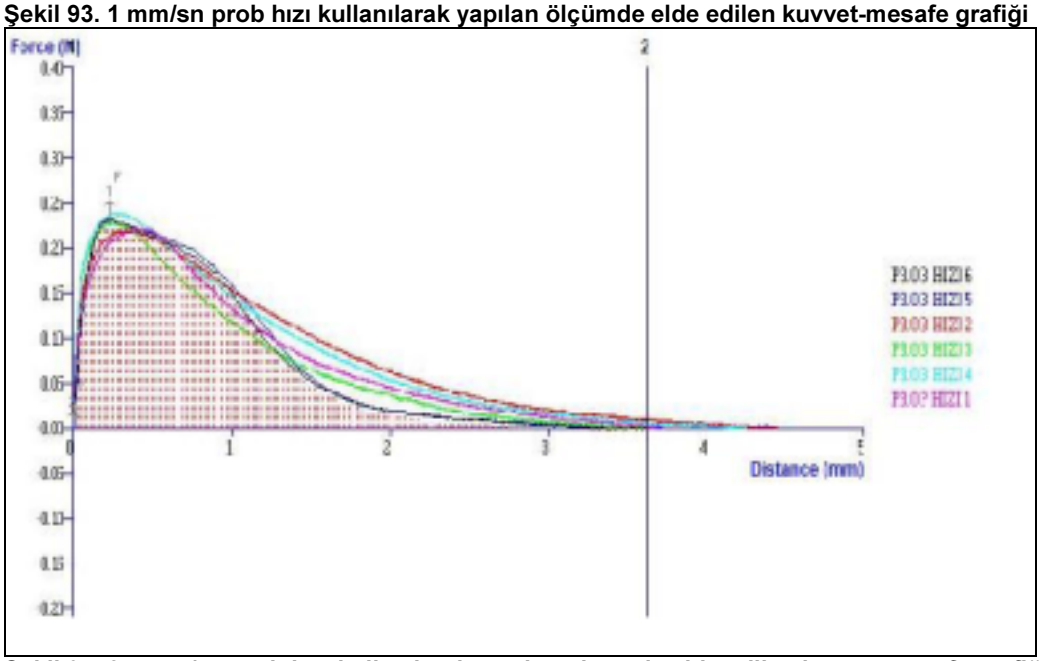
parametreye göre değerlendirildiğinde en fazla yapışma müsin içeren vajinal sıvıda gerçekleşmiştir. Bu nedenle mukoadezyon ölçümlerimizde VFS+Müsin ortamının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.6.2. Farklı Prob Hızlarının Denenmesine Ait Bulgular

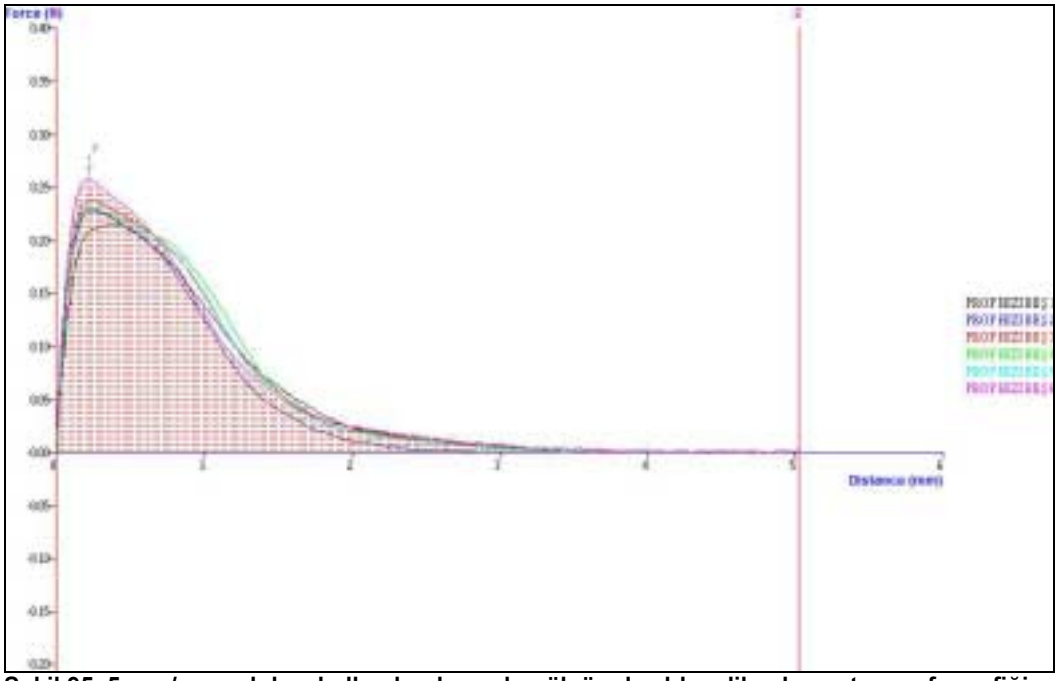
Üç farklı prob hızında yapılan ölçümlerin kuvvet-mesafe grafikleri Şekil 93-95'de gösterilmiştir.



Şekil 93. 1 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 94. 2.5 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 95. 5 mm/sn prob hızı kullanılarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği

Bu ölçümlerden sonra elde edilen verilerden mukoadezyon işi hesaplandı ve Tablo 59'da gösterildi.

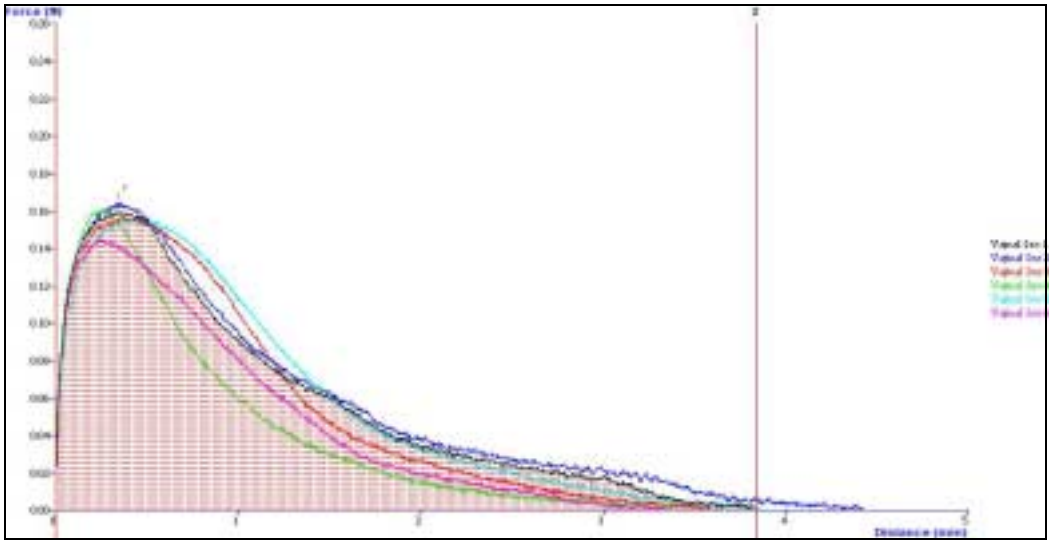
Tablo 59. Farklı prob hızlarında yapılan mukoadezyon ölçümünün sonuçları

UYGULANAN PROB HIZI	KUVVET (N)	İŞ (N.mm)	MUCO. İŞİ (mj/cm^2)
1 mm/dak	0.276±0.015	0.287±0.016	0.216±0.012
2.5 mm/dak	0.230±0.006	0.301±0.028	0.227±0.021
5 mm/dak	0.234±0.012	0.269±0.014	0.203±0.010

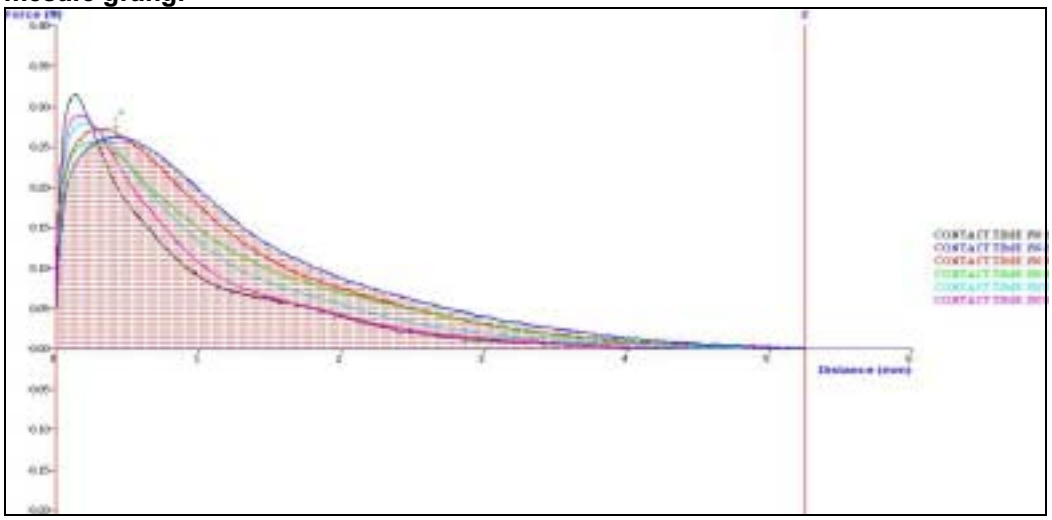
Ölçüm sonucunda yapılan değerlendirmelerine göre mukoadezyon işi açısından farklı prob hızlarının arasında çok belirgin bir fark yoktur. Ortalama bir değer olarak 1 mm/sn prob hızı olarak seçilmiştir.

4.6.3. Mukoza İle Ölçümü Yapılan Örneğin Farklı Temas Sürelerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

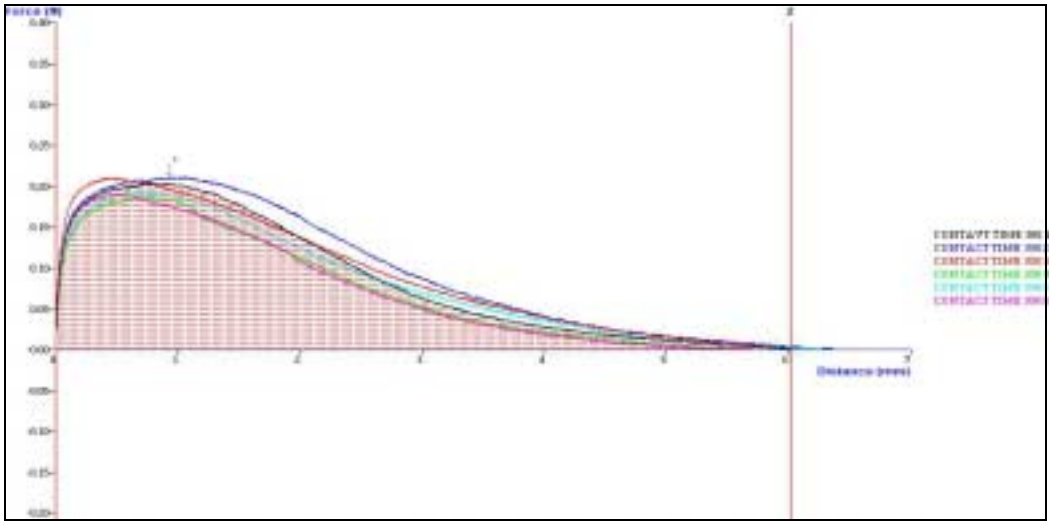
Biz çalışmamızda 60, 150 ve 300 saniye sürelerde çalıştık. Elde edilen kuvvet-mesafe grafikleri Şekil 96-98'de gösterilmiştir.



Şekil 96. 60 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 97. 150 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği



Şekil 98. 300 sn temas süresi uygulanarak yapılan ölçümde elde edilen kuvvet-mesafe grafiği

Mukoza ile Carbopol jelin temas süresi mukoadezif parametreleri etkilemektedir. Grafiklere (Şekil 96-98) bakıldığında sürenin artması ile AUC değerinin arttığı görülebilmektedir. Elde edilen veriler hesaplandığında benzer sonuç elde edilmiştir (Tablo 60).

Tablo 60. Farklı temas sürelerinde yapılan mukoadezyon ölçümünün sonuçları

UYGULANAN TEMAS SÜRESİ	KUVVET (N)	İŞ (N.mm)	MUCO. İŞİ (mj/cm^2)
60 SANİYE	0.276±0.015	0.287±0.016	0.216±0.012
150 SANİYE	0.280±0.017	0.368±0.057	0.277±0.043
300 SANİYE	0.200±0.009	0.515±0.053	0.388±0.040

Mukoadezyon işi değerlerine bakıldığında süre arttıkça değerlerin de arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle ortalama bir değer olarak deneylerimize 150 sn ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.6.4. Mukoadezyon Test Parametrelerin Değerlendirilmesinin Sonuçları

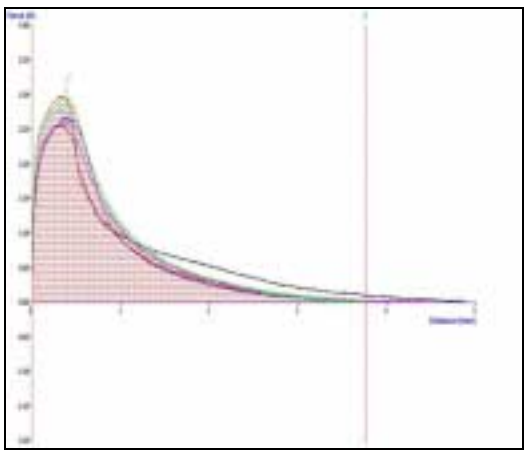
Yukarıda gösterilen değerler ve yapılan açıklamalar doğrultusunda Tablo 61'de verilen test parametrelerinin bundan sonraki deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir. Hazırlanan tüm biyoadezif vajinal formülasyonların yapışma özellikleri bu parametreler kullanılarak belirlenecektir.

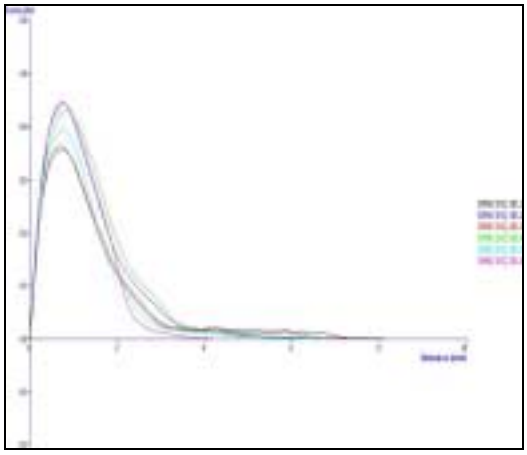
Tablo 61. Validasyon çalışması sonucunda elde edilen ve tüm çalışmalarda kullanılacak olan mukoadezyon test koşulları

Test Koşulları ve Alete Ait Parametreler	Kullanılacak Değerler
Daldırma Sıvısı	VFS+Musin
Prob Hızı (mm/sn)	1.0
Probun Uyguladığı Kuvvet (N)	0.2
Mukoza ile Örneğin Temas Süresi (sn)	150

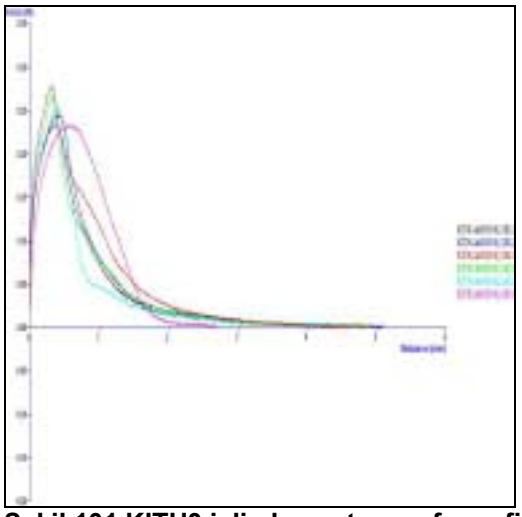
4.6.5. Etkin Madde İçermeyen Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyonlarına Ait Bulgular

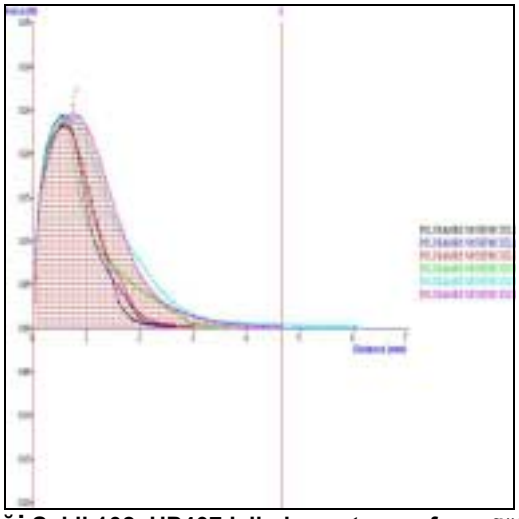
Jeller üzerinde yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kuvvet-mesafe grafikleri Şekil 99-102'de gösterilmiştir.





Şekil 99. KR jelin kuvvet-mesafe grafiği **Şekil100.K100M jelin kuvvet-mesafe grafiği**





Şekil 101.KITH3 jelin kuvvet-mesafe grafiği **Şekil 102. HP407 jelin kuvvet-mesafe grafiği**

Bu grafiklerden elde edilen veriler hesaplandı ve hangi jelin daha iyi mukoadezyon gösterdiğini belirlemek üzere Tablo 62'de gösterildi.

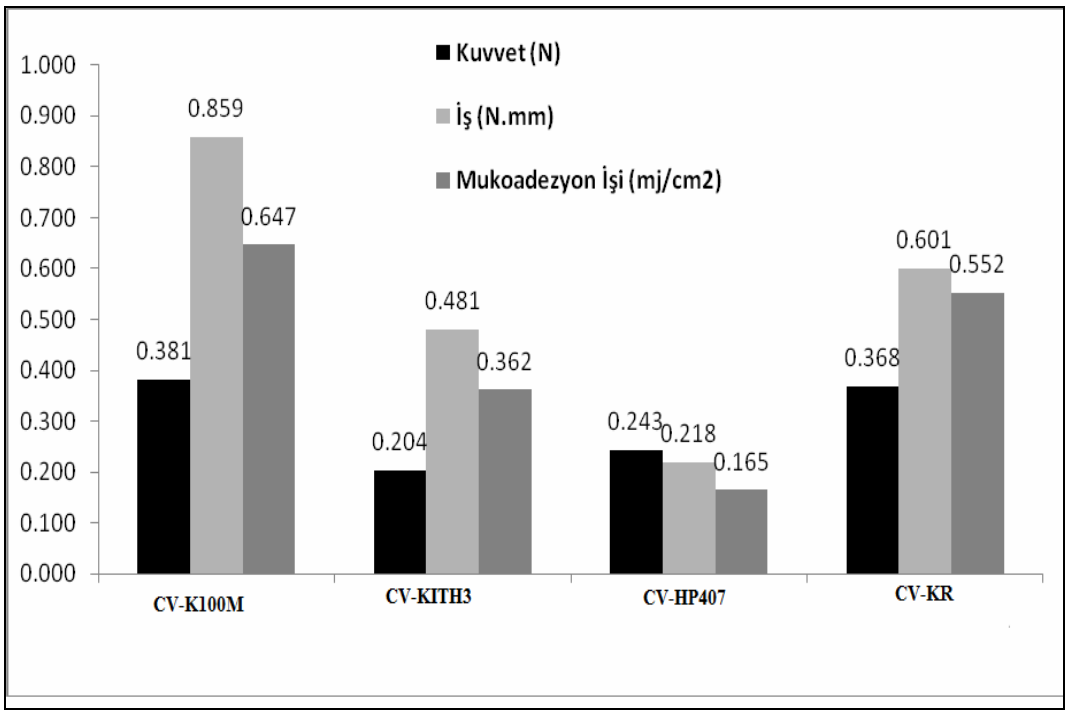
Tablo 62. Etkin madde içermeyen farklı jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları

UYGULANAN JEL	KUVVET (N)	İŞ (N.mm)	MUCO. İŞİ (mj/cm^2)
KR	0.276±0.015	0.287±0.016	0.216±0.012
K100M	0.407±0.033	0.695±0.060	0.524±0.045
KITH3	0.252±0.015	0.234±0.022	0.176±0.017
HP407	0.241±0.005	0.313±0.053	0.206±0.040

Bu sonuçlara göre değerlendirdiğimizde mukoadezyonu en yüksek olan jelin HPMC jel olduğu görülmektedir. Sonuç formülasyon belirlenmesinde bu özellik önemli bir parametredir.

4.6.6. Cidofovir Etkin Maddesi İçeren Biyoadezif Vajinal Jellerin Mukoadezyon Testleri

Aynı koşullarda CV içeren jellerin mukoadezyon özellikleri ölçüldü. CV içeren jeller üzerinde yapılan ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 103'de verilmiştir.



Şekil 103. CV içeren farklı jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları

CV içeren jellerin mukoadezyon işleri değerlendirildiğinde CV-K100M>CV-KR>CV-KITH3>CV-HP407 sıralamasını görmekteyiz. CV-HPMC jelin salım profili de amaca uygun bulunduğu için sonuç formülasyon olmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda lipojellerin ve mikroküre içeren jellerin de mukoadezyon özellikleri belirlenmiştir (Tablo 63).

Tablo 63. CV içeren jellerin, lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları

Formülasyon	Kuvvet (N)	İş (N.mm)	Mukoadezyon İşi (mj/cm^2)
		JEL FORMÜLASYONLARI	
CV-KITH3	0.204±0.054	0.481±0.019	0.362±0.015
CV-K100M	0.381±0.013	0.859±0.056	0.647±0.067
CV- HP407	0.255±0.002	0.218±0.010	0.165±0.008
CV-KR	0.368±0.048	0.601±0.034	0.552±0.038
		LİPOJEL FORMÜLASYONLARI	
CV-FS2-KITH3	0.178±0.038	0.401±0.031	0.303±0.048
CV-FS2-K100M	0.352±0.039	0.792±0.043	0.600±0.016
CV-FS2-HP407	0.191±0.038	0.430±0.034	0.326±0.025
CV-FS2-KR	0.337±0.029	0.758±0.049	0.574±0.038
CV-PS2-KITH3	0.163±0.071	0.367±0.016	0.278±0.034
CV-PS2-K100M	0.295±0.074	0.664±0.048	0.503±0.029
CV-PS2-HP407	0.158±0.028	0.356±0.091	0.270±0.038
CV-PS2-KR	0.318±0.035	0.716±0.052	0.542±0.026
		MİKROKÜRE-JEL FORMÜLASYONLARI	
CV-T1-KITH3	0.155±0.029	0.348±0.038	0.459±0.037
CV-T1-K100M	0.322±0.083	0.724±0.036	0.956±0.023
CV-T1-HP407	0.173±0.065	0.389±0.024	0.513±0.046
CV-T1-KR	0.308±0.033	0.693±0.037	0.525±0.052
CV-K1-KITH3	0.160±0.028	0.297±0.038	0.225±0.067
CV-K1-K100M	0.330±0.044	0.743±0.043	0.563±0.047
CV-K1-HP407	0.190±0.029	0.428±0.027	0.324±0.011
CV-K1-KR	0.317±0.048	0.713±0.041	0.540±0.048
CV-AS4-KITH3	0.123±0.055	0.276±0.055	0.209±0.047
CV-AS4-K100M	0.256±0.031	0.576±0.038	0.436±0.028
CV-AS4-HP407	0.132±0.012	0.297±0.083	0.225±0.051
CV-AS4-KR	0.268±0.087	0.603±0.068	0.457±0.029
CV-BT4-KITH3	0.131±0.009	0.297±0.043	0.225±0.013
CV-BT4-K100M	0.279±0.041	0.628±0.071	0.476±0.029
CV-BT4-HP407	0.153±0.028	0.344±0.083	0.261±0.022
CV-AS4-KR	0.271±0.031	0.610±0.66	0.462±0.035

Lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon özellikleri değerlendirildiğinde ise jellere göre değerlerin düştüğünü görmekteyiz. Ancak CV-K100M>CV-KR>CV-KITH3>CV-HP407 sıralaması lipojel ve mikroküre-jeller için de geçerlidir.

4.7. İn Vivo Çalışmalar Ait Bulgular

Bölüm 3.2.14'de anlatıldığı gibi yapılan in vivo çalışmalarda sonuç formülasyon olarak CV içeren HPMC jel (CV-K100M2) kullanılmaya karar verilmiştir. Bu formülasyon 48 saat boyunca kontrollü salım yapan ve iyi yapışma özelliği gösteren bir formülasyondu. Lipozom ve mikroküre içeren jellerimizden salım çok az olduğu için sonuç formülasyon olarak seçilmediler.

CV-K100M2 formülasyonu in vivo çalışmalarda tavşanların sırtında oluşturulacak olan siğillerin tedavisinde kullanılacak ve tedavi etkinliği CV'in paranteral preparatı ile karşılaştırılacaktı. Ancak ayrıntılarını Bölüm 3.2.13'de anlattığımız Pasteur Enstitüsünden sağlanan Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) ile Yeni Zellanda tipi dişi tavşanları enfekte edildiği halde siğil oluşumu gözlenememiştir.

Tavşanların sırtı traş edildikten sonra tahriş edilmiş ve kızaran, kanamak üzere olan deriye virüs çözeltisi sürülmüştür. Bu işlem 6 hafta ara ile dört defa yapılmıştır. Siğil oluşması gözlenmemiştir. Belli zaman aralıklarında 20 adet tavşanın enfekte edilen sırt bölgelerinin resimleri çekilmiştir. Bir tavşanın 6 hafta boyunca çekilen resimleri Resim 10-16'da verilmiştir.



Resim 10. CRPV ile enfekte edilen 4.tavşanın ilk gün resmi



Resim 11. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın birinci hafta resmi



Resim 12. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın ikinci hafta resmi



Resim13. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın üçüncü hafta resmi



Resim 14. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın dördüncü hafta resmi



Resim 15. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın beşinci hafta resmi



Resim 16. CRPV ile enfekte edilen 4. tavşanın altıncı hafta resmi

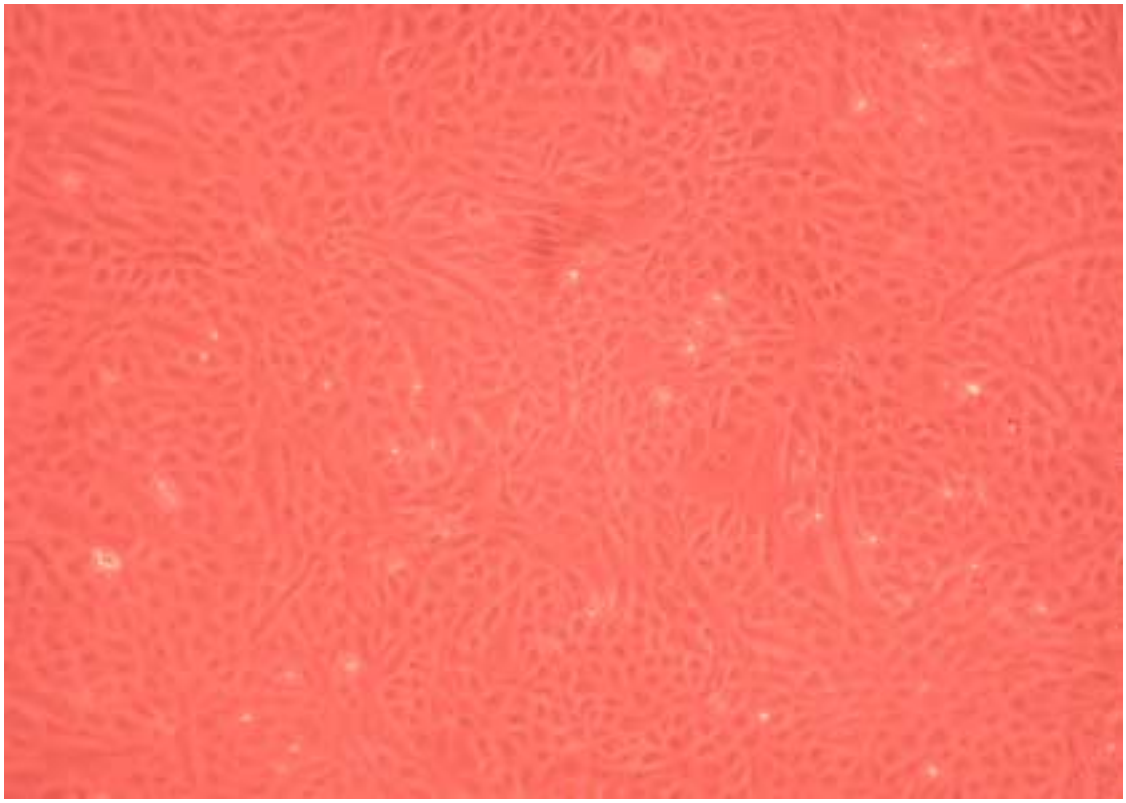
4.8. Cidofovirin Sığır Herpes Virüsü (Bhv) Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Tayin Edildiği Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

4.8.1. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular

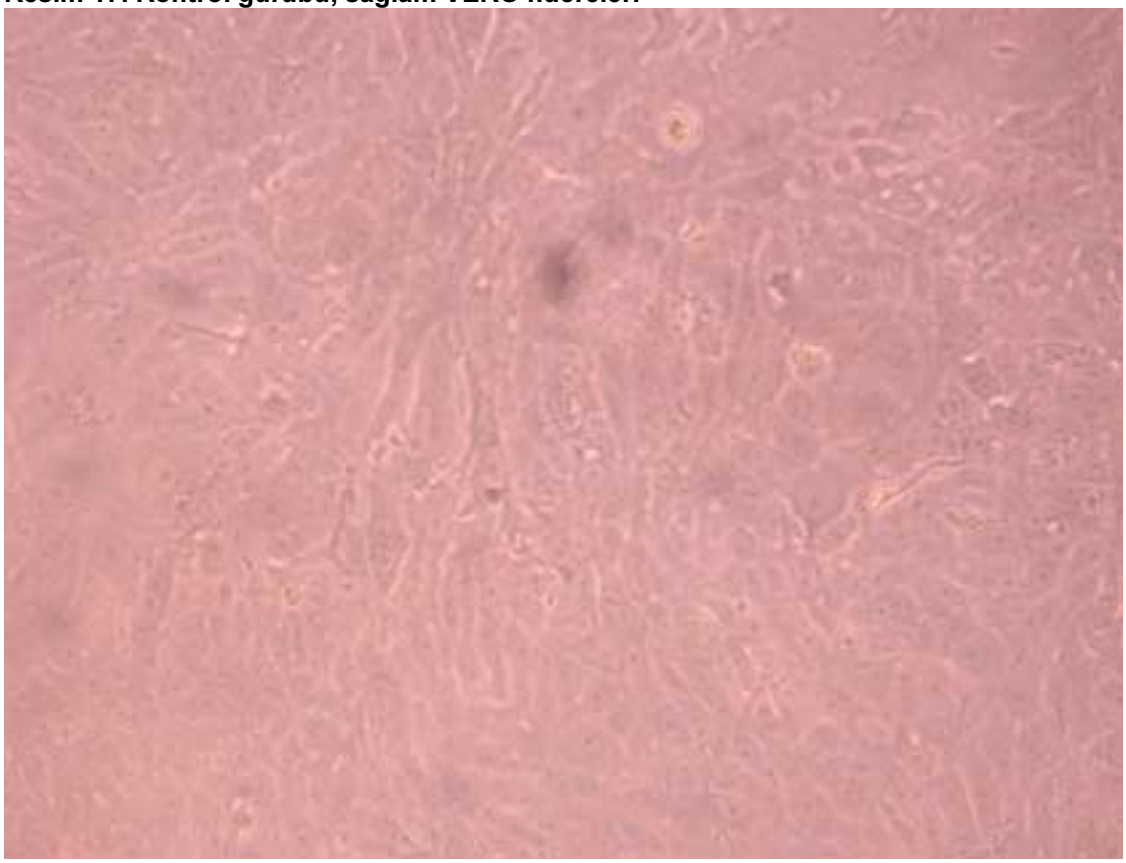
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji ABD'nda gerçekleştirilen çalışmada, test edilen örneklerin toksik etkileri VERO hücreleri üzerindeki sitopatolojik değerlendirmeler ile yapıldı. Sonuçta, doğrudan VERO hücrelerinin üzerine uygulanan biyoadezif jellerden Carbopol, kitosan, HPMC ve poloksamer-HPMC jelleri toksik görüldü. Ancak Agar Overlay Test Yöntemi kullanıldığında HPMC jelin toksik etki göstermediği tespit edildi.

Resim 17-21'de 4 faklı jelin direkt olarak VERO hücrelerinin üzerine uygulandığında, 48 saatlik sitotoksisite çalışması sonucunda mikroskop görüntüleri verilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

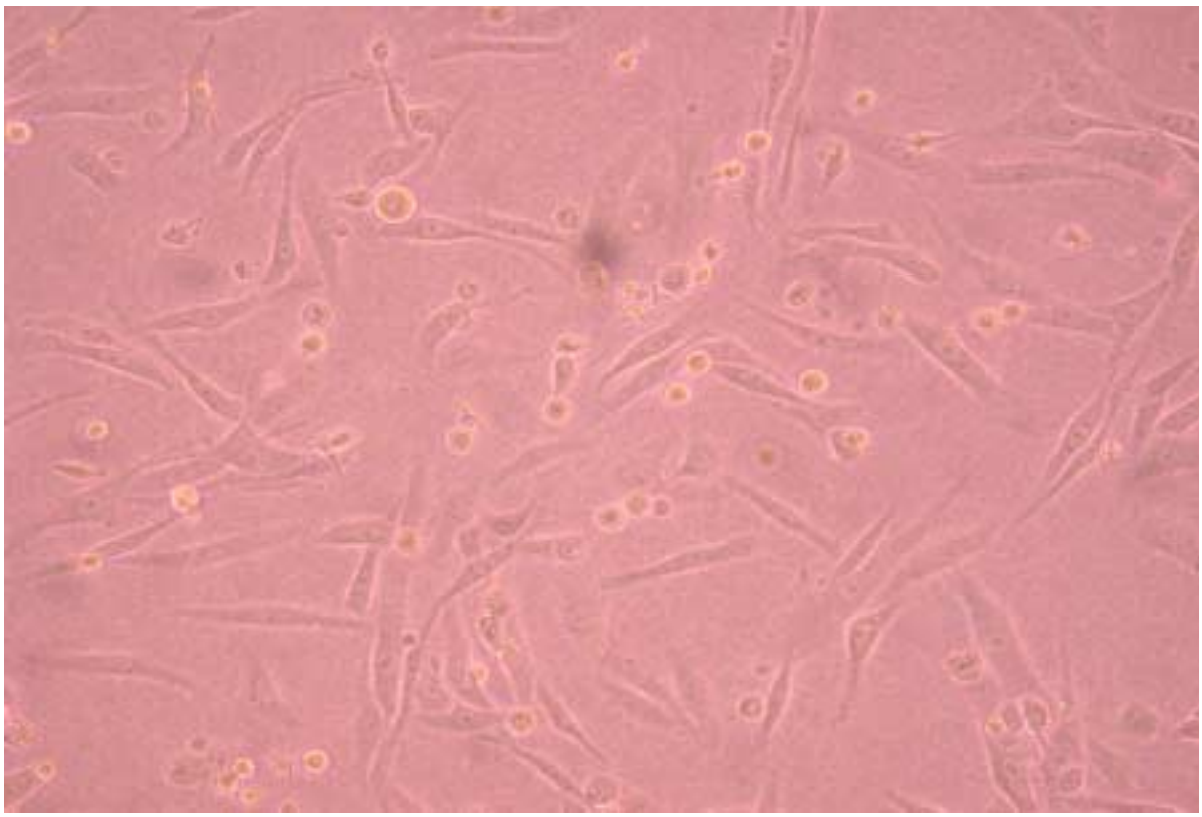
Yapılan histopatolojik değerlendirmeler neticesinde, jellerin hücre üzerindeki toksik mikroskobik temel bulgusu hücre parçalanması olarak tespit edilmiştir (Resim 18-21). Hücrelerin lizisine varan süreçte ise, ana toksisite gelişim basamakları olarak; karyoreksis (hücre çekirdeğinin parçalanması) ve buna bağlı olarak hiperkromatik hücre gelişimi birinci bulgu olarak kaydedildi. Bu dönem zarfında, yine bazofilik karakterli intrastoplazmik granülasyon ve bazı hücrelerde vakuolizasyon tespit edildi (Resim 17). İlerleyen dönemlerde ise, kromozom fragmantasyonu (parçalanması) neticesinde hiperkromatik hücre yüzeyinde apoptotik cisimcikler gözlendi (Resim 20). Devamında koloni organizasyonu sergileyen hücrelerde gruptan ayrılma, büzülme ve lizise kadar varan basamaklarda çeşitli değişiklikler gözlendi. Lizise uğramış hücre alanları, makroskobik alanda şeffaf görüntü vermiştir. Resim 17-21'de 4 faklı jelin 48 saatlik sitotoksisite çalışması sonucunda görüntüleri verilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



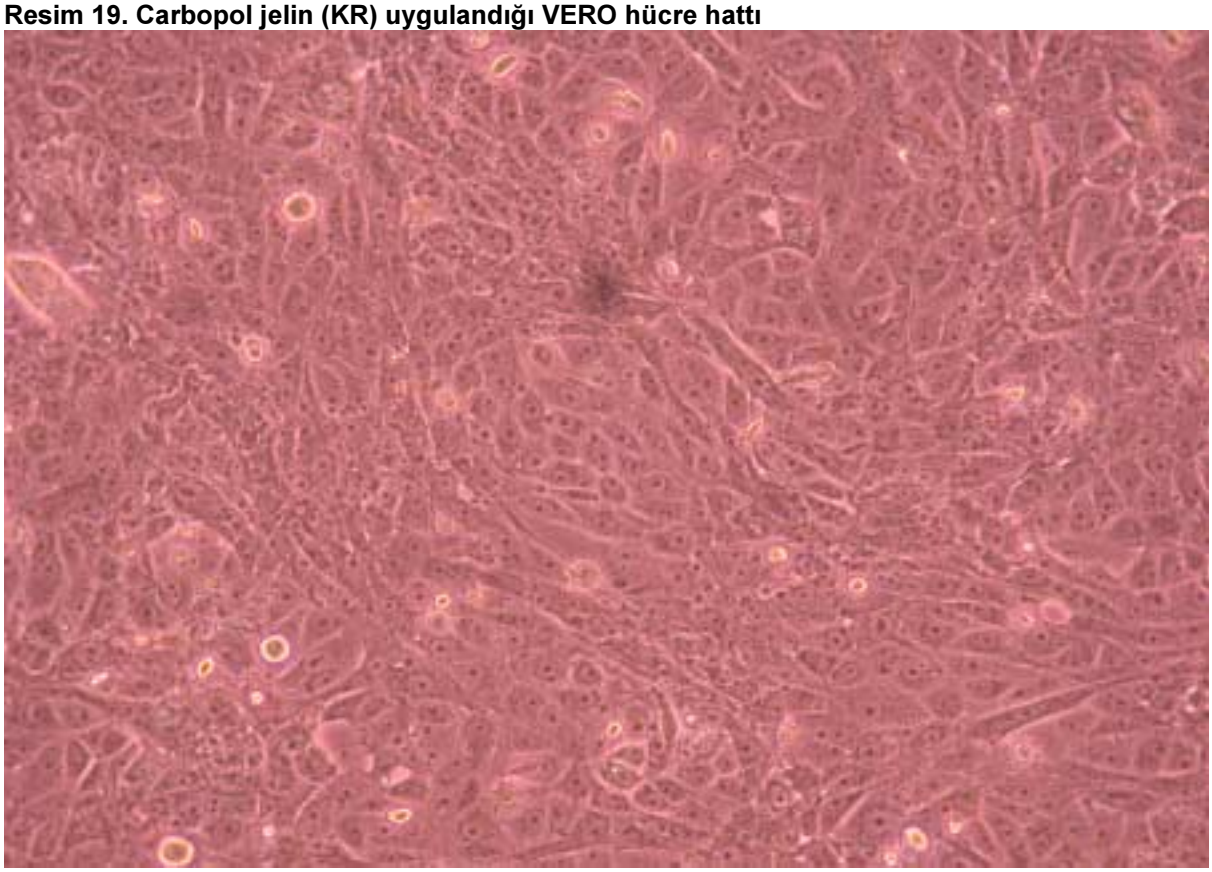
Resim 17. Kontrol gurubu, sağlam VERO hücreleri



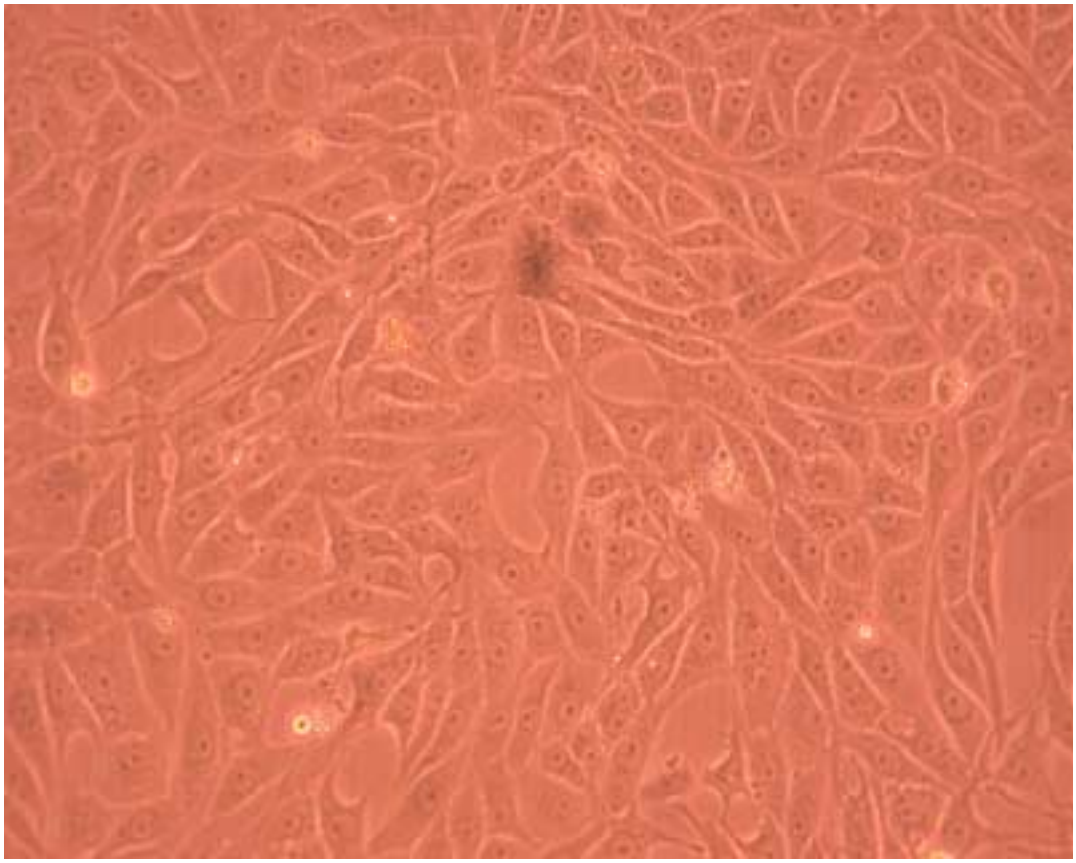
Resim 18. Kitosan jelin (KITH3) uygulandığı VERO hücre hattı



Resim 19. Carbopol jelin (KR) uygulandığı VERO hücre hattı



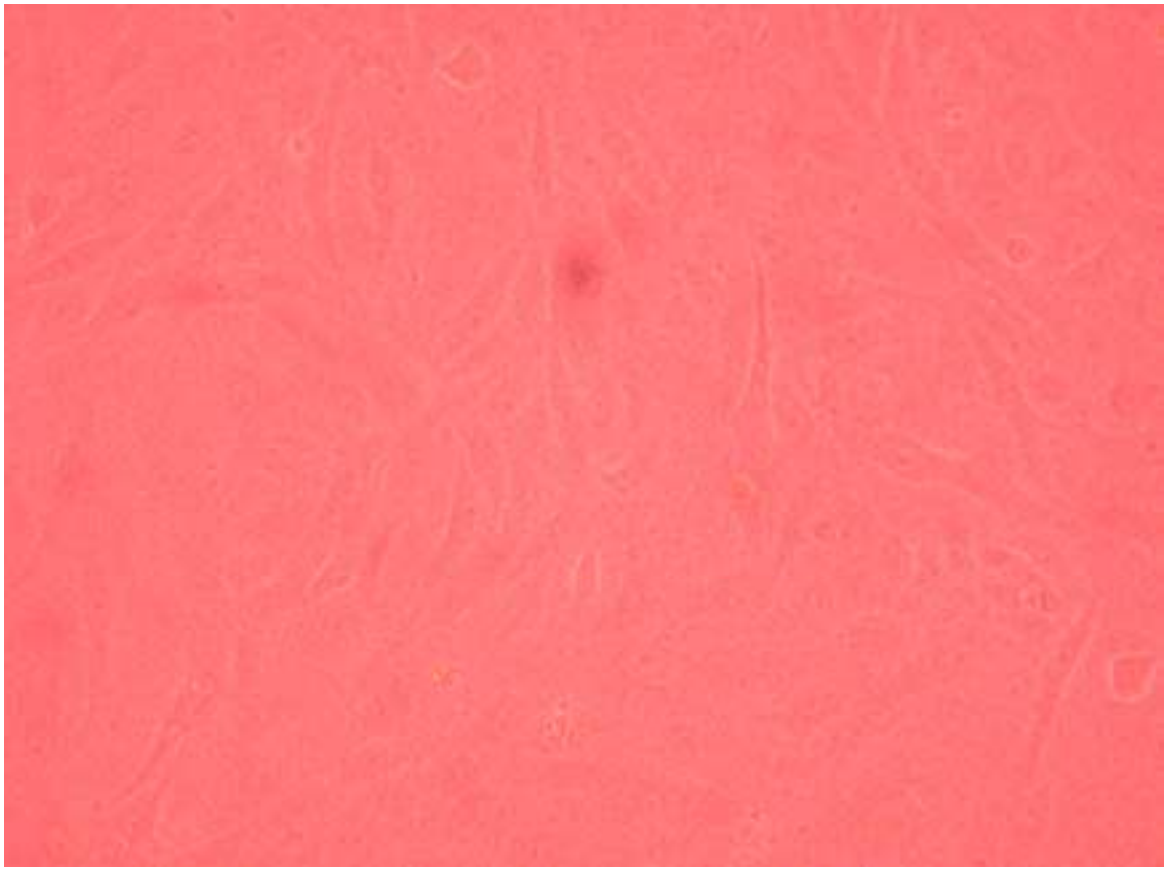
Resim 20. HPMC jelin (K100M) uygulandığı VERO hücre hattı



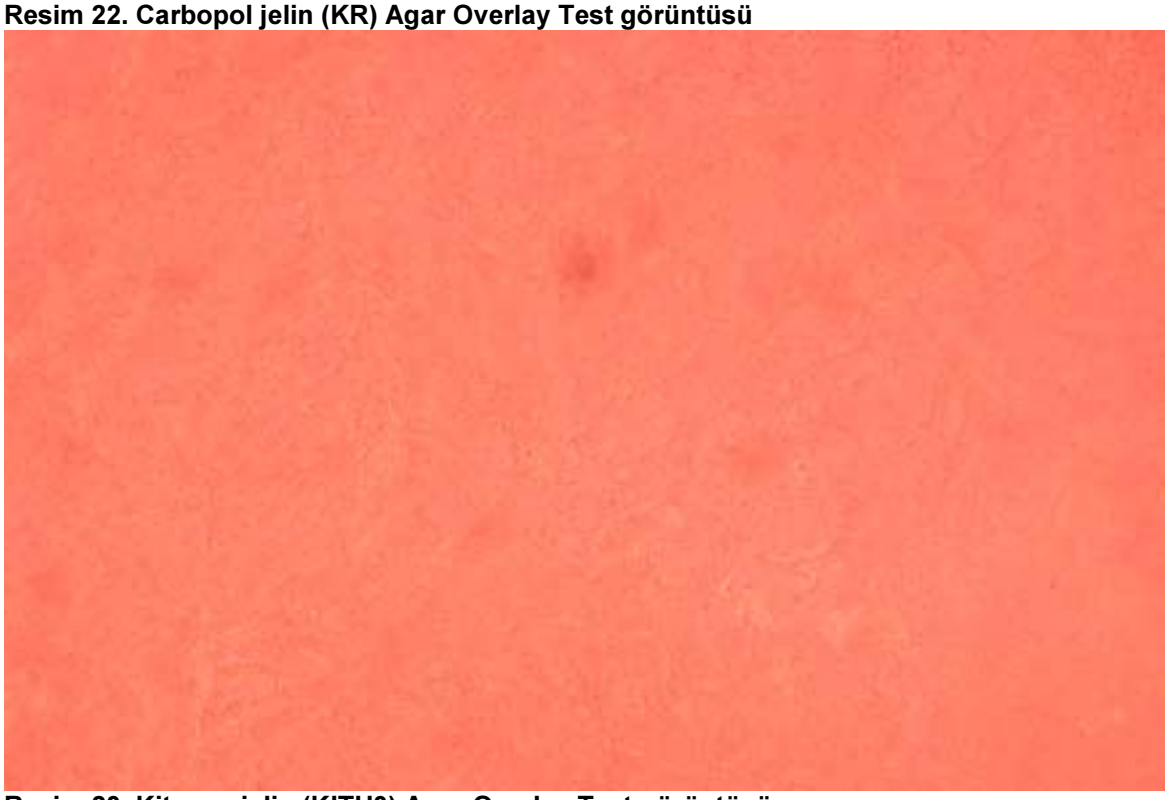
Resim 21. Poloksamer-HPMC jelin (HP407) uygulandığı VERO hücre hattı

4.8.2. Biyoadezif Jellerin VERO Hücresi Üzerinde Agar Overlay Test Yöntemi ile Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular

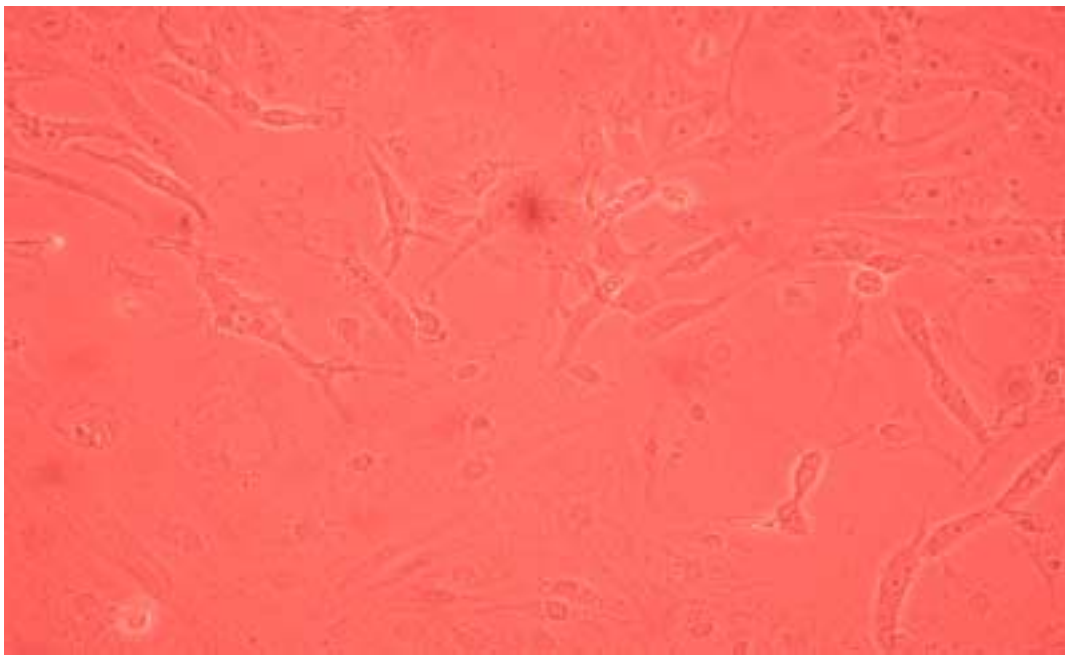
Uyguladığımız 4 farklı jelin üçünde lizise uğramış hücre alanları, makroskobik alanda şeffaf görüntü sergilemiştir (Resim 22-25). HPMC ile hazırlanan jellerde bu durum ile karşılaşılmamıştır. Resim 22-25'deki şeffaf alanlar toksik gelişimin makroskobik olarak tanımlandığı dekolorizasyon alanları olarak kaydedildi.



Resim 22. Carbopol jelin (KR) Agar Overlay Test görüntüsü

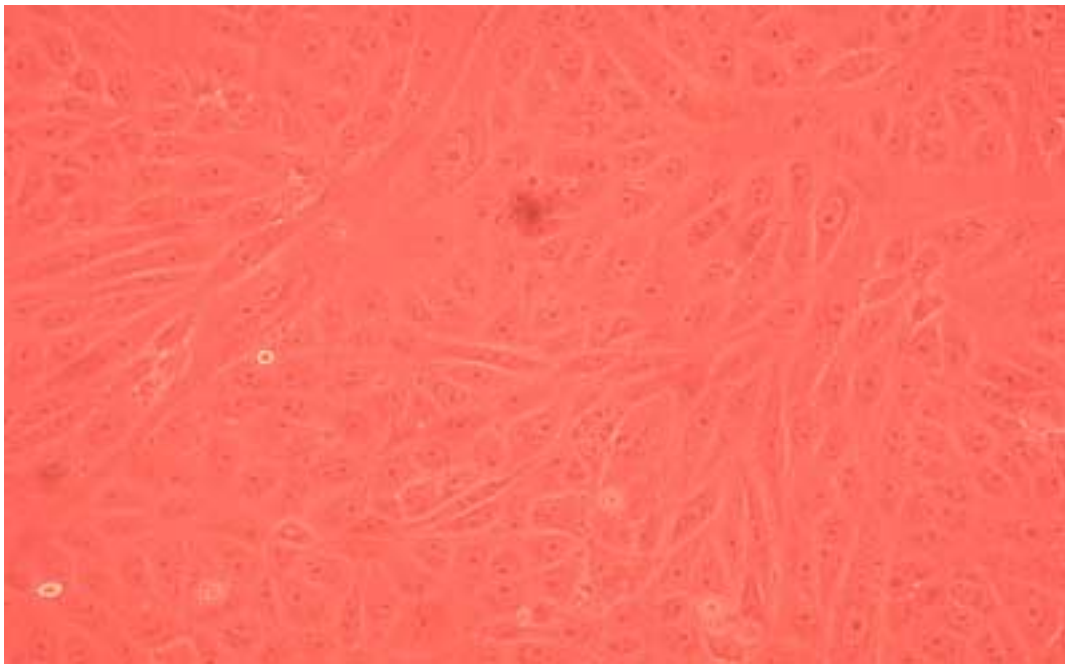


Resim 23. Kitosan jelin (KITH3) Agar Overlay Test görüntüsü



Resim 24. Poloksamer-HPMC jelin (HP407) Agar Overlay Test görüntüsü

Yukardaki şekillerde uygulanan jellerin VERO hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmektedir. Ancak HPMC jel ile yapılan Agar Overlay Test'inde herhangi bir sitotoksik bulguya rastlanmamıştır. HPMC jel direkt olarak Vero hücrelerinin üzerine uygulandığında toksik etki gösterirken, jel ile hücre arasında agar tabakası olduğunda toksik etkisi görülmemiştir.



Resim 25. HPMC jelin (K100M) Agar Overlay Test görüntüsü

Bu bulgular sonucunda etkin maddenin antiviral etkinliği tayin edilirken HPMC jel içinde taşınabileceği sonucuna varıldı. Böylece CV içeren HPMC formülasyonunun antiviral aktivitesi belirlenmiş olacaktır.

4.8.3. Cidofovirin VERO Hücresi Üzerinde Sitotoksisite Deneylerine Ait Bulgular

Etkin madde olarak antiviral etkinliğini inceleyeceğimiz CV'in hücrelere sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile VERO hücrelerinin üretildiği 24 göz plate'e %1 konsantrasyondan başlayarak 10^{-5}'e kadar seyreltme yapıldı. Cidofovir DMEM'de %1 oranında çözüldü ve süzülerek kullanıldı. 10^{-3} seyreltmeye kadar aşağıdaki durumlar hücreler üzerinde gözlendi:

- İrili ufaklı stoplazmik vakualizasyon
- Nükleer membran tahribatı
- Kromozom parçalanması ve çekirdek zarı altında toplanma
- Apopitotik yapıların oluşması

10^{-3} seyreltmeden başlayarak CV'nin toksik etkisi görülmemeye başlamıştır. 10^{-3} seyreltmeli CV konsantrasyonu uygun toksiste olarak seçildi ve devam eden antiviral çalışmada CV dozu olarak kullanıldı.

4.8.4. Antiviral Aktivite Tayinine Ait Bulgular

Çalışmada paralel titrasyonu yapılan BHV-1'in normal visköz medyumdaki enfektivitesi Doku Kültürü İnfektif Doz 50 ($DKID_{50}$) $10^{5.25}$/ mL olarak tespit edildi. Diğer taraftan % 0.001 oranında CV içeren HPMC ilave yapılan enfektivite sorgulamasında BHV-1 titresi $DKID_{50}$ 10^{2}/mL olarak tespit edildi. Bu durum CV'nin BHV-1 replikasyonunu in vitro şartlarda 2 log basamağından daha fazla bloke ettiği şeklinde yorumlandı. Sonuç olarak CV içeren HPMC jelin BHV-1 virüsü üzerinde antiviral etkinliğinin olduğu kanıtlanmış oldu.

5. BULGULAR (oksibütinine ait bulgular)

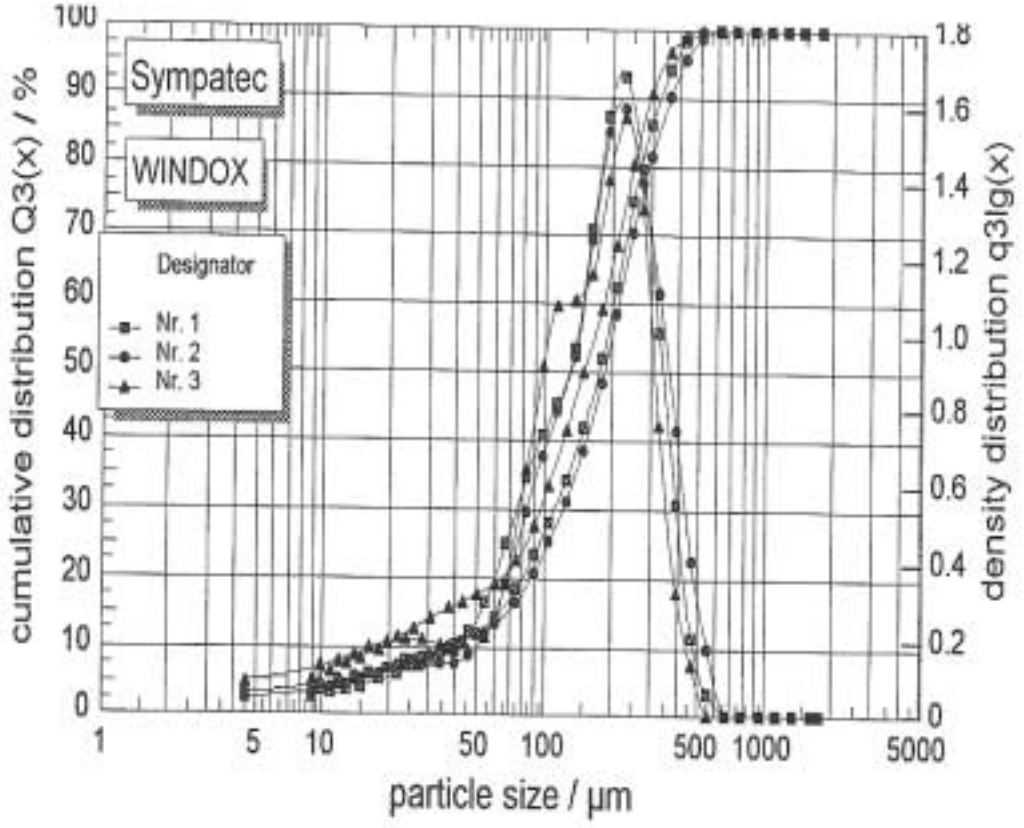
5.1. Oksibütininin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

5.1.1. Erime Noktası Tayini

Oksibütininin erime noktası 129.3 ± 0.8°C, % bağıl sapması 0.620 olarak bulunmuştur.

5.1.2. Partikül Büyüklüğü Analizi

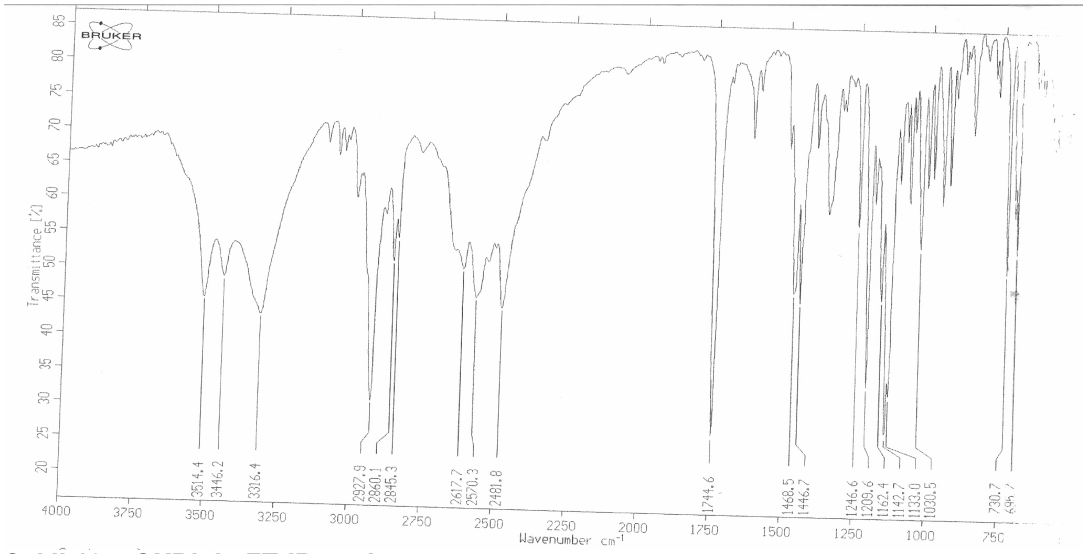
OXB'nin partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 104'de gösterilmiştir. Buna göre OXB'in ortalama partikül büyüklüğü 170.71±3.87 µm olarak bulunmuştur.



Şekil 104. OXB'nin partikül büyüklüğü dağılımı

5.1.3. IR Spektrumu

OXB'e ait FT-IR spektrumları Şekil 105'de gösterilmiştir.

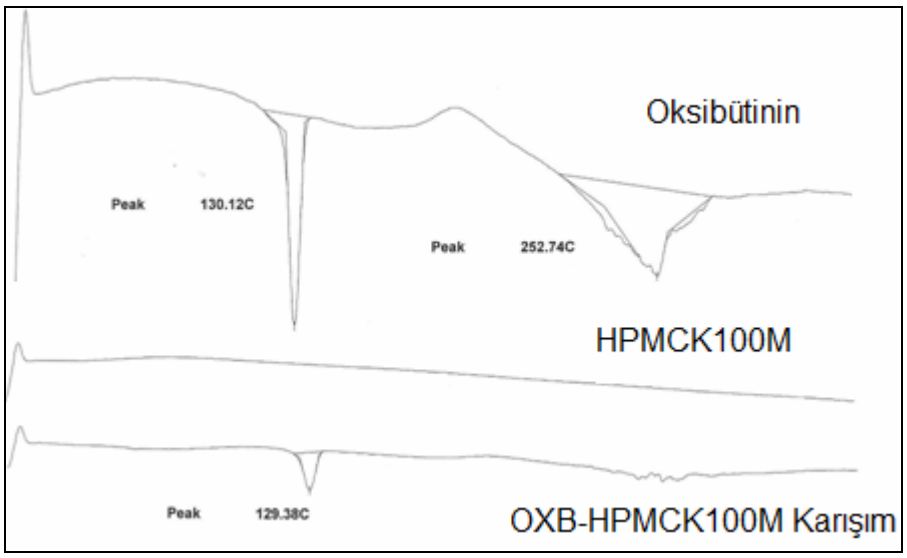


Şekil 105. OXB'nin FT-IR spekturumu

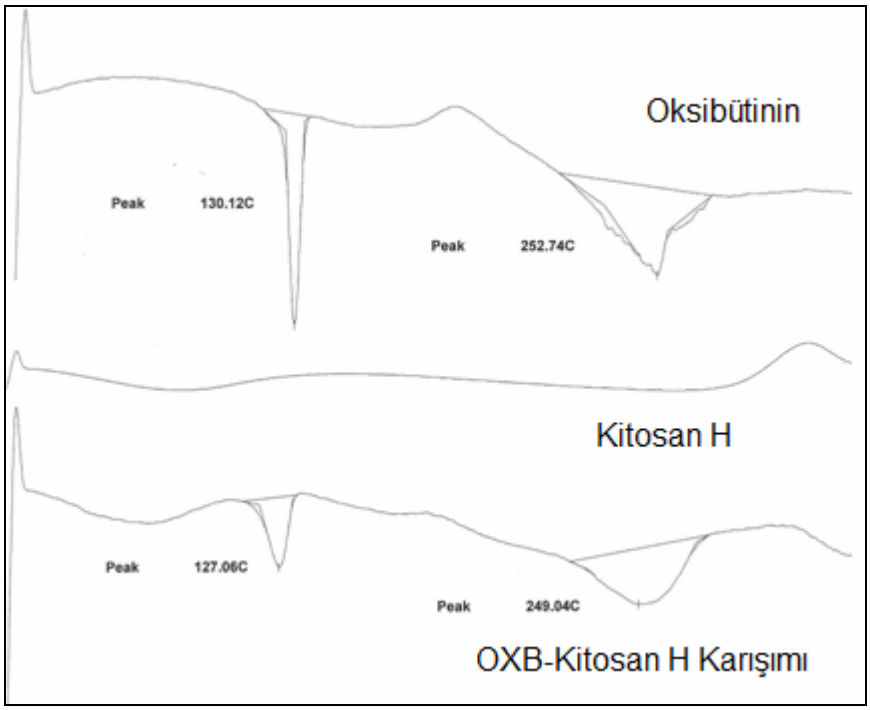
5.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, Bölüm 3.2.1.2.4'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. OXB'e ilişkin termogram Şekil 106'da verilmiştir ve 130°C'de elde edilen endotermik pik OXB'in erime noktasını göstermektedir. Bu değer literatürde 129°C olarak belirtilmiştir[223].

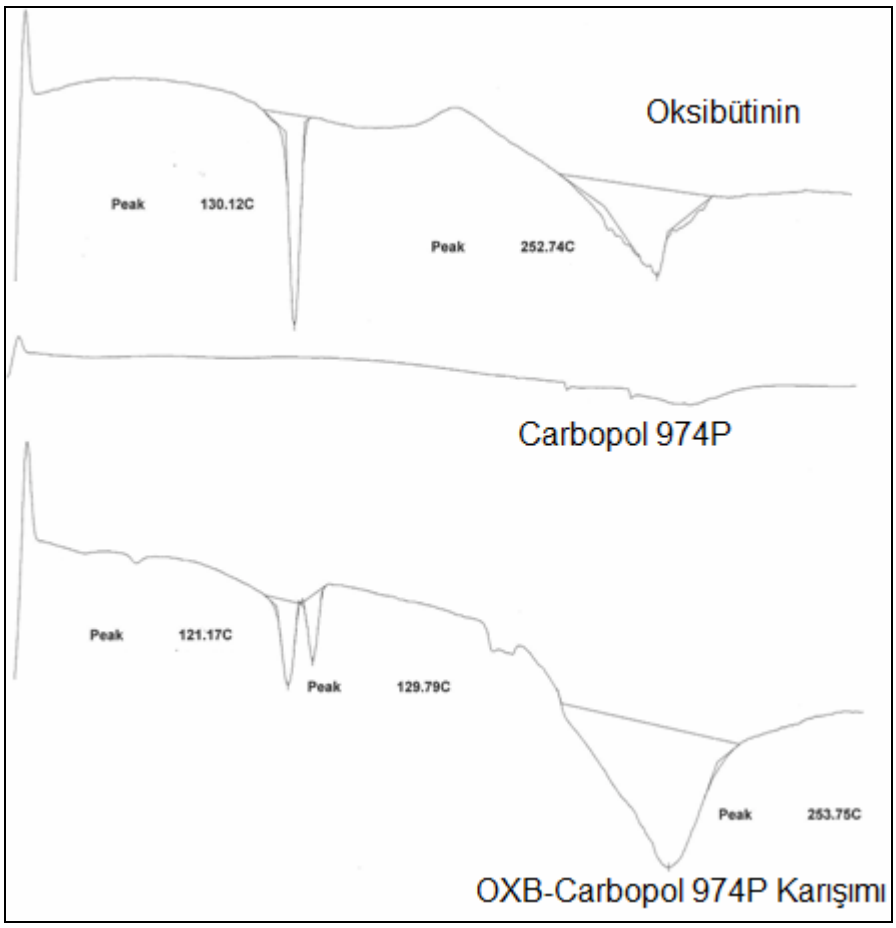
Jel formülasyon çalışmalarımızda en çok kullanılan polimerler (KITH3 ve C974P) ve sonuç formülasyonda kullandığımız polimerin (HPMCK100M) yalnız ve OXB ile 1:1 oranında karışımlarının termogramları çekilmiştir. Şekil 106 ve 107'deki termogramlarda HPMCK100M ve KITH3 polimerleri ile OXB arasında herhangi bir etkileşme görülmezken, Şekil 108'de OXB ile Carbopol 974 arasında etkileşme olabileceği, 121°C'de yeni bir endotermik pikin oluştuğu görülmüştür. OXB'in Carbopol 974P ile jel formülasyonlarının hazırlanması sırasında da etkileşme olduğu ve jel kıvamının oluşmadığı görülmüştür. Bu durum iki madde arasında etkileşme olasılığını kuvvetlendirmiştir. Literatürde OXB'in Carbopol ile yapılmış jel çalışmasına rastlanmadığı için geçimsizlik konusunda da bir bilgi edinilememiştir.



Şekil 106. OXB'nin, HPMCK100M'in ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları



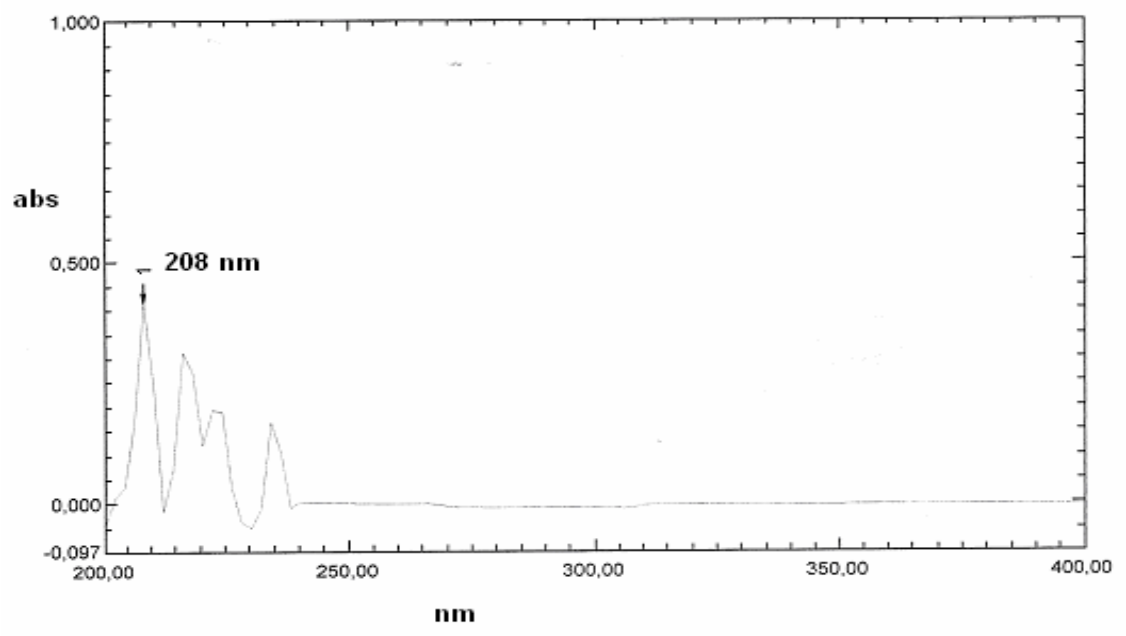
Şekil 107. OXB'nin, Kitosan H'ın ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları



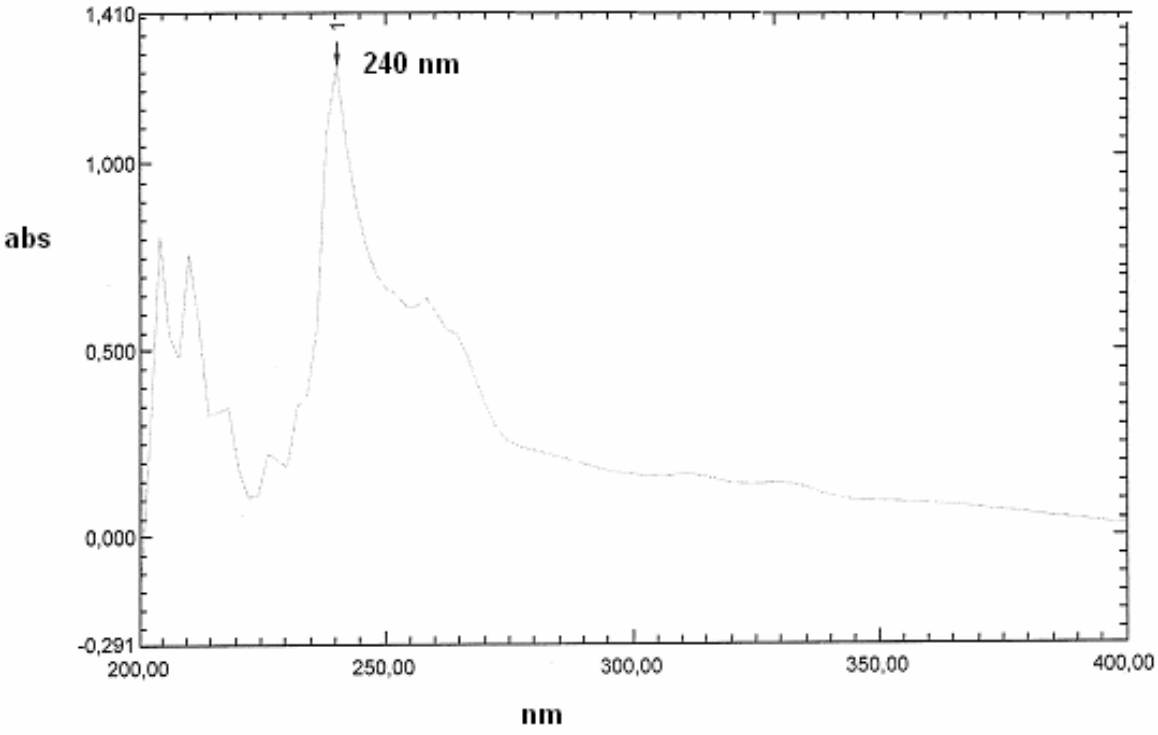
Şekil 108. OXB'nin, Carbopol 974P'nin ve bu maddelerin fiziksel karışımlarının DSC termogramları

5.1.5. UV Spektrumu

Analiz metodunun geliştirilmesi sırasında oksibütinine ait maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyunu bulmak için bölüm 3.3.1.1.4'de açıklanan çalışmalar yapılmıştır. Varma[219] ve arkadaşlarının kullandığı yönteme göre kloroform tabakasında oksibütinin spektrumları 208 nm ve 240 nm'de maksimum absorbans vermiştir (Şekil 109, 110). Ancak bu dalga boylarında alınan ölçümlerde tutarlı bir sonuç elde edilemedi ve yöntem valide edilemedi bu nedenle HPLC ile in vitro analiz yöntemi geliştirildi.



Şekil 109. Oksibütininin kloroform tabakasındaki spekturumu(208 nm)

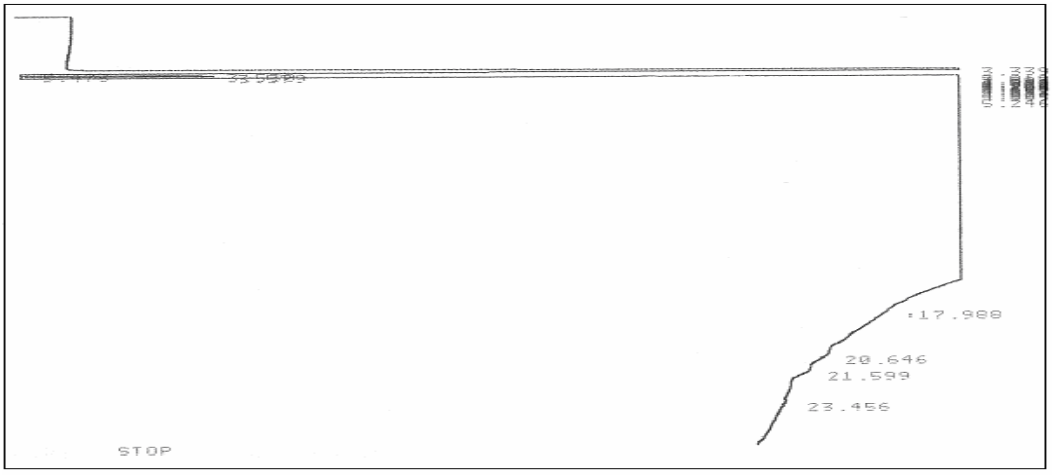


Şekil 110. Oksibütininin kloroform tabakasındaki spekturumu (240 nm)

5.1.6. Oksibütininin HPLC ile İn Vitro Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Yönteminin Validasyonu

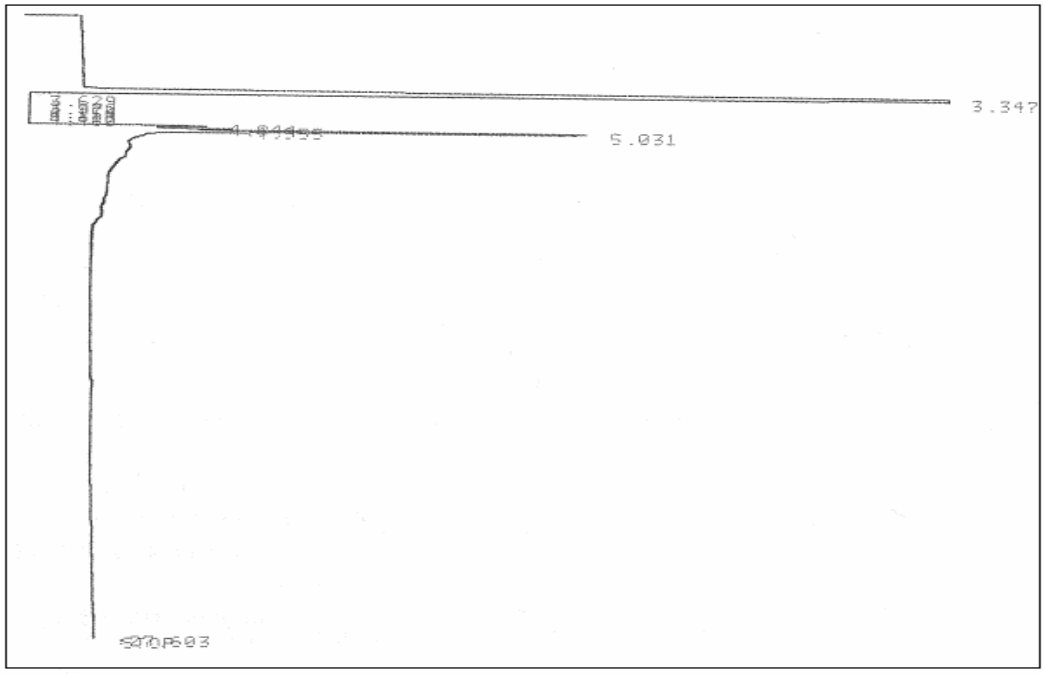
5.1.6.1. Oksibütininin İn Vitro HPLC ile Analiz Yöntemi

Öncelikle Wolfson[220] ve arkadaşlarının kullandığı yöntem denendi ve 0.994. dakikada bir pik bulundu ancak oksibütinine ait olmadığı anlaşıldı. Değişen konsantrasyonlarda oksibütinin hazırlandığında pik hep aynı kaldı. 40 dakika beklendi ve başka pik elde edilemediği için bu yöntem başarısız kabul edildi.Daha sonra Massoud[223] ve arkadaşlarının kullandığı yöntemde öncelikle mobil faz enjekte edildi 4 ve 6. dakikalar arasında piklere rastlandı. Çalışmanın devamında mobil fazda oksibütinin çözülerek belli konsantrasyonlarda HPLC'ye enjekte edildi ve 15. dakikada konsantrasyona duyarlı bir pik elde edildi. Mobil fazda anlamlı sonuçlar elde ettikten sonra oksibütininin pH 4.5 fosfat tamponunda analizine geçildi. Öncelikle pH 4.5 fosfat tamponu enjekte edildi. Tamponda kullanılan maddelere ait pikler 3. dakikadan sonra çok yoğun bir şekilde görüldü (Şekil 111).



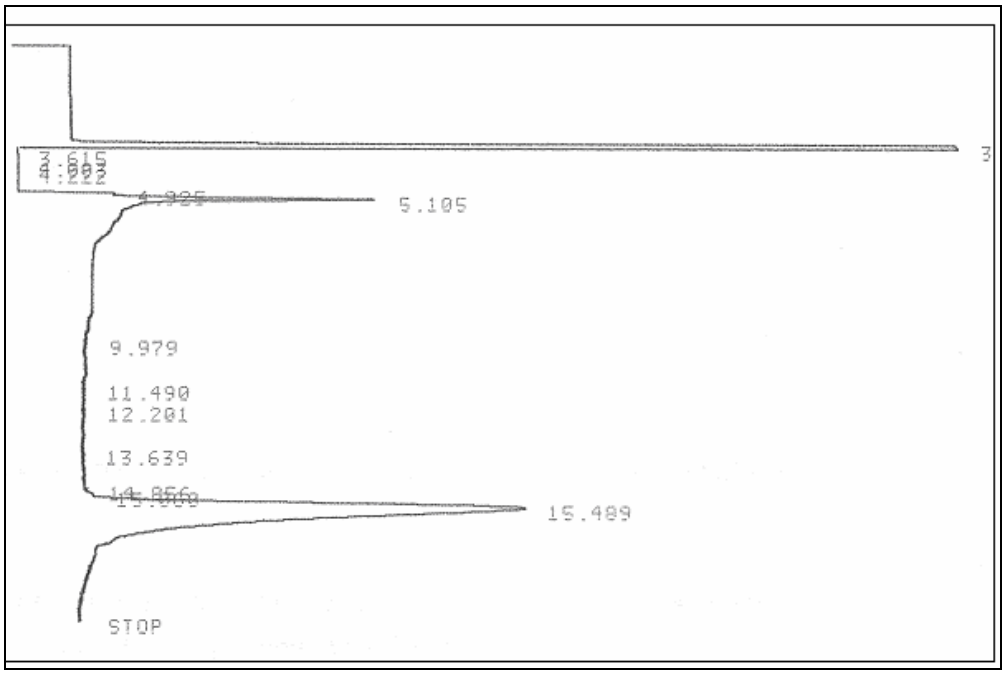
Şekil 111. pH 4.5 fosfat tamponuna ait pikler

Çıkan pik oksibütininin analizini etkileyeceğinden tamponun seyreltilerek kullanılmasına karar verildi. % 4 oranında seyreltik pH 4.5 fosfat tamponu hazırlandı ve HPLC analizi yapıldı (Şekil 112). 3-5. dakikalar arasında pikler elde edildi ve bu piklerin oksibütinin pikini etkilemeyeceği düşünülerek pH 4.5 tamponunun % 4 oranında seyreltilerek kullanılmasına karar verildi.



Şekil 112. % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponuna ait pikler

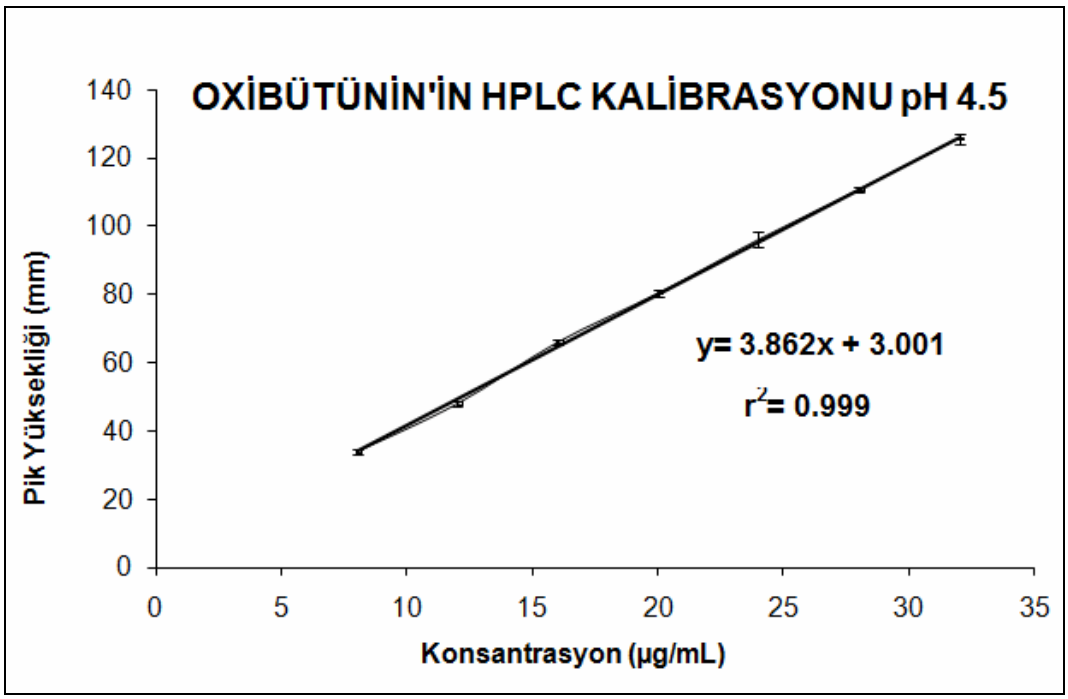
Son olarak % 4 oranında seyreltilmiş fosfat tamponu içerisinde oksibütininin belli konsantrasyonlarda çözeltisi hazırlandı ve analizi yapıldı. 15-16. dakikalar arasında oksibütinine ait olan pik elde edildi (Şekil 113).



Şekil 113. Oksibütininin % 4'lük pH 4.5 fosfat tamponu içindeki çözeltisinin HPLC analizi

5.1.6.2. HPLC ile Oksibütininin % 4 Oranında Seyreltilmiş pH 4.5 Fosfat Tamponundaki Standart Doğrusunun Elde Edilmesi

Bölüm 3.3.1.1.5'de anlatıldığı gibi oksibütininin % 4'lük pH 4.5 tamponunda değişik konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandı, tespit edilen dalga boyunda HPLC'ye enjekte edilerek pikler elde edildi. Bunlardan hareketle kalibrasyon grafiği ve doğru denklemleri hazırlandı (Şekil 114).



Şekil 114. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 kalibrasyon grafiği

5.1.6.3. HPLC ile Oksibütininin % 4 Oranında Seyreltilmiş pH 4.5 Fosfat Tamponundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu

5.1.6.3.1. Doğruluk

Deneyler 5.1.1.5.3.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 64'de gösterildi. Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin geri elde edilen miktarları bulundu. Bu üç sonucun ortalaması alınarak % geri elde dilen miktarlar bulundu. % 2'den daha az sapma görüldüğü için sonuçlar uygun bulundu.

Tablo 64. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki analizine ait doğruluk sonuçları

Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)	% Geri elde edilen miktar (µg/mL)	% Bağıl Sapma
80	80.2±0.5 n=3	0.823
100	101±1 n=3	0.982
120	121±2 n=3	1.12

5.1.6.3.2. Kesinlik

Deneyiçi kesinlik*:* Oksibütininin 8 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltisi HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 65'de gösterildi.

Tablo 65. Oksibütininin %4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki analizine ait kesinlik testi sonuçları

Örnek No	Oksibütinin çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler % (µg/mL)
1	8	8.023
2	8	8.023
3	8	8.023
4	8	8.28
5	8	7.76
6	8	8.02
Ortalama		8.02
SD		0.16
% Bağıl Sapma		2.04

Deneylerarası kesinlik*:* Birbirini takip eden 3 gün içinde aynı şekilde hazırlanan stok çözeltilerin analizi yapıldı. Sonuçlar Tablo 66'de verildi. Yöntemin günden güne değişik sonuçlar vermediği anlaşıldı.

Tablo 66. Oksibütininin % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki deneylerarası kesinlik testi sonuçları

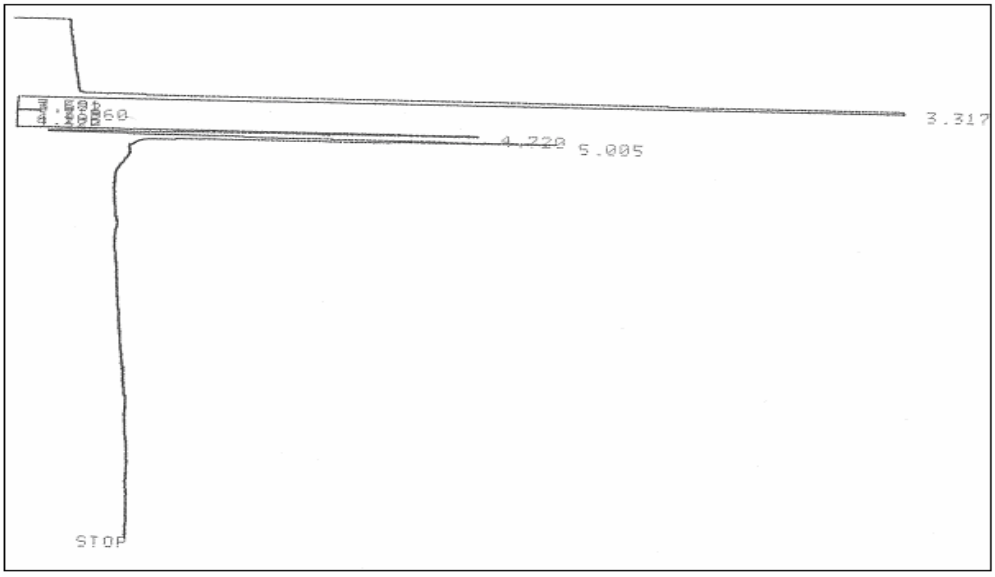
KONSANTRASYON(µg/ml)	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
8	8.024	8.024	8.024
8	8.023	8.024	8.024
8	8.024	8.024	8.024
ORTALAMA	8.024	8.024	8.024
% Bağıl Sapma	0.0012	0.0007	0.0007

5.1.6.3.3. Doğrusallık

Bölüm 3.2.1.3.2.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçülen pik yüksekliklerinden regresyon denklemi bulundu ve bu denklemlerin r^2'leri hesaplandı. Söz konusu konsantrasyon aralığında hesaplanan regresyon denklemlerinin doğrusallıkları hesaplandı ve kanıtlandı (Şekil 111).

5.1.6.3.4. Özgünlük, Seçicilik

Formülasyona giren oksibütininin dışındaki bileşenlerin bulunduğu fosfat tampon çözeltisi HPLC'ye enjekte edildi. Oksibütininin pik verdiği bölgede oksibütininin dışında herhangi başka bir pik gözlenmedi (Şekil 115). Yöntem oksibütinin için uygun bulundu.



Şekil 115. Oksibütinin bulunmayan çözeltinin HPLC'de analizi

5.1.6.3.5. Duyarlılık

Bölüm 3.3.1.1.5.3.5.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Kalibrasyon doğrusunun eğimi 3.86 olarak hesaplandı.

5.1.6.3.6. Saptama Sınırı

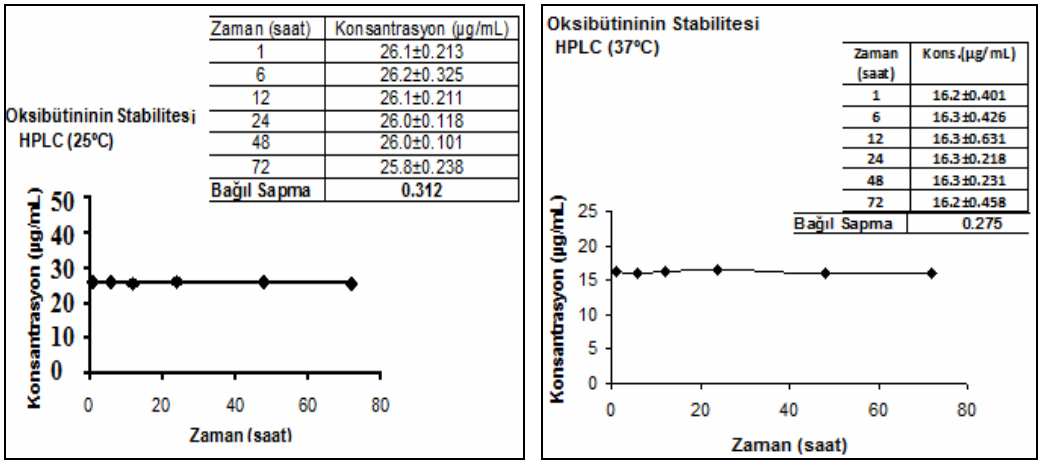
Deney bölüm 3.3.1.1.5.3.6'de anlatıldığı gibi yapıldı. Saptama sınırı 0.2 µg/ml olarak bulundu.

5.1.6.3.7. Duyarlılık Sınırı

Deney bölüm 3.3.1.1.5.3.7'de anlatıldığı gibi yapıldı. Duyarlılık sınırı 0.4 µg/ml olarak bulundu.

5.1.6.3..8. Stabilite

Deney şartlarında oksibütininin stabilitesini incelemek amacı ile Bölüm 5.1.1.5.3.8'de verilen yöntem uygulandı. Oda sıcaklığında ve 37°C'de elde edilen sonuçlar Şekil 116'da gösterildi. Sonuç olarak oksibütinin deney koşullarında stabil bulundu.



Şekil 116.Oksibütininin oda sıcaklığında ve 37°C'de % 4 oranında seyreltilmiş pH 4.5 fosfat tamponundaki stabilitesi

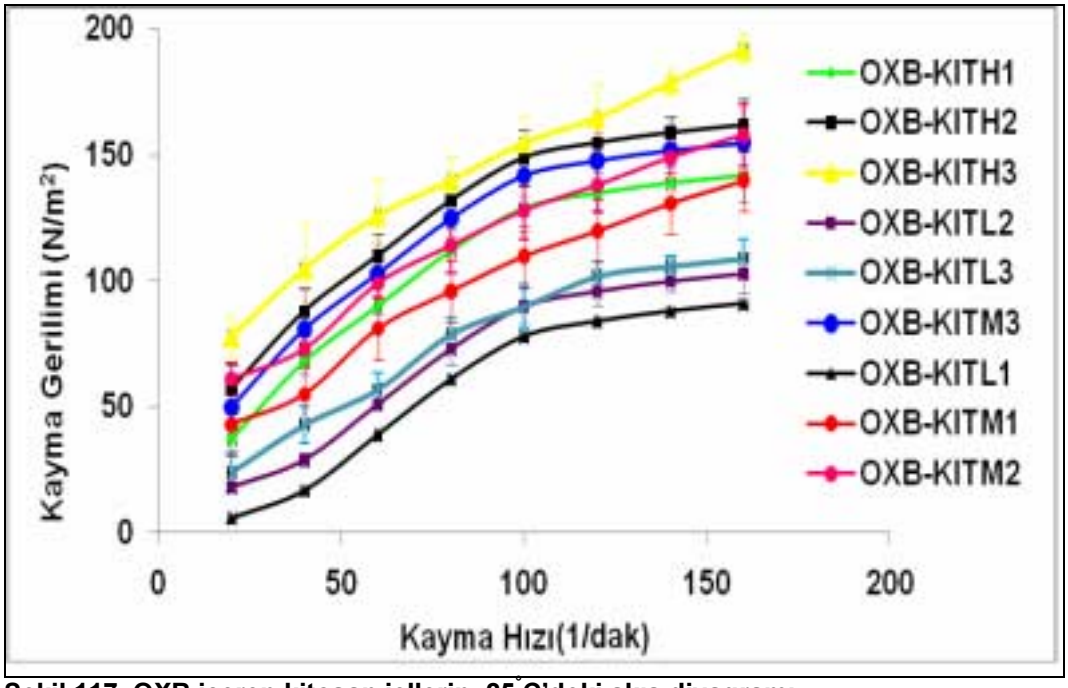
5.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

5.2.1. Biyoadezif Jel Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

5.2.1.1. Kitosan-Jel Formülasyonuna Ait Bulgular

Etkin madde içermeyen ve farklı glasiyel asetik asit ile kitosan oranlarına sahip jellerin pH değerleri ve viskozite değerleri Tablo 35'de verilmişti. Bu kısımda sadece OXB içeren kitosan jellere ait bulgular verilmiştir.

Tablo 21'de formülasyon kodları ve içerikleri belirtilen OXB içeren kitosan jellerin akış özelliği incelenmiş ve Şekil 117'de akış grafikleri gösterilmiştir. Jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri saptanmıştır.



Şekil 117. OXB içeren kitosan jellerin 25°C'deki akış diyagramı

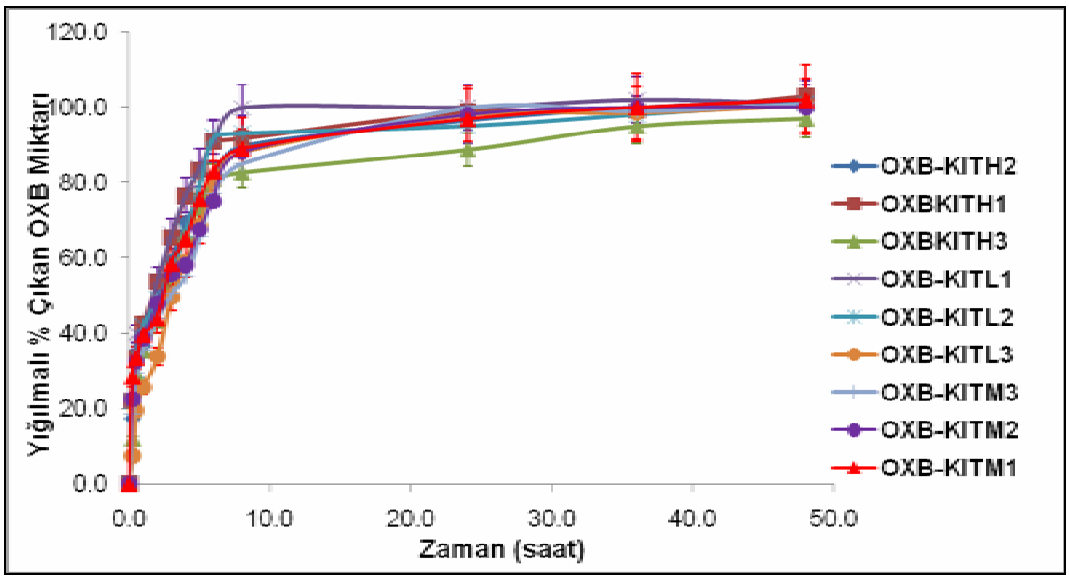
Kitosan ile hazırlanan ve etkin madde içeren bütün formülasyonların şeffaf görünümde oldukları belirlendi. %3 polimer içeren jellerin fiziksel görüntüsü, sürülebilirliği ve sürüldüğü yerde kalış süresi daha iyi olduğu için bu formülasyonlar üzerinden çalışmaya devam edildi. Etkin madde içeren %3'lük kitosan jellerin viskozite, pH ve miktar tayini değerleri Tablo 67'de gösterilmiştir.

Tablo 67. OXB içeren %3'lük kitosan jellerin özellikleri

Oksibütinin Kitosan jel Form.	OXB-KITH3	OXB-KITM3	OXB-KITL3
Miktar Tayini	10.3±0.1 mg/mL	10.1±0.4 mg/mL	10.6±0.5 mg/mL
pH	4.18	4.27	3.87
Viskozite (cP)	503±5	327±10	487±4
rpm	20	20	20
Spindle No	52	52	52

5.2.1.1.1. OXB İçeren Kitosan-Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

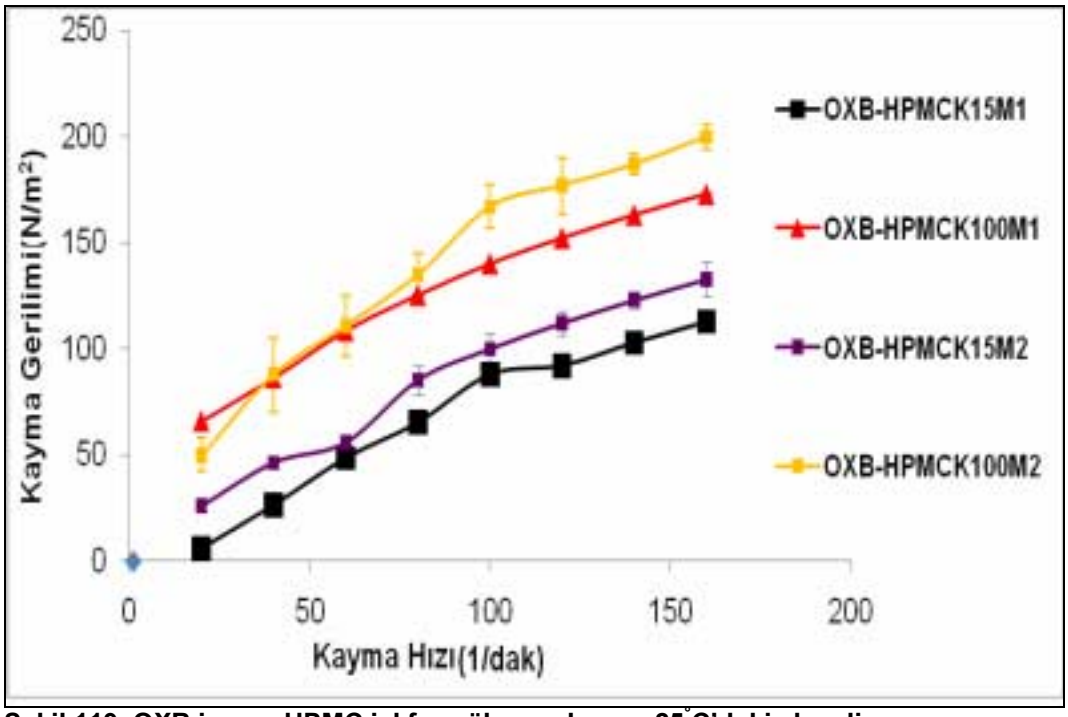
Bölüm 3.2.5.5'de anlatıldığı şekilde pH 4.5 fosfat tamponunda yapılan, 12000 Daltondan küçük moleküllere geçirgen olan membrandan kitosan jel formülasyonlarının etkin madde salım deneyine ait profiller Şekil 118'de verilmiştir. Buna göre ilk sekiz satte en az salım yapan formülasyon %82.8±4.3 OXB salan OXB-KITH3 formülasyonudur. En fazla salım ise sekiz saatin sonunda %99.8±2.2 OXB salan OXB-KITL1 formülasyonu olmuştur. Formülasyonların hepsi ilk sekiz saatin sonunda %80'den fazla salım yaptıkları için kontrollü salım özelliği göstermemektedirler. Formülasyonlar 48 saatin sonunda OXB miktarının %100'ünü salmıştır. Bu nedenle OXB ile kontrollü salım sağlamak amacıyla farklı polimer ve formülasyonlar denenmiştir



Şekil 118. Kitosan jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

5.2.1.2. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 22'de içerikleri verilen jellerin kontrolleri yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir. Jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri saptanmıştır. Şekil 119'da OXB içeren HPMC jellerin akış diyagramları gösterilmiştir.



Şekil 119. OXB içeren HPMC jel formülasyonlarının 25°C'deki akış diyagramı

Hazırlanan HPMC jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Farklı jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, rpm değerleri ve viskozite ölçümünde kullanılan spindle numaraları Tablo 68'da verilmiştir. Miktar tayini çalışmasında jellerin başlangıçta içerdikleri etkin madde miktarı 10 mg'dır.

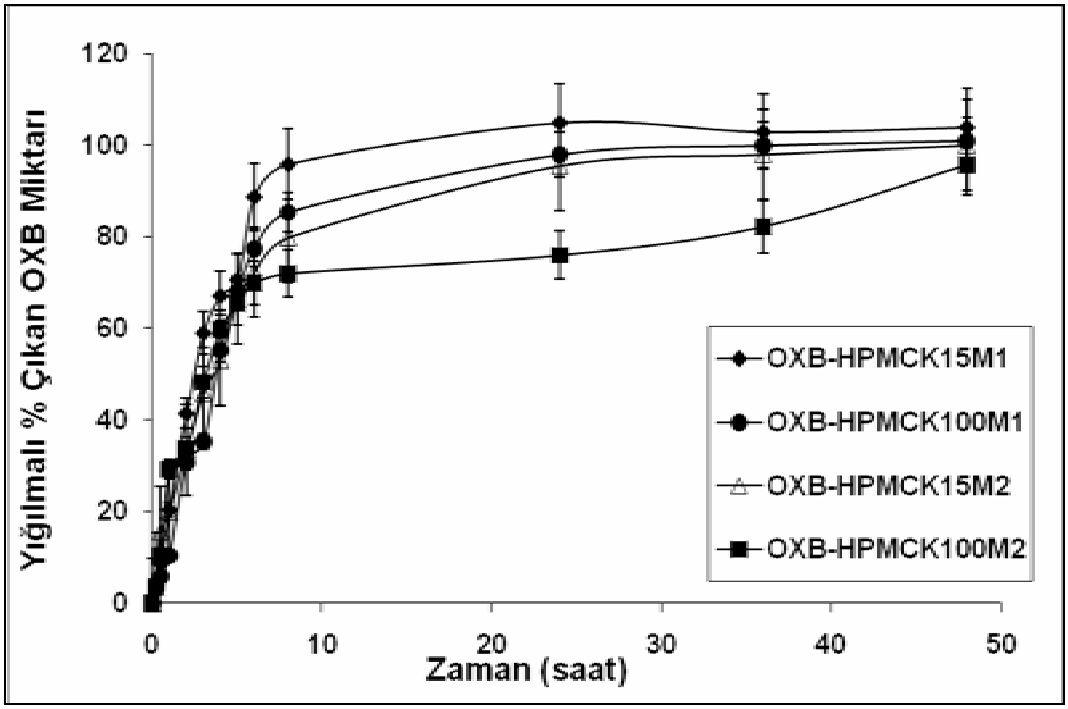
Tablo 68. OXB-HPMC jel formülasyonlarının pH değerleri, viskozite değerleri, miktar tayinleri, rpm değerleri ve spindle numaraları

Jel Formülasyonları	Miktar Tayini	pH	Viskozite (cP)	rpm	Spindle No
OXB-HPMCK100M1	10.0±0.0 mg/mL	4.27	597±6	20	52
OXB-HPMCK100M2	10.2±0.1 mg/mL	4.29	975±4	20	52
OXB-HPMCK15M1	10.0±0.0 mg/mL	4.27	528±7	20	52
OXB-HPMCK15M2	10.2±0.1 mg/mL	4.27	948±13	20	52

OXB-HPMCK100M2 formülasyonunun viskozite değeri bu grup formülasyonlar içinde en yüksektir.

5.2.1.2.1. OXB İçeren HPMC Jel Formülasyonlarından In Vitro Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Franz difüzyon hücrelerinden geçiş çalışması sonucu elde edilen salım profilleri Şekil 120'de verilmiştir.



Şekil 120. OXB içeren HPMC jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Şekil 120'de göre OXB-HPMCK100M2 formülasyonundan ilk sekiz saatte %72.2±4.7 ve 24 saattin sonunda %76.0±3.1 oranında salım gözlenmiştir. Salım deneyine devam edildiğinde bu oran 48 saatin sonunda %95.8±3.2 olmuştur İki günde bir uygulanması amaçlanan ve kontrollü salım yaparak kontrollü sistemik etki elde edilmesi amaçlanan OXB formülasyonlarından OXB-HPMCK100M2 formülasyonu istenilen amaca uygun bulunmuştur. Diğer formülasyonlar ilk sekiz saatte etkin madde miktarının %80'den fazlasını salmışlardır.

5.2.1.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 23'de içerikleri verilen jellerin kontrolleri yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

Jellerin özellikleri oda sıcaklığında incelenmiştir.

5.2.1.3.1. Poloksamer Jellerde Jelleşme Sıcaklığı ($T_{sol-jel}$)

Su banyosunda, magnetik karıştırıcı üzerinde cam beher içine +4°C'de bekleyen P407 veya P188 jelden 10 mL konuldu. Su banyosunun sıcaklığı kademeli olarak artırıldı ve magnetin artık dönemeyeceği kadar jelleşme olduğunda sıcaklık kaydedildi. Çalışma üç defa tekrarlandı. Formülasyonların jelleşme sıcaklıkları Tablo 69'da verilmiştir.

Tablo 69. Poloksamer 407 veya 188 kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının jelleşme sıcaklığı

Formülasyon	$T_{sol-jel}$ 1	$T_{sol-jel}$ 2	$T_{sol-jel}$ 3
OXB-P407	26°C	27°C	26°C
OXB-MP407	25°C	25°C	25°C
OXB-HP407	27°C	27°C	27°C

5.2.1.3.2. Poloksamer Jellerin Fiziksel Görünüşleri, pH'sı, Viskozitesi ve Akış Özellikleri

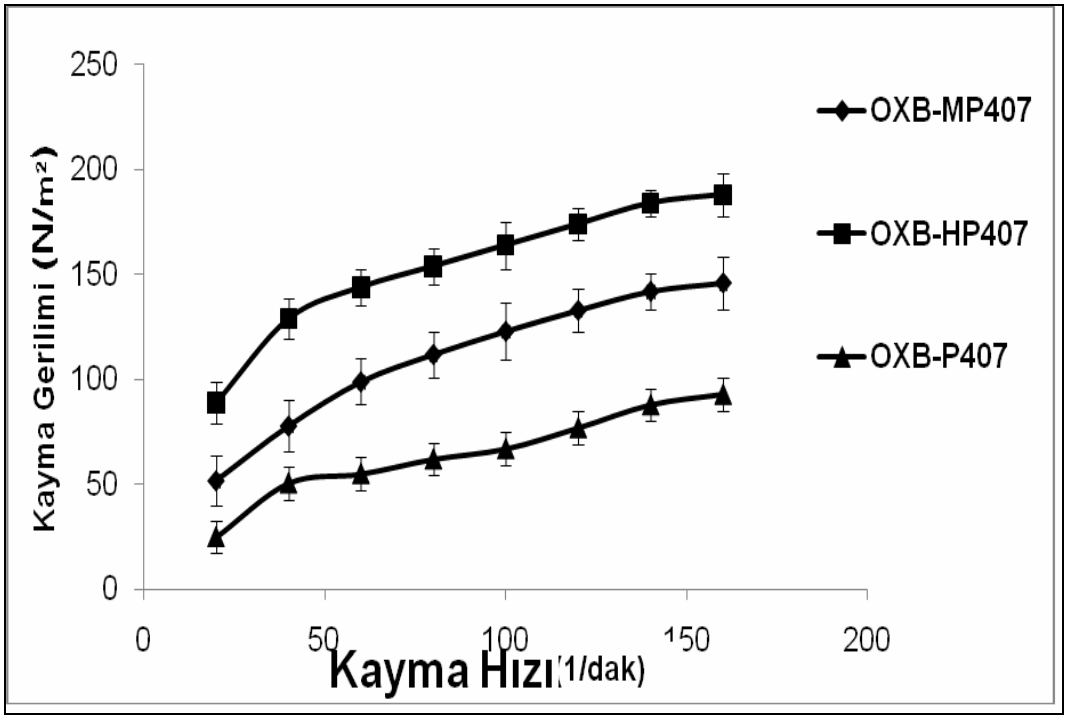
Jellerin fiziksel görünüşü, oda sıcaklığındaki renk ve şeffaflık özelliği incelenerek değerlendirildi. pH değerleri ise pH-metre kullanılarak saptandı. Hazırlanan jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Jellerin özellikleri Tablo 70'de verilmiştir.

Tablo 70. OXB içeren poloksamer jellerin viskozite değerleri

FORMÜLASYON KODLARI	Miktar Tayini (mg/mL)	pH	Spindle	rpm	Viskozite (cP)
OXB-P407	10.1±0.2	5.02	52	20	458±6
OXB-MP407	10.1±0.1	5.05	52	20	677±10
OXB-HP407	10.1±0.2	5.06	52	20	1165±9

Vajinal uygulama için hazırlanmış olan jel formülasyonlarının pH değerleri uygundur. Jellerin akış özelliklerinin saptanmasında, kayma gerilimine karşı (x), hız gradienti (Deformasyon değişim oranı) (y) grafiğe

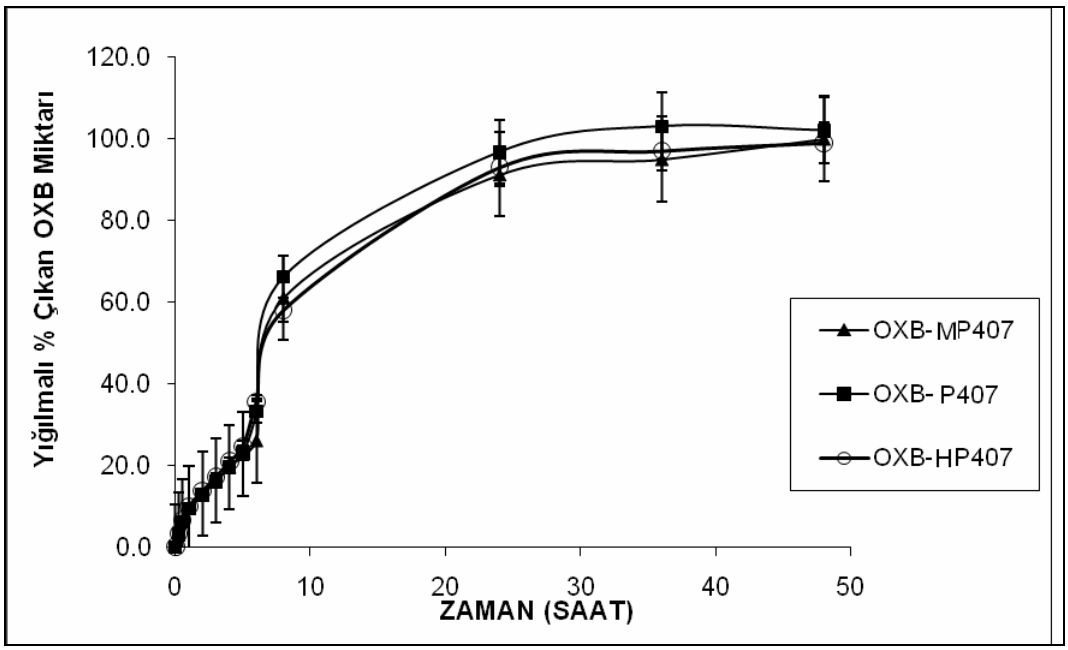
geçirildiğinde, aralarındaki ilişkinin doğrusal olmadığı görülmüştür. Jellerin pseudoplastik akış özelliği gösterdiği görülmüştür. Jellerin reolojik özelliklerine ait grafik Şekil 121'de gösterilmiştir.



Şekil 121. OXB-poloksamer jellerin 25°C'deki akış diyagramı

5.2.1.3.3. Poloksamer Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Hazırlanan Poloksamer jellerden 1.0 g, terazinin üzerinde tartılarak Franz difüzyon hücrelerine yerleştirildi. Şekil 122'de % 0.2 ve % 0.5 HPMC içeren P407 jellerden OXB'nin salım profilleri karşılaştırılmıştır. Poloksamer jellerden salımın 48 saat sürdüğünü ve daha kontrollü olduğunu görmekteyiz. Buna göre ilk sekiz saatin sonunda en kontrollü salımı % 58.0±3.7 ile OXB-P407H formülasyonu yapmıştır. Diğer formülasyonların ilk sekiz saatteki salımları ise, OXB-P407M için %61.1±5.1 ve OXB-P407 için %66.2±2.8'dir. Salım çalışmasının 24. saatinde ise her üç formülasyonunun da etkin madde oranlarının yaklaşık tamamını saldığını görmekteyiz. Bu nedenle bu grup jel formülasyonları istenilen kontrollü salım özelliğini sağlayamamışlardır.



Şekil 122. OXB içeren poloksamer jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişi (n=6)

5.2.1.4. Jel Formülasyonlarının Stabilitesine Ait Bulgular

Bölüm 3.3.1.2.1.6'da anlatıldığı gibi yapılan stabilite çalışmaları üç ay süreyle 4°C/ortam nem, 25°C/% 60 bağıl nem ve 40°C/% 75 bağıl nem ortamlarında yapılmıştır. Farklı polimerler ile hazırlanan jel formülasyon gruplarından en kontrollü salım yapan formülasyonlar sonuç formülasyonlar seçilerek bu formülasyonlar üzerinde stabilite testleri yapılmıştır. Adı geçen formülasyonlar şöyle sıralanabilir:

OXB-KITH3: Kitosan H ile hazırlanmış % 3 oranında polimer ve %1 oranında OXB içeren jel formülasyonu

OXB-C974P2: Carbopol 974P ile hazırlanmış % 2 oranında polimer ve %1 oranında OXB içeren jel formülasyonu

OXB-HPMCK100M2: HPMC K100M ile hazırlanmış % 2 oranında polimer ve %1 oranında OXB içeren jel formülasyonu

OXB-HP407: Poloksamer 407P (% 20) ve HPMC K100M (% 0.5) kullanılarak hazırlanan ve % 1 oranında OXB içeren jel formülasyonu

Sonuç formülasyonlar üzerinde yapılan stabilite deneylerine ait bulgular Tablo 71-73'de gösterilmiştir.

Tablo 71. OXB-KITH3 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	OXB-KITH3 Başlangıç	OXB-KITH3 1. ay	OXB-KITH3 2.ay	OXB-KITH3 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**OXB-KITH3 Başlangıç**	**OXB-KITH3 1. ay**	**OXB-KITH3 2.ay**	**OXB-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	4.18	4.20	4.19	4.20
25°C/%60 bağıl nem	4.18	4.19	4.20	4.19
40°C/%75 bağıl nem	4.18	4.65	5.15	5.88
Viskozite (cP)	**OXB-KITH3 Başlangıç**	**OXB-KITH3 1. ay**	**OXB-KITH3 2.ay**	**OXB-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	503±5	505±4	504±3	510±7
25°C/%60 bağıl nem	503±5	504±3	507±1	501±3
40°C/%75 bağıl nem	503±5	488±6	453±4	427±1
Miktar Tayini (mg/mL)	**OXB-KITH3 Başlangıç**	**OXB-KITH3 1. ay**	**OXB-KITH3 2.ay**	**OXB-KITH3 3.ay**
4°C/ortam nemi	10.3±0.1	10.2±0.4	10.2±0.1	10.1±0.2
25°C/%60 bağıl nem	10.3±0.1	10.2±0.3	10.1±0.2	10.1±0.3
40°C/%75 bağıl nem	10.3±0.1	10.1±0.1	9.91±0.41	9.68±0.53

Tablo 72. OXB-HPMCK100M2 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	OXB-HPMCK100M2 Başlangıç	OXB-HPMCK100M2 1. ay	OXB-HPMCK100M2 2.ay	OXB-HPMCK100M2 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**OXB-HPMCK100M2 Başlangıç**	**OXB-HPMCK100M2 1. ay**	**OXB-HPMCK100M2 2.ay**	**OXB-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	4.29	4.25	4.27	4.29
25°C/%60 bağıl nem	4.29	4.28	4.28	4.25
40°C/%75 bağıl nem	4.29	5.12	5.22	5.41
Viskozite (cP)	**OXB-HPMCK100M2 Başlangıç**	**OXB-HPMCK100M2 1. ay**	**OXB-HPMCK100M2 2.ay**	**OXB-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	975±4	970±8	971±5	969±13
25°C/%60 bağıl nem	975±4	968±7	968±7	970±8
40°C/%75 bağıl nem	975±4	944±11	939±13	920±12
Miktar Tayini (mg/mL)	**OXB-HPMCK100M2 Başlangıç**	**OXB-HPMCK100M2 1. ay**	**OXB-HPMCK100M2 2.ay**	**OXB-HPMCK100M2 3.ay**
4°C/ortam nemi	10.2±0.1	10.3±0.5	10.2±0.1	10.2±0.3
25°C/%60 bağıl nem	10.2±0.1	10.3±0.1	10.2±0.2	10.1±0.3
40°C/%75 bağıl nem	10.2±0.1	9.88±0.42	9.71±0.34	9.59±0.13

Tablo 73. OXB-HP407 jel formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Görünüş	OXB-HP407 Başlangıç	OXB-HP407 1. ay	OXB-HP407 2.ay	OXB-HP407 3.ay
4°C/ortam nemi	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
25°C/%60 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
40°C/%75 bağıl nem	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf
pH	**OXB-HP407 Başlangıç**	**OXB-HP407 1. ay**	**OXB-HP407 2.ay**	**OXB-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	5.06	5.06	5.04	5.11
25°C/%60 bağıl nem	5.06	5.04	5.05	5.07
40°C/%75 bağıl nem	5.06	5.55	6.12	6.58
Viskozite (cP)	**OXB-HP407 Başlangıç**	**OXB-HP407 1. ay**	**OXB-HP407 2.ay**	**OXB-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	1165±17	1159±11	1155±12	1150±10
25°C/%60 bağıl nem	1165±17	1143±9	1148±13	1146±14
40°C/%75 bağıl nem	1165±17	962±14	910±15	898±11
Miktar Tayini (mg/mL)	**OXB-HP407 Başlangıç**	**OXB-HP407 1. ay**	**OXB-HP407 2.ay**	**OXB-HP407 3.ay**
4°C/ortam nemi	10.1±0.2	10.1±0.1	10.1±0.3	9.96±0.22
25°C/%60 bağıl nem	10.1±0.2	9.98±0.2	9.99±0.13	9.92±0.41
40°C/%75 bağıl nem	10.1±0.2	9.73±0.21	9.42±0.44	9.16±0.23

Sonuç formülasyon olarak seçilen jellerin stabilite testleri sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde:

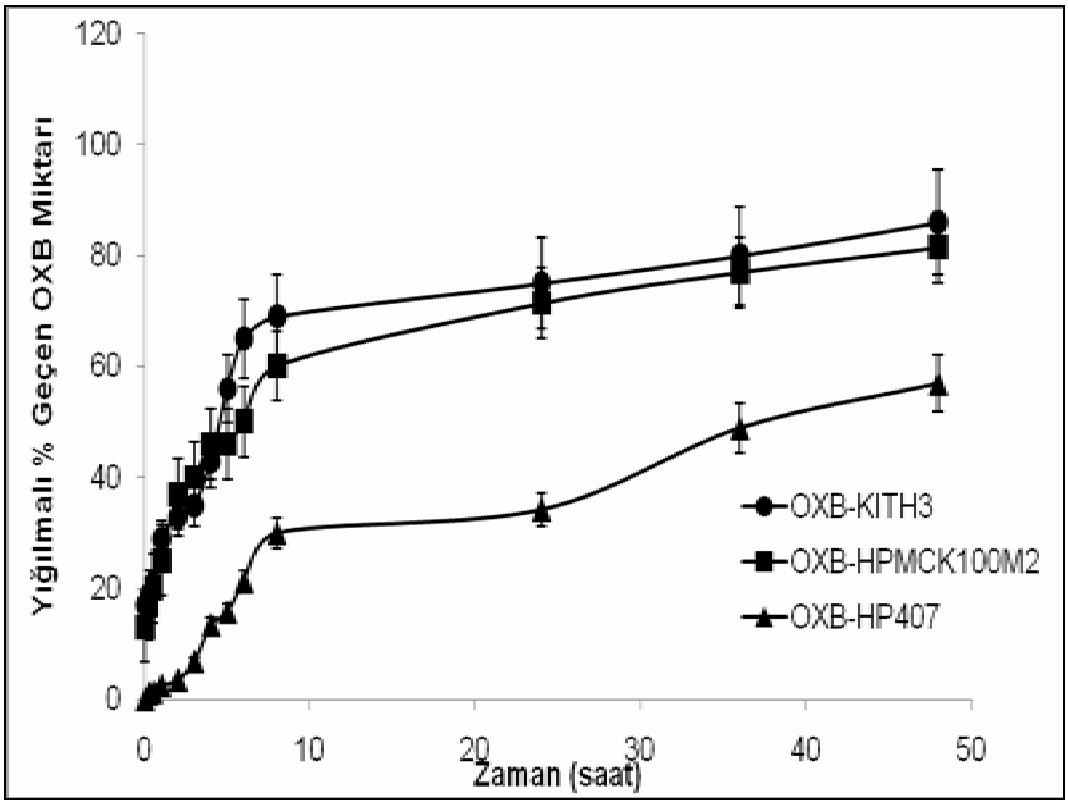
- Bütün formülasyonların her üç saklama koşulunda da 3 ay boyunca şeffaf görüntüsünü kaybetmediği görülmüştür.
- Bu formülasyonların pH değerlerine bakıldığında, başlangıçtaki değere göre özellikle 4°C'de ve 25°C saklanan jellerin pH değerinde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$). Ancak 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jel formülasyonlarının pH değerlerindeki artış anlamlıdır (t-test, $p<0.05$).
- Jellerin viskozite değerleri değerlendirildiğinde yine 4°C'de ve 25°C'de saklanan jellerin viskozitesinde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$), ancak 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jelllerin viskozite değeri başlangıca göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (t-test, $p<0.05$).

- ✶ Miktar tayini testi değerlendirildiğinde ise sadece 40°C/%75 bağıl nemde saklanan jellerin içindeki OXB miktarındaki azalmanın anlamlı olduğu bulunmuştur (t-test, $p<0.05$), diğer saklama koşullarında bekletilen jellerde ise etkin madde miktarı açısından anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$).

Stabilite testlerinin sonucunda vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan ve OXB içeren biyoadezif jellerin oda sıcaklığında ve 4°C'de stabil olduğu özelliklerinin değişmediği, ancak 40°C/%75 bağıl nem ortamında stabil olmadığı bulunmuştur.

5.2.1.5. Oksibütinin İçeren Jel Formülasyonların Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

Deney Bölüm 3.3.1.2.1.7'de anlatıldığı gibi yapıldı. Örnekler HPLC ile analiz edilerek % kümülatif geçen OXB miktarı hesaplandı (Şekil 123).



Şekil 123. OXB içeren jel formülasyonlarının tavşan vajinal dokusundan geçişi

İn vivo deneyde uygulanacak formülasyona karar verilmesinde dokudan geçiş deneyleri oldukça önemlidir. İn vitro salım deneylerinde Franz difüzyon hücrelerinde diyaliz mebrandan geçişinde en kontrollü profili gösreren OXB-HPMCK100M2 jelin tavşan vajinal dokusundan geçişide istenilen kontrollü salım özelliğinde bulunmuştur. OXB-HPMCK100M2 jelin tavşan vainasından geçişine bakıldığında ilk sekiz saatte %60.1±3.6, 24. saatte %71.4±4.1 ve 48. saatin sonunda %81.5±1.3 oranında geçiş görülmüştür. OXB-KITH3 jelinde geçişi de OXB-HPMCK100M2 formülasyonunun geçişine oldukça yakındır. Ancak poloksamer içeren formülasyonun salımı 48 saatte %56.9±2.3'de kaldığı için OXB'nin kontrollü sistemik etkisi için uygun bir formülasyon olarak değerlendirilmemiştir.

Dokudan geçiş verilerinin kinetik değerlendirme sonuçları Tablo 74'de verilmektedir. Kinetik değerlendirme için sıfır derece, birinci derece ve Higuchi salım kinetik modelleri incelenmiştir.

Tablo 74. Dokudan geçiş verilerinin kinetik incelemesi.

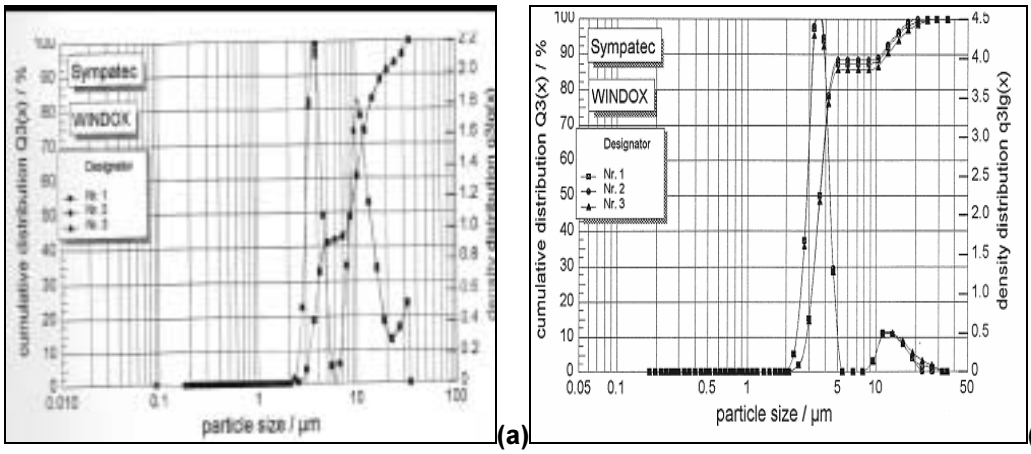
JEL FORMÜLASYONLARIAN AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
0.Derece				1.Derece			Q√t (Higuchi)		
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
OXB-KITH3	1.37	0.627	17.1	0.024	0.537	0.376	11.4	0.836	11.4
OXB-K100M	1.31	0.687	14.3	0.025	0.568	0.354	10.8	0.889	8.53
OXB-HP407	1.16	0.891	6.57	0.065	0.551	0.972	8.68	0.958	4.10

5.2.2. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular

Bölüm 3.3.1.2.2'de hazırlanma prosedürleri anlatılan toplam 8 adet lipozom formülasyonunun karakterizasyon çalışması birlikte yapılmıştır.

5.2.2.1. Lipozomların Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular

- OXB içeren, film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-F2 lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden önceki (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 124'de gösterilmiştir.



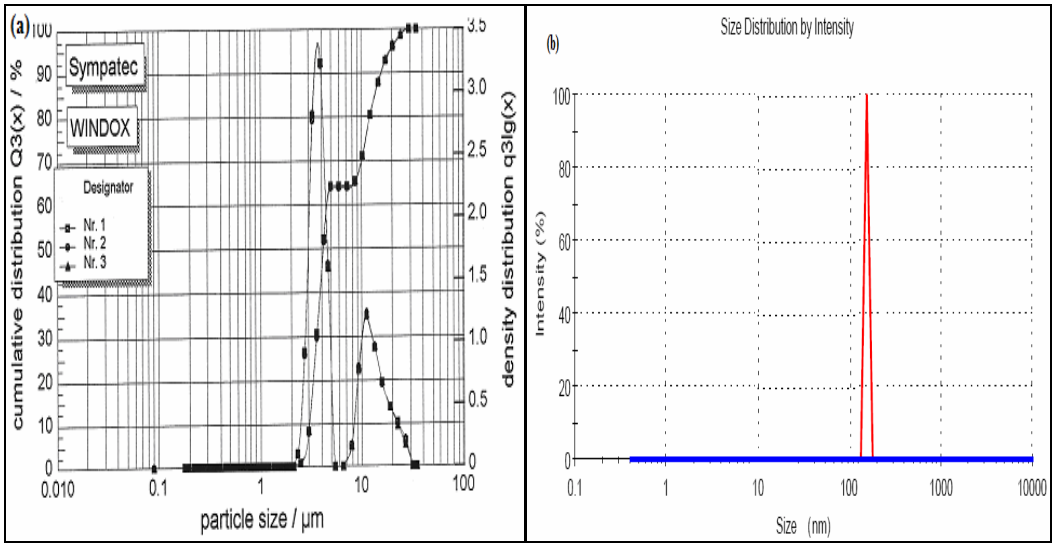
Şekil 124. OXB-F2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önce (a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı.

Şekil 124 a'da görüldüğü gibi film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan OXB lipozomların partikül büyüklüğü dağılımı homojen değildir. Lipozomların ekstruksiyon işleminden önce ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 11 µm civarındayken ekstruksiyon işleminden sonra bu değer ~3 µm civarına düşmüştür (Tablo 75).

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve OXB içeren OXB-P2 lipozom formülasyonun ekstruksiyon işleminden önceki partikül büyüklüğü dağılımı Laser-Diffraction Particle Sizer ile ölçülmüş ve dağılım Şekil 125'de gösterilmiştir.

OXB-P2 lipozomlarının partikül büyüklüğü dağılımı ekstruksiyon işleminin öncesinde ve sonrasında oldukça dar bir aralıkta olup son

derece homojendir. Ekstruksiyon işleminden önce lipozomların ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 3.45±0.76 µm iken ekstruksiyon yapıldıktan sonra lipozomların partikül büyüklüğü nm boyutuna (229.3±1.0 nm) inmiştir ve ölçümler Malvern Zeta Sizer Nanoseries'da yapılmıştır (Şekil 125). Partikül büyüklüğündeki değişmenin lipozom jel formülasyonunun farmasötik özelliklerini etkileyeceği ve etkin madde salımını değiştireceği düşünülmektedir.



Şekil 125. OXB-P2 lipozom formülasyonunun ekstruksiyon işleminden önceki(a) ve sonraki (b) partikül büyüklüğü dağılımı.

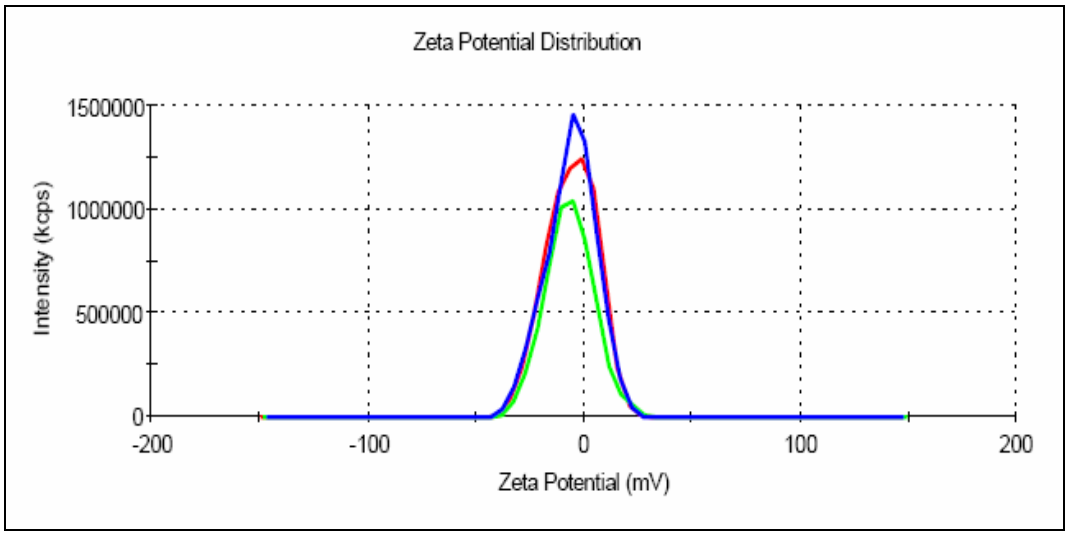
Lipozomların fiziksel stabilitesini arttırmak için formülasyonlara stearilamin ilave edilmiştir. Bu maddenin ilavesi ile hazırlanan OXB-FS1 ve OXB-PS1 formülasyonlarının partikül büyüklüğü homojen değildir ve enkapsülasyon yüzdesi çok düşüktür. Bu nedenle Bölüm 3.3.1.2.2'de de belirtildiği gibi hazırlama prosedürüne dondurup çözme basamağı ilave edilmiş ve böylece OXB-FS2 ve OXB-PS2 formülasyonları hazırlanmıştır.

- SA ilave edilen ve dondurup çözme yöntemi kullanılarak hazırlanan OXB lipozom formülasyonlarının hepsinin partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve polidispersite indeksleri (PI) Tablo 75'de verilmiştir.

Tablo 75. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri

	Ekstruksiyondan Önce			Ekstruksiyondan Sonra		
	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ	POLİDİSPERSİTE INDEKS	ZETA POTANSİYELİ	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ	POLİDİSPERSİTE INDEKS	ZETA POTANSİYELİ
OXB-F2	11.3 ± 0.4 µm	0.126 ± 0.011	-6,80±0,26 mV	3.74±0.03 µm	0.171 ± 0.064	-6,34±0,78 mV
OXB-P2	3.45±0.76 µm	0.127 ± 0.031	4.736±0.187 mV	229.3±1.0 nm	0.184 ± 0.028	4.234±0.211 mV
OXB-FS1	32.43±0.43 µm	0.145 ± 0.49	49.37±4.27 mV	8.80±0.07 µm	0.198 ± 0.063	40.16±3.03 mV
OXB-FS2	9.28±0.56 µm	0.329 ± 0.057	51.28±11.8 mV	4.54±0.39 µm	0.201 ± 0.027	36.75±0.78 mV
OXB-PS1	3.54±0.76 µm	0.361 ± 0.037	11.06±0.89 mV	377±8 nm	0.189 ± 0.018	8.32±1.14 mV
OXB-PS2	3.12±0.65 µm	0.190 ± 0.064	28.61±1.87 mV	307±6 nm	0.176 ± 0.098	21.15±1.31 mV

Film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan ve OXB içeren OXB-F2 formülasyonunun zeta potansiyeli negatifken, formülasyona SA ilave edilerek aynı yöntem ile hazırlanan OXB-FS1 formülasyonunun zeta potansiyeli pozitifdir. Vajinal yoldan emilmesi istenilen ve sistemik etki göstermesi beklenen OXB lipozom formülasyonlarının katyonik özellikte olması tercih edilmektedir. Katyonik özelliğe sahip formülasyonların vajinal mukozadan daha iyi emilmesi beklenmektedir. Şekil 126'da zeta potansiyel ölçümlerinde elde edilen grafiklere örnek olarak OXB-F2 formülasyonunun üç paralel olarak ölçülen zeta potansiyel grafiği verilmiştir. Dondurup çözme işlemi uygulanan OXB-FS2 formülasyonunda ise OXB-FS1'e göre partikül büyüklüğü düşmüş, zeta potansiyeli artmıştır

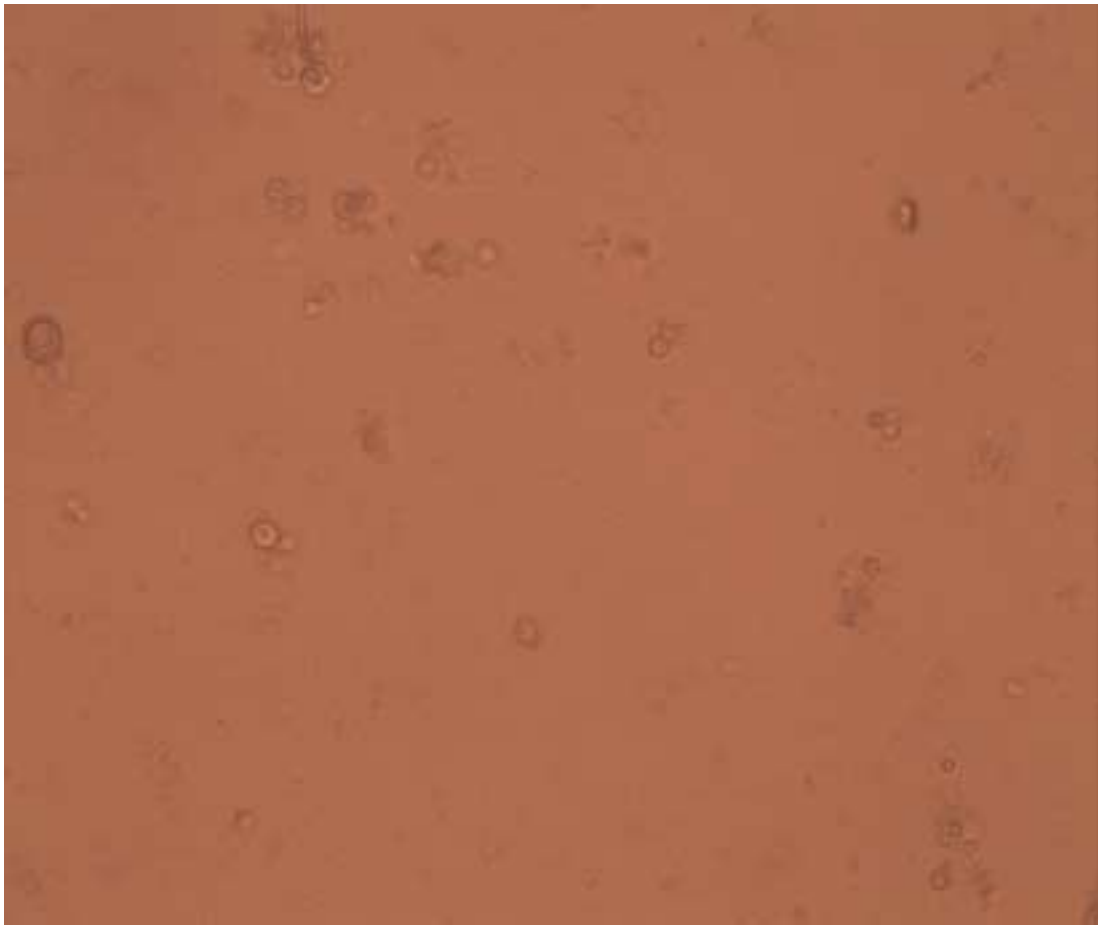


Şekil 126. OXB-F2 formülasyonuna ait zeta potansiyel grafiği

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve OXB içeren lipozom formülasyonlarının, OXB-P2 formülasyonu, zeta potansiyelinin pozitif olduğunu görmekteyiz. SA ilavesi ile hazırlanan OXB-PS1 formülasyonun ise zeta potansiyeli OXB-P2'ye göre iki kat fazladır. Dondurup çözme işlemi ise (OXB-PS2) zeta potansiyelini arttırmıştır.

5.2.2.2. Lipozomların Işık Mikroskobu ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntülerine Ait Bulgular

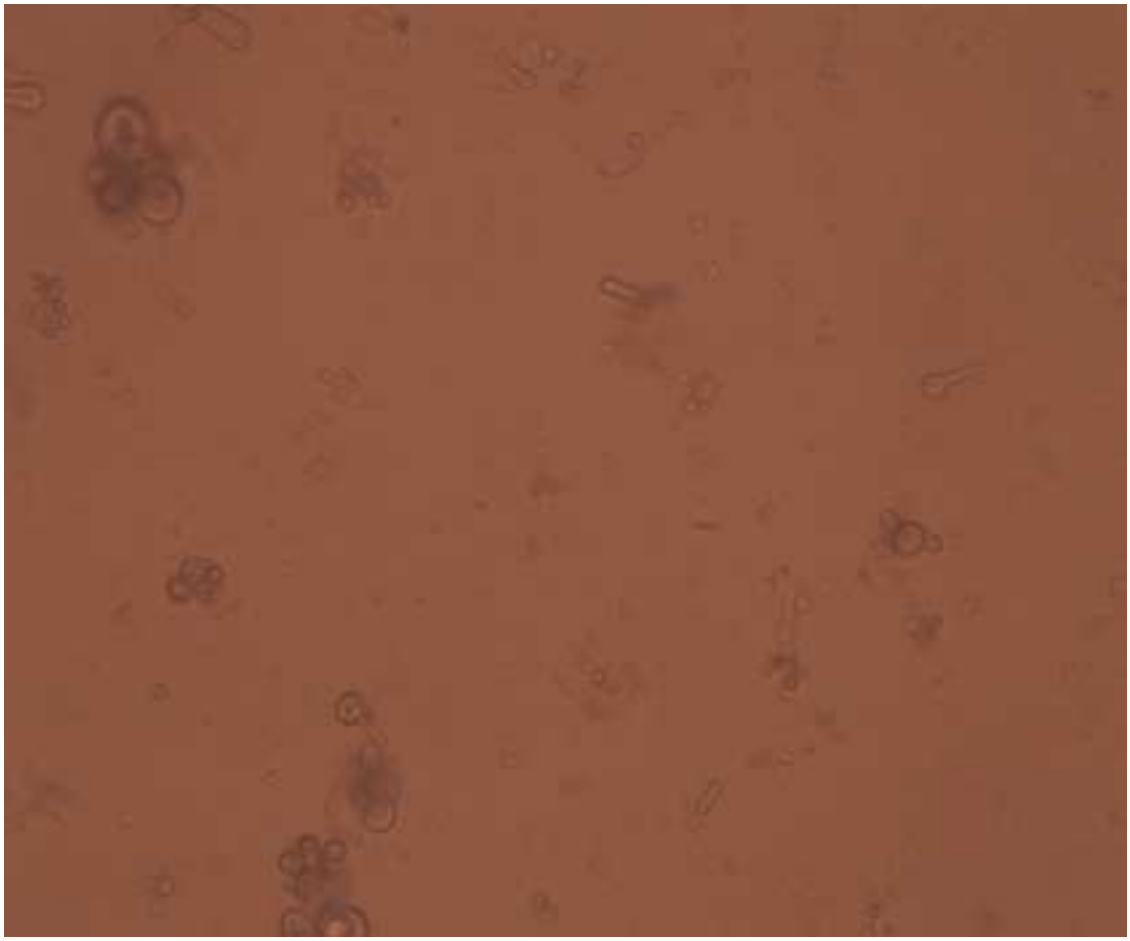
Film yöntemi ile hazırlanan lipozomların görüntüleri polarize ataçmanlı LEICA DMEP adlı mikroskop ile görüntülendi. OXB-F2 formülasyonunun görüntüsü Şekil 127'de verilmiştir.



Şekil 127. OXB-F2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü(x40)

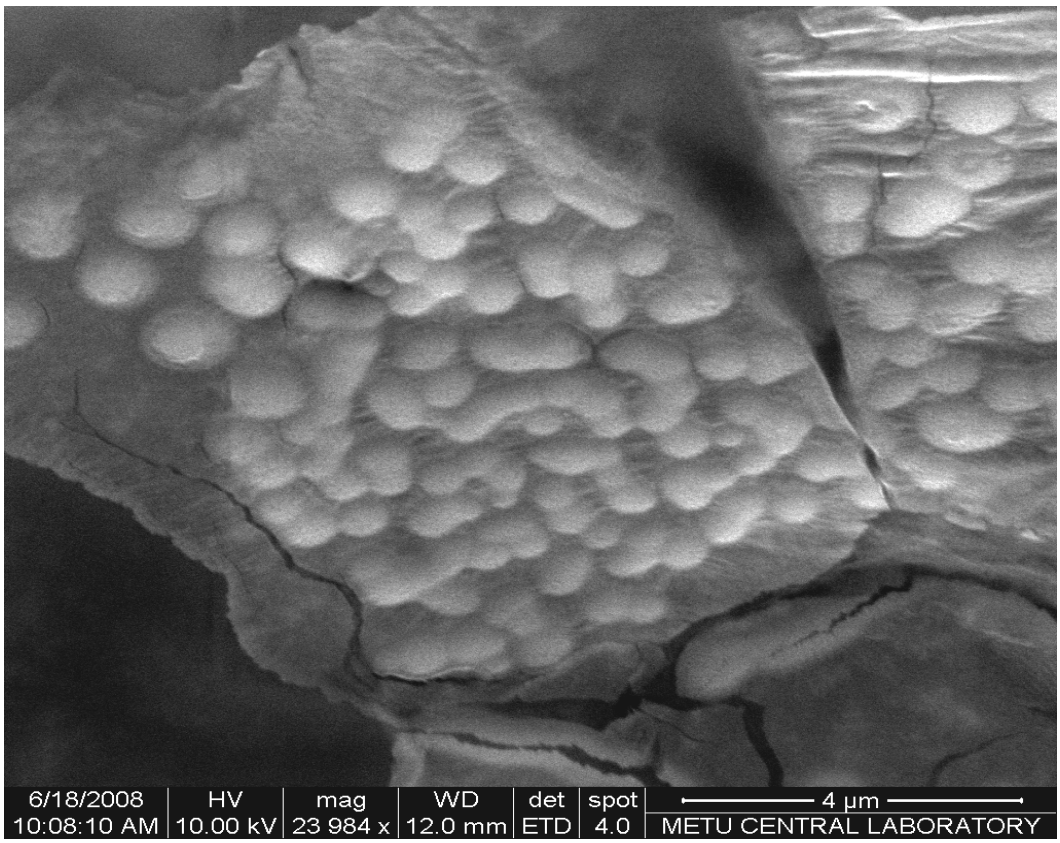
OXB-F2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntülerinden çok tabakalı lipozom oldukları anlaşılmıştır. Lipozomların çok tabakalı olması, ilacı tabakalarının arasına alması ve ilacı yavaş salması açısından avantaj oluşturacağı düşünülmektedir.

OXB-FS2 lipozomlarına ait mikroskop görüntüsü ile Şekil 128'de verilmiş ve çok tabakalı lipozomlar görülmüştür.



Şekil 128. OXB-FS2 formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüsü

Şekil 129'da ise OXB-PS2 formülasyonunun SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 129. OXB-PS2 formülasyonunun SEM görüntüsü

5.2.2.3. Lipozomların Yükleme Kapasitesine Ait Bulgular

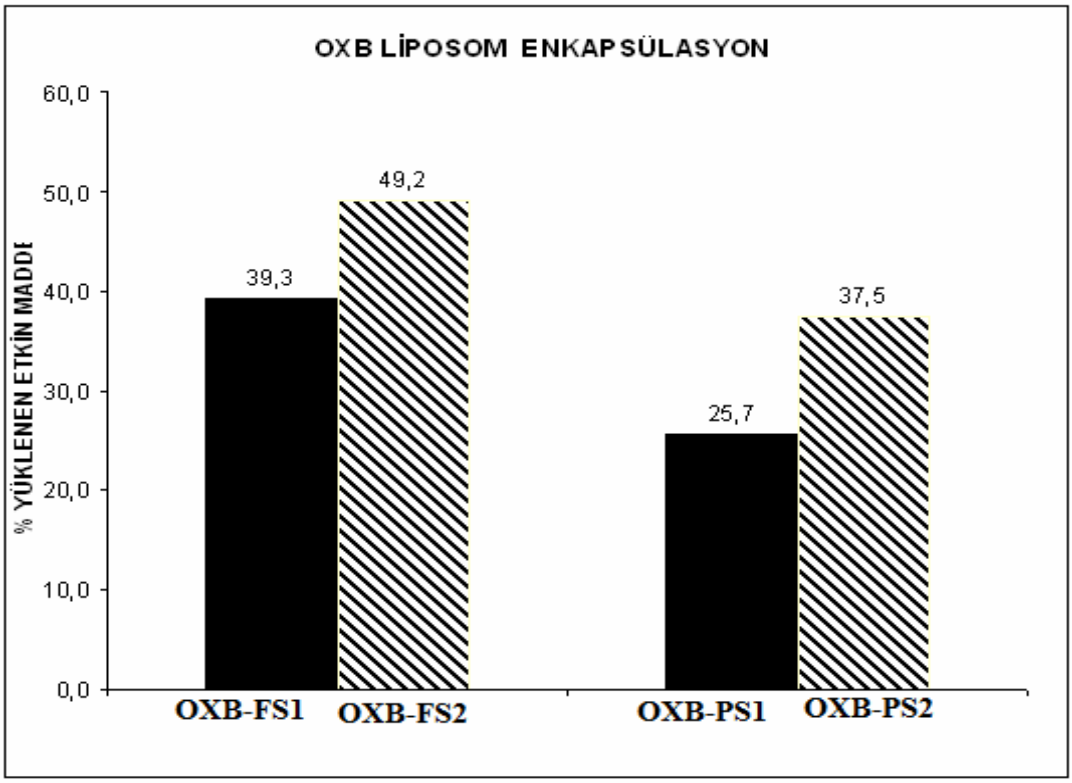
Yükleme kapasitesine ait çalışmalar Bölüm 3.2.7.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. OXB'in film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-F2 lipozomların içinde tutulma oranı her iki miktar tayini yöntemi ile % 56.2±4.8 ve % 58.1±1.6 olarak bulunmuştur. Lipozomlar içine hapsedilen etkin madde miktarı kullanılan lipidin tip ve bileşimine, maddenin partisyon katsayısına ve lipozomların hazırlama yöntemlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Aynı çalışma P2 lipozomu için yapıldığında OXB'nin lipozom içinde tutulma oranı % 32.5±3.6 ve % 34.3±3.8'dir. Poliol dilüsyon yönteminin film-hidrasyon yöntemine göre daha düşük yükleme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Daha sonra yapılan çalışmalarda lipozom bileşenlerinin molar oranları değiştirilmiş ve hazırlama yöntemine dondurarak çözme aşaması ilave

edilmiştir. Bu değişiklikler sonucunda oluşan OXB-FS1, OXB-FS2, OXB-PS1 ve OXB-PS2 formülasyonlarının yükleme kapasitesi sonuçları Şekil 130'da verilmiştir.

Sonuçlar daha önce cidofovir ile yaptığımız çalışma ile paralel çıkmıştır. İkinci grup lipozom formülasyonlarımızı yükleme kapasitesi birinci gruba göre daha iyidir. Bu sonuca göre hazırlama aşamasında dondurup çözme basamağının eklenmesi ile yükleme kapasitesi kısmen artırılmıştır.



Şekil 130. OXB içeren FS1, FS2, PS1 ve PS2 lipozomlarında % yükleme kapasitesi

5.2.2.4. Lipozomların Stabilitesine Ait Bulgular

OXB içeren lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğünün ve zeta potansiyelinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla, lipozomlar farklı saklama koşullarında (4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nemde) 3 ay bekletilmiş ve partikül büyüklüğü ile zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır.

OXB-F2 formülasyonuna ait stabilite sonuçları Tablo 76'da verilmiştir.

Tablo 76. OXB-F2 lipozom formülasyonunun stabilite çalışması boyunca ölçülen partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	OXB-F2 1.Gün	OXB-F2 7.Gün	OXB-F2 14.Gün	OXB-F2 21.Gün	OXB-F2 1.Ay	OXB-F2 2.Ay	OXB-F2 3.Ay
4°C/ortam nemi	3.74±0.03	3.76±0.04	3.75±0.12	3.78±0.05	3.77±0.04	3.80±0.01	3.81±0.04
25°C/%60 bağıl nem	3.74±0.03	3.75±0.02	3.78±0.11	3.81±0.10	3.80±0.05	3.83±0.06	3.85±0.03
40°C/%75 bağıl nem	3.74±0.03	3.79±0.08	3.85±0.09	3.91±0.05	3.96±0.12	4.03±0.05	4.12±0.07
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-F2 1.Gün**	**OXB-F2 7.Gün**	**OXB-F2 14.Gün**	**OXB-F2 21.Gün**	**OXB-F2 1.Ay**	**OXB-F2 2.Ay**	**OXB-F2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	-6.34±0.78	-6.36±0.48	-6.36±0.81	-6.38±0.33	-6.41±0.62	-6.44±0.28	-6.48±0.22
25°C/%60 bağıl nem	-6.34±0.78	-6.33±0.73	-6.38±0.99	-6.40±0.17	-6.43±0.26	-6.36±0.61	-6.45±0.52
40°C/%75 bağıl nem	-6.34±0.78	-6.69±0.68	-6.81±0.39	-6.85±0.29	-6.92±0.74	-7.12±0.85	-7.18±0.68

OXB-F2 formülasyonlarının partikül büyüklüğündeki değişim değerlendirildiğinde özellikle 4°C'de saklanan lipozomların partikül büyüklüğünde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme gözlenmemiştir (t-test, $p>0.05$). Aynı şekilde lipozomların zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde 4°C/ortam nemi ve 25°C/%60 bağıl nem içeren ortamlarda zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişme bulunamamıştır (t-test, $p>0.05$), ancak 40°C/%75 bağıl nemde içeren ortamda saklanan OXB-F2 lipozomlarının zeta potansiyel değerlerindeki değişim anlamlıdır (t-test, $p<0.05$).

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan OXB-P2 lipozom formülasyonunun aynı ortamlarda yapılan stabilite çalışmasının sonunda bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Tablo 77'de verilmiştir.

Tablo 77. OXB-P2 lipozom formülasyonunun stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	OXB-P2 1.Gün	OXB-P2 7.Gün	OXB-P2 14.Gün	OXB-P2 21.Gün	OXB-P2 1.Ay	OXB-P2 2.Ay	OXB-P2 3.Ay
4°C/ortam nemi	229.3±1.0	231.2±0.8	233.6±0.9	235.6±0.2	233.4±0.6	235.5±0.6	337.4±0.6
25°C/%60 bağıl nem	229.3±1.0	230.3±0.5	232.2±0.6	235.3±0.1	235.7±0.2	232.5±0.1	236.2±0.7
40°C/%75 bağıl nem	229.3±1.0	235.6±0.9	240.2±0.4	248.3±0.1	255.6±0.7	266.3±0.4	274.1±0.5
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-P2 1.Gün**	**OXB-P2 7.Gün**	**OXB-P2 14.Gün**	**OXB-P2 21.Gün**	**OXB-P2 1.Ay**	**OXB-P2 2.Ay**	**OXB-P2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	4.23±0.21	4.22±0.35	4.25±0.38	4.25±0.37	4.28±0.53	4.27±0.64	4.26±0.39
25°C/%60 bağıl nem	4.23±0.21	4.25±0.73	4.27±0.33	4.26±0.28	4.31±0.76	4.30±0.37	4.29±0.41
40°C/%75 bağıl nem	4.23±0.21	4.38±0.62	4.45±0.87	4.53±0.45	4.58±0.51	4.64±0.32	4.70±0.11

OXB-P2 formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerlerine bakıldığında ve hesaplanan P değerleri incelendiğinde 4 ve 25 °C'de saklanan lipozomların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerlerinde 3 ayın sonunda anlamlı bir değişme yoktur (t-test, $p>0.05$). Ancak 40°C'de saklanan OXB-P2 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli anlamlı bir şekilde artmıştır (t-test, $p<0.05$).

SA kullanılarak hazırlanan OXB-FS1 ve yine SA kullanılan ayrıca dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan OXB-FS2'nin stabilite çalışmasında bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 78'de verilmiştir.

Tablo 78. OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (µm) ve zeta potansiyeli (mV).

PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	OXB-FS1 1.Gün	OXB-FS1 7.Gün	OXB-FS1 14.Gün	OXB-FS1 21.Gün	OXB-FS1 1.Ay	OXB-FS1 2.Ay	OXB-FS1 3.Ay
4°C/ortam nemi	8.80±0.07	8.83±0.11	8.85±0.17	8.85±0.03	8.90±0.04	8.89±0.01	8.91±0.10
25°C/%60 bağıl nem	8.80±0.07	8.85±0.03	8.86±0.10	8.88±0.09	8.93±0.03	8.95±0.05	8.94±0.06
40°C/%75 bağıl nem	8.80±0.07	8.91±0.12	8.93±0.16	8.96±0.06	9.23±0.06	9.81±0.11	9.89±0.02
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)	**OXB-FS2 1.Gün**	**OXB-FS2 7.Gün**	**OXB-FS2 14.Gün**	**OXB-FS2 21.Gün**	**OXB-FS2 1.Ay**	**OXB-FS2 2.Ay**	**OXB-FS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	4.54±0.39	4.58±0.27	4.59±0.23	4.61±0.33	4.66±0.46	4.68±0.26	4.70±0.14
25°C/%60 bağıl nem	4.54±0.39	4.60±0.18	4.59±0.47	4.63±0.41	4.68±0.17	4.67±0.31	4.73±0.37
40°C/%75 bağıl nem	4.54±0.39	4.68±0.48	4.72±0.29	4.77±0.18	4.94±0.69	5.04±0.19	5.26±0.61
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-FS1 1.Gün**	**OXB-FS1 7.Gün**	**OXB-FS1 14.Gün**	**OXB-FS1 21.Gün**	**OXB-FS1 1.Ay**	**OXB-FS1 2.Ay**	**OXB-FS1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	40.16 ±3.03	40.32 ±3.27	40.56 ±3.71	40.63 ±2.76	40.67 ±3.17	40.73 ±3.37	40.93 ±3.95
25°C/%60 bağıl nem	40.16 ±3.03	40.40 ±2.89	40.61 ±3.18	40.68 ±2.62	40.74 ±3.28	40.86 ±3.18	40.97 ±3.18
40°C/%75 bağıl nem	40.16 ±3.03	40.69 ±3.45	40.71 ±3.29	40.93 ±3.84	40.98 ±2.75	41.58 ±3.81	43.76 ±2.75
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-FS2 1.Gün**	**OXB-FS2 7.Gün**	**OXB-FS2 14.Gün**	**OXB-FS2 21.Gün**	**OXB-FS2 1.Ay**	**OXB-FS2 2.Ay**	**OXB-FS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	36.75±0.78	36.78±0.94	36.83±1.03	36.88±0.28	36.95±0.26	36.98±0.39	37.05±0.37
25°C/%60 bağıl nem	36.75±0.78	36.79±1.17	36.88±1.19	36.93±0.62	37.02±1.09	37.17±1.15	37.23±0.62
40°C/%75 bağıl nem	36.75±0.78	37.39±0.91	37.45±0.56	37.59±1.41	38.05±1.46	38.65±1.27	40.38±1.59

OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozom formülasyolarının farklı saklama koşullarında partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli incelendiğinde 4 ve 25 °C'deki değerlerde anlamlı bir değişme bulunmamıştır (test, $p>0.05$).

Yani OXB-FS1 ve OXB-FS2 formülasyonları 4 ve 25°C'de partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli açısından stabildir ancak 40°C'de saklanan

lipozomların değerlerindeki değişim anlamlıdır (t-test, $p<0.05$), yani 40°C'de bu formülasyonlar stabil değildir.

Poliol-dilüsyon yöntemi ile SA kullanılarak hazırlanan OXB-PS1 ve yine farklı lipit oranına sahip ayrıca dondurup çözme yöntemi ile hazırlanan PS2'nin stabilite çalışmasında bulunan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Tablo 79'da verilmiştir.

Tablo 79. OXB-PS1 ve OXB-PS2 lipozom formülasyonlarının stabilite çalışmasındaki partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyeli (mV).

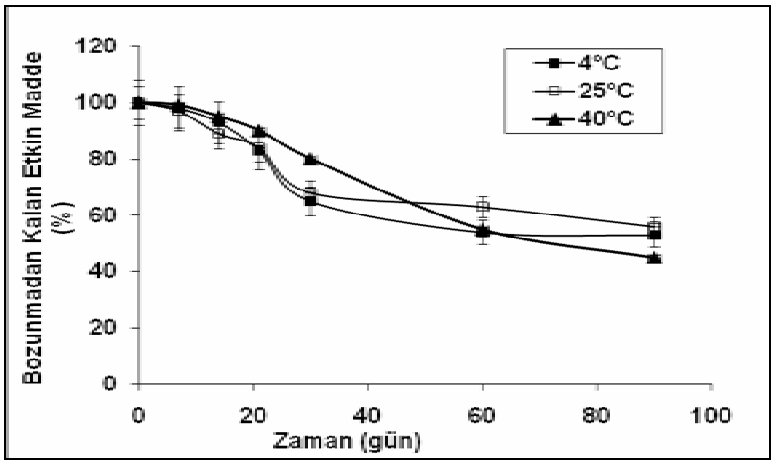
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	OXB-PS1 1.Gün	OXB-PS1 7.Gün	OXB-PS1 14.Gün	OXB-PS1 21.Gün	OXB-PS1 1.Ay	OXB-PS1 2.Ay	OXB-PS1 3.Ay
4°C/ortam nemi	377±8	377±5	379±4	380±2	382±7	381±4	380±6
25°C/%60 bağıl nem	377±9	378±4	380±5	382±6	382±5	383±8	381±4
40°C/%75 bağıl nem	377±8	378±3	384±6	387±7	389±6	387±6	385±5
PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	**OXB-PS2 1.Gün**	**OXB-PS2 7.Gün**	**OXB-PS2 14.Gün**	**OXB-PS2 21.Gün**	**OXB-PS2 1.Ay**	**OXB-PS2 2.Ay**	**OXB-PS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	307±6	305±5	310±5	309±9	310±4	311±4	311±8
25°C/%60 bağıl nem	307±6	308±3	311±2	308±5	311±3	312±7	313±3
40°C/%75 bağıl nem	307±6	309±7	313±4	313±6	316±7	315±3	314±8
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-PS1 1.Gün**	**OXB-PS1 7.Gün**	**OXB-PS1 14.Gün**	**OXB-PS1 21.Gün**	**OXB-PS1 1.Ay**	**OXB-PS1 2.Ay**	**OXB-PS1 3.Ay**
4°C/ortam nemi	8.32±1.14	8.33±1.28	8.35±1.37	8.35±1.38	8.37±1.09	8.36±1.38	8.38±1.32
25°C/%60 bağıl nem	8.32±1.14	8.35±1.16	8.37±1.27	8.36±1.25	8.38±1.48	8.39±1.98	8.39±1.42
40°C/%75 bağıl nem	8.32±1.14	8.39±1.25	8.42±1.49	8.44±2.03	8.46±1.77	8.45±1.46	8.46±1.54
ZETA POTANSİYELİ (mV)	**OXB-PS2 1.Gün**	**OXB-PS2 7.Gün**	**OXB-PS2 14.Gün**	**OXB-PS2 21.Gün**	**OXB-PS2 1.Ay**	**OXB-PS2 2.Ay**	**OXB-PS2 3.Ay**
4°C/ortam nemi	21.15±1.31	21.17±1.54	21.19±1.56	21.26±2.21	21.35±1.73	21.33±1.28	21.36±2.15
25°C/%60 bağıl nem	21.15±1.31	21.20±1.25	21.25±1.44	21.29±1.62	21.37±3.30	21.39±1.03	21.43±1.18
40°C/%75 bağıl nem	21.15±1.31	21.22±1.28	21.27±1.89	21.35±1.37	21.45±1.87	21.43±1.51	21.55±1.38

OXB-PS1 ve OXB-PS2 formülasyonlarının stabilite çalışmalarında da zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü özellikleri açısından 3 ay boyunca anlamlı bir değişme olmadığı bulunmuştur (t-test, $p>0.05$).

Lipozom formülasyonların stabilitesi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde en stabil formülasyonlar OXB-PS1 ve OXB-PS2 bulunmuştur. Bu sonuçlar cidofovir ile bulunan stabilite sonuçları ile paraleldir.

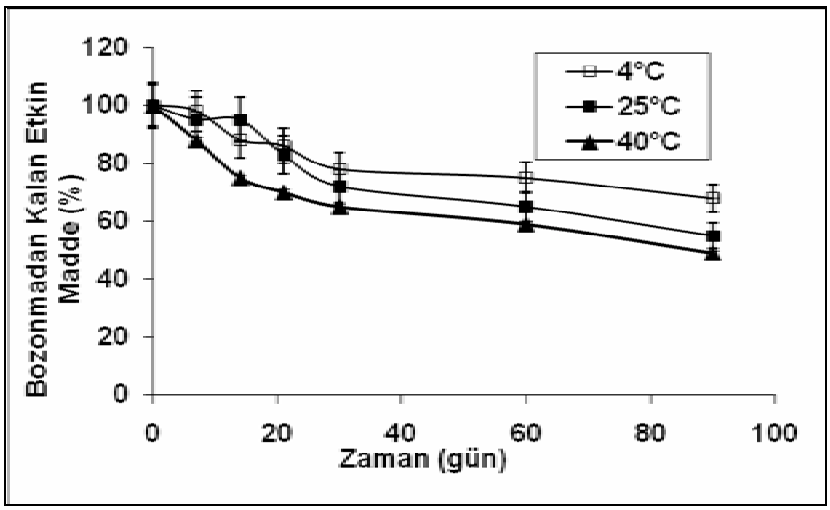
Stabilite çalışmalarında lipozomların içinde bozulmadan kalan OXB miktar tayini de yapılmış ve etkin maddenin miktarındaki değişmeye bağlı olarak determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı gibi uyum ölçütleri incelenmiştir. Elde edilen profiller kinetik açıdan incelenerek, lipozom formülasyonundaki etkin maddelerin bozunma kinetikleri belirlenmiştir.

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-F2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zamana göre değişimi Şekil 131'de gösterilmiştir.



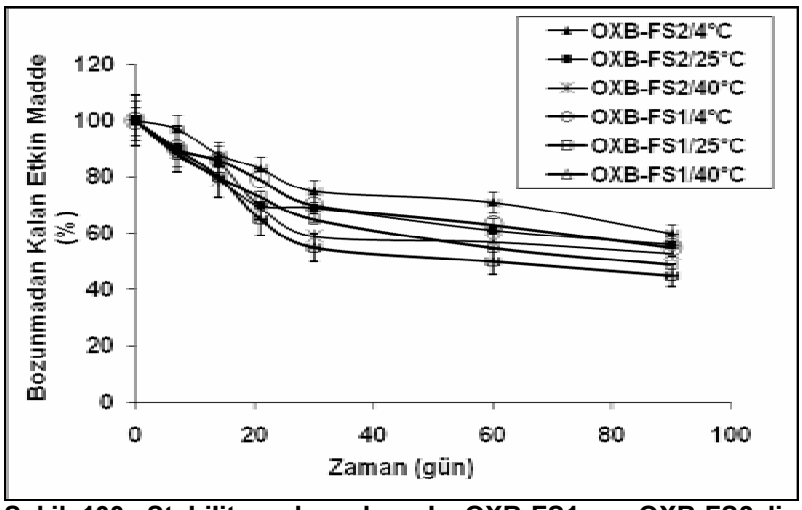
Şekil 131. Stabilite çalışmalarında OXB-F2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi

Poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan OXB-P2 lipozomların içindeki OXB miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zaman göre değişimi Şekil 132'de gösterilmiştir.



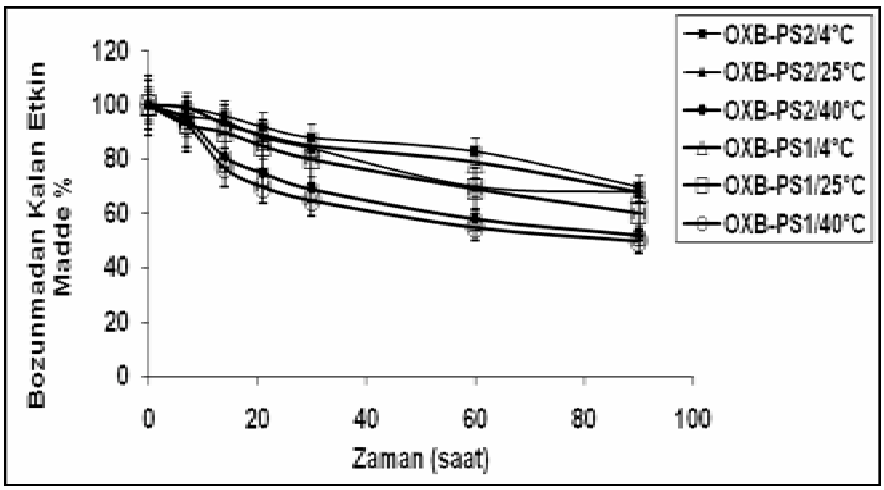
Şekil 132. Stabilite çalışmalarında OXB-P2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan fakat farklı lipit molar oranlarına sahip FS1 ve dondurup çözme metodu ile hazırlanan FS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zaman göre değişimi Şekil 133'de gösterilmiştir



Şekil 133. Stabilite çalışmalarında OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi

Poliol-dilüsyon ile hazırlanan fakat SA içeren OXB-PS1 ve dondurup çözme metodu ile hazırlanan OXB-PS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının, formülasyonun farklı saklama koşullarında, zaman göre değişimi Şekil 134'de gösterilmiştir



Şekil 134. Stabilite çalışmalarında PS1 ve PS2 lipozomlarının içindeki OXB miktarının zamana göre değişimi

Stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen kinetik hesaplar film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için Tablo 80'de, poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlar için Tablo 81'de gösterilmiştir.

Tablo 80. OXB'in OXB-F2, OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozom formülasyonu içindeki stabilitesine ait parametreler

Reakiyon Derecesi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C_0)	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
OXB-F2	**OXB-F2**	**OXB-F2**	**OXB-F2**	**OXB-F2**	**OXB-F2**
Sıfır Derece	4	0.5804	96.41	0.8403	52765
	25	0.4989	95.40	0.8666	50567
	40	0.6763	98.94	0.9737	44591
Birinci Derece	4	0.008	4.5785	0.8684	40637
	25	0.006	4.5662	0.9008	39861
	40	0.010	4.6587	0.9813	41872
İkinci Derece	4	0.0001	0.0101	0.8916	40817
	25	0.0005	0.0103	0.9296	39816
	40	0.0001	0.0089	0.9777	42736
OXB-FS1	**OXB-FS1**	**OXB-FS1**	**OXB-FS1**	**OXB-FS1**	**OXB-FS1**
Sıfır Derece	4	0.3764	4.6483	0.8573	32842
	25	0.7465	4.8264	0.8735	33912
	40	0.4689	4.7354	0.8173	35927
Birinci Derece	4	0.0063	4.5331	0.935	43984
	25	0.0076	4.5012	0.9198	40927
	40	0.0086	4.4722	0.8284	38621
İkinci Derece	4	0.0001	0.0106	0.9669	45628
	25	0.0001	0.0109	0.9645	44276
	40	0.0001	0.0113	0.8865	39617
FS2	**OXB-FS2**	**OXB-FS2**	**OXB-FS2**	**OXB-FS2**	**OXB-FS2**
Sıfır Derece	4	0.4227	95.41	0.9076	33082
	25	0.4452	89.98	0.7919	30821
	40	0.4658	87.06	0.7189	29615
Birinci Derece	4	0.0054	4.5654	0.9338	40834
	25	0.0061	4.5016	0.8459	38167
	40	0.0066	4.4635	0.7718	33928
İkinci Derece	4	$5X10^{-7}$	0.0103	0.9565	50837
	25	$5X10^{-8}$	0.0111	0.8939	51298
	40	$5X10^{-9}$	0.0115	0.8192	41097

Bozunma reaksiyon kinetikleri incelenen ve uyum ölçütleri belirlenen film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanmış lipozomların içindeki OXB'in İkinci derece kinetikle bozunduğu bulunmuştur. ikinci derece kinetiğe göre hesaplanan SKT ve r^2 değerleri diğer kinetiklerden yüksek bulunmuştur. Üç ayın sonunda 4°C'de saklanan OXB-F2, OXB-FS1 ve OXB-FS2 lipozomları içinde bozunmadan kalan OXB miktarı sırasıyla % 53, % 55 ve % 60 olarak bulunmuştur. Ancak 40°C'de saklanan lipozomları içinde 3 ay sonunda kalan OXB miktarı % 44, % 45 ve % 53'dür.

Tablo 81. OXB'in OXB-P2, OXB-PS1 ve OXB-PS2 lipozom formülasyou içindeki stabilitesine ait parametreler

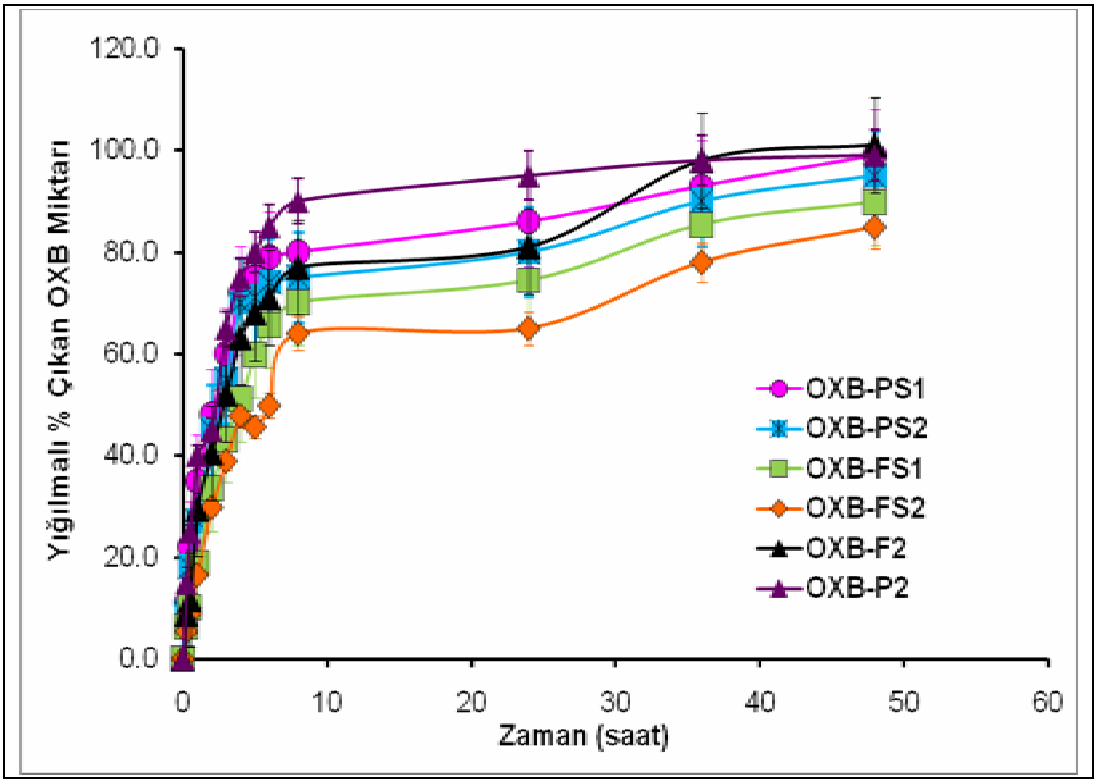
Reakiyon Derecesi	Sıcaklık (°C)	Eğim (k)	Kesişim (C_0)	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)
OXB-P2	**OXB-P2**	**OXB-P2**	**OXB-P2**	**OXB-P2**	**OXB-P2**
Sıfır Derece	4	0.3399	95.493	0.8573	4467
	25	0.5077	96.814	0.9097	5855
	40	0.4822	87.578	0.8071	458
Birinci Derece	4	0.0041	4.5619	0.8899	51088
	25	0.0068	4.5848	0.9428	47479
	40	0.0070	4.4779	0.8835	35300
İkinci Derece	4	$5X10^{-5}$	0.0104	0.9178	55837
	25	$5X10^{-9}$	0.0101	0.9656	51736
	40	0.0001	0.0112	0.9397	50836
OXB-PS1	**OXB-PS1**	**OXB-PS1**	**OXB-PS1**	**OXB-PS1**	**OXB-PS1**
Sıfır Derece	4	0.347	98.58	0.9642	33746
	25	0.4265	95.95	0.9675	32947
	40	0.5164	89.24	0.8043	30826
Birinci Derece	4	0.0042	4.5972	0.9762	48567
	25	0.0055	4.5738	0.9881	44753
	40	0.0074	4.4958	0.8747	40857
İkinci Derece	4	$5X10^{-5}$	0.0100	0.9804	53857
	25	$4X10^{-7}$	0.0103	0.9979	48567
	40	0.0001	0.0011	0.9322	46849
PS2	**OXB-PS2**	**OXB-PS2**	**OXB-PS2**	**OXB-PS2**	**OXB-PS2**
Sıfır Derece	4	0.3246	100.01	0.9775	3964
	25	0.3767	97.661	0.9354	3846
	40	0.5131	91.987	0.8602	8675
Birinci Derece	4	0.0038	4.6119	0.9755	53875
	25	0.0046	4.5875	0.9471	49479
	40	0.0072	4.5299	0.9180	37462
İkinci Derece	4	$5X10^{-5}$	0.0098	0.9664	58644
	25	$4X10^{-6}$	0.0101	0.9549	56370
	40	0.0001	0.0106	0.9614	40955

Uyum ölçütlerine göre poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların içindeki OXB tüm saklama koşullarında ikinci derece kinetikle bozunmuştur. İkinci derece kinetiğe göre hesaplanan SKT değeri diğer kinetiklerin SKT değerinden daha büyüktür. Üç ayın sonunda 4°C'de saklanan OXB-P2, OXB-PS1 ve OXB-PS2 lipozomları içinde bozunmadan kalan OXB miktarı sırasıyla % 68, % 69 ve % 70'dir. Bu değerler 40°C'de % 49, % 50 ve % 52 olarak bulunmuştur.

Bütün lipozomların bozunma özellikleri değerlendirildiğinde OXB-PS2 lipozom formülasyonun en stabil formülasyon olduğu saptanmıştır.

5.2.2.5. Lipozom Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

Hazırlanan lipozomlardan belli miktar tartılarak 12000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membrandan geçiş incelendi. Belli zaman aralıklarında örnekler alındı. Alınan örneklerden OXB'in analizi HPLC ile 235 nm'de yapıldı. Sonuçlar standart doğru denkleminde yerine konularak diyaliz membrandan geçen etkin madde miktarı hesaplandı (Şekil 135).

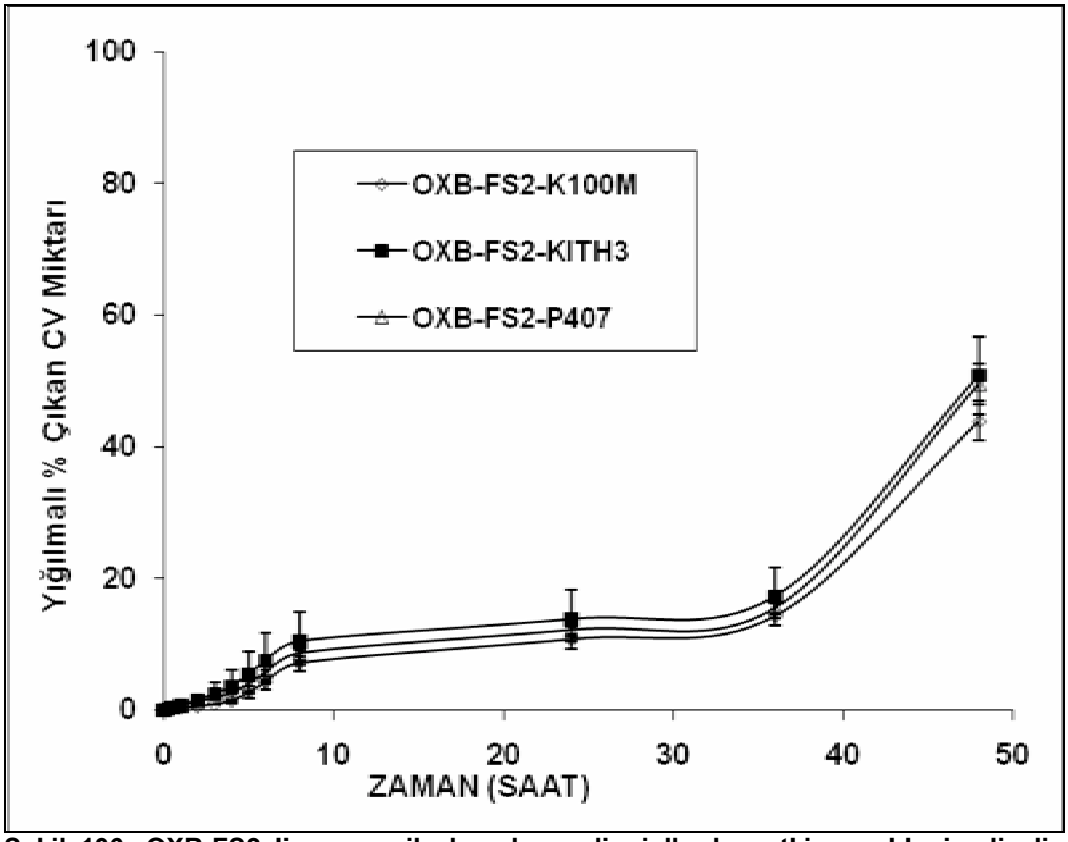


Şekil 135. OXB etkin maddesi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarından etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Profilden de anlaşılacağı gibi 48 saatin sonunda lipozomlar içindeki etkin maddenin tamamına yakını salınmıştır. En az salım yapan formülasyon 48 saatin sonunda % 84.9±2.4 OXB salan OXB-FS2 lipozom formülasyonudur.

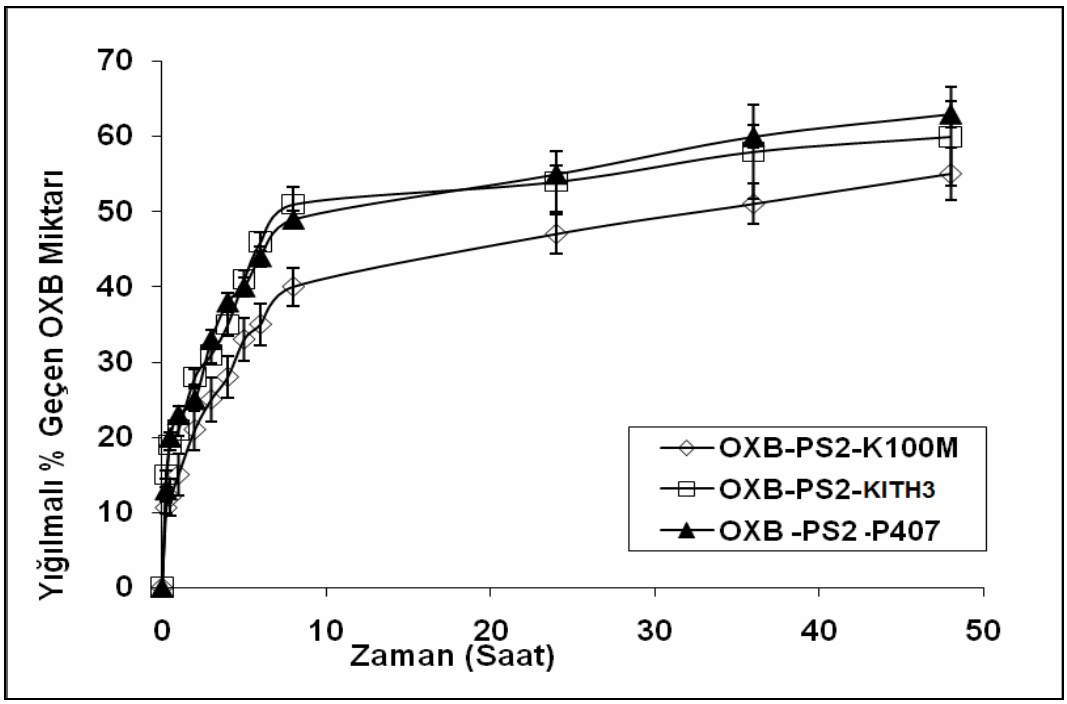
5.2.2.6. Biyoadezif Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulgular

Tablo 26'da kodları verilen lipojeller OXB-FS2 ve OXB-PS2 lipozomlarını taşımaktadır. Taşıyıcı olarak daha önce üzerinde çalıştığımız kitosan, HPMC, poloksamer jel kullanılmıştır. OXB-FS2 ve OXB-PS2 lipozomu içeren lipojellerden OXB salım profilleri Şekil 136 ve 137'de verilmiştir.



Şekil 136. OXB-FS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipojellerden salımın oldukça azaldığını ve kontrollü salımın sağlandığını görmekteyiz. Özellikle HPMC-K100M ile hazırlanan lipojellerden salımın 48 saatin sonunda % 43.9±3.61 olduğu bulunmuştur. OXB-FS2-KITH3 formülasyonundan ise ilk 8 saatin sonunda % 10.4±5.26 olduğu 48 saatin sonunda da % 50.8±3.47 olduğu bulunmuştur.



Şekil 137. OXB-PS2 lipozomu ile hazırlanan lipojellerden etkin maddenin diyaliz membrandan geçiş profilleri

Poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipojellerden de salımın azaldığı ve en az salımın 48 saatin sonunda % 55.8±2.5 ile HPMC-K100M içeren formülasyon olduğu bulunmuştur. Poloksamer jel kullanılarak hazırlanan OXB-PS2-P407 formülasyonu ilk sekiz saatte % 49.5±2.43 salım yapmış ancak bu değerin 48 saatin sonunda % 63.5±2.58 olduğu bulunmuştur. Bu lipojellerin viskozite ve akış özellikleri de incelenmiştir. Bütün jellerin pseudo plastik akış gösterdiği belirlenmiş ve vizkozite değerleri Tablo 82'de verilmiştir. Buna göre içine lipozom konulmuş biyoadezif vajinal jellerin, lipozom taşımayan jellere göre viskozitesinde düşme gözlenmiştir.

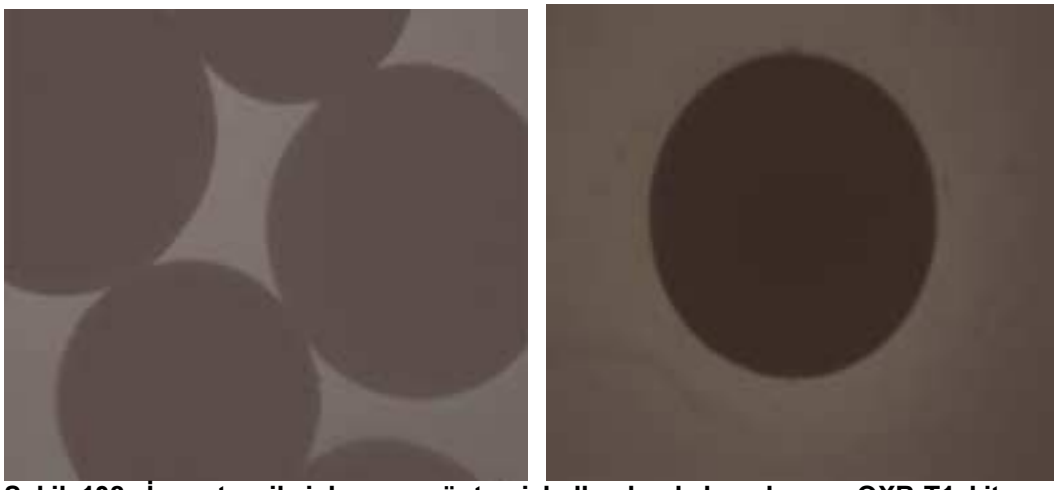
Tablo 82. Lipojellerin viskozite değerleri

	Viskozite (cP)	rpm	Spindle No
OXB-FS2-KITH3	422±5	20	52
OXB-FS2-K100M	953±7	20	52
OXB-FS2-P407	873±9	20	52
OXB-PS2-KITH3	364±5	20	52
OXB-PS2-K100M	744±8	20	52
OXB-PS2-P407	683±6	20	52

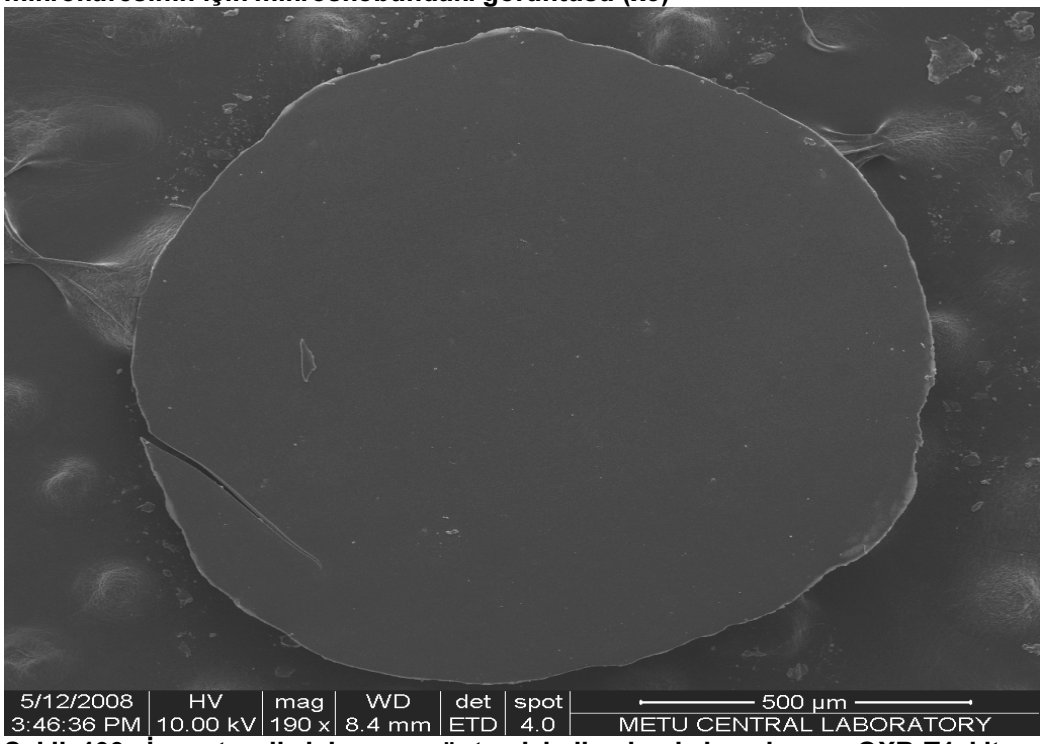
5.2.3. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulgular

5.2.3.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

Bu yöntem ile elde edilen OXB-T1 mikrokürelerinin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 138'de verilmiştir. SEM görüntüleri ise Şekil 139'da verilmiştir.



Şekil 138. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-T1 kitosan mikroküresinin ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)

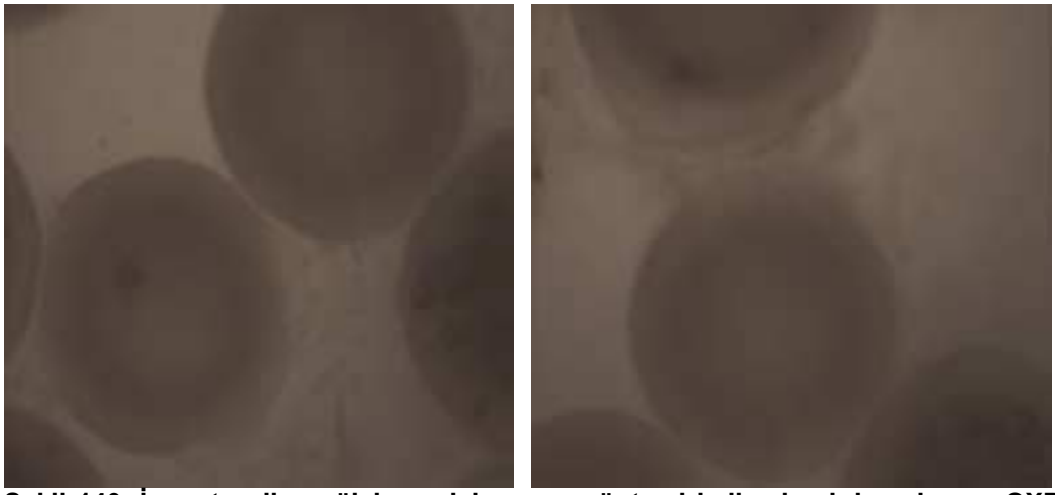


Şekil 139. İyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-T1 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

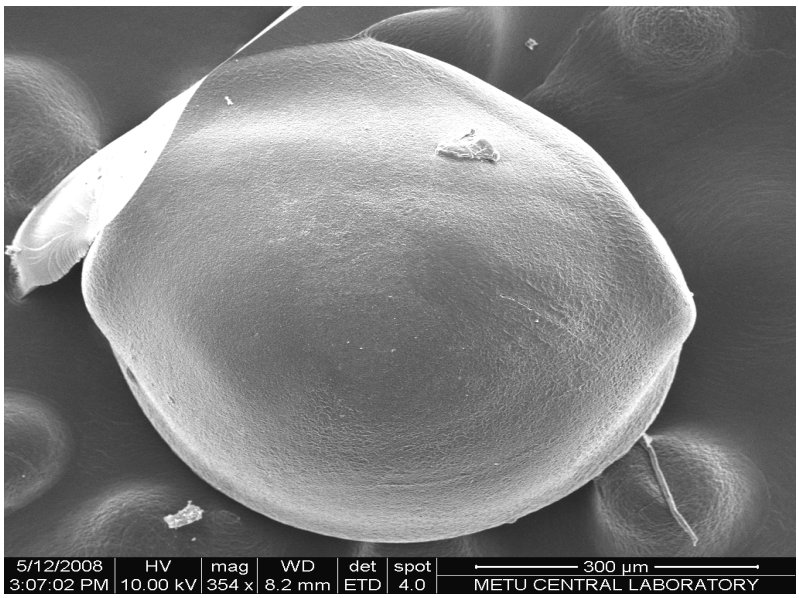
Bu yöntem ile hazırlanan formülasyonların küresel olduğu görülmüş ve mikroküre formülasyonları üzerinde yapılan kontrollere geçilmiştir. SEM ile yüzey özellikleri incelenen OXB-T1 mikroküresinin yüzey özelliği oldukça düzgün olduğu bulunmuştur.

5.2.3.2. İyonotropik Emülsiyon Jelasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

Bu yöntemle hazırlanan OXB-K1 mikroküre formülasyonunun ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 140'da, SEM görüntüleri ise Şekil 141'de verilmiştir.



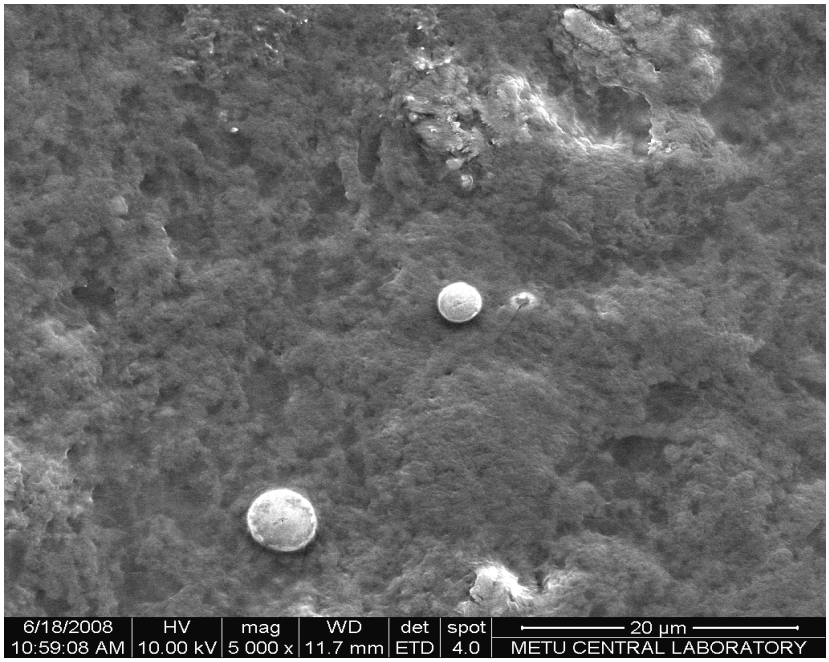
Şekil 140. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB içeren kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı andaki ışık mikroskobundaki görüntüsü (x5)



Şekil 141. İyonotropik emülsiyon jelasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan, OXB-K1 kitosan mikroküresinin SEM görüntüsü

5.2.3.3. Kompleks Koaservasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerine Ait Bulgular

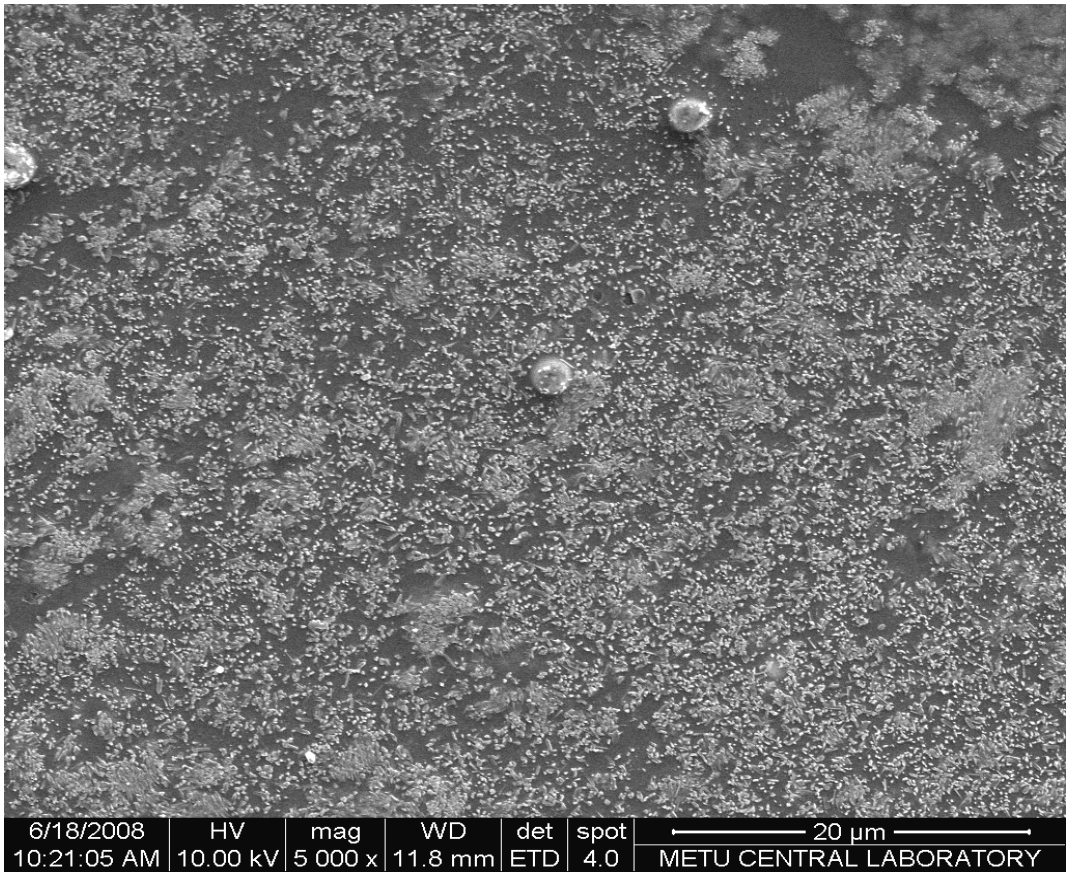
Hazırlama sırasında OXB-AS4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre formülasyonu olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi (Şekil 142).



Şekil 142. Kompleks Koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan OXB-AS4 kitosan mikrokürelerinin SEM görüntüsü

5.2.3.4. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Kitosan Mikroküre lerine Ait Bulgular

Hazırlama sırasında OXB-BT4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi (Şekil 143).



Şekil 143. Sodyum Sülfat ile Presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan BT4 kitosan mikro- partiküllerinin SEM görüntüsü

5.2.3.5. Hazırlanan Kitosan Mikrokürelerinin Karakterizasyonu

5.2.3.5.1. Hazırlanan Mikrokürelerde Etkin Madde Miktar Tayini ve İşlem Etkinliği

Bölüm 3.2.10.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 83'de verilmiştir.

Tablo 83. Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinin işlem etkinliği

KOD	Teorik Etkin mad. Miktarı %	Ölçülen Etkin Mad. Miktarı %	İŞLEM ETKİNLİĞİ %
OXB-T1	5	4.15±0.05	83.7
OXB-K1	5	4.07±0.09	81.4
OXB-AS4	5	3.16±0.06	63.6
OXB-BT4	5	3.21±0.08	64.2

5.2.3.5.2. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Mikrokürelerin partikül büyüklüğü ölçümü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sonuçları Tablo 84'de verilmiştir.

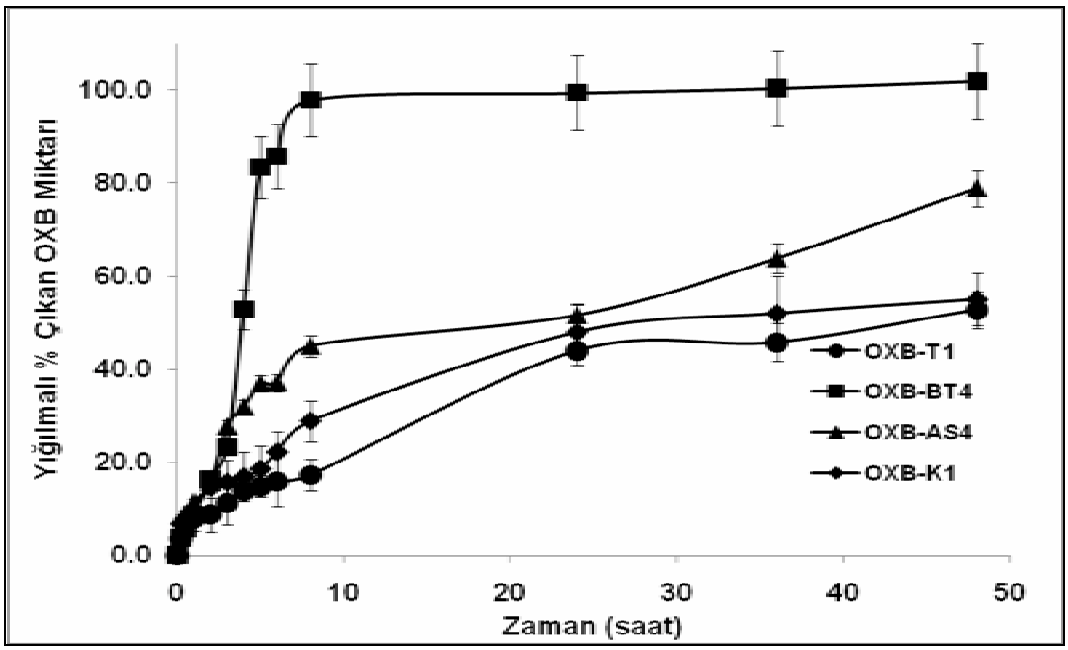
Tablo 84. Hazırlanan OXB kitosan mikrokürelerin ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel (mV)

Formülasyonlar	Partikül Büyüklğü	Polidispersite Indeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
OXB-T1	897 ±3	0.245±0.028	6.28
OXB-K1	995±3	0.156±0.054	-11.54
OXB-AS4	1080±9 nm	0.234±0.037	-4.48
OXB-BT4	674±6 nm	0.263±0.072	-6.83

5.2.3.5.3. OXB-Mikroküre Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular

Mikrokürelerin süspansiyon halinde geçiş çalışmaları yapılmış ve salım profilleri Şekil 144'de verilmiştir.

Süspande haldeki mikroküre formülasyonlarından OXB salımı ilk sekiz saatin sonunda % 17-29 aralığında olmuştur. Bu oran 48 saatin sonunda ise %41-55 olarak bulunmuştur. En az salımı 48 saatin sonunda % 41.2±3.6 salım yapan OXB-AS4 formülasyonudur.



Şekil 144. OXB-mikroküre formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

5.2.4. Mikrokürelere-Jel Formülasyonlarına Ait Bulgular

5.2.4.1. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Viskozitesi ve Akış Özellikleri

Hazırlanan mikroküre-jel formülasyonlarının viskozite ve akış özellikleri de incelenmiştir. Bütün mikroküre-jellerin pseudo plastik akış gösterdiği belirlenmiş ve vizkozite değerleri Tablo 85'de verilmiştir. Buna göre içine mikroküre konulmuş biyoadezif vajinal jellerin viskozitesinde düşme gözlenmiştir.

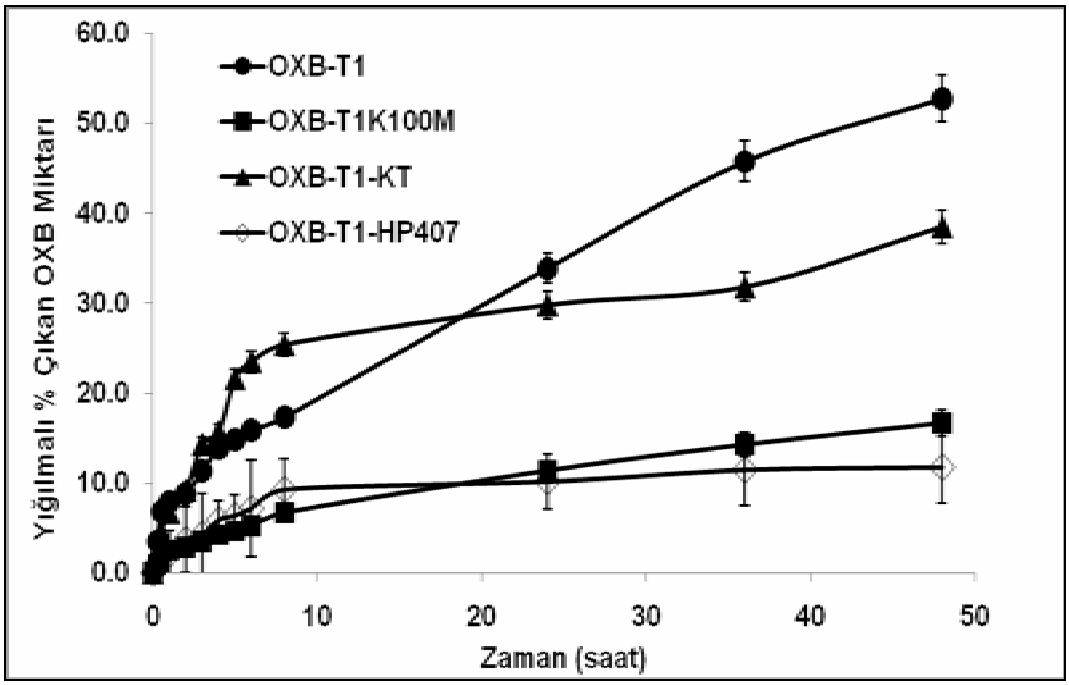
Tablo 85. OXB-Mikroküre içeren jellerin viskozite değerleri

	Viskozite (cP)	rpm	Spindle No
OXB-T1-KT	496±3	20	52
OXB-T1-K100M	1018±6	20	52
OXB-T1-HP407	938±4	20	52
OXB-K1-KT	517±4	20	52
OXB-K1-K100M	1073±9	20	52
OXB-K1-HP407	905±11	20	52
OXB-AS4-KT	328±7	20	52
OXB-AS4-K100M	854±8	20	52
OXB-AS4-HP407	884±6	20	52
OXB-BT4-KT	374±10	20	52
OXB-BT4-K100M	708±12	20	52
OXB-BT4-HP407	892±8	20	52

5.2.4.2. Mikroküre-Jel Formülasyonlarının Franz Difüzyon Hücresinden Geçişine Ait Bulgular

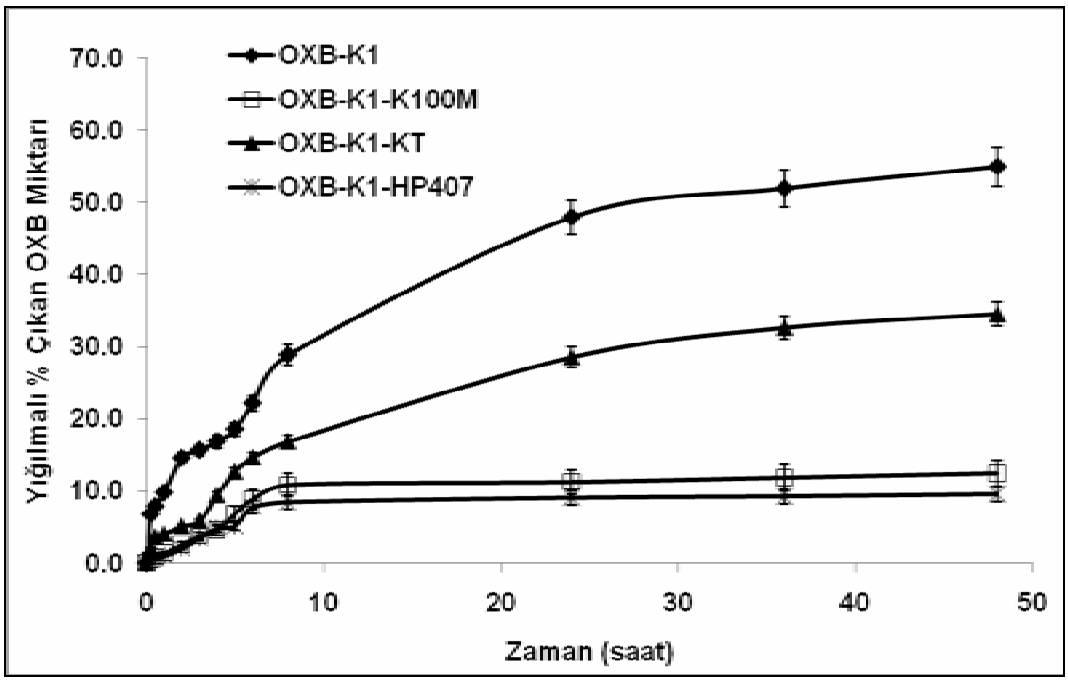
Tablo 29'de formülasyon kodları ve içerikleri verilen mikroküre-jel formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 145'de verilmiştir.

Bu grup mikroküre-jel formülasyonları arasında en fazla salımı OXB-T1-KT formülasyonu yapmıştır. Buna göre 8, 24 ve 48. saatlerin sonunda % 25.4±1.6, % 29.8±2.4 ve % 38.5±3.4 oranında salım gözlenmiştir. Bu grup mikroküre-jel formülasyonlarından en az salımı ise 48 saatin sonunda % 11.8±4.2 oranında salım yapan OXB-T1-HP407 formülasyonudur.



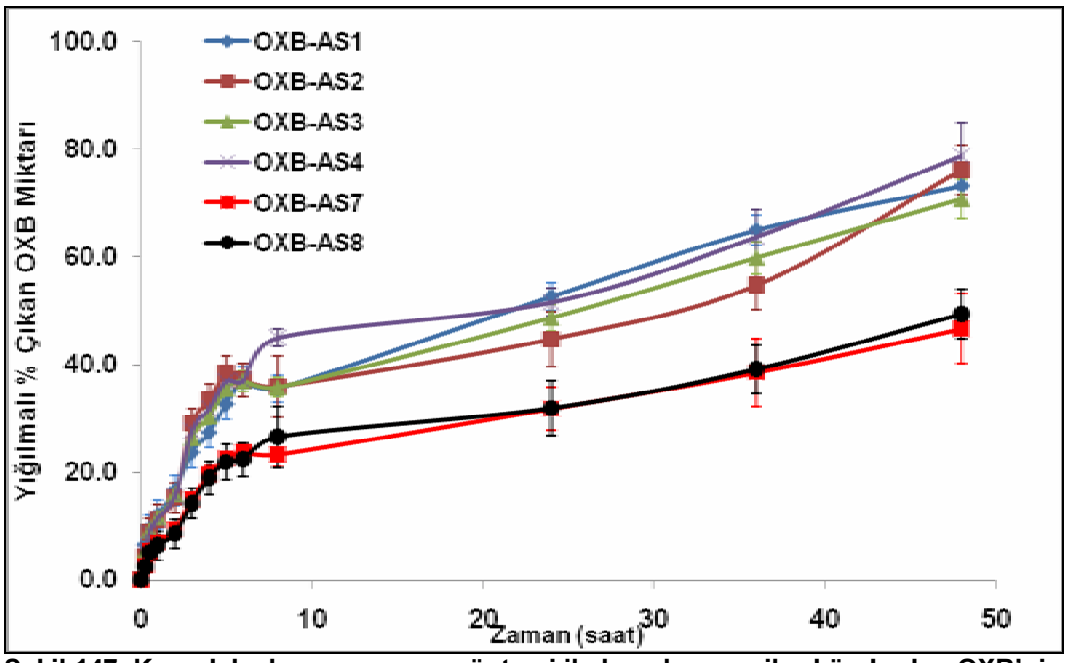
Şekil 145. OXB-T1 mikroküre ve OXB-T1 mikroküre-jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Şekil 146'da OXB-K1 grubu mikrokürelerin salım profilleri görülmektedir. OXB-K1 mikroküresi süspansiyon halinde 8. saatin sonunda % 28.9±1.3, 24. saatin sonunda % 48.0±2.7 ve 48. saatin sonunda % 55.4±2.3 oranında salım yapmıştır. Jel içindeki OXB-K1 mikrokürelerinden salıma bakıldığında ise 48 saatin sonunda en fazla salımı OXB-K1-KT formülasyonu (% 34.6±2.6), en az salımıda OXB-K1-HP407 formülasyonu (% 9.6±2.1) yapmıştır.



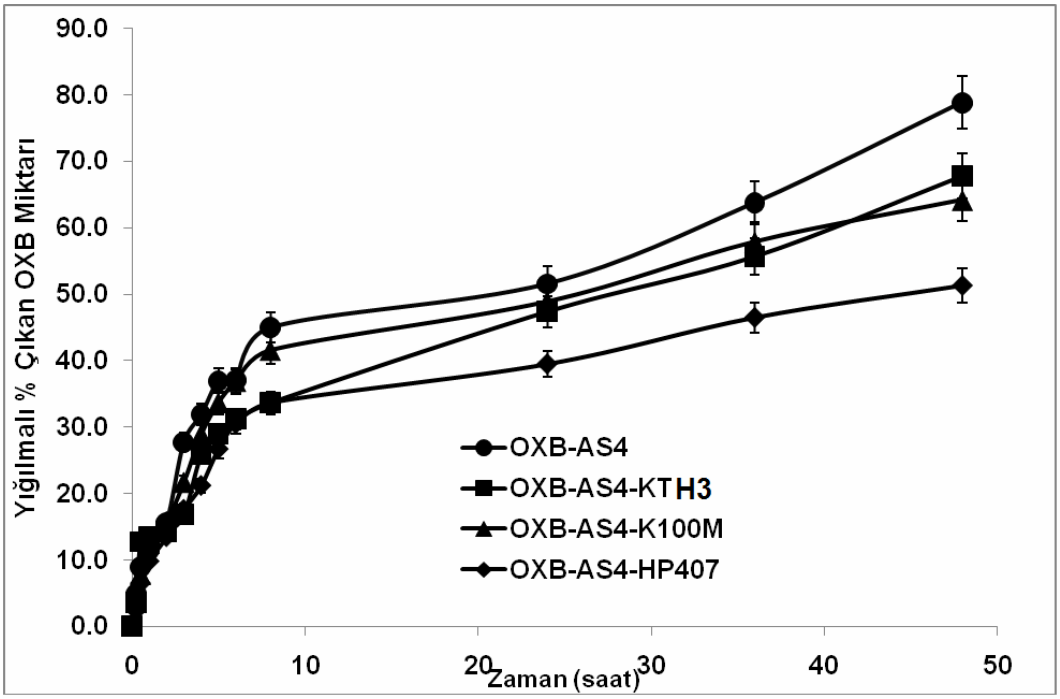
Şekil 146. OXB-K1 mikroküre ve OXB-K1 mikroküre-jel formülasyonlarından OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan 8 farklı mikroküre formülasyonlarından 6 tanesinde mikroküre oluşumu gözlenmiştir (Tablo 27). Bu mikrokürelerin süspansiyon halinde diyaliz membrandan geçiş profilleri Şekil 147'de gösterilmiştir. En fazla salımı yapan OXB-AS4 formülasyonu 48 saatin sonunda % 78.9±3.2 oranında salım yapmıştır ve mikroküre-jel formülasyonlarının hazırlanması için seçilmiştir.



Şekil 147. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre lerden OXB'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

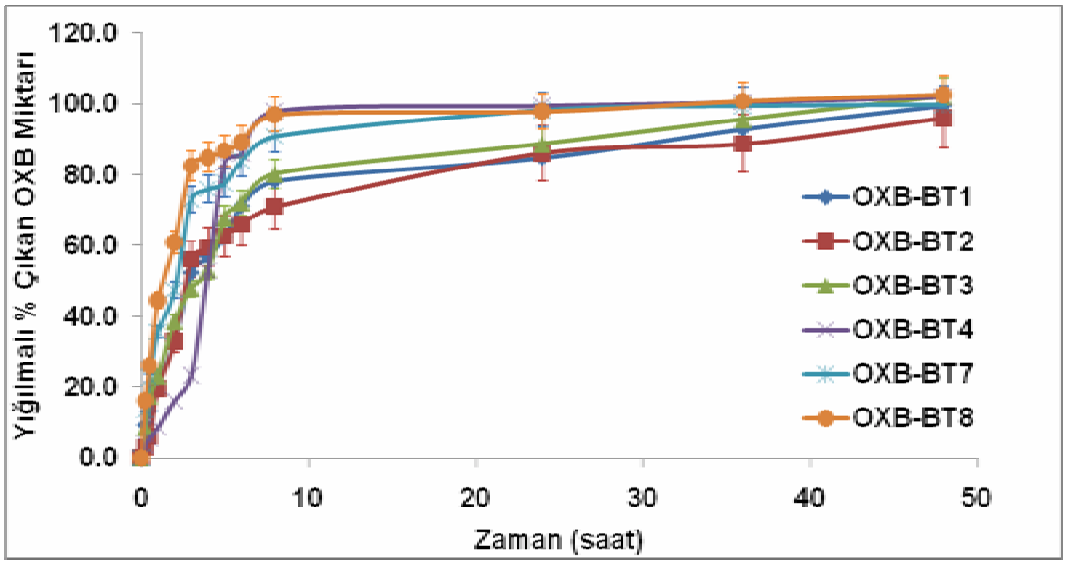
OXB-AS4 ile kazırlanan mikroküre jel formülasyonlarının içerikleri Tablo 29'da verilmiş ve diyaliz memrandan geçiş profilleri Şekil 148'de gösterilmiştir.



Şekil 148. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-mikroküre-jel formülasyonlarından CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

OXB-AS4-HP407 formülasyonu 48 saatin sonunda en az salım (%51.3±3.5) yapan formülasyon olurken OXB-AS4-KT formülasyonu en yüksek salımı (%64.2±4.7) yapmıştır.

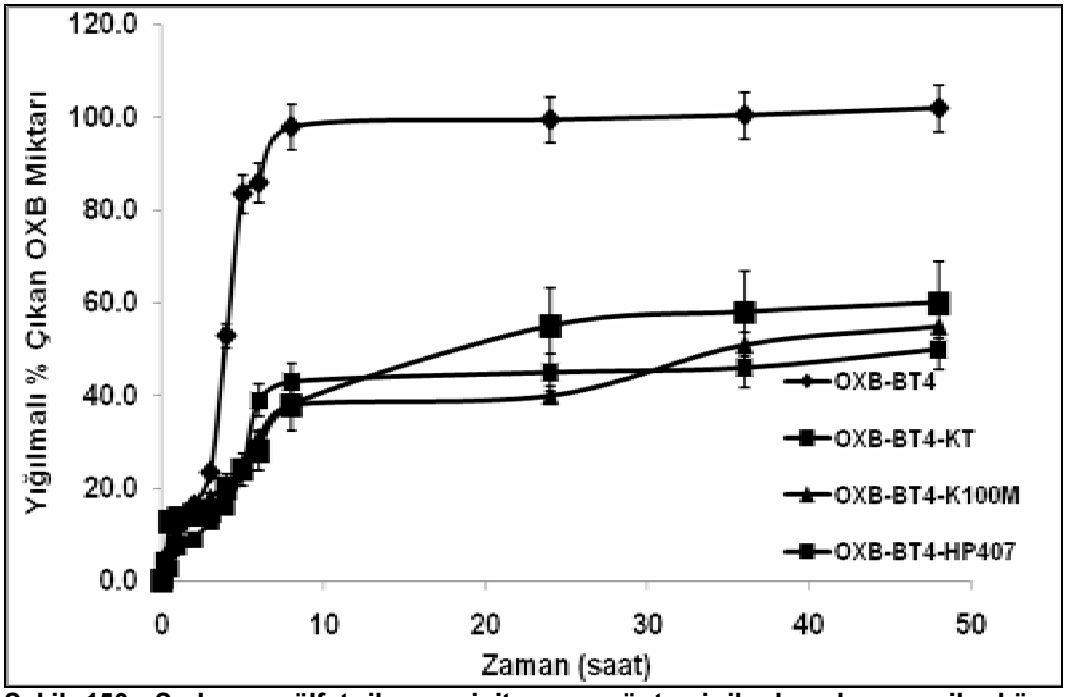
Mikroküre formülasyonlarında son olarak sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan OXB-BT grubu mikroküreler üzerinde çalışılmıştır. Bu mikrokürelerin süspansiyon halinde diyaliz membrandan geçiş profilleri Şekil 149'da gösterilmiştir. Mikrokürelere süspansiyonlarından salım 48 saatin sonunda OXB'in yaklaşık % 96-102 oranında salmışlardır. Bu nedenle işlem etkinliği en yüksek olan BT4 formülasyonu mikroküre-jel formülasyonlarında kullanılmak üzere şeçilmiştir.



Şekil 149. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

BT4 ile hazırlanan mikroküre jel formülasyonlarının içerikleri 29'da verilmiş ve diyaliz memrandan geçiş profilleri Şekil 150'de gösterilmiştir. Profiller, OXB-BT4 mikroküresininin süspansiyon halindeki salım profili ile karşılaştırılmıştır. Süspansiyon halinde etkin maddenin %100'ünü salan mikroküreler, jel içinde %60'ın altında salım yapmaktadır. Mikroküreler süapansiyon halinde vajinaya uygulanamayacağı için jel içinde taşınması sağlanmış ancak uygun etkin madde salımı elde edilememiştir. Buna göre en az salım yapan OXB-BT4-HP407 formülasyonu 48 saatin sonundaki

salım %50.0±3.6 olmuştur. En fazla salım yapan BT4-KT formülasyonu ise 48 saatin sonunda %60.3±4.1 oranında OXB salmıştır.



Şekil 150. Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan mikroküre-jellerden CV'nin diyaliz membrandan geçişi (n=6)

Mikroküre-jeller ile yapılan diyaliz membrandan geçiş çalışmalarının sonunda 48 saat süresince etkin maddenin tamamını salan bir formülasyon olmamıştır. Bu nedenle vajinal uygulanacak ve iki gün süre ile kontollü salım yapacak formülasyona ulaşılamamıştır.

5.3. Diyaliz Membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi

OXB içeren tüm formülasyonlara ait in vitro geçiş verilerinin kinetik değerlendirme sonuçları Tablo 86'da verilmektedir. Kinetik değerlendirme için sıfır derece, birinci derece ve Higuchi salım kinetik modelleri incelenmiştir.

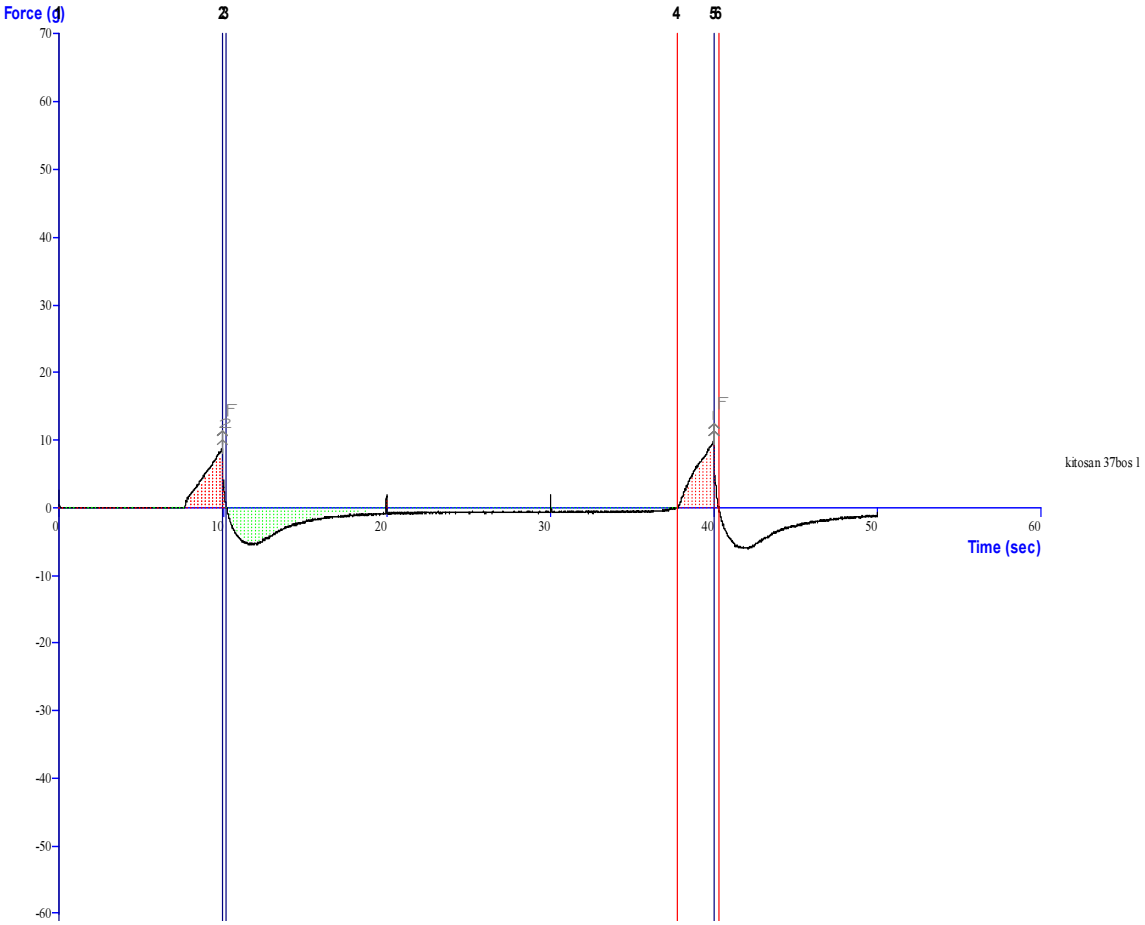
Tablo 86. Hazırlanan OXB içeren formülasyonların diyaliz membrandan geçiş verilerinin kinetik incelemesi.

JEL FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
0.Derece				1.Derece			Q√t (Higuchi)		
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
OXB-KITH1	1.44	0.477	25.8	0.019	0.364	0.416	12.9	0.695	19.2
OXB-KITH2	1.56	0.518	24.3	0.022	0.395	0.461	13.6	0.760	17.1
OXB-KITH3	1.48	0.508	23.4	0.023	0.348	0.525	12.9	0.747	16.8
OXB-KITM1	1.52	0.539	22.7	0.020	0.489	0.338	13.1	0.774	15.9
OXB-KITM2	1.57	0.581	21.5	0.022	0.502	0.358	13.3	0.812	14.4
OXB-KITM3	1.65	0.603	21.6	0.024	0.498	0.403	13.9	0.828	14.2
OXB-KITL1	1.41	0.422	26.7	0.018	0.353	0.407	12.8	0.671	20.1
OXB-KITL2	1.45	0.468	25.0	0.020	0.398	0.402	12.8	0.710	18.5
OXB-KITL3	1.75	0.561	24.9	0.031	0.368	0.673	14.9	0.792	17.2
OXB-HPMCK15M1	1.84	0.502	29.6	0.037	0.287	0.966	16.1	0.739	21.4
OXB-HPMCK15M2	1.81	0.617	23.1	0.014	0.379	0.737	15.2	0.836	15.1
OXB-HPMCK100M1	1.94	0.586	26.4	0.045	0.348	1.01	16.3	0.801	18.3
OXB-HPMCK100M2	1.51	0.549	22.1	0.033	0.285	0.876	12.9	0.769	15.8
OXB-P407	2.35	0.840	16.5	0.058	0.623	0.751	17.7	0.929	11.0
OXB-MP407	2.24	0.860	14.6	0.056	0.622	0.718	16.8	0.938	9.72
OXB-HP407	2.22	0.857	14.7	0.057	0.641	0.712	16.8	0.948	8.86
LİPOZOM FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
OXB-F2	1.67	0.592	22.4	0.030	0.362	0.671	14.0	0.810	15.3
OXB-P2	1.47	0.452	26.2	0.022	0.331	0.520	13.2	0.698	19.4
OXB-FS1	1.53	0.597	20.4	0.033	0.368	0.723	12.9	0.814	13.9
OXB-FS2	1.47	0.666	16.8	0.035	0.399	0.711	12.0	0.862	10.8
OXB-PS1	1.47	0.490	24.2	0.024	0.323	0.577	12.8	0.727	17.7
OXB-PS2	1.46	0.503	23.4	0.026	0.322	0.632	12.6	0.735	17.1
OXB-FS2-K100M	0.72	0.850	4.88	0.105	0.647	1.29	4.81	0.734	6.51
OXB-FS2-KITH3	0.823	0.851	5.56	0.083	0.620	1.08	5.59	0.761	7.04
OXB-FS2-P407	0.795	0.838	5.65	0.085	0.681	0.959	5.34	0.730	7.29
OXB-PS2-K100M	0.907	0.694	9.73	0.026	0.561	0.388	7.40	0.893	5.75
OXB-PS2-KITH3	0.910	0.584	12.4	0.021	0.517	0.340	7.70	0.810	8.39
OXB-PS2-P407	0.972	0.631	12.0	0.022	0.528	0.351	8.09	0.847	7.74
MİKROKÜRE FORMÜLASYONLARINA AİT GEÇİŞ KİNETİKLERİ									
Form.No	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
OXB-T1	1.14	0.828	3.46	0.046	0.765	0.421	7.94	0.978	2.66
OXB-T1K100M	1.74	0.907	5.67	0.048	0.693	0.528	2.44	0.997	0.312
OXB-T1-KT	1.59	0.803	5.83	0.037	0.464	0.654	5.39	0.893	4.20
OXB-T1-HP407	1.69	0.785	5.65	0.038	0.424	0.726	1.79	0.885	1.45
OXB-K1	1.20	0.911	8.48	0.039	0.736	0.383	8.30	0.981	2.58
OXB-K1-K100M	1.41	0.710	8.45	0.046	0.407	0.923	2.01	0.830	2.05
OXB-K1-KT	1.16	0.899	5.82	0.048	0.658	0.569	5.46	0.979	1.82
OXB-K1-HP407	1.55	0.607	6.76	0.044	0.380	0.932	1.55	0.797	1.76
OXB-AS1	1.35	0.853	9.03	0.038	0.612	0.496	10.4	0.976	3.66
OXB-AS2	1.26	0.767	11.0	0.037	0.479	0.638	9.61	0.897	7.30
OXB-AS3	1.24	0.803	9.94	0.037	0.538	0.562	9.67	0.944	5.29
OXB-AS4	1.38	0.803	11.1	0.039	0.522	0.618	10.7	0.940	6.11
OXB-AS7	0.83	0.813	6.44	0.039	0.521	0.623	6.45	0.948	3.39
OXB-AS8	0.88	0.827	6.50	0.042	0.528	0.655	6.88	0.951	3.47
OXB-AS4-KT	1.21	0.859	7.92	0.038	0.558	0.564	9.26	0.971	3.61
OXB-AS4-K100M	1.16	0.756	10.60	0.036	0.509	0.590	9.19	0.925	5.90

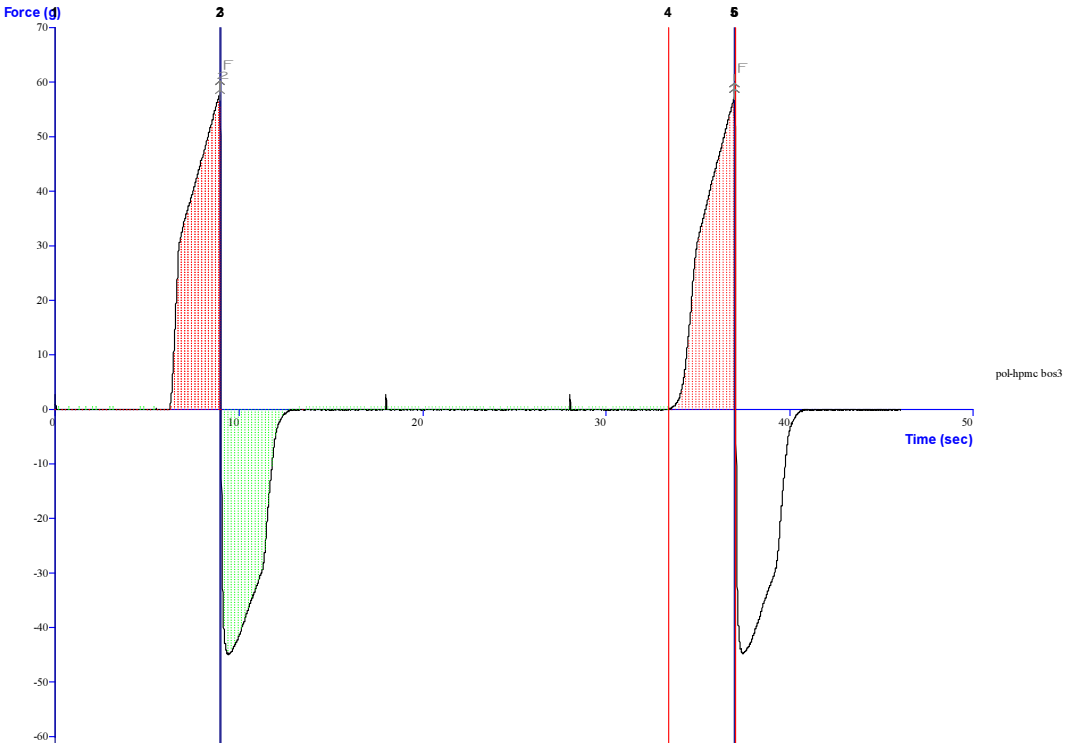
OXB-AS4-HP407	0.93	0.750	8.71	0.038	0.452	0.702	7.43	0.921	4.90
OXB-BT1	1.69	0.605	22.1	0.032	0.401	0.642	14.1	0.822	14.8
OXB-BT2	1.67	0.578	23.0	0.039	0.301	0.979	14.1	0.799	15.9
OXB-BT3	1.74	0.618	22.0	0.031	0.404	0.625	14.5	0.835	14.5
OXB-BT4	1.07	0.654	24.1	0.048	0.365	1.04	17.0	0.715	24.1
OXB-BT7	1.35	0.635	22.1	0.023	0.318	0.560	13.5	0.696	20.1
OXB-BT8	1.92	0.595	23.9	0.020	0.264	0.540	12.9	0.615	22.9
OXB-BT4-KT	1.44	0.902	20.5	0.039	0.575	0.558	9.24	0.952	4.63
OXB-BT4-K100M	1.34	0.887	18.8	0.035	0.564	0.514	7.83	0.931	4.78
OXB-BT4-HP407	1.83	0.753	19.2	0.056	0.302	1.40	8.06	0.812	8.71

5.4. OXB-Jellerin Texture Profil Analizi'ne (TPA) Ait Bulgular

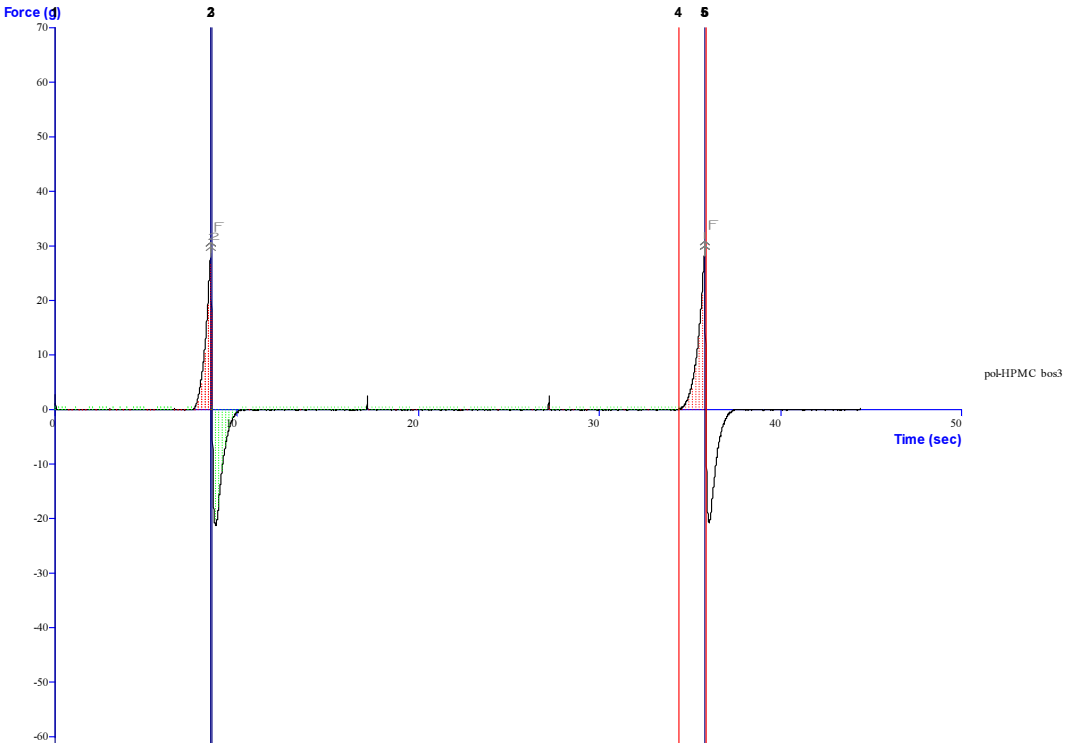
Bölüm 3.2.12'de anlatıldığı gibi yapılan TPA testleri sonucunda jellerin sertlik, sıkışabilirlik, elastiklik, adezyon ve kohezyon özellikleri, Tablo 30'da belirtilen jeller için, TPA grafiklerinden belirlendi (Şekil 151-153). Ayrıca jellerin, lipojellerin ve mikroküre içeren jellerin mekanik özellikleri hesaplandı ve Tablo 87'de ifade edildi.



Şekil 151. OXB-KT jel formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 152. OXB-HPMC jel formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 153. OXB-HPMC-POL jel formülasyonuna ait TPA grafiği

Tablo 87. Hazırlanan biyoadezif jel, lipojel ve mikroküre içeren jel formülasyonlarının mekanik özellikleri (n=6)

Formülasyon	Sertlik (N)	Sıkışabilirlik (N.mm)	Adeziflik (N.mm)	Koheziflik	Elastikiyet
		JEL FORMÜLASYONLARI			
OXB-KT	0.077±0.006	0.602±0.049	0.158±0.029	0.784±0.049	0.703±0.028
OXB-HP407	0.349±0.038	1.294±0.287	0.385±0.092	0.819±0.129	0.717±0.016
OXB-K100M	0.849±0.119	2.956±0.573	1.487±0.473	0.955±0.092	0.826±0.011
		LİPOJEL FORMÜLASYONLARI			
OXB-FS2-KT	0.115±0.022	1.047±0.038	0.093±0.019	0.629±0.072	0.655±0.082
OXB-FS2-K100M	0.862±0.041	3.371±0.048	1.187±0.016	0.715±0.051	0.862±0.048
OXB-FS2-HP407	0.491±0.058	1.593±0.028	0.128±0.062	0.481±0.064	0.629±0.081
OXB-PS2-KT	0.202±0.077	1.176±0.071	0.189±0.028	0.619±0.026	0.665±0.075
OXB-PS2-K100M	0.892±0.069	2.291±0.057	1.726±0.071	0.893±0.067	0.908±0.085
OXB-PS2-HP407	0.537±0.247	1.079±0.078	0.228±0.063	0.618±0.073	0.684±0.034
		MİKROKÜRE-JEL FORMÜLASYONLARI			
OXB-T1-KT	0.280±0.038	1.304±0.074	0.044±0.038	0.439±0.084	0.487±0.075
OXB-T1-K100M	0.984±0.025	3.628±0.027	0.538±0.028	0.749±0.059	0.648±0.029
OXB-T1-HP407	0.599±0.241	1.045±0.065	0.209±0.029	0.591±0.083	0.639±0.059
OXB-K1-KT	0.301±0.038	1.146±0.044	0.059±0.058	0.429±0.082	0.498±0.049
OXB-K1-K100M	1.273±0.064	3.164±0.072	0.782±0.024	0.839±0.062	0.749±0.066
OXB-T1-HP407	0.520±0.241	1.043±0.037	0.211±0.054	0.542±0.093	0.654±0.059
OXB-AS4-KT	0.106±0.076	0.659±0.028	0.128±0.098	0.702±0.073	0.659±0.035
OXB-AS4-K100M	0.827±0.082	2.385±0.039	1.926±0.049	0.759±0.081	0.904±0.073
OXB-AS4-HP407	0.479±0.069	1.349±0.024	0.128±0.076	0.487±0.063	0.605±0.051
OXB-BT4-KT	0.097±0.044	0.584±0.083	0.149±0.038	0.638±0.059	0.659±0.062
OXB-BT4-K100M	0.905±0.076	2.739±0.029	1.973±0.074	0.885±0.076	0.829±0.049
OXB-BT4-HP407	0.498±0.063	1.028±0.043	0.176±0.069	0.589±0.017	0.618±0.092

Sertlik ve sıkışabilirlik değerleri, jele etkin madde ilavesi, lipozom ilavesi veya mikroküre ilavesi ile, boş jellere göre belirgin bir şekilde artmıştır (t-test, $p<0.05$). Ancak diğer değerlerin (adeziflik, koheziflik ve elastikiyet) jele ilave edilen etkin madde, lipozom veya mikroküreden sonra azaldığı görülmektedir.

Lipojellerin değerlendirmesi de boş jellere göre yapıldığında yine adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerlerindeki düşüş anlamlıdır (t-test, $p<0.05$). Ancak jellere katı halde ilave edilen OXB-FS2 lipozomları ile hazırlanan lipojellerin değerleri, jellere süspansiyon halinde ilave edilen ve

daha küçük partikül boyutuna sahip olan OXB-PS2 lipozomları ile hazırlanan lipojellerden daha düşüktür (t-test, $p<0.05$).

Aynı değerlendirme mikroküreler için de yapılabilir. OXB-T1 grubu ve OXB-K1 grubu mikroküreler jellere katı halde ilave edildikleri için ve partikül büyüklükleri diğer mikroküre gruplarından büyük olduğu için boş jellere göre ve OXB-AS4, OXB-BT4 mikroküreleri ilave edilen jellere göre daha düşük adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri göstermişlerdir (t-test, $p<0.05$).

OXB-AS4 ve OXB-BT4 grubu mikroküreler nm boyutundadır ve jellere süspansiyon şeklinde ilave edilmişlerdir. Bu nedenle OXB-T1 ve OXB-K1 grubu mikroküre içeren jellere göre adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri anlamlı şekilde daha yüksektir (t-test, $p<0.05$). Bu grup mikroküre-jeller boş jeller ile kıyaslandığında ise anlamlı şekilde daha düşük adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri göstermişlerdir (t-test, $p<0.05$).

Mukoadezyon özelliğinin değerlendirilmesinde adezyon, kohezyon kuvvetleri ile elastikiyetin büyük olması beklenir. Büyük oldukları durumlarda formülasyonun vajinada kalış süresi uzar. Bu açıdan değerlendirdiğimizde üzerinde çalıştığımız ilaç şekillerinden (jel, lipojel ve mikroküre-jel) jellerin diğerlerinden daha yüksek adezyon, kohezyon ve elastikiyet değeri gösterdiği bulunmuştur (t-test, $p<0.05$).

Jeller kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise, HPMC jelin adezyon, kohezyon ve elastikiyeti diğer jellerden anlamlı bir şekilde fazladır (t-test, $p<0.05$). Hazırladığımız jelleri mekanik özellikleri en iyi olandan kötüye doğru sıralarsak HPMC>HPMC-POL>KT şeklinde olduğunu görüyoruz. Bu durumda mekanik özellikleri açısından en düşük formülasyon kitosan jel formülasyonudur.

5.5. Vajinal Biyoadezif Formülasyonlarda Mukoadezyon Çalışmalarına Ait Bulgular

5.5.1. OXB Etkin Maddesi İçeren Biyoadezif Vajinal Formülasyonların Mukoadezyon Testleri

Bölüm 3.2.13'de anlatılan koşullarda yapılan deneylerde öncelikle OXB içeren jellerin mukoadezyon özellikleri belirlendi. OXB içeren jeller üzerinde yapılan ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 88'de verilmiştir. Çalışmamızda lipojellerin ve mikroküre içeren jellerin de mukoadezyon özellikleri belirlenmiştir (Tablo 88).

Tablo 88. OXB içeren jellerin, lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon ölçümünün sonuçları

Formülasyon	Kuvvet (N)	İş (N.mm)	Mukoadezyon İşi (mj/cm^2)
		JEL FORMÜLASYONLARI	
OXB-KITH3	0.194±0.028	0.436±0.074	0.330±0.022
OXB-K100M2	0.355±0.021	0.799±0.029	0.605±0.036
OXB- HP407	0.218±0.002	0.490±0.010	0.371±0.008
		LİPOJEL FORMÜLASYONLARI	
OXB-FS2-KITH3	0.163±0.034	0.367±0.053	0.287±0.065
OXB-FS2-K100M2	0.328±0.047	0.738±0.085	0.559±0.027
OXB-FS2-HP407	0.187±0.082	0.421±0.069	0.318±0.068
OXB-PS2-KITH3	0.148±0.038	0.334±0.083	0.253±0.034
OXB-PS2-K100M2	0.309±0.014	0.695±0.025	0.526±0.044
OXB-PS2-HP407	0.173±0.065	0.389±0.041	0.294±0.065
		MİKROKÜRE-JEL FORMÜLASYONLARI	
OXB-T1-KITH3	0.143±0.046	0.321±0.054	0.243±0.062
OXB-T1-K100M2	0.307±0.018	0.690±0.081	0.523±0.041
OXB-T1-HP407	0.156±0.042	0.351±0.045	0.265±0.034
OXB-K1-KITH3	0.132±0.028	0.297±0.038	0.225±0.049
OXB-K1-K100M2	0.295±0.039	0.663±0.023	0.502±0.082
OXB-K1-HP407	0.131±0.073	0.294±0.049	0.222±0.048
OXB-AS4-KITH3	0.118±0.028	0.266±0.036	0.201±0.012
OXB-AS4-K100M2	0.245±0.054	0.551±0.048	0.417±0.037
OXB-AS4-HP407	0.121±0.062	0.272±0.041	0.206±0.044
OXB-BT4-KITH3	0.128±0.037	0.288±0.054	0.218±0.028
OXB-BT4-K100M2	0.274±0.069	0.617±0.042	0.467±0.039
OXB-BT4-HP407	0.145±0.016	0.326±0.027	0.246±0.058

OXB içeren jellerin mukoadezyon özellikleri değerlendirilirken özellikle mukoadezyon işi değeri dikkate alınmaktadır. Buna göre en yüksek mukoadezyon işini OXB-K100M formülasyonu yapmıştır. Mukoadezyon işini yüksekten düşüğe göre sıralarsak OXB-K100M>OXB-HP407>OXB-KT sıralaması çıkmaktadır.

İn vivo çalışmalarda kullanılacak olan sonuç formülasyonun belirlenmesinde bu önemli bir kriterdir. OXB-K100M jelin salım profilide de amaca uygun bulunduğu için sonuç formülasyon olmasına karar verilmiştir.

Lipojellerin ve mikroküre-jellerin mukoadezyon özellikleri değerlendirildiğinde ise jellere göre değerlerin düştüğünü görmekteyiz. Ancak OXB-K100M>OXB-HP407>OXB-KT sıralaması lipojel ve mikroküre-jeller için de geçerlidir.

5.6. Oksibütinin İle Yapılan İn Vivo Çalışmalar Ait Bulgular

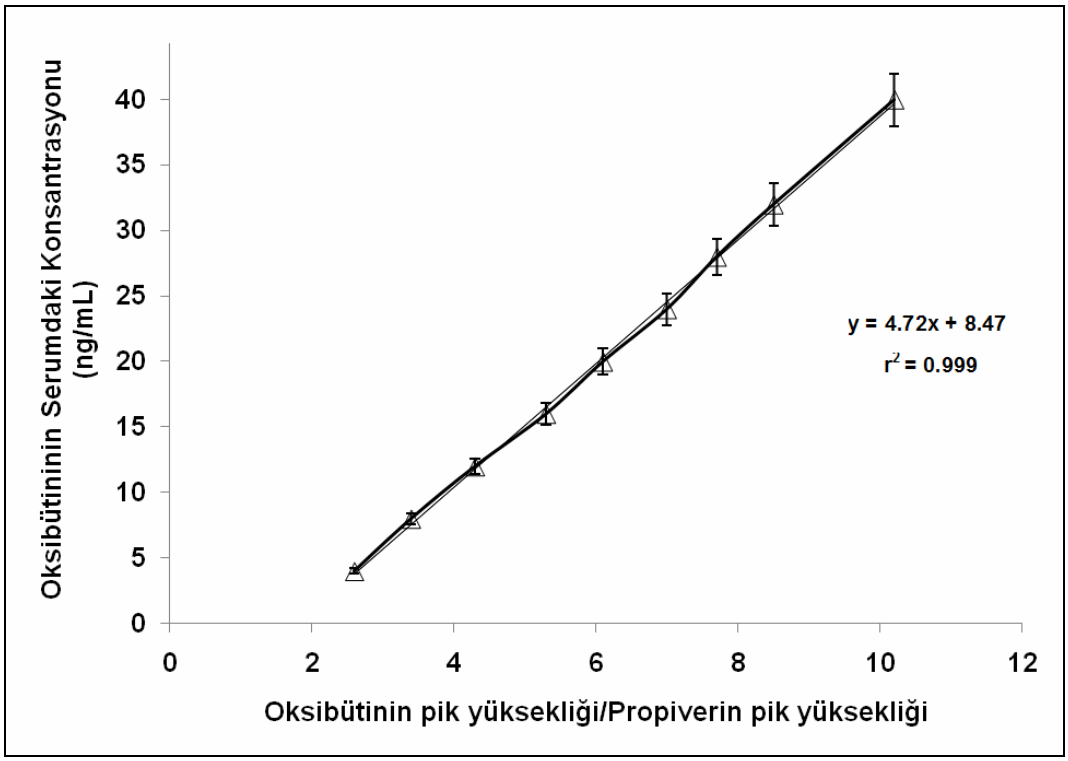
5.6.1. Oksibütininin Tavşan Serumundan HPLC Yöntemi ile Analizine Ait Bulgular

5.6.1.1. Örnek Hazırlamaya Ait Bulgular

Tavşanlardan alınan kan örnekleri Bölüm 5.2.1.1'de anlatıldığı bigi hazırlandı. Kullanılan mobil faza ve etkin maddenin alıkonma zamanına en uygun madde olarak Propiverine HCl (PVP) bulundu. Bu maddenin piki etkin maddenin piki ile karışmamakta ve iyi bir şekilde ayrılmaktadır (Şekil 24)

5.6.1.2. HPLC Yöntemi Kullanılarak Oksibütininin Serumdaki Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

OXB'nin tavşan kan serumundaki kalibrasyonu Bölüm 5.2.1.2'deki gibi yapıldı. Kalibrasyon grafiği Şekil 154'de gösterilmiştir.



Şekil 154. OXB'nin tavşan serumundan analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği

5.6.1.3. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Miktar Tayini İçin Yöntem Validasyonu

5.6.1.3.1. Doğruluk (accuracy) ve Geri Elde (recovery)

Bölüm 5.1.1.5.3.1.'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 89'da gösterildi. Amerikan Farmakopesi (USP XXVII) esas alınarak validasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. OXB'nin tavşan serumunda miktar tayini validasyonu için yaptığımız çalışmalarda, doğruluk için hesaplanan tüm % bağıl sapma sonuçları % 2'in altındadır (Tablo 89).

Tablo 89. Oksibütininin tavşan serumunda ekstraksiyon işlemi uygulanarak yapılan analizine ait doğruluk test sonuçları

Hazırlanan konsantrasyon (ng/mL)	Geri elde edilen miktar (ng/mL) ve %'si	% Bağıl Sapma
16	16.2±1.0 - %101	1.25
20	20.2±0.7 - %101	1.00
24	24.0±0.4 - %100	0.0833

5.6.1.3.2. Kesinlik

Deneyiçi Kesinlik: Hesaplanan bağıl sapmanın % 2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir (Tablo 90).

Tablo 90. OXB'nin tavşan serumunda ekstraksiyon işleminden sonra deneyiçi kesinlik sonuçları

ÖRNEK NO	OXB'nin Tavşan serumundaki Derişimi (ng/mL)	OXB'nin Hesapla Bulunan Değeri
1	28	27.8
2	28	28.0
3	28	28.3
4	28	28.6
5	28	28.5
6	28	28.3
7	28	28.0
8	28	28.8
9	28	28.04
10	28	28.8
Ortalama		**27.9**
Standart sapma		**0.4**
Bağıl Sapma		**1.34**
±Güven Sınırı		**0.5**

Deneylerarası Kesinlik: Bölüm 6.1.5.3.2'de anlatılan çalışmanın sonuçları Tablo 91'de verilmiştir. Bağıl sapma %2'nin altındadır. Yöntemin günden güne farklı sonuçlar vermediği anlaşıldı.

Tablo 91. OXB'nin tavşan serumunda ekstraksiyon işleminden sonra deneylerarası kesinlik sonuçları

Konsantrasyon (ng/mL)	1. GÜN	2. GÜN	3. GÜN
28	28.04	27.8	28.04
28	27.8	28.04	28.04
28	28.04	27.8	28.3
Ortalama	**28.0**	**27.86**	**28.1**
Standart sapma	**0.2**	**0.2**	**0.2**
Bağıl Sapma	**0.537**	**0.539**	**0.534**
±Güven Sınırı	**0.4**	**0.4**	**0.4**

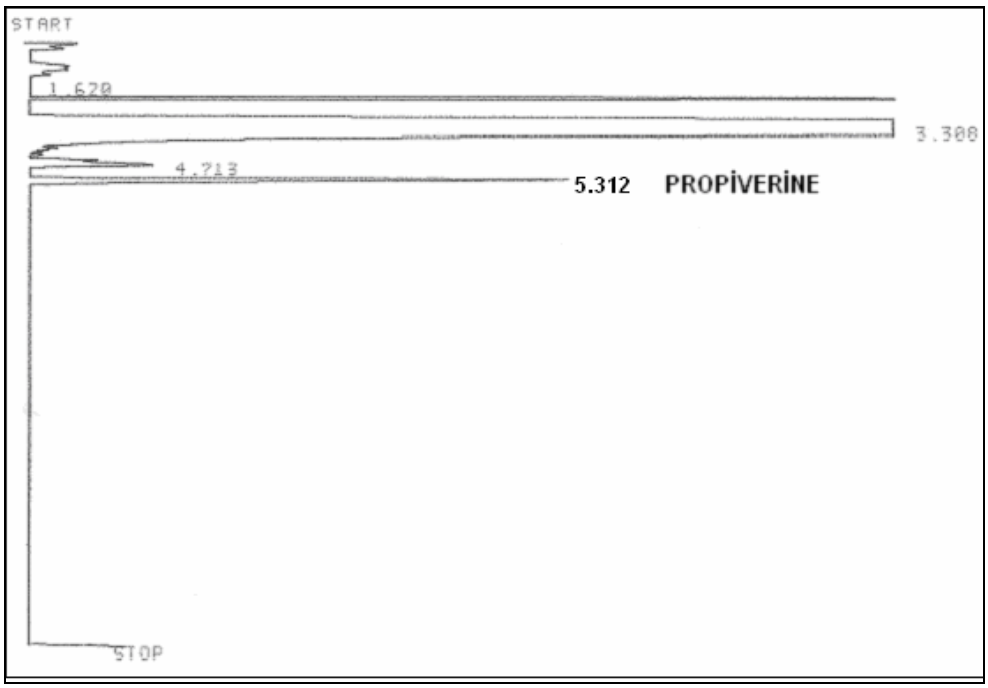
Analizler her gün HPLC yöntemi, şartları ve kolonu test etmek için günlük kalibrasyon testleri kontrolü yapıldı ve kalibrasyonun geçerli olduğu saptandı.

5.6.1.3.3. Doğrusallık

Yöntemin doğrusal olduğu regresyon denkleminin doğrusallığından hesaplandı (0.9989) ve kanıtlandı (Şekil 154).

5.6.1.3.4. Özgünlük, Seçicilik

OXB içermeyen tavşan serumunun ekstraksiyonu yapıldı ve HPLC kromotogramı incelendiğinde OXB piki görülmedi ve yöntemin özgün olduğu kanıtlandı (Şekil 155).



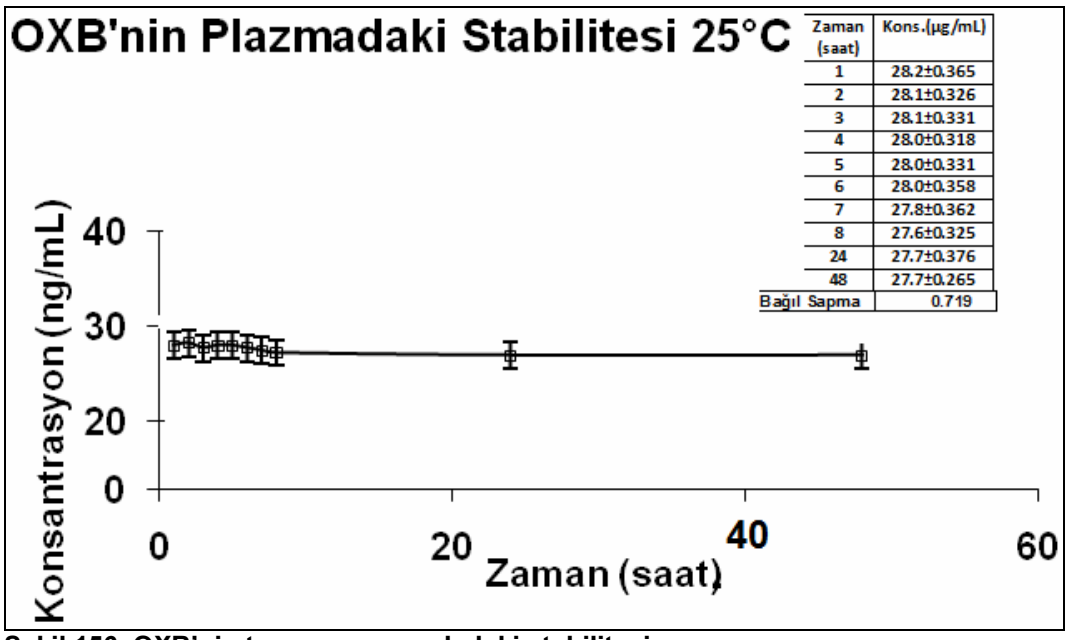
Şekil 155. Ektraksiyon işleminden sonra tavşan serumunun kromotogramı

5.6.1.3.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Bölüm 5.2.1.3.5'de açıklandığı şekilde hazırlanan 4 ve 2 ng/mL'lik örneklerin analizi sonucu 4 ng/mL'lik örneğin bağıl sapması %8, geri eldesi %83±4, 2 ng/mL'lik örneğin bağıl sapması %23, geri eldesi %77±13 olarak bulundu. Duyarlılık sınırı 4 ng/mL olarak kabul edildi. HPLC kromatogramları incelenerek sinyal/gürültü oranı 3:1 olarak ve analitik yöntemin saptama sınırı 2 ng/mL olarak kabul edildi.

5.6.1.3.6. Stabilite

Deney şartlarında oksibütininin stabilitesini incelemek amacı ile 28 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan örneklerin 48 saat boyunca belli zamanlarda 235 nm de HPLC'deki pik yükseklikleri elde edildi. Sonuçlar Şekil 156'daki grafiklerde gösterildi.



Şekil 156. OXB'nin taşan serumundadaki stabilitesi

Kırksekiz saatin sonunda geri kazanım %99.7 olarak ve bağıl sapması da %1.53 olarak bulunduğu için analiz süresi boyunca örneklerin stabil olduğu kanıtlanmıştır.

5.6.2. Tavşanlara Üropan Tablet ve Vajinal Jel Uygulaması

İn vivo çalışmalarda uygulanacak sonuç formülasyon seçilirken, Oksibütinin ile yapılan formülasyon çalışmaları değerlendirilmiş ve şu sonuçlar ortaya çıkmıştır:

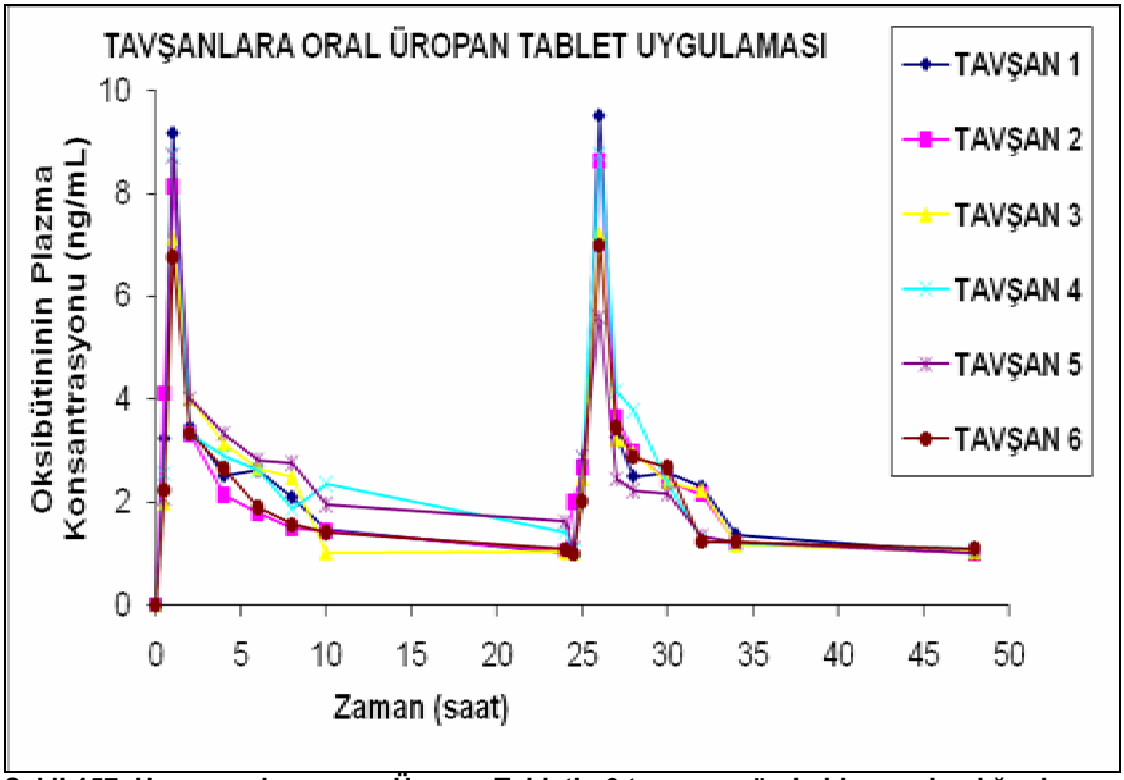
- ✓ Carbopol ile OXB içeren formülasyonlar geçimsizlik nedeniyle hazırlanamamıştır.
- ✓ Jel formülasyonlarının Franz difüzyon hücrelerinden salım çalışmaları değerlendirildiğinde 48 saat boyunca kontrollü salım sağlayan formülasyonun OXB-K100M2 formülasyonu olduğu bulunmuş ve in vivo çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmiştir.
- ✓ Ayrıca bu bulguyu dokudan geçiş çalışmalarımızda desteklemektedir. Tavşan vajinal dokusundan geçişi incelenen OXB-K100M formülasyonundan 48 saat süresince etkin maddenin kontrollü geçiş yaptığı bulundu.

- ✓ Biyoyararlanım çalışmasında OXB-K100M2 formülasyonu ile karşılaştırılmak üzere OXB-KTH3 formülasyonu seçilmiştir. Bunun nedeni OXB-KTH3 formülasyonunun in vitro salım yüzdesi ve etkin madde dokudan geçiş oranı OXB-K100M2 formülasyonundan daha fazla olmasıdır.
- ✓ Lipojel ve mikroküre-jel formülasyonları 48 saatin sonunda etkin maddenin tamamını salamadıkları için in vivo çalışmalar için uygun bulunmamışlardı.
- ✓ OXB-K100M2 formülasyonunun mekanik özelliklerinin en iyi ve mukoadezyon özelliğinin en fazla bulunması nedeniyle in vivo çalışmalarda uygulanmasına karar verilmiştir. Ayrıca OXB-KITH formülasyonunun mekanik özellikleri ve mukozadezyon gücü daha zayıf olduğu için bu durumun in vivo çalışmaya nasıl yansıyacağını anlamak için OXB-KITH3 formülasyonu ile karşılaştırmalı çalışma yapılmıştır.
- ✓ Lipojel ve mikroküre-jel formülasyonlarının mekanik özellikleri jellere göre daha zayıfdır ve mukoadezyon özellikleri de daha düşüktür. Bu nedenle in vivo uygulamalar için uygun bulunmamışlardır.
- ✓ İn vivo çalışmalarda OXB'in pH 4.5 fosfat tamponundaki çözeltisi de uygulanmıştır. Bu uygulamanın nedeni biyoyararlanımlarının karşılaştırılması ve OXB'nin vajina epiteli ile direkt temasında nasıl bir cevap oluşturacağının bilinmesininin istenmesidir.

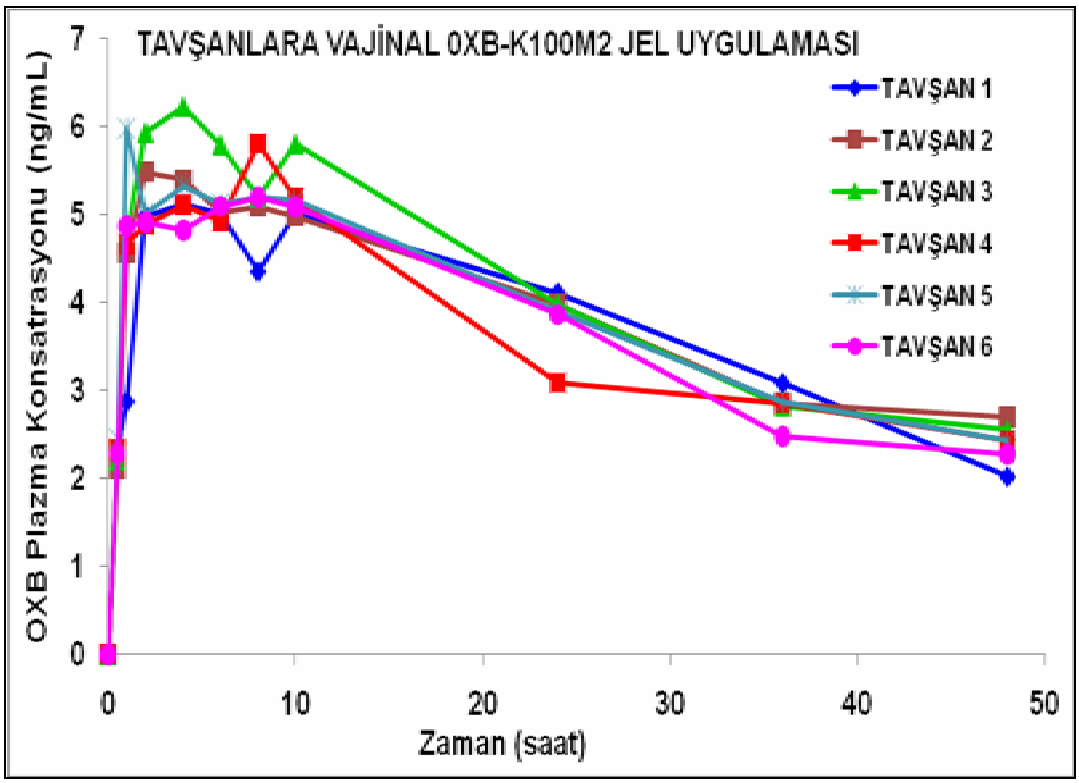
Üropan tablet, biyoadezif kontrollü salım yapan vajinal jeller ve OXB çözeltisinin iki günlük tedavileri sonucunda tavşanlarda oluşturdukları kan konsantrasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmada eğri altında kalan alanı (AUC) hesaplamak için Trapez (Doğrusal AUC) Yöntemi[224] Kullanılmış ve NCOMP programı ile hesaplanan AUC ile karşılaştırılmıştır. Trapez yönteminde plazma profilini oluşturan noktalar, koordinatları ile beraber grafiğe geçirildi ve her noktadan $[P_n(t_n,C_n)]$, x eksenine birer izdüşüm çizildi.

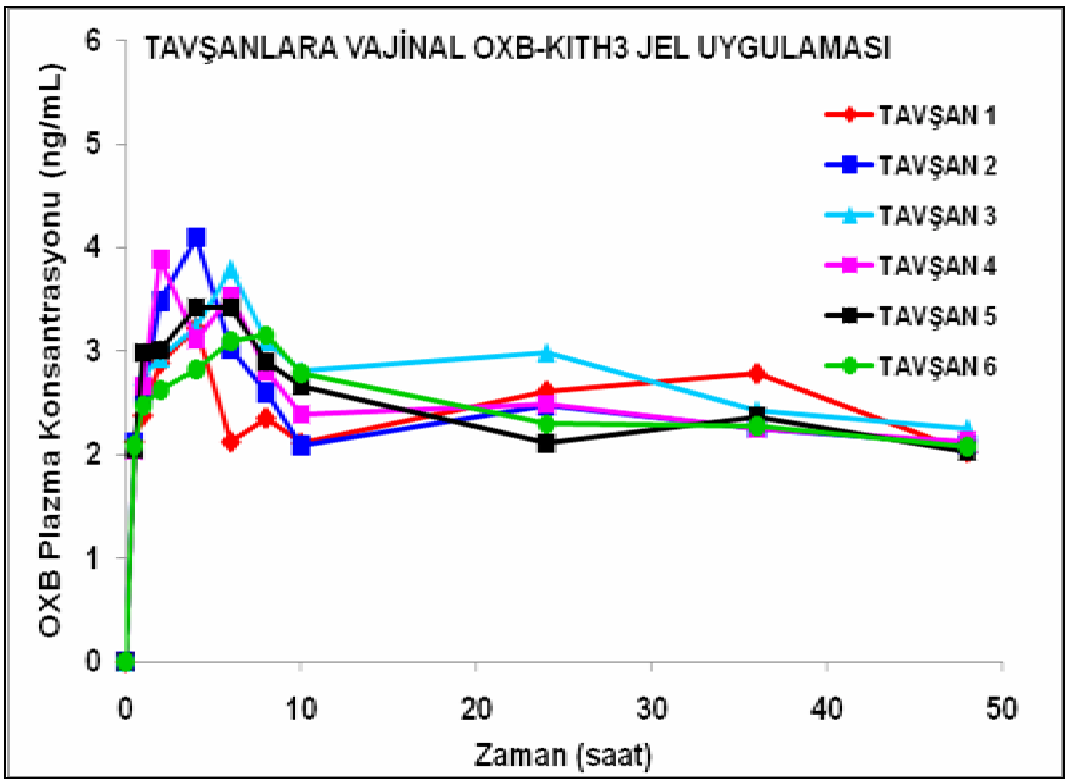
Böylece eğri altında kalan alan bir dizi yamuğa (Trapeze dönüşür. Trapezlerin alanları ayrı ayrı hesaplanıp toplandığında toplam AUC bulunmuş olur. Üropan tabletin 48 saat süresince 24 saatte bir olmak üzere iki defa oral olarak uygulandığı 6 adet tavşandan elde edilen kan konsantrasyon eğrileri Şekil 157'de gösterilmiştir. OXB-K100M2 ve OXB-KITH3 jeller ile OXB çözeltisinin tavşanlara vajinal uygulaması sonucu oluşan kan konsantrasyon eğrileri ise Şekil 158-160'de verilmiştir.



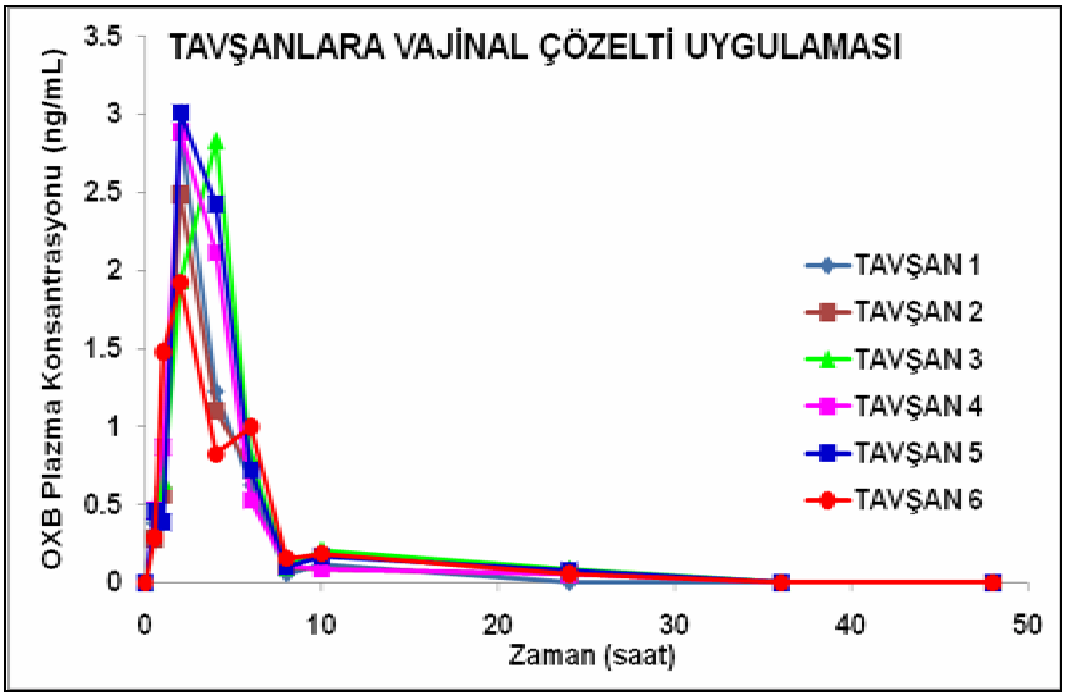
Şekil 157. Hemen salım yapan Üropan Tabletin 6 tavşana günde bir uygulandığında elde edilen kan profili



Şekil 158. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-K100M2 jelin 6 tavşana uygulanmasıyla elde edilen kan profili

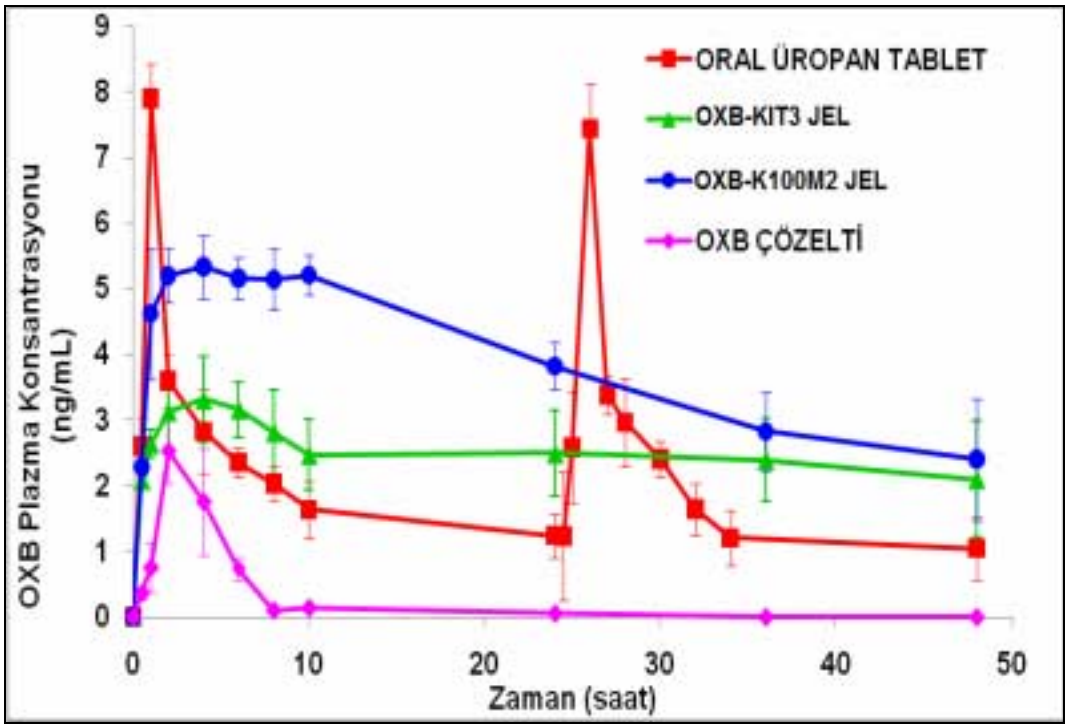


Şekil 159. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-KTH3 jelin 6 tavşana uygulanmasıyla elde edilen kan profili



Şekil 160. Vajinal uygulanan OXB çözeltisinin 6 tavşana uygulanmasıyla elde edilen kan profili

Şekil 161'de ise dört farklı formülasyonun uygulanması sonucunda oluşan kan konsantrasyonları birlikte gösterilmiştir.



Şekil 161. Vajinal uygulanan biyoadezif OXB-K100M2 jel, OXB-KTH3 jel, OXB çözelti ve oral üropan tabletin 6 tavşanda ortalama kan profili

Şekil 157, 158, 159 ve 160'da gösterilen eğrilerin altında kalan alanlar aşağıdaki denklem kullanılarak trapez yöntemi ile hesaplandı. Her bir trapezin alanı denklem olarak gösterildi ve toplandı.

$$AUC_{0\to\infty} = \sum_{i=1}^{n} 0.5*(t_n - t_{n-1})*(C_n + C_{n-1})$$

Bu trapezlerin alanları teker teker hesaplanıp toplandığında, son deneysel noktaya kadar olan toplam alan ($AUC_{0\to n}$) hesaplanmış olur. Halbuki biyoyararlanım saptanmasında sıfırdan sonsuza olan alan gereklidir ($AUC_{0\to\infty}$). Bunu bulabilmek için, plazma profilini tanımlayan denklemin n'den sonsuza integrali alındı.

$$AUC_{n\to\infty} = \int_{n}^{\infty} C.dt = \frac{C_n}{\lambda_1} = \frac{C_n}{k_d}$$

Diğer bir deyişle, en son deneysel noktanın derişimi uzaklaşma hız değişmezine bölünerek alan elde edildi. Bu durumda toplam alan aşağıdaki gibi oldu.

$$AUC_{0\to\infty} = AUC_{0\to n} + AUC_{n\to\infty}$$

Yukarıda sözü edilen bu en son nokta(C_n) düşük bir derişim olup, burada analiz hataları daha yüksek olma eğilimindedir, bundan dolayı, bağıl olarak daha fazla hata içeren bu noktadan giderek, nisbeten hatalı bir AUC yerine, biraz daha güvenilir bir değer hesaplamak daha doğru olacaktır. Bunun için hesapta, C_n yerine $\hat{C}_n$ (C_nşapka) kullanılmıştır.

$$AUC_{0\to\infty} = AUC_{0\to n} + \frac{\hat{C}_n}{k_d}$$ Hesaplarımızda bu formülü kullandık.

Sonuçlar yukarıdaki formüle göre hesaplandıktan sonra vajinal salım yapan jel formülasyonunun hemen salım yapan tablete göre bağıl biyoyararlanımı bulundu ve Tablo 92'de sonuçlar verildi.

NCOMP ile AUC hesaplanırken önce 0. satten 24. saate kadar hesaplandı, sonda 24-48 saatler arası hesaplandı ve toplamları alınarak AUC bulundu.

Tablo 92. OXB'nin Üropan tablet ve HPMC vajinal jel uygulamaları sonucunda bulunan AUC, Cmax ve tmax değerleri.

Uygulama Şekli	AUC Trapez (ng/mL.dak)	AUC NCOMP (ng/mL.dak) (0-24 + 0-48)	Cmax (ng/mL) 0-24 / 24-28	Tmax (saat) 0-24 / 24-28
Oral Üropan Tablet 1	93.8	95.3	9.18 / 9.52	1.00 / 26.0
Oral Üropan Tablet 2	87.3	90.4	8.13/8.63	1.00 / 26.0
Oral Üropan Tablet 3	87.6	91.1	7.13/7.23	1.00 / 26.0
Oral Üropan Tablet 4	95.4	97.3	8.76 / 8.77	1.00 / 26.0
Oral Üropan Tablet 5	96.8	98.4	8.73 / 5.60	1.00 / 26.0
Oral Üropan Tablet 6	99.2	95.6	6.77 / 5.00	1.00 / 26.0
Üropan Tablet Ortalama	**93.4±4.9**	**95.6 + 5.9**	**8.12 / 7.46**	**1.00 / 26.0**
Uygulama Şekli	**AUC Trapez (ng/mL.dak)**	**AUC NCOMP (ng/mL.dak)**	**Cmax (ng/mL)**	**Tmax (saat)**
Vajinal OXB-K100M2 Jel 1	167.6	171.2	5.12	4.0
Vajinal OXB-K100M2 Jel 2	169.7	175.4	5.39	4.0
Vajinal OXB-K100M2 Jel 3	174.3	180.9	6.23	4.0
Vajinal OXB-K100M2 Jel 4	166.5	173.8	5.81	8.0
Vajinal OXB-K100M2 Jel 5	160.3	167.9	5.32	8.0
Vajinal OXB-K100M2 Jel 6	167.4	172.5	5.21	8.0
Vajinal OXB Jel Ortalama	**167.6±4.5**	**173.6 ±6.2**	**5.51**	**6**
Uygulama Şekli	**AUC Trapez (ng/mL.dak)**	**AUC NCOMP (ng/mL.dak)**	**Cmax (ng/mL)**	**Tmax (saat)**
Vajinal OXB-KTH3 Jel 1	115.2	121.2	3.22	4.0
Vajinal OXB-KTH3 Jel 2	105.9	112.5	4.09	4.0
Vajinal OXB-KTH3 Jel 3	112.1	111.7	3.79	6.0
Vajinal OXB-KTH3 Jel 4	120.2	125.3	3.52	6.0
Vajinal OXB-KTH3 Jel 5	106.4	112.6	3.42	6.0
Vajinal OXB-KTH3 Jel 6	108.5	116.9	3.15	8.0
Vajinal OXB Jel Ortalama	**111.2±5.8**	**116.7 ±7.8**	**3.53**	**5.66**
Uygulama Şekli	**AUC Trapez (ng/mL.dak)**	**AUC NCOMP (ng/mL.dak)**	**Cmax (ng/mL)**	**Tmax (saat)**
OXB Çözelti 1	9.68	10.3	2.89	2
OXB Çözelti 2	9.56	9.89	2.49	2
OXB Çözelti 3	13.8	15.1	2.83	4
OXB Çözelti 4	12.1	12.5	2.88	2
OXB Çözelti 5	13.9	14.2	3.01	2
OXB Çözelti 6	10.3	15.0	1.92	2
Vajinal OXB Çözelti Ortalama	**11.6±17.6**	**12.7 ±18.3**	**2.67**	**2.33**

Bağıl Biyoyararlanım= ($AUC_{OXB\text{-}K100M2\ Jel}$/ $AUC_{üropan\ tab}$) X 100

= (167.6/93.4) X 100

=179

Bağıl Biyoyararlanım= ($AUC_{OXB\text{-}KTH3\ Jel}$/ $AUC_{üropan\ tab}$) X 100

= (111.2/93.4) X 100

=119

Bağıl Biyoyararlanım= ($AUC_{OXB\ Çözeltil}$/ $AUC_{üropan\ tab}$) X 100

= (11.6/93.4) X 100

=12.4

Bağıl biyoyararlanım OXB-K100M2 formülasyonu için %179, OXB-KTH3 formülasyonu için 119 ve vajinal OXB çözeltisi için %12.4 olarak bulunmuştur. Kontrollü salım yapan vajinal jeller, oral uygulanan piyasa tabletine göre ve vajinal uygulanan çözeltiye göre daha biyoyararlıdır. İn vitro salım deneylerinde ve tavşan vajinal dokusundan geçiş deneylerinde OXB-KTH3 jele göre 48 saat boyunca daha kontrollü salım yapan OXB-K100M2 formülasyonu in vivo deneylerde daha yüksek kan konsantrasyonu oluşturmuş ve daha uzun süre bu kan konsantrasyonunu devam etttirmiştir. Bu durumun oluşmasında OXB-K100M2 formülasyonunun mukoadezif özelliğinin OXB-KTH3 formülasyonunundan daha üstün olmasının rol oynadığı düşünülmektedir.

OXB-K100M2 jelin AUC değerinin oral Üropan tablete göre ve vajinal kitosan jele göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

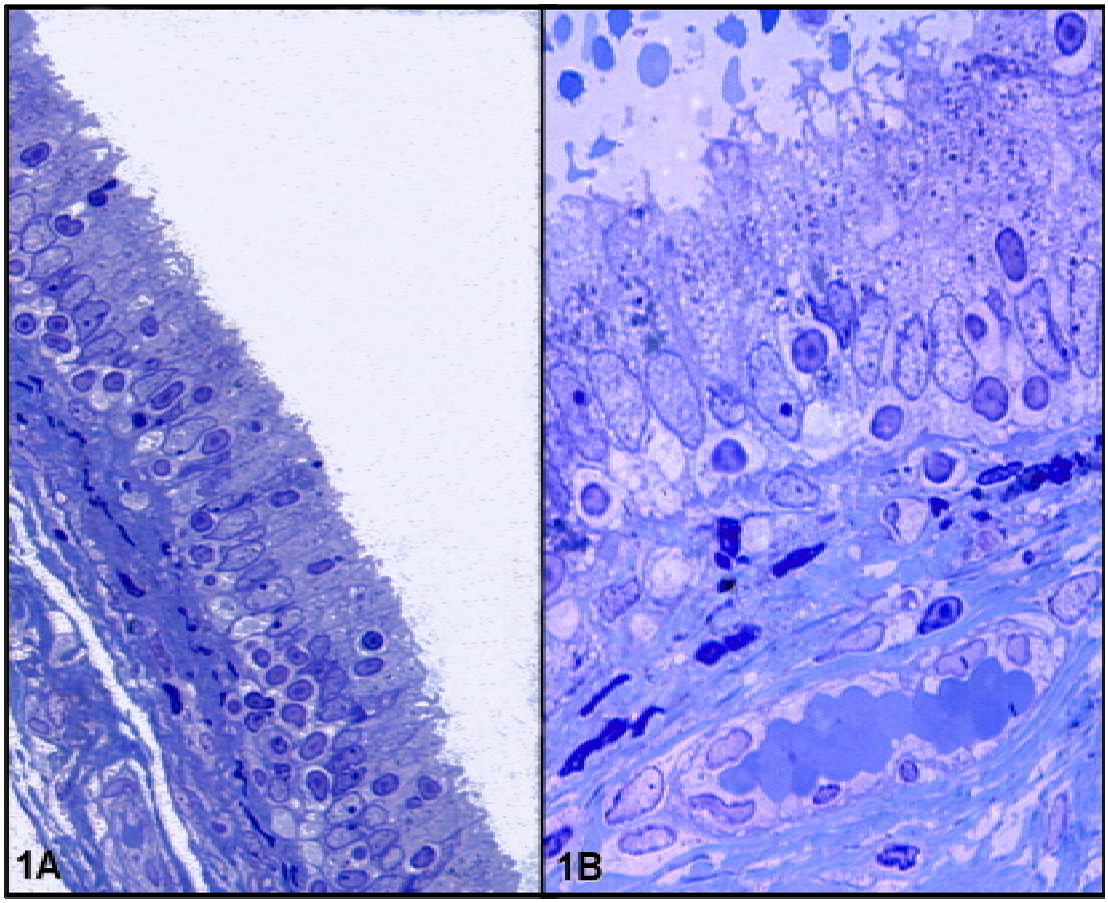
T_{max} süreleri değerlendirildiğinde ise OXB-K100M2 jelin maksimum kan konsantrasyonunu ortalama 6 saatte oluşturduğunu gördük, bu değer OXB-KTH3 jeli için 5.66 saat olarak bulunmuştur. Kontrollü salım amacıyla tasarladığımız OXB-K100M2 vajinal jel formülasyonunu oral Üropan tablete göre 6 saat sonra maksimum kan konsantrasyonuna ulaşmıştır. Oral Üropan tabletin T_{max} süreleri 1 saat olup, C_{max} değeri ise 6.77-9.18 ng/mL aralığındadır. Vajinal uygulanan OXB çözeltisinin ortalama T_{max} süreleri 2.33 saat olup, C_{max} değeri ise 2.67 ng/mL'dir.

Sonuç olarak vajinal uygulandığında kontrollü salım yapacak ve 2 gün boyunca salımını sürdürecek OXB-K100M2 jel formülasyonumuz, Üropan tabletten daha biyoyararlı bulunmuştur.

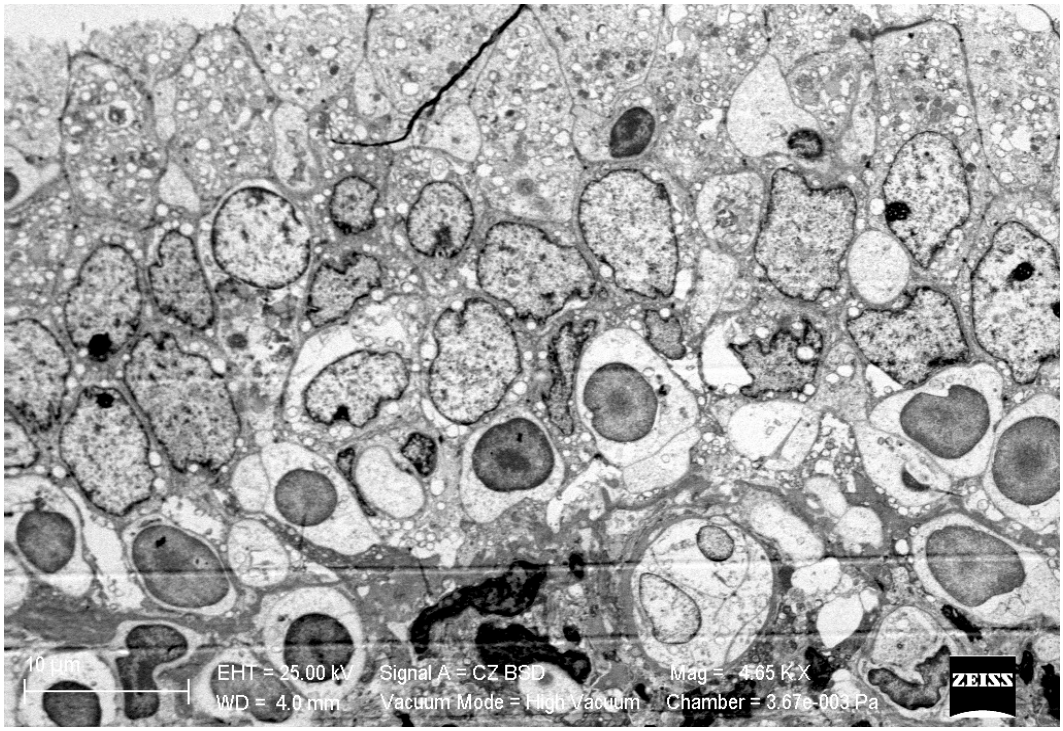
5.6.3. Tavşan Vajinal Dokusunun Histolojik Açıdan İncelenmesi

5.6.3.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

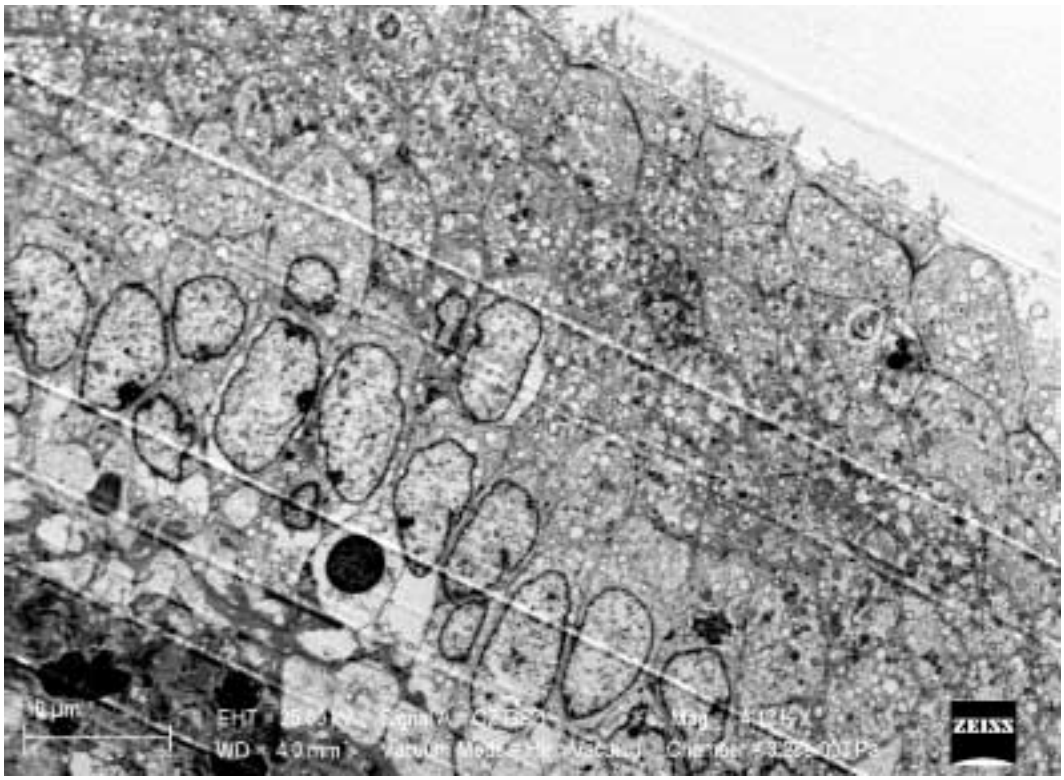
Bu gruptaki tavşanlara herhangi bir uygulama yapılmamış ve vajinaları çıkarılarak histolojik olarak incelenmiştir. Resim 26'daki yarı kesit resimlerinde ve Resim 27-28'deki TEM resimlerinde epitel çok katlı yassı yapıdadır.



Resim 26. Kontrol grubuna ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisi X 1A:400, 1B:1000).



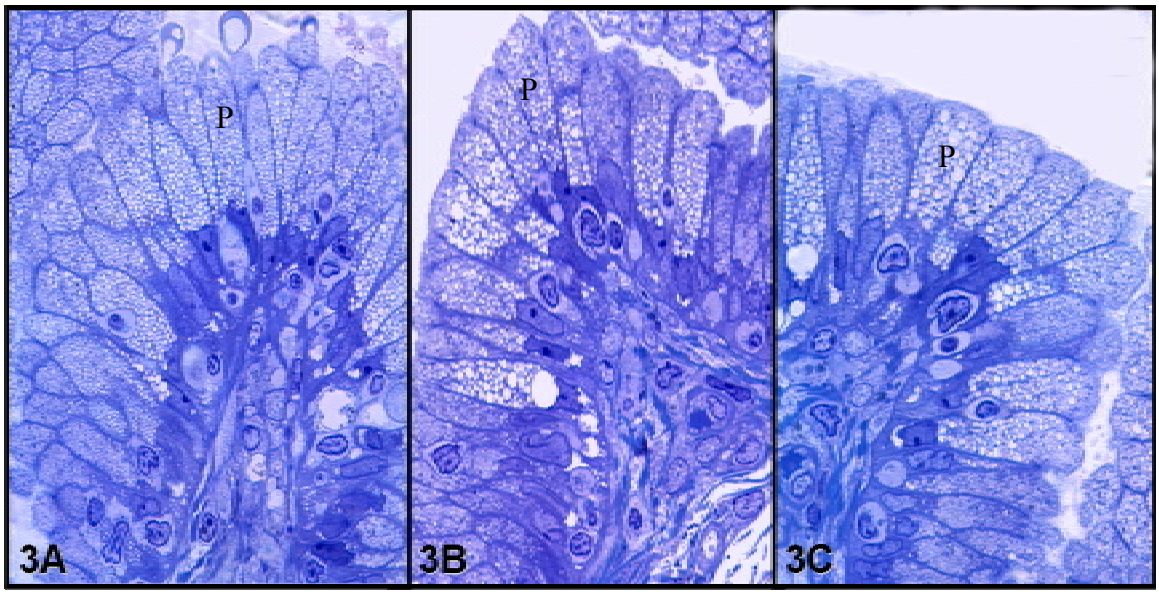
Resim 27. Kontrol grubuna ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat).



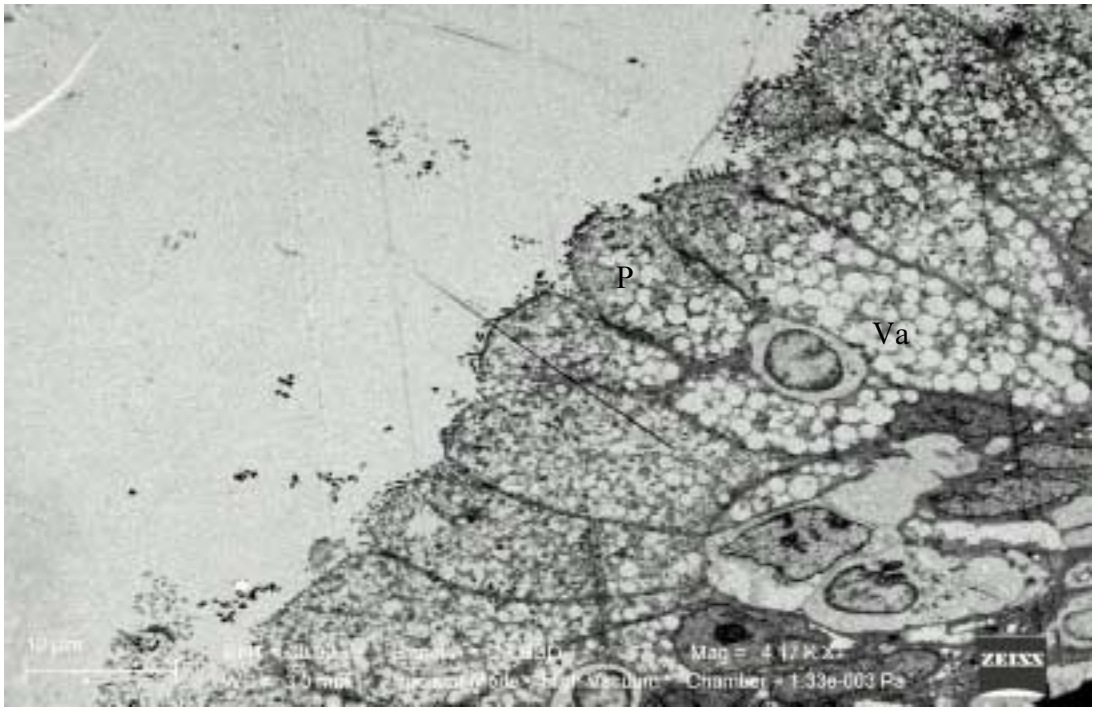
Resim 28. Kontrol grubuna ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat).

5.6.3.2. Vajinal OXB Çözeltisi Uygulanan Gruba Ait Bulgular

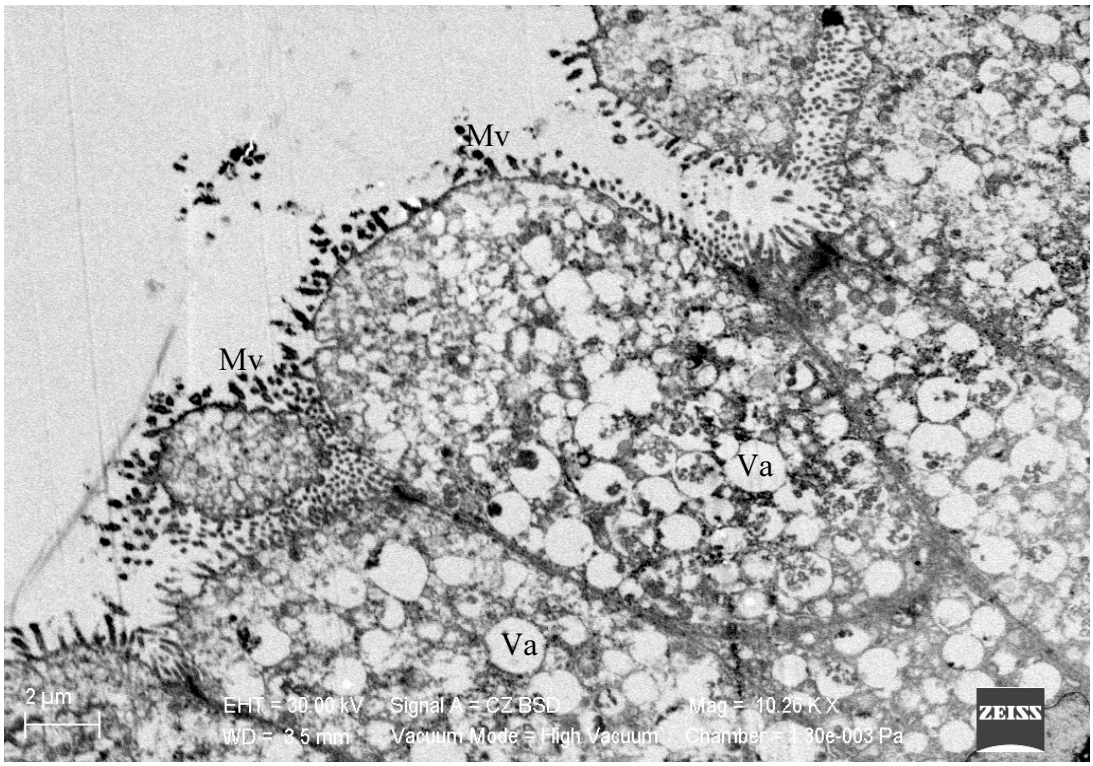
Bu gruptaki tavşanlara vajinal yoldan 10 mg OXB içeren OXB çözeltisi uygulanmış ve 48 saatin sonunda vajinaları çıkarılarak histolojik inceleme yapılmıştır. Resim 29'daki yarı kesit resimlerinde ve Resim 30-31'deki TEM resimlerinde en üst sıradaki yassı hücrelerin şekil değiştirerek prizmatik hale geldiği, üst yüzünde mikrovillus benzeri yapılar oluştuğu ve sitoplazmanın irili ufaklı vakuollerle dolduğu ve metaplaziye yakın bir hücre dejenerasyonunun geliştiği görülmüştür.



Resim 29. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisiX 3A, 3B, 3C: 1000). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P),



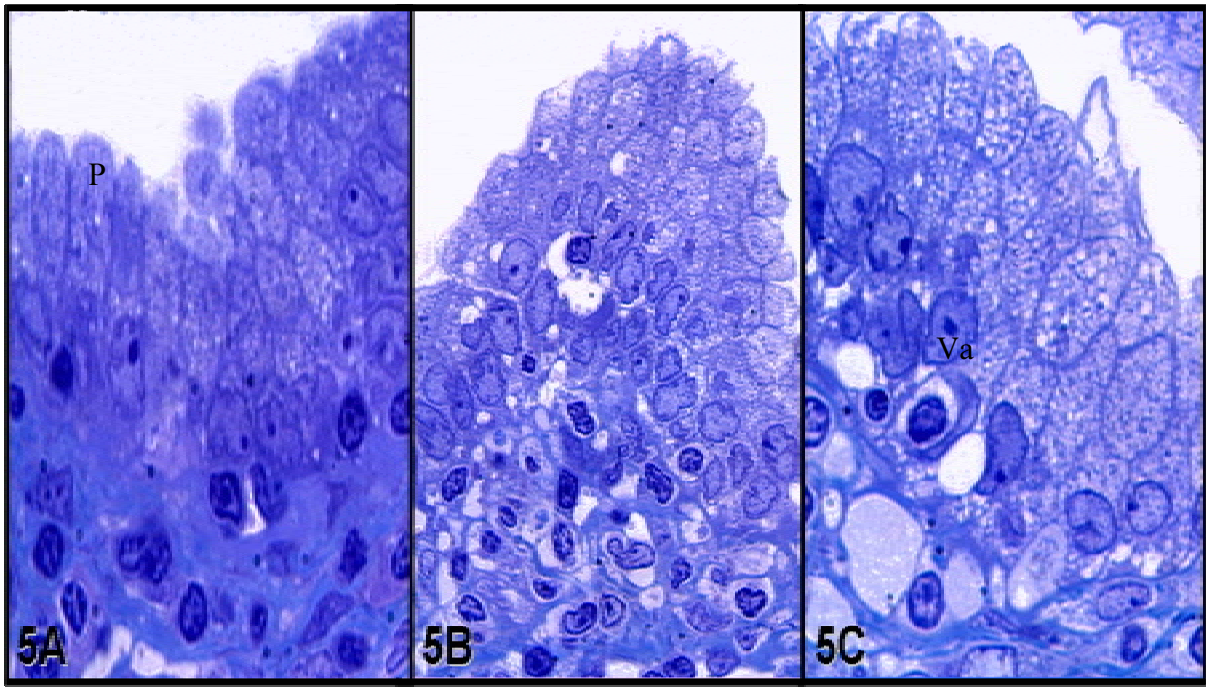
Resim 30. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va)



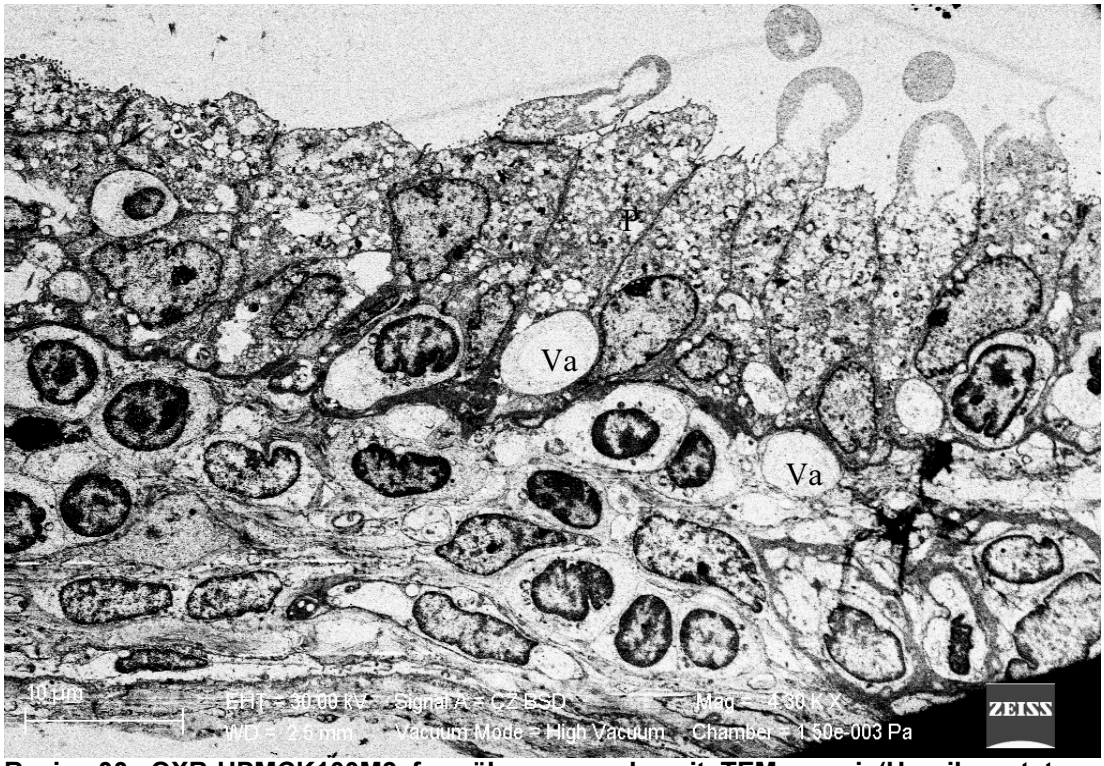
Resim 31. OXB çözeltisi uygulanan gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat). Vakuoller (Va), mikrovillus benzeri yapılar (Mv)

5.6.3.3. Vajinal OXB-HPMCK100M2 Formülasyonu Uygulanan Gruba Ait Bulgular

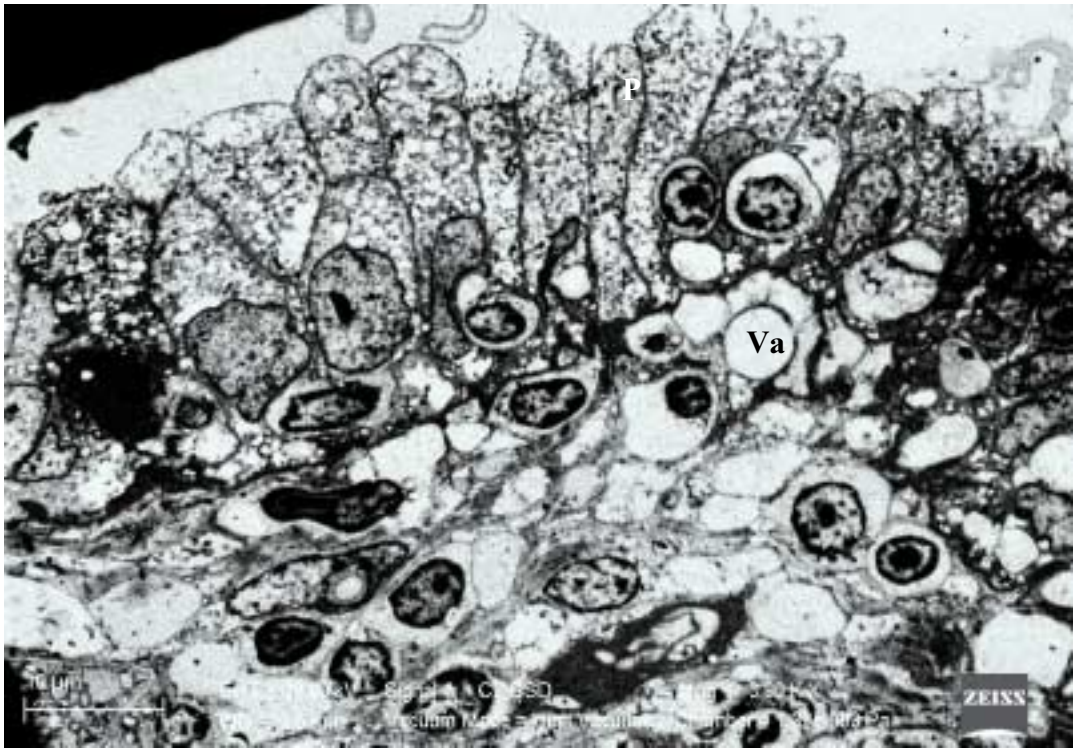
Bu gruptaki tavşanlara vajinal yoldan 10 mg OXB içeren OXB-HPMCK100M formülasyonu uygulanmış ve 48 saatin sonunda vajinaları çıkarılarak histolojik inceleme yapılmıştır. Resim 32'deki yarı kesit resimlerinde ve Resim 33-34'deki TEM resimlerinde en üst sıradaki yassı hücrelerin prizmatik hale geldiği, hücrelerin şekil değiştirdiği ve oldukça iri vakuollerin oluştuğu gözlenmiştir.



Resim 32. OXB-HPMCK100M2 formülasyon grubuna ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisiX 5A, 5B, 5C: 1000). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va),



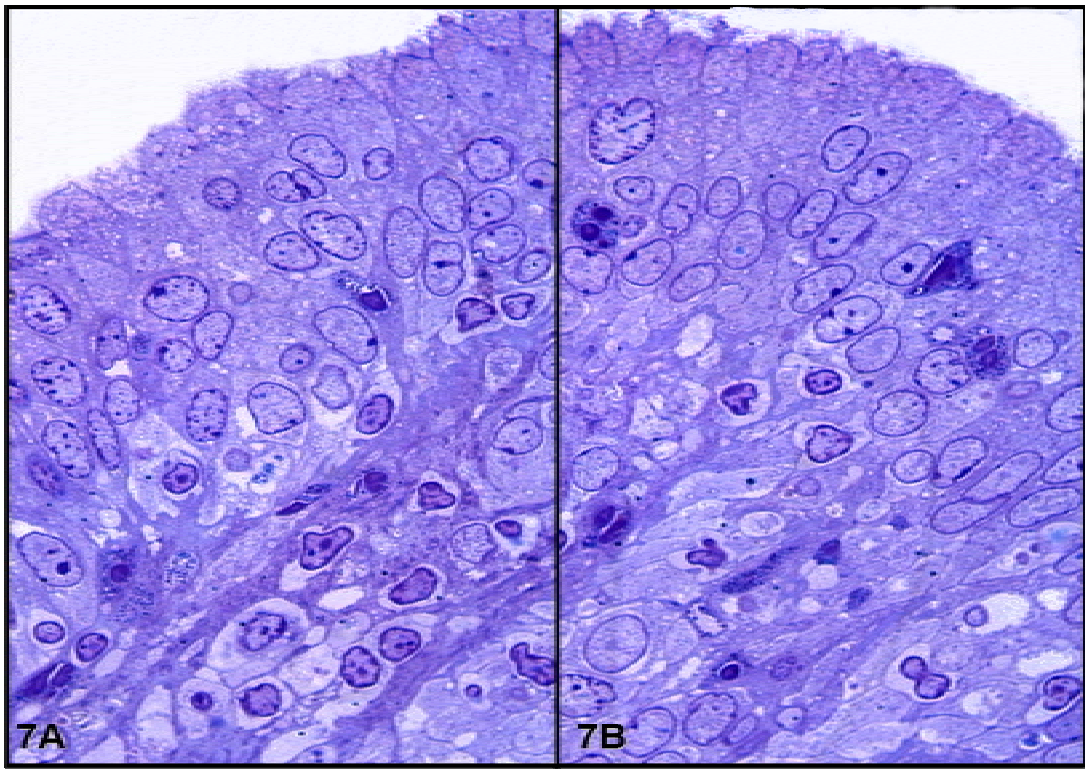
Resim 33. OXB-HPMCK100M2 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va)



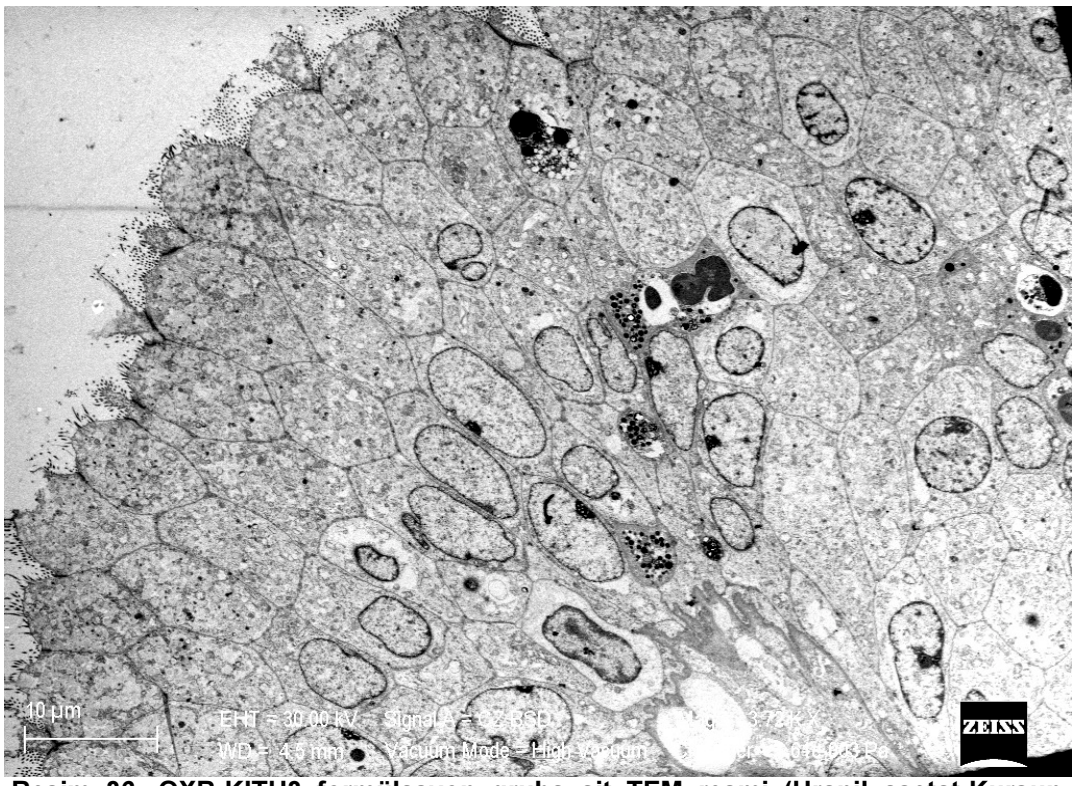
Resim 34. OXB-HPMCK100M2 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat). Prizmatik hale dönüşen yassı hücreler (P), vakuoller (Va)

5.6.3.4. Vajinal OXB-KITH3 Formülasyonu Uygulanan Gruba Ait Bulgular

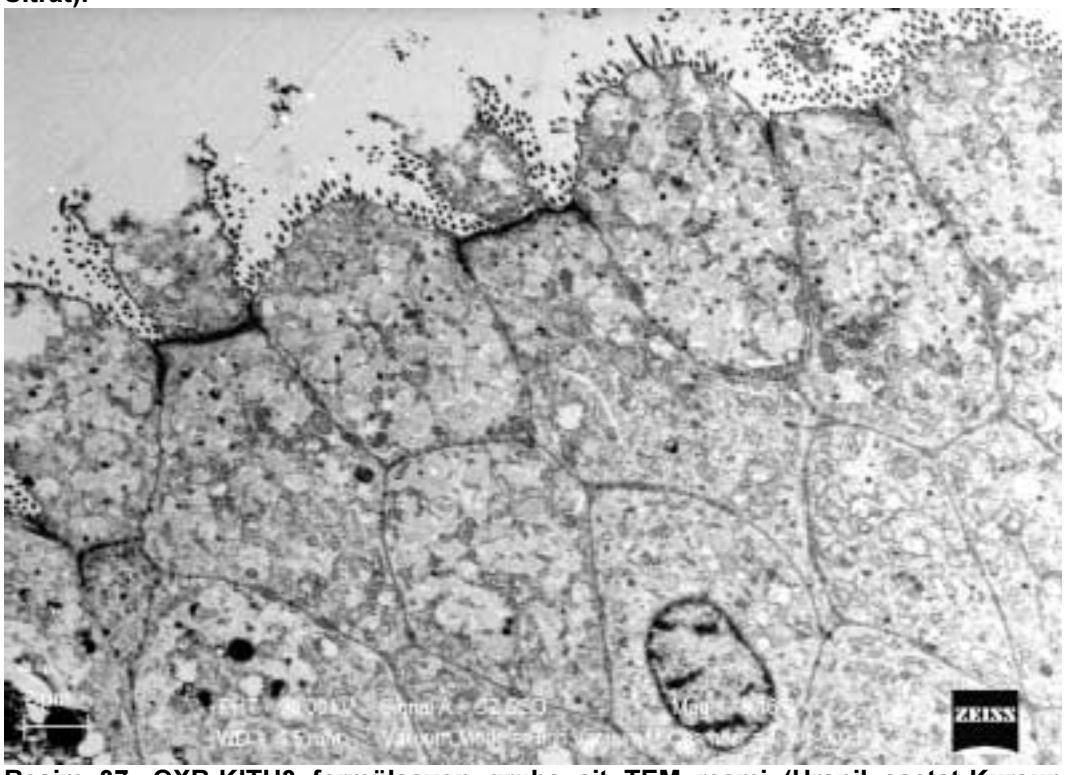
Bu gruptaki tavşanlara vajinal yoldan 10 mg OXB içeren OXB-KITH3 formülasyonu uygulanmış ve 48 saatin sonunda vajinaları çıkarılarak histolojik inceleme yapılmıştır. Resim 35'deki yarı kesit resimlerinde ve Resim 36-37'deki TEM resimlerinde vakuoller daha küçüktür ve madde düzgün bir şekilde iletilmiştir. En üst sıradaki yassı hücrelerde değişme olmadığı, prizmatik hücrelerin oluşmadığı belirlenmiştir.



Resim 35. OXB-KITH3 formülasyon grubuna ait yarı ince kesit resimleri (Toluidin mavisiX 7A, 7B: 1000).



Resim 36. OXB-KITH3 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat).



Resim 37. OXB-KITH3 formülasyon gruba ait TEM resmi (Uranil asetat-Kurşun Sitrat).

5.6.4. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etki Çalışmasına Ait Bulgular

İn vivo çalışmalarımız sırasında hazırladığımız, OXB içeren biyoadezif vajinal jellerin ve oral Üropan tabletin tavşanların çene altı tükrük bezleri (Şekil 38) üzerindeki oksidatif etkisi tayin edilmiş ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (Tablo 93).



Resim 38. Tavşanların çene altı tükrük bezleri

Tablo 93. İn vivo çalışmalarda tavşanların çene altı tükrük bezlerindeki MDA, GSH ve Total NOx değerleri

Formülsyon/Uygulama Yolu	MDA	GSH	Total Nox
Kontrol Grubu	53.3±7.77	12.74±5.85	-
Üropan Tablet/Oral uygulama	749±68	19.7±3.5	343±18
HPMC jel/vajinal uygulama	176±21	5.95±0.45	500±48
Kitosan jel/vajinal uygulama	205±30	5.09±0.36	556±33

OXB-HPMCK100M2 ve OXB-KITH3 jellerinin MDA ve GSH değerleri Üropan tablete göre anlamlı şekilde düşmüştür (t-test, $p<0.05$). OXB-HPMCK100M2 ve OXB-KITH3 jellerinin NOx değerleri ile Ürropan tabletin NOx değeri arasında anlamlı fark yoktur (t-test, $p>0.05$). Vajinal yoldan uygulanmak üzere hazırladığımız iki biyoadezif jelin (OXB-HPMCK100M2 ve OXB-KITH3) arasındaki karşılaştırmalarda MDA, Total NOx ve GSH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.798$, $p=0.811$, t-test, $p>0.05$).

6. TARTIŞMA

6.1.Etkin Maddeler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

Cidofovirin tayin edilen erime noktası Gilead Sciences, Inc.'den gelen spesifikasyon belgesi ile uygunluk göstermektedir. Oksibütinin ise erime noktası literatür ile uyumlu bulunmuştur[222].

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü ilacın difüzyonunda ve biyoyararlanımında önemli bir parametredir. CV ve OXB için hesaplanan ortalama partikül büyüklüklerinin standart sapması küçüktür (Şekil 25 ve104). Bundan dolayı partikül büyüklüğü dağılımının dar olduğu kanısına varılarak etkin maddeler herhangi bir ayırma işlemine tabi tutulmaksızın doğrudan kullanılmıştır.

Etkin maddelerin FT-IR spektrumu elde edilmiş ve incelenmiştir (Şekil 26 ve 105). Spekturumlarda karakteristik madde pikleri görülmektedir. Bu sonuçlar etkin maddelerin kimyasal yapısıyla uyumluluk göstermektedir.

CV ile polimerlerin DSC termogramları Şekil 27-29'da gösterilmiş ve polimerler ile CV arasında etkileşme olmadığı bulunmuştur. OXB ile polimerlerin DSC termogramlarına bakıldığında ise termogram ve erime derecesi literatüre[223] uyumlu bulunurken, Carbopol 974P polimeri ile alınan termogramda yeni endotermik bir pikin oluştuğu görülmüş ve aralarında etkileşme olabileceği düşünülmüştür (Şekil 106-108).

CV'in pH 4.5 ortamındaki UV spektrumu elde edilmiş ve maksimum absorbans değeri bulunmuştur. CV'in 278 nm'de maksimum absorbans verdiği tesbit edilmiştir, bu bulgu literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur[165]. Spektrumda CV'e ait pikden başka pik görülmemiştir (Şekil 30). CV'in pH 4.5 ortamında hazırlanan standart doğrusunda, doğrunun kesişim değerinin sıfır noktasından geçtiği bulunmuş ve bu noktalara ait doğrunun eğimi kullanılmıştır (Şekil 31 ve Tablo 31).

CV'in in vitro miktar tayini yönteminin validasyonu Amerikan Farmakopesi (USP XXVII) esas alınarak yapılmıştır. pH 4.5'de miktar tayini validasyonu için yaptığımız çalışmalarda, doğruluk ve tekrarlanabilirlik için hesaplanan tüm % bağıl sapma sonuçları %1'in altındadır (Tablo 32 ve 33). Özgünlüğün saptanabilmesi için yapılan çalışmalarda ise cidofovir dışındaki karışımın, cidofovirin spektrofotometrik olarak çalışıldığı dalga boyunda herhangi bir pik vermediği saptanmıştır (Şekil 32).

Laboratuvar şartlarımızda, CV'in deney koşullarındaki (25±0.5°C, 37±0.5°C ve 60±0.5°C) 24 saatlik stabilitesi incelenmiş ve spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu koşullarda cidofovirin 24 saat süreyle yapılan stabilite testi sonucunda derişiminde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (t-test, $p>0.05$) (Şekil 33).

Oksibütininin spektrofotometrik miktar tayini çalışmalarında, Varma[219] ve arkadaşlarının kullandığı yöntem denenmiş buna göre kloroform tabakasında oksibütininin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 208 nm'de ve 240 nm'de bulunmuştur (Şekil 109 ve 110). Sabit bir dalga boyu elde edilemediği için analiz yöntemi valide edilememiştir.

Oksibütininin spektrofotometrik yöntem ile analizinin problemli olduğu literatürde de belirtilmektedir. Gindy ve arkadaşlarının[225] yaptığı çalışmada oksibütinin piklerinin yakınlarında degradasyon ürünlerinin piki olduğu ve bu nedenle analizin zor olacağı görülmektedir. Çalışmamızda bu nedenle oksibütininin analizi HPLC ile yapılmıştır.

Massoud ve arkadaşlarının[222] kullandığı yöntem ile çalıştığımızda pH 4.5 fosfat tamponu içinde OXB analizi yapılırken çok yoğun tampon pikleri gözlenmiştir (Şekil 111). Bu nedenle oksibütinine ait pik elde edilememiştir. Bu sorunu gidermek için pH 4.5 fosfat tamponu %4 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. pH değeri değişmediği ve HPLC de tampona ait piklerin küçüldüğü için daha sonraki çalışmalara bu şekilde devam edilmiştir. Sonuçta tampon pikleri oksibütinin pikini etkilemeyecek duruma getirilmiş ve 15-16. dakikalar arasında oksibütinine ait olan pik

elde edilmiştir (Şekil 112 ve 113). Oksibütininin kalibrasyon grafikleri ve doğru denklemleri hazırlanmıştır (Şekil 114) . Hazırlanan 8 farklı konsantrasyonda çizilen kalibrasyon doğrusuna ilişkin denklemde regresyon katsayısı (r^2) 0.9994 olarak hesaplanmıştır. Bu değer ile çalışılan aralıkta OXB için elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallığını gösterilmiştir. Bu kapsamda ayrıca doğruluk, kesinlik ve günler arası farklılık ile analiz süresince stabilite, duyarlılık ve saptama sınırı saptanmıştır. Doğruluk için hesaplanan tüm % bağıl sapma sonuçları %2'nin altındadır (Tablo 64). Deney içi kesinlik bulguları değerlendirilmiş ve sonuçta % bağıl sapma 2.04 olarak elde edilmiştir (Tablo 65). Deneyler arasında, kalibrasyon doğrusu sürekli olarak kontrol edilmiş ve büyük bir sapma tespit edilmemiştir (Tablo 66). Metot özgün bulunmuş ve stabilite deneyleri sonucunda da 72 saatte olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 115 ve 116).

Tez çalışmalarımızda, CV ve OXB için yaptığımız bu analitik yöntem validasyon sonuçları değerlendirildiğinde, bilimsel güvenilirliği olan bu spektrofotometrik ve HPLC metodunun, etkin maddelerin miktar tayini gerektiren tüm deneysel aşamalarda kullanılabilecek güvenilir yöntemler olduğu gösterilmiştir.

6.2. Polimerlerin Viskozite ve Akış Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kullanılan polimerlerin viskozitelerinin, etkin maddelerin difüzyonuna etkisini incelenmek amacıyla viskoziteleri ölçülmüştür (Tablo 34).

Çalışmada özellikle polimerlerin viskozitelerinin karşılaştırılabilir olması için çaba harcanmıştır. Viskoziteleri birbirinden çok farklı olan bu polimerlerin ortak spindle numarasında ve ortak rpm'de ölçülmesine gayret edilmiştir. Carbopol 974P ve Polikarbofil dışında tüm polimerin viskozitesi 20 rpm'de ve Spindle No 52'de ölçülmüştür. Akış özellikleri de aynı ölçüm şartlarında belirlenmiştir. Carbopol 974P ve Polikarbofil'in viskozitesi

diğerlerinden yüksek olduğu için 20 rpm'de ölçüm yapılamamış ve 2 rpm'de ölçülmüş ve viskoziteleri kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde viskozite sıralaması büyükten küçüğe doğru şöyledir: Carbopol 974P > Polikarbofil > HPMC K100M > Kitosan H > HPMC K15M > Poloksamer 407 > Kitosan M > Kitosan L. Bu durumun etkin maddelerin difüzyonunu etkileyeceği düşünülmektedir. Bu polimerlerin literatürdeki viskozite değerleri farklı alet kullanılması veya farklı koşullarda ölçülmesinden dolayı karşılaştırılabilir değildir. Literatürdeki çalışmalarda genellikle viskozitesi ölçülen polimer veya formülasyonlar kendi aralarında karşılaştırılmıştır[149]. Aynı şekilde bizim bulduğumuz viskozite değerleri polimerlerin analiz sertifikaları ile de uyumlu değildir. Örneğin Noveon firması Carbopol 974P ve Polikarbofilin viskozite ölçümünü Brookfield Viskozimetresinde, 20 rpm'de, % 0.5'lik çözeltilerde ve pH 7.5'de yapmışlardır. Bizim kullandığımız cihaz Brookfield Viskozimetresinin başka bir modelidir ve biz 2 rpm de % 1 'lik jellerin viskozitelerini pH 4.5'de ölçtüğümüz için sonuçlarımız karşılaştırılabilir değildir[73].

Ayrıca polimerlerin akış özelliğinin saptanması için çizilen kayma gerilimine karşı (x), hız gradienti (deformasyon değişim oranı)(y) grafiğinde aralarındaki ilişkinin doğrusal olmadığı görülmüştür. Polimer jellerinin non-Newtonian akış gösterdiği ve akışın pseudoplastik akışa uyduğu saptanmıştır (Şekil 34). Carbopol 974P ve Polikarbofilin akış diyagramları diğer polimerler ile aynı grafikte gösterildiğinde farklı rpm'de ölçüldükleri için belirgin derecede farklıdır. Ancak Carbopol 974P ve Polikarbofil pseudoplastik akış göstermektedir. Formülasyon çalışmalarında her polimer grubunun akış diyagramı çizilmiş ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

Hidroksietilselüloz ve kitosan türevleriyle hazırlanan jellerin de literatürde pseudoplastik akış gösterdiği belirtilmiştir[129]. Valenta[11] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada modifiye edilmiş ve edilmemiş poliakrilik asit türevlerinin pseudoplastik akış gösterdiği bulunmuştur, tüm

jellerde kayma hızı arttığında bizim çalışmamızda da olduğu gibi viskozite azalmıştır.

Viskozitesi ölçülen polimer jellerin pH'sına bakıldığında bütün jellerin pH'sı vajinal uygulama için uygun bulunmuştur (Tablo 34).

6.3. Biyoadezif Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

6.3.1. Kitosan Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hazırlanan ön formülasyonların hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Vajinal uygulama için hazırlanmış olan jel formülasyonlarının pH değerleri uygundur. Bütün pH değerleri 4-5 aralığındadır (Tablo 35).

Viskoziteleri değerlendirildiğinde, Kitosan H içeren formülasyonların viskozitesinin yüksek olduğu ve polimer oranı arttığında viskozitenin de arttığı görülmüştür (Tablo 35). Kitosan jel önformülasyonlarının hepsinin pseudoplastik akışa uyduğu saptanmıştır (Şekil 35-37). Önformülasyon çalışmalarında özellikle vajinal pH'ya uygun pH'da jeller hazırlanmaya çalışılmış ve glasiyel asetik asit miktarı buna göre ayarlanmıştır. Literatürde de vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan ve %1.5 kitosan içeren jelin %0.5 asetik asit içeren ortamda hazırlandığı belirtilmektedir[131]. Bizim çalışmamızda ise %3 oranında polimer içeren jellerin hazırlanmasında %1 oranında glasiyel asetik asit kullanılmıştır (Tablo 2).

CV ve OXB içeren kitosan jellerin viskozite değerlerinin etkin madde içermeyen kitosan jellere göre daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 36, 67). Etkin madde içeren kitosan jellerin akış özelliğine baktığımızda ise yine pseudoplastik akış özelliği gösterdiği bulunmuştur (Şekil 38 ve 117).

Önformülasyon çalışmasından sonra Kitosan H, Kitosan M ve Kitosan L ile hazırlanan ve %3 oranında polimer içeren jeller ile çalışmaya devam edilmiştir. CV ve OXB içeren bu jellerin miktar tayinleri kabul edilen sınırlar içindedir ve pH değerleri 3.87-4.42 arasında değiştiği için vajinal uygulama için uygundur (Tablo 36 ve 67). Kitosan H ile hazırlanan

formülasyonlarının viskozitesi en yüksektir. Bu nedenle bu formülasyonların vajinada kalış süresinin daha uzun olacağı ve daha kontrollü salım yapacakları düşünülmektedir. Miktar tayini kabul edilen sınırlar içinde bulunmuştur (Tablo 36 ve 67).

Kitosan ve modifiye kitosan ile hazırlanan vajinal jel formülasyonlarının reolojik özelliklerinin ve salım özelliklerinin özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, jellerin bizim de çalışmamızda olduğu gibi pseudoplastik akış gösterdiği ve viskozitesinin polimer oranına bağlı olarak arttığı görülmüştür. Piyasa preparatı ile karşılaştırılan modifiye kitosan ile hazırlanan jellerin özelliklerinin daha üstün olduğu belirtilmiştir[129].

Etkin maddeli jellerin diyaliz membrandan geçiş profilleri incelendiğinde 48 saatin sonunda bütün jellerin CV'in tamamını saldığını görmekteyiz. Ancak viskozitesi yüksek olan Kitosan H ile hazırlanan ve % 3 oranında polimer içeren CV-KITH3 formülasyonu, sekizinci saatte % 69.2±2.5 salım yaparak diğer formülasyonlara göre daha kontrollü bir salım göstermiştir (Şekil 39). Viskozitesi en düşük olan kitosan ile aynı polimer oranında (% 3) hazırlanan CV-KITL3 formülasyonu ise sekizinci satte %92.0±5.19 oranında CV salımı gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kitosan polimer oranının artması ile CV salımının azalacağı ancak 48 saat sürecek olan kontrollü salımı sağlayamadığı yorumu yapılabilir.

OXB için yapılan çalışmalarda da, %3 oranında Kitosan H polimeri içeren OXB-KITH3 formülasyonundan salım, diğerlerinden daha yavaş olsa da ilk 8 saatte %80'ne yakın salım gerçekleştirdiği için OXB kontrollü salımı için uygun olmadığı düşünülmüştür (Şekil 118).

Asiklovirin model madde olarak kullanıldığı başka bir çalışmada da, kitosan HCl ve kitosan sitrat (%3) kullanılarak jel formülasyonları hazırlanmış ve geçiş çalışması Franz difüzyon hücresinden yapılmıştır. Jeller ile kontrol grubu olarak asiklovirin süspansiyonunun kullanıldığı çalışmada kitosan jellerin asiklovir salımını etkilemediği salımın süspansiyon formu ile aynı olduğu bildirilmiştir[120]. Bizim kitosan jel ile

yaptığımız diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında ilk 8 saatte etkin maddelerin tamamına yakını salınmıştır. Çalışmamızda 48 saat sürecek olan kontrollü salımı amaçladığımız için kitosan jellerin salım profillerinin uygun olmadığı görülmüş ve bu bulgu literatür ile de desteklenmiştir.

Bu grup formülasyon çalışmalarının sonunda vajinada uzun süreli kontrollü salım için kitosan jel formülasyonlarının uygun taşıyıcılar olmadığı düşünülmüştür. Ancak OXB'in in vivo deneylerinde kontrollü salım yapan formülasyonu ile OXB-KITH3 formülasyonunun karşılaştırılmasına karar verilmiştir. Böylece in vitro çalışmalarda görülen farkın in vivo çalışmalara etkisinin anlaşılması amaçlanmaktadır.

6.3.2. Carbopol 974P Jel ve Polikarbofil Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bu grup polimerler ile OXB arasında geçimsizlik olduğu için OXB içeren formülasyonlar hazırlanamamış, sadece CV ile formülasyonlar hazırlanmıştır.

Poliakrilik asit türevi polimerler ile hazırlanan ve CV içeren jellerin hepsi şeffaf görünüşte ve homojen yapıdadır. Etkin madde içeren ve içermeyen tüm jellerin akış özellikleri pseudoplastikdir (Şekil 40 ve 41). Ayrıca bu jellerde pH ölçümü yapılmış ve vajinal uygulama için uygun bulunmuştur. Jellerin pH'sı 4.25 ile 4.97 arasında değişmektedir (Tablo 37). Viskozite değerlerine bakıldığında ise % 2 Carbopol® 974P içeren jelin en yüksek viskozite gösterdiği bulunmuştur (Tablo 37). Carbopol® 974P ile hazırlanan jellerin viskozitesi polikarbofil ile hazırlananlardan daha yüksek bulunmuştur ve polimer oranı arttıkça vizkozite de artmaktadır. Shin[110] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da Carbopol-poloksamer jelde Carbopolün polimer konsantrasyonu arttıkça viskozite ve biyoadezyon özelliğinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca viskozitenin pH'dan etkilendiği, en yüksek viskozitenin pH 6'da gerçekleştiği bildirilmiştir. Biz çalışmamızda vajinal uygulanacak jel formülasyonları geliştirmek istediğimiz için Carbopol ve Polikarbofil jellerin hazırlanması aşamasında jelleşmeyi

sağlamak için ilave edilen %10 NaOH miktarını pH 4.5 olacak şekilde ayarladık ve viskozite ölçümlerini bu pH'da yaptık.

Salım profilleri incelendiğinde Carbopol 974P'yi % 2 oranında içeren CV-C974P2 formülasyonu sekiz saatin sonunda % 51.2±3.8 oranında salım yapmış ve 48 saat boyunca kontrollü salım sağlamıştır. Polimer oranı daha düşük olan ve %1 oranında Carbopol 974P içeren CV-C974P1 formülasyonundan salımın 48 saatlik profilde daha fazla olduğunu görmekteyiz (Şekil 42). Polimer oranı düştükçe salım artmaktadır. Benzer bir sonuç Cevher[149] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da bulunmuştur. Carbopol® 974P polimeri ile (% 2, 3 ve 4 oranında) hazırlanan formülasyonlardan 72 saat boyunca klomifen sitrat salımının polimer oranlarına göre sırayla %91.27, %73.41 ve %56.76 oranındadır. Bizim çalışmamızda da polimer oranı arttıkça salımın azaldığı görülmektedir.

Polikarbofil içeren formülasyonların daha hızlı salım yaptıkları görülmüştür. Bunun nedeni Polikarbofilin viskozitesinin Carbopolden düşük olması olabilir. CV-POL2 formülasyonu sekiz saatin sonunda % 74.0±2.8 oranında salım yapmıştır. Literatürde genellikle Polikarbofilin diğer farklı polimerler ile kombine edilerek kontrollü salımının sağlandığı görülmüştür. Bu çalışmalardan birinde Polikarbofil (%3) ile hidroksietilselüloz (%5) ve polivinilpirolidon (%4) kombine edilerek vajinal jel formülasyonları hazırlanmış ve model ilaç olan erioglaucine'in salımının 24 saatin sonunda %38.77±1.28 olduğu bulunmuştur[226]. Literatürde poloksamerlerin (P407 ve 188) polikarbofil ile kombine edildiği çalışmalara da rastlanmıştır. Bu kombine polimer karışımından oluşan jellerden klotrimazol salımının incelendiği bir çalışmada ilk sekiz saatte salım % 60-70 civarında olmuştur. Polikarbofil miktarı arttıkça daha kontrollü salım elde edildiği belirtilmiştir[137].

Bu grup formülasyon çalışmalarımızın sonucunda CV-C974P2 formülasyonunun 48 saat sürecek olan kontrollü salım özelliğini sağladığı ve diğer formülasyonlara göre vajinal uygulama için daha uygun olduğu

görülmüştür. Ancak Carbopol ile hazırlanan jellerin mekanik özellikleri ve mukoadezyon gücü HPMC jellerden daha düşük olduğu için sonuç formülasyon olarak belirlenmemişlerdir.

6.3.3. HPMC Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

HPMC K100M ve HPMC K15M kullanılarak yaptığımız çalışmalarda hazırlanan jellerin akış özelliklerinin pseudoplastik olduğu çizilen akış diyagramlarında görülmüştür (Şekil 43, 44 ve 119). Benzer HPMC'ler (E5, E15, E50 ve K100M) kullanılarak yapılan bir çalışmada biyoadezif bukkal jeller hazırlanmış ve HPMC K100M'in pseudoplastik akış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca jellerin viskozitesindeki artışa bağlı olarak etkin madde salımının azaldığı da bildirilmiştir[227].

Hazırladığımız HPMC jellerin vajinal uygulama için uygun pH'da oldukları görülmüştür (Tablo 38 ve 68). HPMC K100M ile hazırladığımız formülasyonların viskoziteleri HPMC K15M ile hazırladığımızdan daha yüksek bulunmuştur. Polimerlerin sertifikalarındaki viskoziteleri karşılaştırıldığında da HPMC K100M'in viskozitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Etkin madde içermeyen jellerin viskozitesi de etkin madde içerenlere göre daha yüksektir.

HPMC ve Carbopol 934P ile ayrı ayrı veya kombine edilerek vajinal jellerinin hazırlandığı bir çalışmada spermisid madde içeren jellerin viskoziteleri ölçülmüştür. HPMC jellerin viskozitesinin polimer konsantrasyonuna göre değiştiği ve %3 oranında polimer içeren jelin viskozitesinin %2 oranında polimer içeren jelden yüksek olduğu bildirilmiştir. Carbopol 934P jel ile kombine edildiğinde HPMC'nin Carbopol jelin viskozitesini arttırıcı etki yaptığı da aynı çalışmada belirtilmektedir[85]. Bizim çalışmamızda da HPMC konsantrasyonu arttığında jellerin viskozitesinin arttığı bulunmuştur (Tablo 38).

Çalışmamızda CV ve OXB'in HPMC kullanılarak hazırlanan jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçişleri incelenmiştir (Şekil 45 ve 120). Salım profillerine bakıldığında viskozitesi daha yüksek olan HPMC

K100M ile hazırlanan formülasyonlardan etkin madde salımının daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada vajinal HPV'nin inaktivasyonu için uygulanan ve sodyum dodesil sülfat içeren jelden (%1.5 HPMC ve %1.5 Carbopol 934P ile hazırlanmış) etkin madde salımı değişik şartlarda incelenmiştir. Jel miktarı 3 g kullanılarak hazırlanan formülasyondan salım 1.8 g kullanılana göre daha az etkin madde salımı gerçekleştirmiştir. Ayrıca pH değişimi de salımı etkilemektedir[81]. Bizim salım çalışmamız pH 4.5'de yapılmış ve etkin madde jel oranı bütün formülasyonlarda sabit tutulmuştur. CV ve OXB içeren jellerden 48 saaatin sonunda en az salım yapan formülasyonlar CV-HPMCK100M2 ve OXB-HPMCK100M2 olmuştur. Bu formülasyonlarda salım ilk sekiz saat için yaklaşık % 70 civarındadır ve salım 48 saat boyunca devam etmiştir. Viskozitesi daha düşük olan HPMC K15M ile hazırlanan jellerden etkin maddelerin salımı ise daha hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. CV ve OXB içeren HPMCK100M2 formülasyonları vajinada 48 saat sürecek salım için uygun formülasyonlar olarak değerlendirilmiştir.

6.3.4. Poloksamer Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Öncelikle bu grup formülasyonlarda jelleşme sıcaklığı belirlenmiştir (Tablo 39 ve 69). Buna göre P407, 25°C'de jel özelliği göstermektedir. P188 polimeri ile hazırlanan jellerde 37°C'de jelleşme olmadığı için daha sonraki çalışmalarda bu polimer kullanılmamıştır. Yapılan bir çalışmada Poloksamer 407'nin bizim çalışmamızda olduğu gibi %20 oranında kullanılarak jel formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyonun jelleşme sıcaklığı 25°C bulunmuş ve pseudoplastik akış gösterdiği belirtilmiştir[228]. Bu literatür bilgisi bizim bulgularımız ile uyumludur.

Poloksamer P407 ile yapılan başka bir çalışmada saklama sıcaklığı olan 4°C'de P407'nin sıvı halde olduğu, 37°C ve üzerindeki sıcaklıklarda ise yarıkatı özellik gösterdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda jelleşme sıcaklığının altında Newtonian akış gösterirken jelleşme sıcaklığının üzerinde ise non-Newtonian akış gösterdiği de belirtilmiştir[229]. Bizim

çalışmamızda da jelleşme sıcaklığının üzerinde bu jeller non-Newtonian akış göstermiştir (Şekil 46 ve 121).

Hazırlanan formülasyonlar hepsi şeffaf görünümdedir ve vajinal uygulama için uygun pH'ya sahiptir (Tablo 40 ve 70).

Özellikle HPMC ile kombine edilerek hazırlanan Poloksamer jellerin viskozitesi daha yüksektir. Etkin madde içeren ve içermeyen HP407 formülasyonlarının viskozitesi en yüksek bulunmuştur (Tablo 40). Bu formülasyonun TPA testleri değerlendirildiğinde kitosan jellerden daha yüksek adeziflik gösterirken Carbopol ve sadece HPMC içeren jellerden daha düşük adeziflik göstermiştir (Tablo 57 ve 87). Mukoadezyon işinin hesaplandığı çalışmalarda ise en düşük değer poloksamer ile hazırlanan formülasyonlardan elde edilmiştir (Tablo 63 ve 88).

Poloksamer jellerin diyaliz membrandan geçiş profilleri incelendiğinde 48 saat sonunda HP407 formülasyonlarının istenilen kontrollü salımı sağladığı bulunmuştur (Şekil 47 ve 122). CV-HP407 formülasyonundan salım 48 saatin sonunda % 69.2±3.4 bulunurken, OXB-HP407 formülasyonu 48 saatte etkin maddenin tamamına yakınını salmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde %20 oranında Poloksamer 407 ve %0.2 oranında HPMC kullanılarak hazırlanan vajinal jellerden β-siklodekstrin ile kompleksi hazırlanan klotrimazolün salımı incelenmiştir. Diyaliz torbadan yapılan salım 4 gün sürmüş ve bahsedilen formülasyondan salım ~%40 civarında olmuştur. HPMC kullanılmadan hazırlanan poloksamer 407 jelden salım daha fazla olmuştur[230]. Bizim de çalışmamızda HPMC ilavesi etkin maddelerin salımını azaltmıştır. Poloksamer ve HPMC ile hazırlanan jeller ile yapılan in vitro çalışmalarda kontrollü salım elde edilmiştir. Ancak bu grup jel formülasyonlarının mukoadezif özellikleri HPMC jellere göre zayıf oldukları için sonuç formülasyon olarak seçilmemişlerdir.

Literatürde poloksamer 407 ile hazırlanan jel formülasyonlarından salımın şişme kontrollü olduğu ve polimerin oranı arttıkça salımın azaldığı belirtilmektedir. P407'yi % 25 oranında içeren jel ceftiofur (3. kuşak

sefalosporin) etkin maddesini 6 saatin sonunda % 96 salarken, % 35 oranında P407 içeren jel % 40 oranında salmıştır. Ayrıca poloksamer 407'de oluşan sisteme polivinil pirolidon, CMC veya HPMC ilave edildiğinde sistemin viskozitesinin artığı ve etkin madde salımının azaldığı bildirilmiştir[133]. Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar da bu literatürdeki bilgiler ile paraleldir. HPMC ilavesi ile poloksamer jellerin viskozitesi artmıştır. HPMC miktarı arttığında viskozitenin arttığı ve salımın azaldığı Tablo 40'da ve Şekil 47 ile 122'de gösterilmektedir.

Bilensoy[140] ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada human papilloma virüsün neden olduğu servikal kanserlerin tedavisinde kullanılan 5-Florourasilin, sıcaklığa hassas polimer Pluronic® F127 ile gel formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlara hyaluronik asit, Carbopol 934 ve HPMC gibi mukoadazif polimerler ilave edilmiştir. 5-Fluorourasilin çözünürlüğünü arttırmak için β-siklodekstrinler ile kompleksi yapılmış ve bahsedilen polimerler ile jel formülasyonları hazırlanmıştır. Bu jel formülasyonlarından salım deneyleri pH 5.5'de diyaliz torbasından yapılmış ve özellikle 12-92 saat arası düzenli kontrollü salım elde edilmiştir. Carbopol ile hazırlanan poloksamer jelin en az salım gösterdiği bildirilmiş ve buna neden olarak da β-siklodekstrinler ile Carbopol arasındaki etkileşme gösterilmiştir.

CV ve OXB ile yapılmış vajinal jel çalışması literatürde yer almamaktadır. Sadece OXB ile vajinal halka hazırlanmış ve in vitro salım deneyi sonucunda 14 gün boyunca kontrollü salım elde edildiği görülmüştür[207].

6.3.5. Jellerin Stabilitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tez çalışmalarımız sırasında hazırlanan jel formülasyonları 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında saklanmış ve 3 ay boyunca görünüş, pH, viskozite ve etkin madde miktar tayini testleri yapılmıştır (Tablo 41-44 ve 71-73).

Tüm saklama koşullarında her iki etkin madde ile hazırlanan jellerin şeffaf görüntüsünde 3 ay boyunca bir değişiklik olmamıştır.

CV-KITH3, CV-HPMCK100M2 ve CV-HP407 formülasyonlarının üç ay boyunca izlenen pH değerinde, 4°C'de ve 25°C'de anlamlı bir değişme görülmemiştir (t-test, $p>0.05$). Ancak 40°C'de saklanan CV jellerin pH değerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (t-test, $p<0.05$).

Aynı şekilde sadece 40°C'de saklanan OXB jellerin pH değerindeki artış anlamlı bulunmuştur (Tablo 71-73) (t-test, $p<0.05$).

OXB ve CV jellerin viskozite değerleri ve miktar tayini testleri değerlendirildiğinde, 4°C'de ve 25°C'de salkanan jellerin değerlerinde anlamlı bir değişme gözlenmezken (t-test, $p>0.05$), 40°C'de saklanan OXB ve CV jellerin değerindeki düşmenin anlamlı olduğu bulunmuştur (t-test, $p<0.05$).

CV ve OXB içeren jellerin 3 ay süren stabilite çalışmalarının sonucunda 4°C'de ve 25°C'de saklanan jellerin stabil olduğu, 40°C'de saklanan jellerin özelliklerinin ise istenmeyen şekilde değiştiği için stabil olmadığı bulunmuştur.

6.3.6. Oksibütinin Jel Formülasyonlarının Tavşan Vajinal Dokusundan Geçiş Çalışmasının Değerlendirilmesi

Oksibütinin ile hazırlanan formülasyonların vajinadan uygulaması sonucunda 48 saat süren bir kan konsantrasyonuna ulaşmayı amaçlamaktayız. Bu nedenle in vitro formülasyon çalışmalarımız sonucunda pH, viskozite ve salım özellikleri açısından in vivo çalışmalarda kullanılabileceği düşünülen OXB-KITH3, OXB-HPMCK100M2 ve OXB-HP407 formülasyonlarının tavşan vajinal dokusundan geçiş çalışması, horizontal difüzyon hücresinde yapılmıştır. Şekil 123'de OXB jellerin tavşan vajinal dokusundan geçiş profilleri görülmektedir. OXB-KITH3 ve OXB-HPMCK100M2 formülasyonlarından 48 saat sonunda vajinal dokudan %70-80 arasında geçiş olmaktadır. OXB-HP407 formülasyonu ise 48 saat sonunda yeterli salımı göstermediği için in vivo çalışmalar için

uygun bulunmamıştır. Literatürde kitosan türevlerinin (5-metil-pirolidinon-kitosan gibi) % 4'lük polimer çözeltilerinin reolojik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, formülasyona asiklovir etkin maddesi % 5 konsantrasyonda eklenerek, Franz Difüzyon hücresinde domuz vajinal mukozasından geçiş çalışması yapılmıştır. Sonuçta asiklovirin kitosan türevleri içindeki çözeltisinin mukozadan geçişi, asiklovirin süspansiyon halindeki geçişinden daha yüksek bulunmuştur[143]. Bizim çalışmamızda da tavşan vajinasından OXB geçişi en yüksek kitosan jel formülasyonundan olmuştur.

Bonferoni[130] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kitosan sitrat tuzu ile kitosan hidroklorürün penetrasyon artırıcı etkisi model madde olarak kullanılan asikovir, siprofloksasin ve fluorescein etkin maddeleri ile hazırlanan kitosan jel formülasyonlarında incelenmiştir. Domuz vajinal dokusundan Franz difüzyon hücresinde yapılan çalışmanın sonunda ise kitosan sitrat jelin, etkin maddelerin dokudan geçişlerinde kitosan hidroklorür jel ve etkin madde süspansiyonlarına göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

HPMC K4M kullanılarak jel hazırlanan başka bir çalışmada diflofenak sodyum ve sulfametizolün difüzyonu horizontal difüzyon ünitesinde 0.45μm por çapı olan selüloz asetat membranda incelenmiştir. Etkin maddelerin difüzyonunun HPMC konsantrasyonuna göre değiştiği ve jellerde HPMC oranı arttıkça difüzyonun azaldığı belirtilmiştir[231]. Çalışmamızda, in vitro salım çalışmalarında en iyi sonucu veren, OXB-HPMCK100M2 formülasyonunun horizontal difüzyon ünitesinde tavşan vajinal dokusundan geçiş çalışması yapılmıştır. Çalışmamızın sonunda literatürdeki geçiş profiline benzer bir profil elde edilmiş ve 48 saat boyunca kontrollü salım sağlandığı gözlenmiştir. Sonuçta in vivo uygulama için en uygun formülasyonun OXB-HPMCK100M2 olduğuna karar verilmiştir.

Literatürde mokelül ağırlığı düşük olan lipofilik ilaçların, insan derisinden ve sentetik selofan membranlardan Franz difüzyon ünitesindeki

geçişlerinin büyük moleküllü ve lipofobik ilaçlara göre daha fazla olduğu belirtilmektedir[232]. OXB serbest baz halinde log*P* değeri 4.9 olan lipofilik bir maddedir. OXB hidroklorür tuzu ise suda iyi çözünür ve log*P* değeri pH'dan etkilenir, pH değerindeki azalmaya bağlı olarak log*P* değeri azalır. Örneğin pH 6.2 değerinde OXB hidroklorürün logP değeri 2.89 olarak belirlenmiştir[221].

Oksibütininin molekül ağılığı (394 Da) düşük, sudaki çözünürlüğü pH'ya bağlı olan lipofilik bir ilaçtır. Literatürde pKa değeri 8.04 olarak bildirilmiş ve asit pH'da iyi çözündüğü gösterilmiştir[233]. Bizim çalıştığımız pH 4.5'de çözünürlüğü yaklaşık 100 mg/mL'dir. Horizontal difüzyon ünitesinde yaptığımız tavşan vajinal dokusundan geçiş çalışmalarında, 48 saat sonunda total miktarının ~%80'ni geçmiştir. Lipofilik bir ilaç olan OXB'nin deriden de iyi permeasyon gösterdiği ve 24 saatte %50 den fazlasının deriden geçtiği belirtilmiştir[221].

Dokudan geçiş verileri 1.derece, 2.derece ve Q√t (Higuchi) kinetiklerine uyum açısından incelenmiştir. Bu kinetiklere ait regresyon analizlerinin determinasyon katsayıları ve regresyonun standart hatasına bakıldığında (Tablo 74) geçişin en iyi Q√t (Higuchi) kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

6.4. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

6.4.1. Lipozom Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan, etkin madde içeren ve içermeyen lipozomların ekstruksiyon işleminden önce ve sonra partikül büyüklüğü dağılımı karşılaştırıldığında, işlemin partikül büyüklüğünün homojen hale gelmesinde çok etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca partikül büyüklüğünde anlamlı bir düşme de gözlenmiştir (Şekil 48, 49 ve 124). Ölçtüğümüz partikül büyüklüğü değerlerinin güven sınırları 0.1-0.44 arasında değişirken, polidispersite indeksi bütün formülasyonlar için 1'in

altındadır. Polidispersite indeksi (PI) partikül büyüklüğü dağılımı ile ilgili bir parametre olup 1'in altında olması istenir[234,235]. Bu durum bize partikül büyüklüğü dağılımının homojen olduğunu göstermektedir. Çilek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda da film hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül büyüklükleri ekstruksiyon işleminin sayısına göre belirgin derecede düşmüş ve homojen hale gelmiştir[236,237]. Lipozomların partikül büyüklüğünün ayarlanabilir olması da bir avantajdır[238]. Literatürde film yöntemi ile hazırlanan EGF lipozomlarının partikül büyüklüğü bizim de çalışmalarımızda kullandığımız lazer partikül sizer ile ölçülmüş ve ortalama partikül büyüklüğü 4.44±0.03 µm olarak bulunmuştur[239]. Bizim sonuçlarımıza göre de OXB-FS2 ve CV-FS2 formülasyonları için partikül büyüklükleri 3.97-4.54 µm aralığındadır.

Film yöntemi ile hazırlanan lipozomların zeta potansiyelleri bulunmuştur (Tablo 45 ve 75). Zeta potansiyeli ölçümleri, partikül dispersiyonunun kolloidal stabilitesi hakkında bilgi vermektedir. Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitlerin fonksiyonel gruplarının negatif değerde olması nedeniyle zeta potansiyel genellikle negatif değerdedir[240].

Film yöntemi ile hazırlanan lipozomların ışık mikroskobu görüntüleri de ekstrüksiyon işleminin ne kadar etkili olduğunu Şekil 51a-51b ve Şekil 126'da göstermektedir. Ekstrüksiyon işleminden sonra lipit kesecikler daha belirgin hale gelmiş ve birbirinden ayrılmıştır. Lipozomların çok tabakalı lipozom oldukları anlaşılmıştır. Lipozomların çok tabakalı olması, etkin maddeyi tabakalarının arasına alması ve yavaş salması açısından avantaj oluşturmaktadır.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozom formülasyonları incelendiğinde, ekstrüksiyon işleminden önce partikül büyüklüğü µm boyutunda iken işlemden sonra nm boyutuna düşmektedir (Tablo 45 ve 75). Lipozom formülasyonlarımızı hazırlama işlemleri sırasında her iki etkin madde ile de hazırlanan FS1 ve PS1 lipozomlarının farmasötik karakterlerini iyileştirmek için lipit kompozosyon değiştirilmiş ve hazırlama işlemine dondurup çözme basamağı eklenmiştir. Bu değişiklikler ile her iki

etkin madde ile hazırlanan FS2 ve PS2 lipozomlarının farmasötik karakterleri daha iyi bulunmuş ve bu durum PI'ne de yansımıştır. FS2 ve PS2 lipozomlarının PI'leri daha düşük bulunmuştur.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve etkin madde içeren lipozomların ekstrüksiyon işleminden önce ve sonra partikül dağılımları homojendir. Bu durumu SEM görüntüleri de doğrulamaktadır. Lipit partiküller oldukça belirgin bir şekilde görülmektedir. Şekil 52 ve 54'de CV-P1 ve CV-PS2 lipozomlarının SEM görüntüleri incelendiğinde partikül büyüklüğü ve şekli açısından homojen olduğu görülmüştür. Partikül büyüklüğü nm boyutunda olduğu için daha yakından görüntü alınamamıştır. OXB-P2 ve OXB-PS2 formülasyonlarının da SEM görüntüleri de Şekil 127 ve 129'da gösterilmiştir.

Film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların (F1, CV-F2, OXB-F2) partikül büyüklüğü dağılımı homojen değildir (Şekil 48a, 49a ve 124a). Bunun yanısıra poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların ekstrüksiyon işleminden önce dahi partikül büyüklüğü dağılımı homojen ve dar bir aralıktadır (Şekil 50a ve 125). Bu durumun lipit kompozisyonundan ve özellikle film yönteminde formülasyonlarda kullanılan kolesterolden kaynaklandığı düşünülmektedir. Poliol dilüsyon yönteminde kolesterol kullanılmamıştır.

Partikül büyüklüğünün istenilen büyüklükte olması ve dağılımının homojen olması için lipozom çalışmalarında ekstrüksiyon işlemi yapılmasına karar verilmiştir. Ekstrüksiyon işleminden önceki ve sonraki değerler arasında anlamlı bir fark oluştuğu bulunmuştur (t-test, $p<0.05$).

CV ve OXB içeren lipozomların partikül büyüklüğünün içermeyenlere kıyasla büyük olması, bize CV ve OXB'in lipozom içine girdiğini göstermektedir.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların zeta potansiyeli boş ve CV içeren lipozom formülasyonlarında negatifdir (Tablo 45). Bu formülasyonlarda kolesterol olmadığı için etkin maddenin özelliğine göre zeta potansiyeli değişmektedir. OXB içeren lipozomların ise zeta

potansiyeli pozitif bulunmuştur (Tablo 75). Katyonik olan lipozomların vajinal absorbsiyonunun daha iyi olacağı literatürde bildirilmektedir[211]. Bu literatürde lipozom formülasyonlarına SA eklenerek pozitif yüklü olması sağlanmıştır. Ayrıca, pH 4.5 tampon ortamında ve musin içeren vajinal sıvı ortamında katyonik lipozomların daha kontrollü salım yaptıkları ve daha stabil oldukları da belirtilmektedir.

Etkin madde içeren ve içermeyen lipozomların zeta potansiyelleri karşılaştırıldığında değişimin anlamlı olduğu bulunmuştur (t-test, $p<0.05$), aynı şekilde ekstrüksiyon işleminden önce ve sonra ölçülen zeta potansiyelleri arasındaki fark da anlamlıdır (t-test, $p<0.05$). Formülasyona ilave edilen maddeler veya hazırlama basamaklarındaki değişiklikler lipozomların zeta potansiyel değerlerini değiştirmektedir. Literatürde klotrimazol ve metronidazol model maddelerinin poliol dilüsyon yöntemi ile aynı lipit kompozisyonlar kullanılarak lipozomları hazırlanmıştır. Zeta potansiyel değerleri ise benzer bulunmuştur (-57, -55)[84]. Lipozom formülasyonlarında lipit kompozisyon zeta potansiyel değerini etkileyen önemli faktörlerden biridir.

Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanmış lipozomların yükleme kapasitesi film yöntemi ile hazırlanan lipozomlara göre daha düşüktür (Şekil 55). Yükleme kapasitesi film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-F2 formülasyonunda % 52.4±3.7, poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan CV-P2 formülasyonunda ise % 24.7±1.2 olarak saptanmıştır. Bu durumun formülasyonlarda aynı lipit kompozisyonu kullanıldığı için hazırlama yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lipozom formülasyonlarını iyileştirme çalışmalarında lipit kompozisyonu ve lipit oranları değiştirilmiştir. Bu çalışmaların sonunda film-hidrasyon yöntemi ile hazırlanan CV-FS2 formülasyonunda % 55.7±1.16, poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan CV-PS2 formülasyonunda ise % 41.1±3.22 olarak saptanmıştır. Özellikle CV-P2 formülasyonu ile CV-PS2 formülasyonu yüklenen etkin madde oranı açısından karşılaştırıldığında, belirgin bir yükselme olduğu bulunmuş ve yapılan iyileştirme çalışmaları sonucu başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Aynı değerlendirme OXB içeren lipozomlar için de yapılabilir. OXB-F2 formülasyonunda etkin madde enkapsülasyon yüzdesi %56.2±4.8 olarak bulunurken OXB-P2 formülasyonunda bu oran %32.5±3.6'dır. Lipit kompozisyonları değiştirilerek hazırlanan OXB-FS2 ve OXB-PS2 formülasyonlarının yükleme kapasitesi %49.2±2.4 ve %37.5±3.1 olarak bulunmuştur. Lipit kompozisyonundaki değişiklik poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların enkapsülasyon yüzdesini kısmen arttırmıştır.

Lasic[241] tarafından yapılan bir derlemede, lipozomlarda enkapsülasyon veriminin teorik olarak % 70'in üzerinde olabileceğinin düşünülmesine karşın, bu değerin deneysel olarak sağlanamadığı belirtilmektedir. Enkapsülasyon veriminde % 50 gibi bir değer iyi bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Literatürde de benzer sonuç görülmüştür. Örneğin hidrofilik bir ilaç olan calceinin vajinada kontollü salım yapmak üzere bizim de çalışmamızda kullandığımız yöntemler olan film yöntemi ile ve poliol dilüsyon yöntemi ile lipozomları hazırlanmış ve en yüksek enkapsülasyon oranı %63 olan poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanmış lipozomlardan elde edilmiştir. Film yöntemi ile %10'nun altında bir enkapsülasyon elde edilmiş ancak dondurup çözme işlemi ile enkapsülasyon veriminin arttırıldığı bildirilmiştir[242].

Bölümümüzde yapılan iki farklı tez çalışmasında bizim de çalışmamızda kullandığımız film yöntemi ile lipozomlar hazırlanmıştır. Model madde olarak rivastigmin kullanılan bir tez çalışmasında lipozom içine hapsedilen rivastigmin miktarı ortalama % 35.4 bulunurken, TGF-α'nın oral kullanılmak üzere film yöntemi ile hazırlanan lipozomlarında yükleme kapasitesi % 51.48±3.87 olarak bulunmuştur[243,244].

Model madde olarak klotrimazol, metronidazol ve kloramfenikolün kullanıldığı başka bir çalışmada vajinaya uygulanmak üzere poliol dilüsyon yöntemi ile lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Lipozomlara yüklenen ilaç miktarları tayin edildiğinde klotrimazolün %94, metronidazolün %6 ve kloramfenikolün %30 oranında yüklendiği görülmüştür. Metronidazolün

yükleme kapasitesinin düşük olmasına neden olarak bu maddenin lipofilik ve hidrofilik ortamlarda düşük çözünürlüğe sahip olması gösterilmiştir[245]. Bizim çalışmamızda kullandığımız OXB'nin pH 4.5'de çözünürlüğü oldukça iyidir (~100mg/mL)[233], ayrıca logP değeri 4.9 olup lipofilik ortamlarda iyi çözünen bir ilaçtır[221]. Bu nedenle OXB enkapsülasyon veriminin etkin maddenin çözünürlük parametrelerinden etkilenmediğini düşünmekteyiz. CV'in sudaki çözünürlüğü ise 170 mg/mL'nin üzerinde ve logP değeri -3.9'dur[152,163]. Partisyon katsayısı (log P) negatif olan maddelerin örneğin, CV gibi -3.9 olan, sudaki çözünürlüğü organik solvandaki çözünürlüğünden 1000 kez daha fazladır[246]. Bu bilgiler doğrultusunda lipofobik özelliğinin CV'in yükleme kapasitesini etkileyebileceği düşünülebilir. Literatürde lipofilik ilaçların lipozomların fosfolipit tabakalarına afinite göstereceği için yükleme kapasitesinin artacağı belirtilmiştir[84]. Lipozomların önemli avantajlarından biri hem hidrofilik hem de lipofilik kısımları olduğu için lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler için uygun bir taşıyıcı sistem olmasıdır[247]. Kullandığımız her iki etkin maddenin lipofilik özellikleri farklı olmakla birlikte, enkapsülasyonlarının yakın olduğu görülmektedir. Bu da maddelerin hem sulu hem de lipit tabakalarda tutunduğunu göstermektedir.

Pavelic ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada vajinal uygulama için geliştirilen lipozom formülasyonunda etkin madde olarak asiklovir seçilmiştir. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların enkapsülasyon etkinliği % 23.78±2.30 olarak bulunmuştur. Zeta potansiyeli yani lipozom tabakalarının yüzey yükü, bu tabakalar arasına sulu fazın ve dolayısıyla etkin maddenin ne oranda yükleneceğini belirlemektedir[211]. Bu çalışmadaki lipozom lipit kompozisyonu ve hazırlama yöntemi bizim çalışmamızda hazırladığımız PS1 lipozomuna çok benzemektedir. PS1 lipozomunda CV yükleme kapasitesi % 15.13±1.23 olarak bulunmuştur.

Lipozom gibi veziküler ilaç taşıyıcı sistemlere fiziksel stabiliteyi sağlamak için elektriksel yük kazandıran bileşikler eklenmektedir[248].

Elektriksel yük kazandıran maddeler elektrostatik etkileşmeler meydana getirerek fiziksel stabiliteyi sağlarlar. Biz de bu amaçla lipozom formülasyonlarımıza stearilamin (SA) ilave ettik. SA ilavesi ile hazırlanan lipozomların (FS1, FS2, PS1, PS2) katyonik olduğu görülmüştür. Lipozomların katyonik hale getirilmesi ile daha iyi vajinal absorbsiyon sağlaması amaçlanmıştır. Ayrıca dondurup çözme gibi basamaklar eklenerek enkapsülasyon artırılmaya çalışılmıştır. Literatürde film yöntemi ile hazırlanan ve dondurup çözme işlemi uygulanan lipozomları etkin maddeyi hapsetme oranı artmıştır[249]. Bizim çalışmamızda da katyonik ve enkapsülasyonu kısmen iyi olan formülasyonlar elde edilmiştir.

CV ve OXB ile yapılan lipozom formülasyon çalışmaları ile özellikleri optimize edilmeye çalışılan lipozom formülasyonlarından FS2 ve PS2 lipozomlarının özelliklerinin en iyi olduğu bulunmuştur.

6.4.2. Lipozomlarda Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

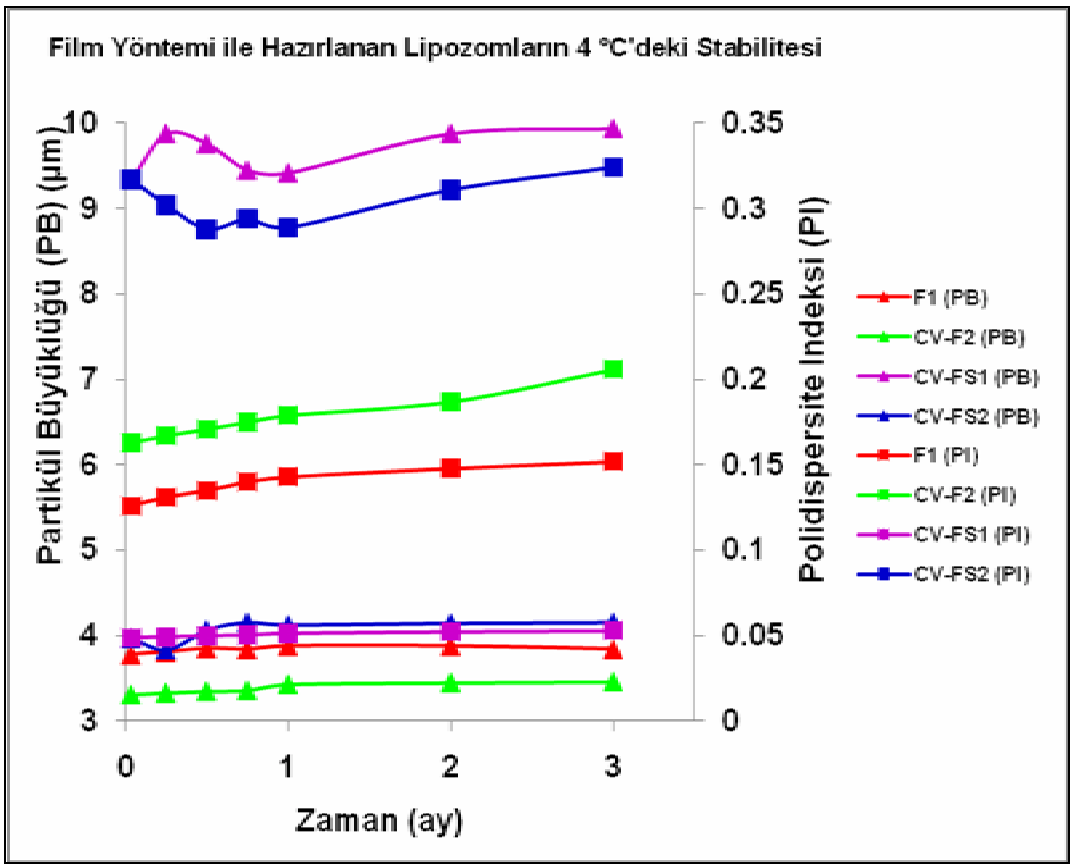
Lipozom formülasyonlarının dezavantajlarından bir tanesi fiziksel ve kimyasal açıdan stabilite sorunlarının sıklıkla görülmesidir. Lipozomların stabilite sorunlarından dolayı raf ömürleri kısadır. Fiziksel dayanıksızlık lipozom içine hapsedilmiş etkin maddenin sızmasına ve ayrıca agregat oluşmasına neden olabilir. Kimyasal stabilite sorunları ise kullanılan lipitlerin yapısına bağlı olarak değişir.

Tez çalışmamız sırasında lipozom formülasyonları 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında saklanmış ve 3 ay boyunca partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve etkin madde miktar tayini yapılmıştır.

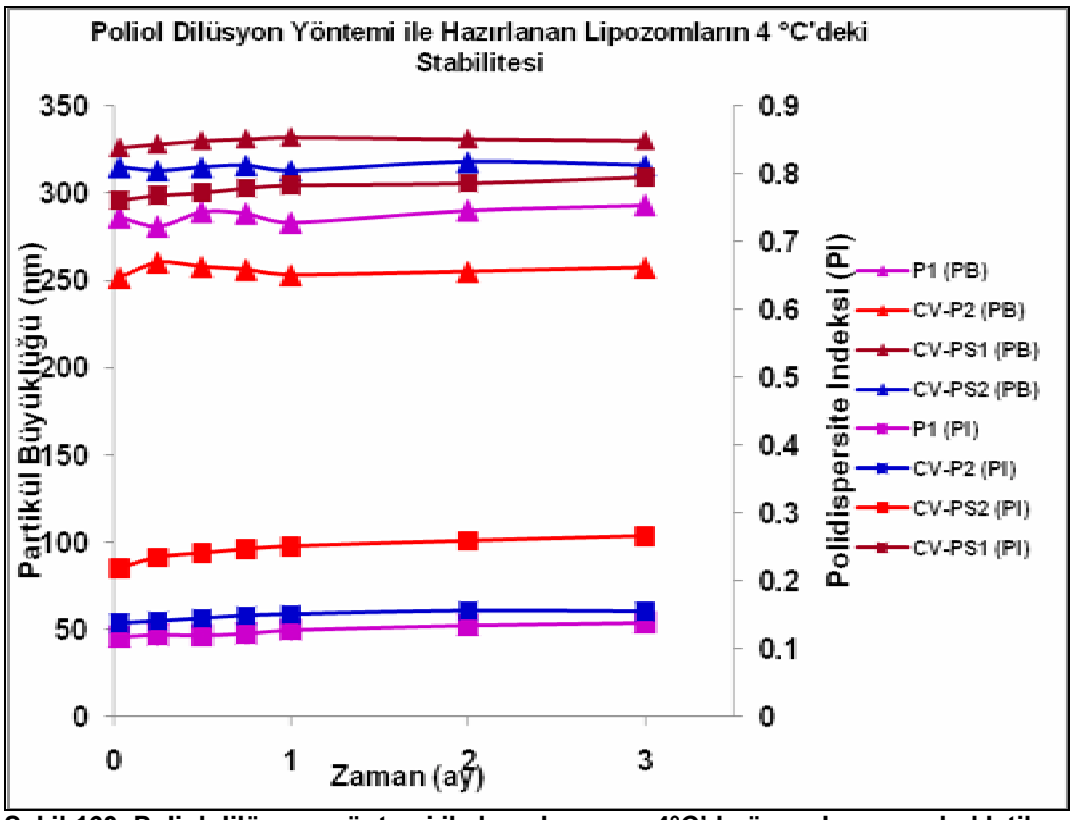
Hazırlanan ve stabilite testlerine tabi tutulan tüm lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ölçümü değerlerine ve güven aralığı verilerine bakıldığında partiküllerin oldukça homojen ve birbirine yakın büyüklükte olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 46, 47, 76 ve 77). Özellikle 4°C'de saklanan lipozomların partikül büyüklüğünde ve zeta

potansiyellerinde 3 ayın sonunda anlamlı bir artış gözlenmemiştir (t-test, p>0.05). Sadece 40°C'de saklanan lipozomların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelinde meydana gelen değişmeler anlamlıdır (t-test, p>0.05).

Stearilamin içeren CV lipozomlarına ait sonuçlar Tablo 48 ve 49'da, OXB lipozomlarına ait sonuçlarda Tablo 78 ve 79'da verilmiştir. Buna göre etkin madde içeren FS1, FS2, PS1 ve PS2 lipozom formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli açısından tüm saklama koşullarında 3 ay boyunca anlamlı bir değişme olmadığı bulunmuştur (t-test, p>0.05). Bu durum film yöntemi ve poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan tüm lipozomlar için, partikül büyüklüğü ve PI açısından değerlendirilmiş Şekil 162 ve 163'deki grafikler çizilmiştir. Şekillerden de anlaşılacağı gibi üç ay boyunca değerlerde anlamlı bir değişme olmamıştır.



Şekil 162. Film yöntemi ile hazırlanan ve 4°C'de üç ay boyunca bekletilen lipozomların partikül büyüklüğü ve PI değerleri. PB:partikül büyüklüğü, PI:polidispersite indeksi



Şekil 163. Poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan ve 4°C'de üç ay boyunca bekletilen lipozomların partikül büyüklüğü ve PI değerleri. PB:partikül büyüklüğü, PI:polidispersite indeksi

SA içermeyen lipozom formülasyonları özellikle 4°C'de, SA içeren formülasyonlar da tüm ortamlarda partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelleri açısından stabil olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak SA içeren lipozomların daha stabil olduğu söylenebilir.

CV ve OXB'in lipozom içindeki stabilitesinin incelendiği çalışmada 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında 3 ay boyunca saklanmış lipozomlardan etkin maddelerin miktar tayini yapılmıştır. Yapılan ölçümlerde % bozunmadan kalan CV ve OXB miktarları hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak elde edilen profiller (Şekil 56-59 ve 131-134) kinetik açıdan değerlendirilerek hangi kinetiğe uygun olarak bozundukları uyum ölçütleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Tablo 50 ve 80'de lipozomların hepsinin 2. derece kinetikle bozundukları görülmüş ve Tablo 94'de raf ömrü değerleri verilmiştir.

Tablo 94. Stabilitesi incelenen lipozomların 4 °C'de raf ömürleri

FORMÜLASYON	RAF ÖMRÜ (gün)
CV-F2	15
CV-FS1	17
CV-FS2	18
CV-P2	20
CV-PS1	22
CV-PS2	23
OXB-F2	13
OXB-FS1	16
OXB-FS2	14
OXB-P2	23
OXB-PS1	22
OXB-PS2	25

Lipozomlara ait raf ömürleri incelendiğinde en yüksek raf ömrünün SA içeren ve dondurup çözme basmağı eklenmiş poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan PS2 lipozomlarına ait olduğu bulunmuştur. Bu formülasyonun raf ömrü diğerlerinden daha uzundur. Yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Örneğin, film yöntemi ile hazırlanan ve IL-2 içeren lipozomlarda IL-2 miktarı bir ay sonunda kabul edilebilir sınırlar içinde bulunurken, rivastigminin ve sodyum taurokolat içeren ve film yöntemi ile hazırlanan lipozomların raf ömrü 4°C'de 21 gün olarak bulunmuştur[236,243].

Lipozomların karakterizasyon çalışmaları sonucunda, amacımıza uygun olarak en iyi özelliklere sahip ve en stabil formülasyonun PS2 lipozomu olduğuna karar verilmiştir

Pavelic ve arkadaşlarının[245] yaptığı bir çalışma da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışmada poliol dilüsyon yöntemi kullanılarak değişik etkin maddelerin formülasyonu hazırlanmış ve kullanılan yöntemin kolay uygulanabilir ve tekrar edilebilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

6.5. Lipozom ve Lipozom-Jel (Lipojel) Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Lipozomlar biyoparçalanır sistemlerdir ve dermatolojide hastalıkların lokal tedavisi için kullanılmaktadır[250]. Aynı zamanda lipozomlar yüklendikleri maddenin uzun süreli salımını gerçekleştirdikleri için tercih edilmektedirler. Lipozomların en önemli dezavantajı vajinal uygulama için sulu bir sistem olmasıdır. Vajinada tutunma ve yayılma lipozom süspansiyonları için çok zordur. Uygun viskoziteyi ve tutunmayı sağlamak amacıyla lipozomlar jel formülasyonları içinde taşınmaktadır[242].

Hazırlanan lipozomların süspansiyon halinde diyaliz membrandan geçiş çalışması incelenmiş ve sonuç profiller Şekil 60 ve 135'da gösterilmiştir. Buna göre 48 saatin sonunda lipozomlar içindeki etkin maddelerin tamamına yakını salınmıştır. En az salım yapan formülasyon 48 saatin sonunda, cidofovir etkin maddesi için CV-PS2 formülasyonu, oksibütinin etkin maddesi için OXB-FS2 formülasyonu olmuş ve %85-90 civarında salım gerçekleştirmişlerdir.

Tablo 9 ve 26'da kodları verilen CV ve OXB lipojellerin salım profilleri Şekil 61 ve 136'da gösterilmiştir. Film-hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ve diğer lipozomlara göre farmasötik karakterleri daha iyi olan CV-FS2 lipozomu ile OXB-FS2 lipozomunun farklı jellerden salımları incelenmiştir. CV-FS2 lipozomu taşıyan lipojellerden en az salımı taşıyıcısı Carbopol jel olan CV-FS2-KR formülasyonu göstermiştir. Bu formülasyondan salım ilk 24 saatte %10.1±0.8 olarak bulunmuştur, 48 saatin sonunda da etkin maddenin tamamı salınmadığı için bu formülasyon amaca uygun bulunmamıştır. Taşıyıcı olarak daha önce üzerinde çalıştığımız kitosan, HPMC, poloksamer kullanılan formülasyonlardan da 48 saat sonunda yeterli salım elde edilememiştir. Bu nedenle bu grup lipojel formülasyonlarının vajinal uygulaması uygun görülmemiştir.

Şekil 136'da OXB içeren lipojellerin salım profiline bakıldığında en fazla salım yapan OXB-FS2-KITH3 formülasyonu 48 saatin sonunda etkin

madde miktarının ancak yarısını salabilmiştir. Bu nedenle bu grup OXB formülasyonları vajinal uygulama için uygun bulunmamıştır.

Aynı yorumlar PS2 lipozomu ve aynı jeller kullanılarak hazırlanan lipojeller için de geçerlidir. CV etkin maddesi için poliol-dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipojellerden de salımın azaldığı ve en az salımın 48 saatin sonunda % 40.4±3.6 ile Carbopol içeren formülasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 62). Poloksamer jel kullanılarak hazırlanan CV-PS2-P407 formülasyonu ilk sekiz saatte % 24.3±5.19 salım yapmaktadır, ancak bu değerin 48 saatin sonunda % 89.4±5.3 olduğu bulunmuştur. CV-PS2-P407 kodlu lipojelin vajinada kontrollü salım için uygun formülasyon olduğu düşünülebilir, ancak bu formülasyonun viskozitesi düşük ve mukoadezyon özellikleri zayıf olduğu için vajinada uzun süreli salım için uygun bulunmamıştır. OXB içeren PS2 lipozomlarını taşıyan jellerin salımına bakıldığında ise (Şekil 137) 48 saatin sonunda salımın %50-60 arasında olduğu görülmüştür. Literatürde klotrimazol ve metronidazolün model madde olarak kullanıldığı ve poliol dilüsyon yöntemi ile lipozomlarının hazırlandığı bir çalışmada lipozomlar Carbopol 974 NF (%1) jel ile taşınmıştır. pH 4.5 ortamında salımı incelenen lipojellerden 24 saatte salım %33-42 civarında olmuştur[84]. Bizim çalışmamızda ise sadece CV ile hazırlanan lipozomlar KR jel ile taşınmıştır. Çünkü OXB ile KR jel geçimsizdir. CV-PS2-KR jelden 24 saatte salım ~%25 civarında olmuştur

Literatürde PS2 ile aynı lipit kompozisyona sahip ve poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların Carbopol jel içinden etkin madde salımı pH 4.5 tampon içinde ilk altı saatte % 27.5±2.2 ve 24 saatte % 78.5±5.8 olarak bulunmuştur[211].

Lipojellerin reolojik özellikleri incelendiğinde ise bütün formülasyonların pseudoplastik akış gösterdiği ve jellerin viskozitesinin lipozom ilavesi ise düştüğü gözlenmiştir (Tablo 52 ve 82). Mourtas[251] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı lipit kompozisyonlarına sahip film yöntemi ile hazırlanan lipozomlar, Carbopol 974NF (%0.4) ve HPMC (%1.5) ile hazırlanan jel ile taşınmıştır. Farklı lipozomları taşıyan bu jellerin

reolojik karakterleri incelendiğinde lipit kompozisyonun reolojik özellikleri etkilediği bulunmuştur. Özellikle kolesterol taşıyan ve lipit konsantrasyonu fazla olan lipozomları taşıyan jelin elastik karakterinin arttığı ve yumuşayarak yayılma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise film yöntemi ile hazırlanan ve kolesterol içeren lipozomların lipit konsantrasyonu poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomlardan daha büyüktür. Ancak film yöntemi ile hazırlanan lipozomların eklendiği jellerin viskozitesindeki azalma poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomları taşıyan jellerden daha azdır. Yani literatürdeki bilginin tersine lipit konsantrasyonu az olan lipozomları taşıyan jellerde daha fazla yumuşama olmuştur. Bunun nedeni poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların jellere süspansiyon halinde ilave edilmiş olmasıdır. Film yöntemi ile hazırlanan lipozomlar ise santrifüjle çöktürüldükten sonra eklenmiştir.

Jain[252] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise film yöntemi ile hazırlanan lipozomlara progesteron yüklenmiş ve lipozomlar poliakrilamid jel ile taşınmıştır. Lipojellerin dişi keçi vajinasından salım çalışması Franz difüzyon hücresinde pH 4.5 ortamında gerçekleştirilmiştir. Lipozom içermeyen jellere göre daha uzun süre salım yapan lipojel formülasyonu sıfır derece kinetikle salım yapmıştır.

Bir çalışmada antifungal bir madde olan klotrimazolün vajinaya uygulanmak üzere film yöntemi ile lipozomları hazırlanmıştır. Bu lipozomlar %2 Carbopol 934 jel içinde vajinaya taşınmıştır. Lipozomların süspansiyon halinde ve jel içinde in vitro salım deneyleri vajinal sıvı ortamında pH 4.2'de yapılmıştır. Çalışmanın sonunda lipozomların jel içinden etkin madde salımı süspansiyon haline göre oldukça yavaş bulunmuştur. Klotrimazol lipozomlarından salım 8 saatte % 70 civarındayken lipozom-jel formülasyonlarından salım 24 saatte % 50 civarında olmuştur[253]. Bizim çalışmamızda da CV-FS2 lipozom formülasyonu ilk 8 saatte %54 civarında salım yaparken CV-FS2-KR lipojel formülasyonunu 24 saatte ~ % 10 salım yapmıştır. Bu durumun

nedeni lipozom içinden salınan etkin maddenin, ikinci bir bariyerle, jel ortamıyla karşılaşması olarak açıklanabilir.

6.6. Mikroküre Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

6.6.1. Mikroküre Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırladığımız formülasyonlarda mikroküre oluşturmada başarılı olunamamıştır (Şekil 63-64). Bu durumun nedeninin kullanılan kitosanın çeşidine ve deasetilasyon derecesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

İyonotropik jelasyon yöntemi kullanarak hazırladığımız T1 sınıfı mikrokürelerin şekilleri ışık mikroskobunda ve SEM ile incelenmiştir. Işık mikroskobu görüntüleri etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar için küresel ve pürüzsüz olarak görülmektedir (Şekil 65, 66 ve 138).

SEM görüntüleri incelendiğinde de CV-T1 ve OXB-T1 formülasyonların küresel olduğu görülmüştür. Ayrıca SEM ile yüzey özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre CV-T1 ve OXB-T1 kürelerinin yüzeyi oldukça düzgün görünmektedir (Şekil 68 ve 139). Xu[254] ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada TPP ile iyonik jelasyon ile oluşturulan mikrokürelerin partikül büyüklüğü 20-200 nm arasında bulunmuş ve TEM görüntülerinde küresel ve düzgün yüzeyli oldukları gösterilmiştir. Farklı molekül ağırlığına ve deasetilasyon derecesine sahip olan kitosanlar ile hazırlanan mikrokürelere sığır serum albümini yüklenmiştir. Kitosanın molekül ağırlığı arttığında yükleme kapasitesinin belirgin bir şekilde arttığı, deasetilasyon derecesindeki artışın ise enkapsülasyon yüzdesindeki artışı daha az etkilediği bildirilmiştir.

Biz kitosan mikroküre formülasyon çalışmalarımızın hepsinde, tez çalışmamız sırasında kullandığımız Kitosan L, Kitosan M ve Kitosan H polimerlerinden molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi en yüksek olan Kitosan H polimerini kullandık.

İyonotropik jelasyon ve iyonotropik emülsiyon jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre lerinin oluşumunda çapraz bağlayıcı ajan olarak TPP kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir. Kitosanın pozitif yüklü amino grubu ile negatif yüklü TPP arasında iyon etkileşmesi olmaktadır. TPP'nin iyonize olma derecesi ise ortamın pH'sına bağlıdır[255,256]. Biz de çalışmamızda nontoksik özelliğinden dolayı çapraz bağlayıcı olarak TPP kullanmayı tercih ettik.

Etkin madde içermeyen ve CV-K1 formülasyonuna ait ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 69 ve 70'de görülmektedir. Hazırlanan bu kürelerin yüzey özelliklerini belirlemek için SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 71 ve 72). Görüntülerden anlaşıldığı üzere etkin madde içermeyen kürelerin yüzeyi CV-K1 küresinin yüzeyinden daha düzgün görünmektedir. OXB-K1 küresinin görüntüsü de ışık mikroskobunda incelendiğinde (Şekil 140) oldukça küresel görünmekte ve SEM görüntüsünde de (Şekil 141) yüzey özelliklerinin oldukça düzgün olduğu görülmüştür. Her iki etkin madde ile hazırlanan K1 mikrokürelerinin SEM görüntüsü (Şekil 72 ve 141) literatürde aynı yöntem kullanılarak hazırlanan felodipin yüklü kitosan mikroküreler ile çok benzerdir[215].

Kompleks koaservasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerini hazırlama sırasında CV-AS4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre formülasyonu olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi (Şekil 73). Buna göre nm boyutundaki partiküllerin yapılarının küresel olduğu ve partikül büyüklüğünün homojen olduğu görülmektedir. Aynı şekil OXB-AS4 formülasyonununda SEM görüntüsü Şekil 142'de verilmiştir.

Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerini hazırlama sırasında CV-BT4 formülasyonunun en iyi özelliklere sahip olan mikroküre formülasyonu olduğu görüldü ve SEM görüntüsü çekildi. Şekil 74'de verilen SEM görüntüsünde partiküller tam olarak anlaşılamamıştır. Buna neden olarak lipozomu kurutma esnasında yapısına zarar verilmiş olunabileceğinin düşünülmesidir. Aynı yöntem ile

hazırlanan OXB-BT4 formülasyonunun SEM görüntüsü Şekil 143'de incelendiğinde partiküllerin küresel ve partikül boyutunun homojen olduğu görülmüştür.

Üretilen mikroküre lerin verimi oldukça yüksek bulunmuştur. Yöntemimizde hazırlama sırasında herhangi bir kayıp olmamıştır (Tablo 53 ve 83).

Kitosan mikroküre lerinin partikül büyüklüğü CV-T1 formülasyonu için 858±3 µm, CV-K1 formülasyonu için 828±5 µm olarak bulunmuştur. OXB içeren T1 ve K1 mikroküre lerinin partikül büyüklükleri de benzer değerdedir. Literatürde de benzer yöntem kullanılarak hazırlanan kitosan mikroküre lerinin boyutu 500-700 µm aralığındadır[215].

Kompleks koaservasyon yöntemi ve sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikroküreleri T1 ve K1 formülasyonlarından daha küçük partikül büyüklüğüne sahiptir.

Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan CV-AS4 formülasyonunun partikül büyüklüğü 639±2 nm, OXB-AS4 formülasyonununki de 1080±9 nm bulunmuştur. Bozkır[216] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pDNA yüklenen ve kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre lerinin partikül büyüklüğü 457-820 nm aralığında bulunmuştur. Aynı çalışmada enkapsülasyon etkinliği %85'in üzerindedir. Çalışmanın sonunda kitosan mikroküre lerinde etkin madde yükleme kapasitesinin kullanılan kitosanın deasetilasyon derecesi ile bağlantılı olabileceği bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda ise işlem etkinliği %64-84 ve %44-74 arasında bulunmuştur (Tablo 53 ve 83).

CV-BT4 formülasyonunun partikül büyüklüğü 831±4 nm'dir. Ayrıca bu formülasyonun işlem etkinliği % 55.2 olarak bulunmuştur (Tablo 53). Literatürde sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan mikroküre lerinin partikül büyüklüğü 1.1-1.5 µm aralığında bulunmuş ve rekombinant interlökin-2 yüklenen mikroküre lerde işlem etkinliğinin % 75-98 arasında olduğu belirtilmiştir[257]. OXB-BT4 formülasyonunun partikül

büyüklüğü 674±4 nm ve işlem etkinliği %64.2 olarak bulunmuştur (Tablo 83 ve 84). Mikrokürelerin PI 1'in altında bulunmuştur. Özellikle AS4 ve BT4 formülasyonlarının PI'nin 0.3'ün altında olması formülasyonların partikül büyüklüğünün homojen olduğunu doğrulamaktadır.

Hazırlanan mikrokürelerin zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nanoseries ile ölçülmüş ve T1 sınıfı kürelerin katyonik, diğer tüm kürelerin anyonik oldukları görülmüştür (Tablo 54 ve 84). Bu durumun hazırlama yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

6.7. Biyoadezif Mikroküre-Jel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

CV ve OXB içeren bütün mikroküre içeren jellerin pseudo plastik akış gösterdiği belirlenmiş ve vizkozite değerleri Tablo 55 ve 85'de verilmiştir. Buna göre içine mikroküre ilave edilen biyoadezif vajinal jellerin viskozitesinde düşme gözlenmiştir, örneğin CV içeren ve % 2 polimer oranına sahip Carbopol jelin viskozitesi 5208 cP iken içine CV-T1 mikroküresi ilave edildiğinde bu değer 4675 cP'e düşmüştür. Mikropartiküler sistemlerin jellere ilave edilmesiyle jellerin bütünlüğü bozulmaktadır.

Mikrokürelerin süspansiyon halinde ve taşındıkları jellerin içinde Franz difüzyon hücresinde diyaliz membrandan geçiş çalışması yapılmıştır. Buna göre Şekil 75'deki CV-T1 mikrokürelerinin etkin madde geçiş profiline bakıldığında, süspansiyon halinde formülasyonların 48 saatte %40'a yakını salınırken mikroküreler jel içinde taşındığında salım daha da azalmaktadır. Özellikle CV-T1-KR formülasyonu 48 saatte %10'nun altında bir salım göstermiştir. OXB içeren T1 mikrokürelerde de durum benzerdir (Şekil 144). K100M ve HP407 jelllerinin içinde taşınan OXB-T1 mikroküreleri 48 saatte %10-15 etkin madde salımı gerçekleştirmiştir. Literatürde benzer yöntem ile hazırlanan kitosan kürelerden sığır serum albümininin salımının 8 güne kadar sürdüğü

belirtilmektedir[254]. Bizim çalışmamızda 48 saat sürecek kontrollü salım amaçlandığı için salım çalışmalarına daha uzun süre devam edilmemiştir.

İyonotropik emülsiyon jelasyon yöntemi ile hazırlanan K1 mikrokürelerinin süspansiyon halinde salımları CV ve OXB için 48 saatin sonunda %50'nin altındadır (Şekil 76 ve 145). K100M ile hazırlanan jel mikroküreler, her iki etkin madde için de en az salımı gerçekleştirmiştir (~%10). Ko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mikrokürelerden etkin madde salımının pH'dan, TPP konsantrasyonundan, kitosanın molekül ağırlığından ve kitosan konsantrasyonundan etkilendiği bildirilmiştir. Literatürde, bizim Tablo 13'de gösterdiğimiz yöntemle hazırlanan mikrokürelerden felodipin salımı 30 saat sonunda en fazla %70 civarında olmuştur[215]. Bizim çalışmamızda da literatürde olduğu gibi K1 mikroküreleri ile uzun süreli salım sağlanmış, ancak 48 saat boyunca salınan etkin madde miktarı yeterli olmadığı için sonuç formülasyon olarak seçilmemiştir.

AS4 grubu mikroküreler nm boyutundadır (Tablo 54 ve 84). CV-AS4 formülasyonu süspansiyon halinde 48 saatte %80'nin üzerinde salım gerçekleştirmiştir (Şekil 77). CV-AS4-KR formülasyonu ise bu gruptaki en az salım yapan formülasyondur ve 48 saatte %55.7±1.9 gibi bir salım yapmıştır (Şekil 78) . OXB-AS4 formülasyonu da 48 saaatte yaklaşık %80 salıma ulaşırken (Şekil 147), OXB-AS4-HP407 formülasyonu 48 saatte en az salımı gerçekleştirmiştir (~%50) (Şekil 148).

Sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemiyle hazırlanan mikroküreler de nm boyutunda oldukları için salımları T1 ve K1 mikrokürelerinden fazladır. CV-BT4 formülasyonu farmasötik karakteri en iyi olan formülasyon olarak seçildiği için farklı jeller içinde taşınarak salım çalışması yapılmıştır (Şekil 80). Profilden de anlaşılacağı üzere 48 saatin sonunda en fazla salımı CV-BT4-KITH3 formülasyonu yapmıştır. OXB-BT4 mikrokürelerinin jellerden salımı incelendiğinde yine kitosan jel içinde taşınan OXB mikroküresinin en fazla salım yaptığını görmekteyiz (Şekil 150). Benzer yöntem kullanılarak hazırlanan kitosan jellerden etkin madde

salımının 3 ay sürdüğü çalışmalar literatürde mevcuttur[257]. Berthold[217] ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise sodyum sülfat ile presipitasyon yöntemiyle hazırlanan mikroküre lerde model madde olarak prednisol sodyum fosfat kullanılmıştır. Salım çalışmasında ilaç/polimer oranına göre salımın değiştiği, polimer oranı arttığında salımın azaldığı ve en fazla salımın 6 saat sonunda %25 civarında olduğu bildirilmiştir.

Bütün kitosan mikroküre lerin jeller içinden salımını değerlendirdiğimizde bütün gruplarda en fazla salımı kitosan jel içindeki mikroküre lerden görmekteyiz. Bu durum kitosan mikroküre lerin asidik yapıdaki kitosan jel içinde daha kolay parçalanmaya uğrayarak daha çok salım yaptığına bağlanmaktadır.

Literatürde kitosanın doğal polimerler arasında pozitif yüzey yüküne sahip bir polimer olarak iyi mukoadezif ve jelleşme özelliği sahip olduğu bildirilmiştir[217,258]. Bizim çalışmalarımızda da vajinaya uygulanmak üzere biyoadezif formülasyonlar geliştirmeye çalıştığımız için kitosan jel ve mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır.

Mikroküre lerin vajinada kontrollü salım yapması ve vajinaya taşınıp orada uzun süreli kalabilmesi için jel formülasyonları içinde taşınmışlardır. Bu mikroküre-jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçiş çalışmaları sonucunda % geçen etkin madde miktarı 48 saat sürecek olan kontrollü bir salım için özellikle BT4 mikroküre lerini taşıyan lipojeller uygun değildir. Salım az olduğu için mikroküre jel formülasyonlarının vajinal uygulama için uygun formülasyonlar olmadığına karar verilmiştir. Ayrıca bu formülasyonların mekanik özelliklerinin ve mukoadezyon gücünün de düşük olması bu kararımızı desteklemektedir.

Literatürde vajinal uygulama amacıyla hazırlanmış ve biyoadezif jeller içinde taşınmış kitosan mikroküre çalışmasına rastlanmamıştır. Vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan biyoadezif mikroküre çalışmasının sadece modifiye edilmiş hyaluronik asit kullanılarak hazırlandığı bildirilmiştir[53].

6.8. Diyaliz membrandan Geçiş Verilerinin Kinetik Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda in vitro diyaliz membrandan geçiş profilleri 0.derece 1.derece ve Q√t (Higuchi) salım kinetiklerine uyum açısından incelenmiştir. Her iki etkin maddenin formülasyonlarının hangi kinetik modele uyduğu belirlenirken regresyon analizlerinin determinasyon katsayıları ve regresyonun standart hatası göz gönünde bulundurulmuştur (Tablo 56 ve 86). Veriler incelendiğinde tüm formülasyonların Q√t (Higuchi) kinetiğine daha iyi uyum sağladığı görülmektedir.

6.9. Biyoadezif Jellerin Texture Profil Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızın bu bölümünde hem etkin madde içermeyen hem de etkin maddeli olarak hazırlanan formülasyonlar TPA diye kısaca söz edebileceğimiz yapı profil analizine tabi tutularak jel sertliği, sıkışabilirliği, adezifliği ve kohezifliği incelenmiştir.

Sertlik, jele uygulanan kuvvet sonucunda oluşan deformasyonu tanımlar ve vajinaya uygulamada rahatlık için düşük olması istenir[259]. Bizim çalışmamızda en düşük sertlik değeri KITH3 jelde elde edilmiştir (Tablo 57 ve 87). En yüksek sertliğe ise HPMC jeller sahiptir. Etkin madde, lipozom ve mikrokürelerin jele ilave edilmesiyle sertlik değerlerinde artış görülmüştür.

Jellerin sertlik özelliğine paralel olarak, sıkıştırılabilirlik değerinin de jelin ambalajdan kolay çıkması ve vajinada iyi yayılabilir olması için düşük olması istenir[260]. Bizim çalışmamızda en düşük sıkışabilirlik değeri KITH3 jelde elde edilmiştir (Tablo 57 ve 87). En yüksek sıkışabilirliğe ise HPMC jeller sahiptir. Etkin madde, lipozom ve mikrokürelerin jele ilave edilmesiyle sıkışabilirlik değerlerinde artış görülmüştür. Literatürde jel formülasyonlarındaki polimer konsantrasyonunun artışına bağlı olarak sertlik ve sıkışabilirlik değerinin artacağı bildirilmiştir[261].

Jellerin elastikiyet değerinin yüksek olması deforme halden eski haline dönebilmesi için gereklidir[262]. Jellerin dokuda iyi adezif özellik gösterebilmesi için elastiklik değerinin yüksek olması gereklidir Elastik polimer zincirleri polimer ve mukus arasında güçlü adezif bağ kurmaktadır[263]. Bizim çalışmamızda mekanik özellikleri karşılaştırılan jeller arasında elastikiyet özelliği en iyi olan jel K100M jelidir (1.067±0.057). Etkin maddelerin ilavesi ile jellerin elastikiyet değerinde düşme olduğu bulunmuştur (CV-K100M: 0.908±0.071, OXB-K100M: 0.826±0.011).

Vajinaya uygulanacak bir jelin kohezifliğinin yüksek olması ürünün bütünlüğü için gereklidir. Bizim üzerinde çalıştığımız jel formülasyonlarında kohezif özellik büyükten küçüğe doğru şöyledir: K100M jel>C974P jel>HP407 jel>KITH3 jel. Bu sıralama aynı zamanda jellerin viskozitesinin de büyükten küçüğe doğru sıralamasıdır. Yani viskozitesini en yüksek bulduğumuz K100M ve C974P jellerin koheziflik değerleri de en yüksektir. Etkin madde, lipozom ve mikrokürelerin jele ilave edilmesiyle kohezif özelliğin azaldığı görülmüştür.

Jellerde adeziflik değerinin dokuya tutunabilmesi için yüksek olması istenir. Bizim çalışmamızda koheziflik ve elastikiyet özellikleri en yüksek bulunan K100M jelinin adeziflik değerleri de en yüksektir. Etkin madde, lipozom ve mikrokürelerin jele ilave edilmesiyle adeziflik değerleri düşmüştür.

Uygun bir mukoadezif jel formülasyonu düşük sertliğe, düşük sıkışabilirliğe, yüksek adezif ve kohezifliğe sahip olmalıdır. Elde edilen verilere göre CV-K100M ve OXB-K100M formülasyonları mekanik özellikleri açısından vajinal uygulama için en uygun formülasyonlardır.

Cevher ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Carbopol C974P polimeri kullanılarak (%1.8, 2.8 ve 3.8 oranında) hazırlanan jellerin mekanik özellikleri incelenmiştir. Buna göre polimer konsantrasyonunun artması ile jellerde adezif ve kohezif özelliğin arttığı bildirilmiştir. Polimer oranı % 1.8 olan C974P formülasyonunun adeziflik değeri 0.272 ± 0.013 (N.mm), koheziflik değeri de 0.954 ± 0.046 olarak bulunmuştur[149]. Bizim

çalışmamızda ise %2 oranında C974P polimeri içeren CV-KR formülasyonunun adeziflik değeri 1.129±0.316 (N.mm), koheziflik değeri de 0.901±0.027 olarak bulunmuştur. Bu bulgular literatürdeki bilgileri desteklemektedir yani polimer oranının artması ile adezif ve kohezif özellik artmıştır.

Benzer bir çalışmada ekonazol nitrat model madde olarak seçilmiş ve vajinaya uygulanmak üzere poloksamer 407 ve poloksamer 188 kombine edilerek jel formülasyonları hazırlanmıştır. Poloksamer 188 konsantrasyonu yüksek olan formülasyonlarda sertlik, sıkışabilirlik ve adeziflik özelliklerinin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca aktif molekülün de formülasyonların mekanik özelliklerini etkilediği, ekonazol nitrat içeren jellerin TPA testlerinde bulunan sonuçların, etkin madde içermeyen jellere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir[228]. Bizim çalışmamızda da CV ve OXB ilave edilen jellerin mekanik özelliklerinde etkin madde içermeyen jellere göre düşme olduğu bulunmuştur. Etkin madde içermeyen HP407 jelimizin adeziflik değeri 0.463±0.109 bulunurken bu değer etkin madde eklenmiş CV-HP407 ve OXB-HP497 formülasyonları için 0.429±0.081 ve 0.385±0.092 olarak bulunmuştur (Tablo 57 ve 87). Sonuç olarak etkin madde ilave edilen jellerin adezif özelliği ilave edilmeyenlere göre daha düşük bulunmuştur.

6.10. Mukoadezyon Çalışmalarına Ait Bulgular

TA.XT.Plus Texture Analyser ile geliştirilen biyoadezif preparatların mukoadezyon işinin ölçülmesi için öncelikle yöntem geliştirilmiştir. Bunun için çeşitli parametrelerin değerleri değiştirilerek yöntem valide edilmiş ve sonuçta ölçümlerin yapılacağı standartlar belirlenmiştir (Tablo 61). Bu çalışma sırasında daldırma sıvısı, prob hızı, probun uyguladığı kuvvet ve mukoza ile temas süresi gibi test parametreleri incelenmiş ve farklı değerler uygulanarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Her test parametresi için denenen farklı değerlerden ne en yüksek ne de en düşük değer seçilmemiştir. Genellikle ortalama olan değerlerde karar kılınmıştır.

Örneğin mukoza ile örneğin temas süresi olarak üç farklı süre (60 sn, 150 sn, 300 sn) denenmiş ve bunlardan 150 sn'nin kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde vajinal jellerin mukoadezyon çalışmasının validasyonunu bizim kullandığımız yöntem ile yapıldığında, test parametreleri belirlenirken orta değerlerin seçildiği vurgulanmıştır[52].

Yöntemin standartları belirlendikten sonra etkin madde içeren ve içermeyen jellerin ölçümleri yapılmıştır. Carbopol, HPMC, kitosan ve HPMC-POL jellerinin mukoadezyon ölçümlerinde kuvvet, iş ve mukoadezyon işi ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Etkin madde içermeyen bu jellerin arasında mukoadezyon işinin en yüksek olduğu jel HPMC olarak bulunmuştur (Şekil 100 ve Tablo 62). Mukoadezif tabletlerin hazırlandığı bir çalışmada polimer olarak HPMC K4M, HPMC 100 cps, Carbopol 934, NaCMC, guar gum ve polivinilpirolidon kullanılmıştır. HPMC K4M'in maksimumum biyoadezyon gösterdiği bulunmuştur[264]

Vajinal uygulanması amaçlanan jellerin mukoadezyon özellikleri vajinada kalış süresi açısından oldukça önemlidir. HPMC K4M ve Poloksamer 407 kombine edilerek hazırlanan rektal jellerin mukoadezyon özelliklerinin texture analyser ile ölçüldüğü bir çalışmada, jel formülasyonundaki HPMC oranının % 0.5'den %1'e çıkması ile mukoadezyon işi 0.3±0.1 mj/cm^2'den 0.4±0.1 mj/cm^2'ye çıkmıştır[265]. Bizim HP407 formülasyonumuz hazırlanırken % 0.5 oranında HPMC K100M kullanılmış ve ölçülen mukoadezyon işi değeri 0.206±0.040 mj/cm^2 olarak bulunmuştur.

Çalışmamız sırasında her iki etkin madde ile hazırlanan kitosan jellerin mukoadezyon gücü, Carbopol ve HPMC ile hazırlanan jellerden düşük bulunmuştur (Tablo 63 ve 88). Etkin madde içermeyen KITH3 formülasyonunun mukoadezyon işi 0.176±0.017 mj/cm^2 olarak bulunurken, etkin madde içeren CV-KITH3 formülasyonu için 0.362±0.015 mj/cm^2 ve OXB-KITH3 formülasyonu için 0.330±0.022 mj/cm^2 olarak bulunmuştur. Etkin madde içeren kitosan jellerin mukoadezyon gücü daha yüksektir. Benzer bir sonuç Değim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da

bulunmuştur. Bu çalışmada taurin içeren ve içermeyen %1.5 oranında polimer ile hazırlanmış kitosan jellerin gerilme kuvveti (tensile strength) ölçülmüş ve en yüksek değer taurin içeren kitosan formülasyonunda bulunmuştur (~6 $N.cm^{-1}$)[266].

CV ile yapılan mukoadezyon çalışması sonucunda HPMC K100M (0.647±0.067 mj/cm^2) ve Carbopol® 974P (0.552±0.038 mj/cm^2) ile hazırlanan jellerin mukoadezyon özelliklerinin birbirine yakın ve diğer jellerden yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 103). En yüksek mukoadezyon işi Carbopol ile hazırlanan CV jel formülasyonunda elde edilmiştir. Değim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Carbopol 934 ve Polikarbofil kullanılarak hazırlanan bukkal tabletler hazırlanmış ve mukoadezyon gücü sığır bukkal mukozasında ölçülmüştür. Instron-model 4301 cihazında yapılan mukoadezif güç ölçümlerinde, Carbopol 934 oranı yüksek olan formülasyonun mukoadezyon gücü (493±40 mg/cm^2) en büyük bulunmuştur[267].

CV ile yapılan in vitro çalışmalar değerlendirildiğinde 48 saat boyunca kontrollü salım sağlayan ve mukoadezyon işi yüksek olan en iyi formülasyonun CV-K100M formülasyonu olduğuna karar verilmiştir. OXB içeren jeller içinde de en yüksek mukoadezyon işi OXB-K100M formülasyonu ile elde edilmiştir (Tablo 88). Lipozom ve mikrokürelerin jele ilave edilmesiyle mukoadezyon işi değerinde düşme gözlenmiştir (Tablo 63 ve 88).

6.11. CİDOFOVİRİN SIĞIR HERPES VİRÜSÜ ÜZERİNDEKİ ANTİVİRAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Cidofovirin antiviral etkinliğinin araştırıldığı çalışmamızda etkin madde ve onun taşıyıcısı olan jellerin öncelikle VERO hücre hattı üzerinde sitotoksik olup olmadığı araştırıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular sayesinde VERO hücre hattına toksik etkisi olmayan etkin madde konsantrasyonu ve jel taşıyıcı belirlenmiştir. Belirlenen etkin madde konsantrasyonu (10^{-3} sulandırma) ve taşıyıcı jel (HPMC) antiviral

aktivitenin araştırıldığı çalışmada kullanılmıştır. Böylece VERO hücre hattı üzerine ekilen BHV'nin VERO hücrelerine olan etkisi tam olarak anlaşılabilmektedir.

Çalışmanın ilk basamağında biyoadezif 4 adet jel (Carbopol, kitosan, HPMC ve Pol-HPMC) VERO hücre hattının üzerine doğrudan uygulandı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün jellerin hücreler üzerinde sitotoksik olduğu bulundu (Resim 17-21).

Bu çalışmanın ardından uygulama şartlarını daha iyi taklit etmesi açısından tercih edilen Agar Overlay Test yöntemi kullanılarak sitotoksisite araştırması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda konrol grubu ile karşılaştırıldığında HPMC jel uygulanan hücrelerde sitotoksik etkiye rastlanmazken diğer jellerin yine toksik oldukları gözlenmiştir (Resim 22-25).

İn vitro deney sonuçlarımıza göre Carbopol 974P ve HPMCK100M ile hazırlanan jel formülasyonlarımız, gerek kontrollü salım açısından gerekse mukoadezyon özelliği açısından iyi sonuç vermiş olan formülasyonlardır. Ancak hücre kültürü sonuçlarımıza göre uygun taşıyıcı jel olarak HPMCK100M ile hazırlanan jel sonuç formülasyon olarak seçilmiştir. Bunun nedeni Carbopol 974P ile hazırlanan jelin hücre kültüründe toksik etki göstermesidir. Uygun taşıyıcı jel olarak HPMCK100M tespit edildikten sonra etkin madde olan cidofovirin VERO hücre hattına toksik olmayan konsantrasyonu bulunmuştur. Bunun için %1'lik CV çözeltisi DMEM ortamında seyreltilerek hüvreler üzerine uygulanmış ve 10^{-3} konsantrasyondan itibaren toksik olmadığı bulunmuştur. Antiviral etkinlik çalışmasında toksik olmayan en yüksek CV konsantrasyonu (10^{-3}) kullanılmıştır. Son olarak BHV-1 virüsü, VERO hücre hattı üzerine ekilmiş ve kontrol grubu ile antiviral CV uygulanan gruplar karşılaştırılmıştır. HPMCK100M jel taşıyıcı içinde uygulanan CV'nin BHV-1 replikasyonunu in vitro şartlarda 2 log basamağından daha fazla bloke ettiği görülmüştür. Kontrol grubunda ise VERO hücreleri BHV-1

tarafından lizise uğratılmıştır. Sonuç olarak hazırladığımız CV içeren HPMCK100M jelin antiviral etkinliği kontrol grubuna göre kanıtlanmıştır.

6.12. Oksibütininin İn Vivo Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

6.12.1. HPLC ile OXB'nin Tavşan Serumundan Analizinin Değerlendirilmesi

HPLC'de OXB'nin tavşan serumundan miktar tayini validasyonu için yaptığımız çalışmalarda, doğruluk için hesaplanan tüm % bağıl sapma sonuçları %2'nin altındadır (Tablo 89). Deney içi kesinlik bulguları değerlendirilmiş ve sonuçta % bağıl sapma 1.34 olarak elde edilmiştir (Tablo 90). Deneyler arasında, kalibrasyon doğrusu sürekli olarak kontrol edilmiş ve büyük bir sapma tespit edilmemiştir (Tablo 91). Metot özgün bulunmuş ve stabilite deneyleri sonucunda da 48 saatte olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 155 ve 156). Sonuç olarak OXB'in tavşan serumundan analizi için yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

6.12.2. Tavşanlara Üropan Tablet ve Vajinal Jel Uygulaması Sonucu Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmada öncelikle oral Üropan tabletin oral ve bizim hazırlamış olduğumuz kontrollü salım yapan biyoadezif OXB-K100M ve OXB-KITH3 jellerinin ve OXB çözeltisinin vajinal uygulaması yapıldı ve kan konsantrasyonları belirlendi (Şekil 157-161). 24 saatte bir uygulanan 5 mg OXB içeren oral hemen salım yapan Üropan tablet (48 saatte toplam 10 mg verilmiştir) ile 10mg OXB içeren ve 48 saatte bir uygulanan vajinal jellerin biyoyararlanımlarının karşılaştırılması için doğrusal trapez yöntemi kullanılarak hesap yapılmış ve aynı veriler NCOMP adlı programda hesaplatılarak Tablo 92'de karşılaştırılmıştır. Her iki yöntem ile hesaplanan AUC değerlerinin birbirine yakın oldukları gözlenmiştir. Vajinal uygulama ile elde edilen AUC değerinin oral Üropan tablete göre daha yüksek

olduğu bulunmuş ve bağıl biyoyararlanımları OXB-K100M formülasyonu için %179, OXB-KITH3 formülasyonu için %119 ve OXB çözeltisi için %12 olarak hesaplanmıştır.

T_{max} süreleri değerlendirildiğinde ise jellerin 5.66-6 saatte maksimum kan konsantrasyonunu oluşturduğunu gördük. Oral üropan tabletin T_{max} süresi 1 saat olup, ortalama C_{max} değeri ise 7.46 - 8.12 ng/mL aralığındadır. Biyoadezif vajinal jelin C_{max} değeri ise 3.53 - 5.51 ng/mL bulunmuştur. Oral Üropan tablet yüksek kan konsantrasyonu oluşturmuş ama bu durum çok kısa sürmüştür. Vajinal jelin ise ulaştığı kan konsantrasyonu tablete göre daha düşüktür ancak ulaşılan kan konsantrasyonu seviyesi uzun sürdüğü için daha biyoyararlı olduğu bulunmuştur. OXB çözelti halinde vajinadan uygulandığında absorbsiyonun çok düştüğü gözlenmiş ve C_{max} değerininde daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 92).

Literatürde vajinal uygulanan OXB'in vajinal yoldan oldukça etkili olduğu ve inta-arteriyal asetilkolin stimülasyonunu engelleyerek idrar kesesinin kasılmasını inhibe etttiği belirtilmektedir. Dişi Yeni Zelanda tavşanları üzerinde yapılan çalışmada OXB, 1.5 gr ve 0.5 gr konsantrasyonlarda 3 mL jel içinde uygulanmış ve farmakolojik parametreler incelenmiştir. Sonuçta OXB'in vajinal yoldan hızlı bir şekilde absorbe olduğu ve düşük dozda bile tavşanlar üzerinde etkisinin oldukça iyi olduğu farmakolojik testler ile kanıtlanmıştır[268]. Bizim çalışmalarımız da elde ettiğimiz dokudan geçiş ve in vivo kan konsantrasyonu bulguları OXB'in vajinal dokudan iyi emildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak vajinal uygulandığında kontrollü salım yapan ve 2 gün boyunca salımını sürdüren jel formülasyonlarımız, oral Üropan tabletten daha biyoyararlı bulunmuştur.

Gupta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada[206] oksibütininin günde bir adet uygulanan kontrollü salım yapan preparatı (OROS®) ile hemen salım yapan tableti 13 sağlıklı gönüllüye uygulanmış ve farmakokinetik parametreleri elde edilmiştir. 4 gün süren çalışmada kontrollü salım yapan

tablet günde bir uygulanırken hemen salım yapan tablet 8 saatte bir uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda AUC hesapları yapılmış ve kontrollü salım yapan tabletin diğerine göre %153 daha biyoyararlı olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da kontrollü salım yapan formülasyonun daha biyoyararlı olduğu bulunmuştur.

McCrery ve Appell'in[269] yaptığı bir derlemede overaktif mesane tadavisinde ilk akla gelen antimuskarinik madde olan OXB'in yan etkilerinden dolayı alternatif veriliş yolları değerlendirilmiştir. OXB'in hemen salım yapan formundan absorbsiyonun hemen gerçekleştiği (t_{max}:0.5-1 saat) ancak ilk geçiş etkisine uğradığı bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da hemen salım yapan Üropan tabletin tavşanlarda t_{max} süresi 1 saattir. Kontrollü salım yapan OXB preparatları değerlendirildiğinde, uzatılmış salım yapan OROS® formülasyonunun biyoyararlanımı %153 oranında arttırdığı ve tmax süresinin 11-13 saat arasında olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda vajinal uygulanan kontrollü salım yapan jel formülasyonlarının bağıl biyoyararlanımı %179-119 oranında arttırdığı ve tmax süresinin 5-6 saat arasında olduğu bulunmuştur.

Vajinal cisimden OXB absorbsiyonunun incelendiği bir çalışmada tavşanlarda OXB kan konsantrasyonu belirlenmiştir. Oniki adet Yeni Zelanda tavşanının kullanıldığı çalışmada her grupta 3 tavşan olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur. Anestezi altındaki tavşanların vajina duvarına, günlük salımları 0.5mg, 1mg ve 5mg olacak şekilde ayarlanan silikon yapısındaki OXB içeren cisimler dikilmiştir. Yedi gün boyunca tavşanlarda OXB kan konsantrasyonu izlenmiştir. Uygulanan günlük doza göre kan konsantrasyonunun değiştiği ve en yüksek dozda en yüksek kan konsantrasyonuna ulaşıldığı belirtilmiştir. Günlük OXB salımı 5mg olan cisim 7 gün boyunca 16-22 ng/mL arasında kan konsantrasyonu oluşturmuştur[208]. Bizim çalışmamızda ise günlük OXB salımı 5mg olan OXB-K100M jelin oluşturduğu maksimum kan konsantrasyonu 5.51 ng/mL'dir. Bu durumun jelin vajinaya uygulama biçimi ile ilgili olduğunu

düşünmekteyiz. Vajina duvarına dikilen bir cisimden, içerdiği tüm OXB miktarı vajinaya salınmakta ve dolayısıyla emilmektedir, yani vajinal cismin vajinada kalış süresi çalışmanın sürdüğü 7 gündür. Bizim biyoadezif jel formülasyonlarımızın bir kısmının vajinadan geri akmış olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda OXB kan konsantrasyonunun daha düşük bulunması bu şekilde açıklanmaktadır.

OXB'nin tablet, şurup ve transdermal preparatları dünya piyasasında bulunmaktadır. Bunlardan hemen salım yapan tabletlerin 5 mg OXB içerdiğini, uzatılmış etki gösteren tabletlerin ise 5, 10, 15 mg OXB içerdiğini görüyoruz. Hemen salım yapan 5 mg OXB içeren tabletlerin farmakokinetik parametrelerine baktığımızda; oral uygulamada ilk geçiş etkisine uğradığı ve metabolitine dönüştüğü bildiriliyor. Metaboliti farmakolojik yönden aktif, ancak kuvvetli yan etki gösteriyor. Biyoyararlanımının %6, dağılma hacminin 193 L, plazma proteinlerine bağlanma oranının %99, plazma yarı ömrünün 2-3 saat, klirensin 25-35 L/h, günlük uygulanabilecek terapötik aralık dozu 5-20 mg/gün'dür[270].

6.13. Tavşan Vajinal Dokusunun Histolojik Değerlendirilmesi

Resim 26-28'deki herhangi bir uygulama yapılmamış tavşanlara ait vajinal epitel doku çok katlı yassı yapıdadır.

Resim 29-31'de ise OXB çözeltisinin vajinal olarak uygulandığı tavşanların vajinal dokularının histolojik sonuçları görülmektedir. Bu resimlerde en üst sıradaki yassı hücrelerin şekil değiştirerek prizmatik hale geldiği, üst yüzünde mikrovillus benzeri yapılar oluştuğu ve sitoplazmanın irili ufaklı vakuollerle dolduğu ve metaplaziye yakın bir hücre dejenerasyonunun geliştiği görülmüştür.

OXB-HPMCK100M formülasyonu uygulanmış tavşanların vajinalarında yapılan histolojik incelemeye ait bulgular Resim 32-34'de görülmektedir. Bu resimlerde en üst sıradaki yassı hücrelerin prizmatik hale geldiği, hücrelerin şekil değiştirdiği ve oldukça iri vakuollerin oluştuğu

gözlenmiştir. Vakuollerin daha fazla etkin maddeyi taşımak için büyük olduğu ve dolayısıyla bu grupta absorbsiyonun daha fazla olduğu görülmektedir.

OXB-KITH3 formülasyonu uygulanmış tavşanların vajinaları histolojik olarak incelenmiş ve sonuçlar Resim 35-37'de gösterilmiştir. bu sonuçlara göre kitosan jel formülasyonundan emilimin hücreye daha az zarar vererek gerçekleştiği görülmüştür. Vakuoller daha küçüktür ve madde düzgün bir şekilde iletilmiştir. En üst sıradaki yassı hücrelerde değişme olmadığı, prizmatik hücrelerin oluşmadığı belirlenmiştir. Bu bulguların ışığında kitosanın koruyucu etki yapmış olabileceği düşünülmüştür.

6.14. Tavşanların Çene Altı Tükrük Bezlerinde Oksidatif Etkinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada oksibutinin farklı uygulama şekillerinin hedef organlardan biri olan çene altı tükürük bezlerine olan oksidatif etkisi araştırılmıştır.

Oksibutinin düz kaslar üzerine direkt etkisi spazm gidericidir. Ayrıca oksibutinin, asetil kolinin düz kaslar üzerindeki muskarinik etkisini inhibe etmektedir. Tükürük bezlerinde bu ilacın etkisi M1 ve M3 reseptörleri üzerinden olmaktadır. İlacın bu reseptörler üzerine blokajı sonucu tükürük sekresyonu azalmakta ve ağız kuruluğu ilacın yan etkisi olarak ortaya çıkmaktadır[271,272].

İlaçların metabolizmaları esnasında bir takım oksidatif olaylar gerçekleşmektedir. Bu oksidatif olaylar esnasında serbest radikaller oluşmakta ve oluşan bu serbest radikallerin canlı sistemde etkileri daha ziyade biyomoleküller ve DNA üzerinde olmaktadır[273]. Ortaya çıkan bu serbest radikaller lipitler üzerine etki ederek lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun son ürünü de malondialdehit (MDA)tir.

Oral uygulamaya alternatif olarak denenen iki farklı vajinal uygulamada da (OXB-HPMCK100M2 ve OXB-KITH3) tükürük bezi MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu. Bu sonuçlar bize ilacın vajinal kullanımının tükürük bezlerinde lipit peroksidasyonunu azalttığını göstermektedir.

Aynı şekilde enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan glutatyon (GSH) düzeyleri değerlendirildiğinde oral uygulamada diğer iki gruba göre artmış GSH düzeyleri tespit edildi. Bu sonuç artmış lipit peroksidasyonunu ortadan kaldırmak için GSH düzeyinin de arttığını göstermektedir.

Hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde rol alan nitrik oksit (NO) düzeyleri değerlendirildiğinde tüm uygulamalarda NO düzeyinin istatistiksel anlamda değişmediği gözlendi. Oksibutinin bu dozlar ve uygulama şekilleri tükürük bezi nitrik oksit düzeylerini etkilememektedir.

7. SONUÇ

Kontrollü salım yapan biyoadezif yeni vajinal ilaç şekillerinin geliştirilmeye çalışıldığı tez çalışmamızda, cidofovir ve oksibütinin adlı etkin maddeler ile, in vitro ve in vivo çalışmalara ait sonuçlar aşağıdaki gibi bulunmuştur:

- **Biyoadezif jel çalışmalarının sonuçları:**
  - Kitosan ile ön formülasyon ve formülasyon çalışmalarımız sonunda CV ve OXB içeren jeller hazırlanmış, in vitro kontrolleri yapılmıştır. Diyaliz membrandan geçiş çalışmalarında hedeflenen kontrollü salıma ulaşılamadığı görülmüştür.
  - Carbopol ve polikarbofil kullanarak hazırladığımız jel formülasyonları sadece CV etkin maddesi ile çalışılmıştır, çünkü poliakrilat yapısındaki polimerler ile OXB'in geçimsiz olduğu görülmüştür. CV içeren ve Carbopol® 974P ile %2 polimer oranı kullanılarak hazırlanan formülasyonunun in vitro kontrolleri yapılmış ve bizim amaçladığımız 48 saat süren kontrollü salım için uygun bulunmuştur. Ancak mukoadezyon testlerinde inek vajinasına yapışma kuvveti HPMC jellerden daha düşük bulunduğu için sonuç formülasyon olarak belirlenmemiştir.
  - HPMC ile CV ve OXB içeren jeller hazırlanmış ve farmasötik kontrolleri yapılmıştır. % 2 HPMC K100M polimeri içeren jelin diyaliz membrandan geçişi incelendiğinde etkin maddeler için uygun kontrollü salımı 48 saat boyunca gösterdiği ve mukoadezyon kuvvetinin de diğer jellerden yüksek olduğu bulunmuştur.
  - CV ve OXB etkin maddeleri pH 4.5'de çözünürlük sorunu olmayan maddelerdir. Bu nedenle diyaliz membrandan geçiş çalışmalarını etkileyen tek parametre etkin maddeleri taşıyan formülasyonun şeklidir.

✶ **Biyoadezif lipojel çalışmalarının sonuçları:**

- Lipozom formülasyonlarındaki lipit kompozisyonlar değiştirilerek ve hazırlama yöntemine dondurup-çözme basamağı eklenerek lipozomların farmasötik karakterlerindeki iyileştirme çalışmaları başarıya ulaşmıştır.
- Formülasyona katyonik özellik kazandıran SA eklenmesi ile pozitif yüke sahip ve stabilitesi kısmen daha iyi olan formülasyonlar elde edilmiştir.
- Lipozomların stabilitesi üç ay boyunca farklı ortamlarda incelenmiş ve en stabil CV-PS2 ve OXB-PS2 formülasyonlarının raf ömürleri 23-25 gün olarak bulunmuştur.
- Sonuçta SA içeren ve poliol dilüsyon yöntemi ile hazırlanıp dondurup çözme uygulanan lipozomların özelliklerinin daha iyi olması nedeni ile jel formülasyonlarının içine konularak lipozom-jel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu lipozom formülasyonlarının süspande halde diyaliz membrandan geçişleri incelendiğinde 48 saat boyunca etkin maddelerin tamamını salmadıkları gözlenmiş ve sonuç formülasyon için uygun bulunmamıştır.

✶ **Biyoadezif mikroküre-jel çalışmalarının sonuçları:**

- Mikrokürelerin vajinada kontrollü salım yapması ve vajinaya taşınıp orada uzun süreli kalabilmesi için jel formülasyonları içinde taşınmışlardır. Bu mikroküre-jel formülasyonlarının diyaliz membrandan geçiş çalışmaları sonucunda % geçen etkin madde miktarı 48 saat sürecek olan kontrollü bir salım için uygun bulunmamıştır. Özellikle BT4 mikrokürelerini taşıyan jeller 48 saatte çok az salım gerçekleştirmiştir. Ayrıca bu formülasyonların mekanik özelliklerinin ve mukoadezyon gücünün de düşük olması bu kararımızı desteklemiştir.

- **Biyoadezif formülasyonların mekanik özelliklerine ait sonuçlar:**
  - Çalışmamız sırasında en iyi mekanik özelliğe sahip formülasyonlar CV-K100M2 ve OXB-K100M2 olarak belirlenmiştir. Vajinaya uygulanmak üzere hazırlanan bu formülasyonların sertlik ve sıkışabilirlik değerlerinin düşük, adezif özellikleri yüksektir. Bu durum dokuya tutunabilirliği açısından önemlidir.
  - Lipojel ve mikroküre içeren jellerin mekanik özellikleri jel formülasyonlardan belirgin derecede düşük bulundukları için sonuç formülasyon olarak seçilmemişlerdir.

- **Biyoadezif formülasyonların mekanik özelliklerine ait sonuçlar şöyledir:**
  - Mukoadezyon testleri de TA.XT.Plus Texture Analyser aletinde yapılmıştır. Öncelikle bizim çalışmamıza uygun yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Hazırlanan biyoadezif formülasyonların testleri yapılmış ve CV-K100M2 ve OXB-K100M2 formülasyonlarının en iyi mukoadezif özellik gösterdiği belirlenmiştir.
  - Lipojel ve mikroküre içeren jellerin mukoadezyon işleri jel formülasyonlardan belirgin derecede düşük bulundukları için sonuç formülasyon olarak seçilmemişlerdir.

- **OXB içeren jel formülasyonlarının tavşan vajinal dokusundan geçiş çalışmalarına ait sonuçlar:**
  - İn vitro çalışmaların son aşamasında, vajinadan uygulandığında sistemik etki göstermesi amaçlanan OXB jel formülasyonlarının dokudan geçiş çalışması yapıldı. Tavşan vajinal dokusundan horizontal difüzyon ünitesinde yapılan ve 48 saat süren geçiş çalışmasının sonucunda OXB-K100M2 formülasyonunun en

uygun sonucu verdiği ve in vivo çalışmalarda kullanılabileceği belirlenmiştir.

✶ **Cidofovir ile yapılan hücre kültürü çalışmalarına ait sonuçlar:**

- Bu kapsamda CV'in antiviral etkinliği sığır herpes virüsü üzerinde incelendi ve antiviral etkinliği kanıtlandı. Farmasötik karakterleri ve mukoadezif özellikleri açısından en uygun formülasyon olan CV-K100M2 formülasyonu ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında HSV üzerinde etkili olduğu bulundu.

✶ **Oksibütinin ile yapılan in vivo çalışmalara ait sonuçlar:**

- Tavşanlar üzerinde oral Üropan tablet ve vajinal olarak uygulanan OXB-K100M2 jel, OXB-KTH3 jel ile OXB çözeltisinin biyoyararlanım çalışması yapılmıştır.
- Bağıl biyoyararlanım oral tablete göre OXB-K100M2 formülasyonu için %179, OXB-KTH3 formülasyonu için 119 ve OB çözeltisi için %12 bulunmuştur. Kontrollü salım yapan vajinal jeller piyasa tabletine göre ve OB çözeltisine göre daha biyoyararlıdır.
- Jeller kendi aralarında karşılaştırıldığında ise OXB-HPMCK100M2 formülasyonu OXB-KITH3 formülasyonundan daha biyoyararlıdır.
- Histolojik çalışmalar değerlendirildiğinde, OXB çözeltisinin vajinal epitelde hücre dejenerasyonu gerçekleştiridiği görülmüştür. OXB-HPMCK100M2 formülasyonu uygulanan tavşanların vajinal epitellerinde hücrelerin fazla absorbsiyondan dolayı zorlandığı ve iri vakuoller oluştuğu gözlenmiştir. OXB-KITH3 formülasyonunda ise emilim daha düzgün ve hücreye zarar vermeden olduğu için kitosan jelin koruyucu özelliği olduğu düşünülmüştür.

- Absorbsiyon açısından HPMC jel daha iyi olmakla birlikte vajinal epitele verdiği zarar kitosan jele göre daha fazladır.
- Tükrük bezinde yapılan oksidatif etki çalışmasında, OXB'in oral uygulamaya altermatif olarak denenen iki farklı vajinal uygulamada da tükrük bezinde MDA ve GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu. Bu sonuçlara dayanarak vajinal uygulanan biyoadezif jellerin yan etklilerinin oral uygulanan OXB'ye göre düşük olduğu söylenebilir.

✶ **SONUÇTA:**

- Literatüre, CV ve OXB içeren yeni biyoadezif ilaç şekilleri geliştirilerek yenilik getirilmiştir.
- Özellikle içinde mikropartiküler sistem taşıyan jellerin üzerinde farklı polimer ve yöntemler ile çalışılarak istenilen özellikte vajinal sistemler geliştirilebilir. Vajinada haftalar süren salım gerçekleştirilebilir.
- Bu sistemler diğer kontrollü salım yapan vajinal ilaç şekillerine alternatif olabilir.
- HPMC içeren vajinal jeller üzerinde çalışmalar devam edebilir, amaca uygun olarak polimer karışımları kullanılabilir.
- Mukoadezyon özelliği diğer polimerlerden daha iyi olan HPMC K100M polimerleri vajinal uygulamalar için tercih edilebilir. Ancak vajinal epitel hasarının da gözönünde bulundurulması gereklidir. OXB-HPMCK100M2 jel daha fazla absorbsiyon göstermekle beraber vajinal epitele verdiği zarar OXB-KITH3 jelden daha fazladır.

8. ÖZET

Kontrollü Salım Yapan Biyoadezif Yeni Vajinal İlaç Şekilleri Üzerinde Çalışmalar

Tezin amacı, sistemik ve topik etkili iki ayrı etkin maddenin kontrollü salım yapan biyoadezif vajinal sistemlerinin geliştirilmesi ve etkinliklerinin ölçülmesidir.

Çalışmada etkin madde olarak, sistemik etki için oksibütinin, topik etki için ise cidofovir seçilmiştir. Seçilen bu etkin maddeler ile biyoadezif jel, biyoadezif lipozom-jel ve biyoadezif mikroküre-jel şeklinde yeni vajinal ilaç şekilleri geliştirilmiştir.

Vajinal ilaç şekillerinin hazırlanması amacıyla polimer olarak hidroksipropilmetilselüloz (HPMC), kitosan, Carbopol, poloksamer ve karışımları kullanılmıştır.

Etkin madde ve polimerlerin gerekli karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Hazırlanan jellerin görünüş, pH, viskosite, akış, Franz Difuzyon hücresinden geçiş ve mukoadezyon özellikleri incelenmiştir. Sistemik etkili olması nedeniyle oksibütinin içeren jellerin ayrıca horizontal difüzyon hücresi kullanılarak tavşan vajinal dokusundan geçiş çalışmaları yapılmıştır.

Cidofovir içeren formülasyonlar ile yapılan in vitro deneyler sonucunda kontrollu salım yapan ve mukoadezyon özelliği iyi olan HPMC ile hazırlanan CV-HPMCK100M2 biyoadezif vajinal jel formülasyonu sonuç formülasyon olarak seçilmiştir. Bu preparatın antiviral etkinliği hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiş ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Oksibütinin hidroklorürün HPMC ile hazırlanan OXB-HPMCK100M2 ve kitosan ile hazırlanan OXB-KITH3 biyoadezif vajinal jel preparatlarının ve çözeltisinin etkinliği tavşanlarda in vivo denenerek oral tablet ile karşılaştırılmıştır. Oksibütininin OXB-HPMCK100M2 formülasyonunun 2 gün süreyle sabit kan konsantrasyonu gösterdiği ve bağıl biyoyararlanımının % 179 olduğu görülmüştür. Ancak histolojik çalışmalar sonucunda OXB-HPMCK100M2 jeli uygulanan tavşanlarda vajinal epitelde

hasar olduğu gözlenmiştir. Bu hasar OXB-KITH3 uygulanan grupta gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksibütinin, Cidofovir, idrar tutamama, HPV, HSV, genital lezyon, biyoadezif vajinal ilaç şekilleri, jel, mikroküre, lipozom

9. ABSTRACT

The aim of this study is to develop the controlled release, bioadhesive vaginal system of two different drugs which are used for systemic or topical effect and to measure their effectiveness.

Cidofovir and oxybutynin hydrochloride are selected for local and systemic effect, respectively. Various new formulations for vaginal administration, such as bioadhesive gels, liposomal gels and microsphere-gels were developed.

Hydroxpropylmethycellulose (HPMC), chitosan, Carbopol, poloxamer and their mixtures were used for the preparation of the vaginal dosage forms.

The required properties of active ingredients and polymers were determined. Some properties of the gel formulations such as appearance, pH, viscosity, flow, diffusion (in Franz Diffusion cell) and mucoadhesion were investigated. Since oxybutynin is a systemically effective drug, the diffusion experiments of the gel formulations containing oxybutinin through the rabbit vaginal tissue were also carried out using horizontal diffusion cell.

The vaginal gel formulation of cidofovir CV-HPMCK100M2 formulation prepared with HPMC showing optimum controlled release and mucoadhesive properties based on the in vitro studies of the cidofovir formulations developed. The effectiveness of this final formulation was tested with cell culture studies and it was found to be effective.

The effectiveness of oxybutynin vaginal formulations of OXB-HPMCK100M2 (with HPMC), OXB-KITH3 (with chitosan) and OXB solution were compared with the oral tablet formulation in rabbits. Sustained plasma profile was obtained with OXB-HPMCK100M2 formulation. The relative bioavailability was found to be 179 %. However damage on vaginal epitel cells was observed in this group; based on histological studies. No damage was observed in OXB-KITH3 group.

Keywords: Oxybutynin, Cidofovir, urinary incontinence, HPV, HSV, genital warts, bioadhesive vaginal dosage forms, gel, microsphere, liposome

10. KAYNAKLAR

1. Chien YW, Lee CH. Drug delivery-vaginal route. In: Swarbrick J. editor. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3 th ed. New York: Informa Healthcare USA Inc.; 2007. Vol.1: p.1339-2913.
2. Brannon-Peppas L. Novel vaginal drug release applications. Adv Drug Deliv Rev 1993; 11: 385-401.
3. Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L, Zampaglione E. Why consider vaginal drug administration? Fertility and Sterility 2004; 82: 1-12.
4. Andrews GP, Laverty, TP, Jones, DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, Eur J Pharm Biopharm 2009; 71: 505-518.
5. Vermani K, Garg S. The scope and potential of vaginal drug delivery. PSST 2000; 3: 359-64.
6. Kokate A, Marasabapalle VP, Jasti BR, Li X. Physiological and Biochemical Barriers to Drug Delivery. In: Li X, Jasti BR, editors. Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. The McGraw-Hill Companies; 2006. s. 65-73.
7. Çalış S, Şumnu M, Hıncal A. Vajinal yolla kullanılan topik ilaç şekilleri, formülasyonları, uygulamaları ve kontrolleri. FABAD, Farmasötik Bilimler Dergisi 1994; 19: 85-95.
8. Greaves P. Female Genital Tract. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 2007; 12: 717-779.
9. Paavonen J. Physiology and ecology of vagina. Scand J Infect Dis 1983; 40: 31–35.
10. Malcolm RK., McCullagh SD., Morrow RJ., Woolfson AD. Vagina and uterus as drug-absorbing organs. In: Touitou E, Barry BW editors. Enhancement in drug delivery. Boca Raton, FL: Tyler & Francis Group; 2007. s. 395-439.
11. Valenta C. The use of muchoadhesive polymers in vaginal drug delivery. Adv Drug Del Rev 2005; 57: 1692-1712.

12. Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Tırnaksız F. Modern Farmasötik Teknoloji, 2. Baskı. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını. Mattek Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.; 2009. s. 379-88.
13. Knuth K, Amiji M, Robinson JR, Hydrogel delivery systems for vaginal and oral applications : Formulation and biological considerations. Adv Drug Del Rev 1993; 11: 137-167.
14. Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid simulant. Contraception 1999; 59: 91–5.
15. Burruano BT, Schnaare R, Malamud D. Synthetic cervical mucus formulations. Contraception 2002; 66: 137-40.
16. Vallor AC, Antonio AD, Hawes SE, Hillier SL. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. J Infec Diseases 2001; 184: 1432-1436.
17. Aslım B, Kılıç E. Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. Jpn J Infec Dis 2006; 59: 249-253.
18. Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U, Matteuzzi D. Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets. J Appl Microbiol 2002; 93: 884-893.
19. Okada H, Vaginal Route of peptide and Protein Drug Delivery, Advances in paranteral Sciences. In: Lee CHL, Robinson J. editors. Marcel Dekker Inc. 1991; 633-666.
20. Brizzolara S, Killeen J, Severino R. Vaginal pH and parabasal cells in postmenopausal women. Obstet Gynecol 1999; 94(5 Pt 1): 700-3
21. Bernkop-Schnurch A, Hornof M. Intravaginal drug delivery systems. Am J Drug Deliv 2003; 1: 241-254.
22. Acartürk F, Parlatan ZI, Saraçoğlu OF. Comparison of vaginal aminopeptidase enzymatic activities in various animals and in humans. J Pharm Pharmacol 2001; 53: 1499-1504.

23. Hussain A, Ahsan F. The vagina as a route for systemic drug delivery. J Cont Rel 2005; 103: 301-13.
24. Acartürk F, Robinson JR. Vaginal permeability and enzymatic activity studies in normal and ovariectomized rabbits. Pharm Res. 1996; 13(5): 779-83.
25. Valenta C, Kast CE, Harich I, Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. J Control Rel 2001; 77: 323-332.
26. Corbo DC, Liu JC, Chien YW. Characterization of the barrier properties of mucosal membranes. J Pharm Sci 1990; 79(3): 202-6.
27. Richardson JL, Illum L. The vaginal route of peptide and protein drug delivery. Adv Drug Del Rev 1992; 8: 341-366.
28. Acartürk F, Robinson JR. Effect of the spermicide, Nonoxynol 9, on vaginal permeability in normal and ovariectomized rabbits. Pharm Res. 1996; 13(6): 950-51.
29. Hussain AS, Ritschel WA. “Body burden” of phosphono-formic acid after topical and vaginal administration to rabbits and beagle dogs. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1989; 11: 111-114.
30. Woolfson AD, Malcolm RK, Gallagher R. Drug delivery by the intravaginal route. Crit Rev Ther Drug Carr Syst 2000; 17: 509-555.
31. Acartürk F, Altuğ N. Preparation and evaluation of bromocryptine mesylate-polydimethylsiloxane matrices. Pharmazie 2000; 55: 668-671.
32. Vermani K, Garg S, Zaneveld LJD. Assemblies for in vitro measurement of bioadhesive strength and retention characteristics in simulated vaginal environment. Drug Dev Ind Pharm 2002; 28: 1133-1146.
33. Mandal TK. Swelling-controlled release system for the vaginal drug delivery of miconazole. Eur J Pharm Biopharm 2000; 50: 337-43.

34. Acartürk F. Vajinal ve Rektal Sistemler. İçinde: Gürsoy AZ editör. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj Sanayii; 2002. s. 261-81.
35. Acartürk F, Altug N. In-vitro and in-vivo evaluation of a matrix-controlled bromocriptine mesilate-releasing vaginal ring. J Pharm Pharmacol. 2001; 53(12): 1721-6.
36. Ceschel GC, Maffei P, Borgia SL, Ronchi C, Rossi S. Development of a mucoadhesive dosage form for vaginal administration. Drug Del 2001; 11: 225-30.
37. Baloğlu E, Özyazıcı M, Hızarcıoğlu SY, Şenyiğit T, Özyurt D, Pekçetin Ç. Bioadhesive controlled release systems of ornidazole of vaginal delivery. Pharm Dev Technology 2006; 11: 477-84.
38. Çelebi N. Biyoadezif kontrollü salım sistemleri. FABAD Farm Bil Der 1988; 13: 450-461.
39. Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery. Int J Pharm 2006; 318: 1-14.
40. Jabbari E, Wisniewski N, Peppas NA. Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly (acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy. J Control Rel 1993; 26: 99-108.
41. Leung SHS, Robinson JR, The contribution of anionic polymer structural features to mucoadhesion. J Control Release 1988; 5: 223-231.
42. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. Adv. Drug Deliv. Rev. 2005; 57: 1556–68.
43. Edsman K, Hägerström H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. J Pharm Pharmacol 2005; 57(1): 3-22.
44. Çapan Y. Mukozaya Yapışan Sistemler. İçinde: Gürsoy A.Z. Kontrollü Salım Sistemleri. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj Sanayii; 2002. s. 177-97.

45. Huang Y, Leobandung W, Foss A, Peppas NA. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. J Control Rel 2000; 65: 63-71.
46. Duchene D, Touchard F, Peppas NA. Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. Drug Dev Ind Pharm 1988; 14: 283-318.
47. Saiano F, Pitarresi G, Cavallaro G, Licciardi M, Giammona G. Evaluation of mucoadhesive properties of α,β-poly(*N*-hydroxyethyl)-DL-aspartamide and α,β-poly(aspartylhydrazide) using ATR–FTIR spectroscopy. Polymer 2002; 43: 6281-6286.
48. Cilurzo F, Minghetti P, Selmin F, Casiraghi A, Montanari L. Polymethacrylate salts as new low-swellable mucoadhesive materials. J Control Rel 2003; 88: 43-53.
49. Paulsson M. Controlled release gel formulations for mucosal drug delivery. Doctoral thesis, Uppsala: Uppsala University; 2001.
50. Grabovac V, Guggi D, Bernkop-Schnürch A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. Adv Drug Del Rev 2005; 57: 1713– 1723.
51. Sezer AD, Cevher E, Hatipoğlu F, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. Biol Pharm Bull. 2008; 31(12): 2326-33
52. Neves JD, Amaral MH, Bahia MF. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. Eur J Pharm Biopharm 2008; 69: 622-632.
53. Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. Int J Pharm 2003; 255: 13-32.
54. Ponchel G, Touchhardi F, Wouessidjewe D, Duchene D, Peppas NA. Bioadhesive analysis of controlled-release system. III.Bioadhesive

and release behaviour of metronidazole-containing poly(acrylic acid)-hydroxypropyl methylcellulose systems. Int J Pharm 1987; 38: 65-70.

55. Tamburic S, Craig DQM. A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance. Eur J Pharm Biopharm 1997; 44: 159-167.
56. Garg S, Tambwekar KR, Vermani K, Kandrapu R, Garg A, Waller DP, et al. Development pharmaceutics of microbicide formulations part II. formulation, evaluation and challenges. AIDS Patient Care STDs 2003; 17: 377-99.
57. F. Mucoadhesive vaginal drug delivery Systems. Recent Patents on Drug Delivery & Formulation 2009; baskıda.
58. Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Tırnaksız F. Modern Farmasötik Teknoloji, 2. Baskı. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını. Mattek Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.; 2009. s.337-64.
59. Yener G. Temel Dozaj Şekilleri, Merhemler, Kremler, Jeller, Patlar. İçinde: Gürsoy AZ editör. Farmasötik Teknoloji. İstanbul: Piksel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri; 2004, 287-99.
60. Garg S, Anderson RA, Chany CJ 2nd, Waller DP, Diao XH, Vermani K, Zaneveld LJ. Properties of a new acid-buffering bioadhesive vaginal formulation (ACIDFORM). Contraception. 2001; 64(1): 67-75.
61. Amaral E, Perdigao A, Souza MH, Mauck C, Waller D, Zaneveld L, et al. Vaginal safety after use of a bioadhesive, acid-buffering, microbicidal contraceptive gel (ACIDFORM) and a 2% nonoxynol-9 product B. Contraception 2006; 73: 542– 547.
62. Owen DH, Peters JJ, Katz DF. Rheological properties of contraceptive gels. Contraception 2000; 62: 321-326.
63. Baloğlu E, Ozyazici M, Hizarcioğlu SY, Karavana HA. An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. Il Farmaco 2003; 58(5): 391-6.

64. Gürsoy A. Bioadhesive controlled release systems for vaginal delivery. STP Pharma 1989; 5(12): 886-892.
65. Wang L, Tang X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design, in vitro and 'in vivo' evaluation. Int J Pharm 2008; 350: 181-7.
66. Celebi N, Kişlal O. Development and evaluation of a buccoadhesive propranolol tablet formulation. Pharmazie. 1995; 50(7): 470-2.
67. Gönül B, Erdoğan D, Ozoğul C, Koz M, Babül A, Çelebi N. Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice. Burns. 1995; 21(1): 7-10.
68. Miller DA, DiNunzio JC, Yang W, McGinity JW, Williams RO III. Targeted intestinal delivery of supersaturated itraconazole for improved oral absorption. Pharm Res 2008; 25(6): 1450-9.
69. Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57(11): 1640-65.
70. Gaudin K, Barbaud A, Boyer C, Langlois MH, Lagueny AM, Dubost JP, et al. In vitro release and stability of an artesunate rectal gel suitable for pediatric use. Int J Pharm 2008; 353(1-2): 1-7.
71. Mumper RJ, Bell MA, Worthen DR, Cone RA, Lewis GR, Paull JR, et al. Formulating a sulfonated antiviral dendrimer in a vaginal microbicidal gel having dual mechanisms of action. Drug Dev Ind Pharm 2009; 35(5): 515-24.
72. Hosny EA. Polycarbophil as a controlled release matrix. Int J Pharm 1993; 98: 235-238.
73. Noveon® Polycarbophil and Noveon® Calcium Polycarbophils [online]. 2009 [cited 2009 August 19] Available from: URL: http://www.lubrizol.com/Pharmaceutical/Products/PolycarbophilsOverview.html
74. Anlar Ş, Çapan Y, Hıncal A. Physico-chemical and bioadhesive properties of polyacrylic acid polymers. Pharmazie 1993; 48: 285-87.

75. Robinson JR, Bologna WJ. Vaginal and reproductive system treatments using a bioadhesive polymer. J Control Rel 1994; 28: 87-94.
76. Caswell M, Kane M. Comparison of the moisturization efficacy of two vaginal moisturizers: Pectin versus polycarbophil technologies. J Cosmet Sci 2002; 53(2): 81-7.
77. Mauck CK, Katz D, Sandefer EP, Nasution MD, Henderson M, Digenis GA, et al. Vaginal distribution of Replens and K-Y Jelly using three imaging techniques. Contraception 2008; 77(3): 195-204.
78. Chatterton BE, Penglis S, Kovacs JC, Presnell B, Hunt B. Retention and distribution of two 99mTc-DTPA labelled vaginal dosage forms. Int J Pharm 2004; 271: 137-43.
79. Bonacucina G, Martelli S, Palmieri GF. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. Int J Pharm. 2004; 282(1-2): 115-30.
80. Owen DH, Peters JJ, Lavine ML, Katz DF. Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. Contraseption 2003; 67: 57-64.
81. Wang Y, Lee CH. Effects of intrinsic variables on release of sodium dodecyl sulfate from a female controlled drug delivery system. Int J Pharm 2004; 282: 173-81.
82. Lee CH, Chien YW. Development and evaluation of a mucoadhesive drug delivery system for dual-controlled delivery of Nonoxynol-9. J Control Rel 1996; 39: 93-103.
83. Fiorilli A, Molteni B, Milani M, Polycarbophil-Carbopol acidic vaginal gel was efficacious and safe in the treatment of bacterial vaginosis. Evid Obstet Gynocol 2006; 8: 28-29.
84. Pavelic Ž, Škalko-Basnet N, Jalsenjak I. Characterisation and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local theraphy of vaginitis. Int J Pharm 2005; 301: 140-48.
85. Wang Y, Lee CH. Characterisation of a female controlled drug delivery sysytem for microbicides. Contraception 2002; 66: 281-87.

86. Ludwig M, Schwartz P, Babahan B, Katalinic A, Weiss JM, Felberbaum R, et al. Luteal phase support using either Crinone® 8% or Utrogest®: results of a prospective, randomized study. Eur J Obst Gynecol Rep Biology 2002; 103: 48-52.
87. Blake EJ, Norris PM, Dorfman SF, Longstreth J, Yankov VI. Single and multidose pharmacokinetic study of a vaginal micronized progesterone insert (Endometrin) compared with vaginal gel in healthy reproductive-aged female subjects. Fertil Steril. 2009: baskıda.
88. Morimoto K, Takeeda T, Nakamoto Y, Morisaka K, Effective vaginal absorption of insulin in diabetic rats and rabbits using polyacrylic acid aqueous gel bases. Int J Pharm 1982; 12: 107-111.
89. Okada H, Yamazaki I, Ogawa Y, Hirai S, Yashiki T, Mima H. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analog (leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement. J Pharm Sci 1982; 71: 1367-1371.
90. Okada H, Yamazaki I, Yashiki T, Mima H. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analogue (leuprolide) in rats II: Mechanism of absorption enhancement with organic acids. J Pharm Sci 1983; 72: 75-78.
91. Fiorilli A, Molteni B, Milani M. Successful treatment of bacterial vaginosis with a policarbophil-carbopol acidic vaginal gel: results from a randomised double-blind, placebo-controlled trial. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005; 120(2): 202-5.
92. Mourtas S, Fotopoulou S, Duraj S, Sfika V, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. Colloids Surf B Biointerfaces. 2007; 55(2): 212-21.
93. Herder J, Adolfsson A, Larsson A. Initial studies of water granulation of eight grades of hypromellose (HPMC). Int J Pharm 2006; 313: 57-65.

94. General Properties of Methocel [online]. 2005 [cited 31 May 2007] Available from: URL: http://www.colorcon.com/pharma/modrel/methocel/literature/general properties.pdf
95. Properties of solutions of Methocel [online]. 2005 [cited 31 May 2007] Available from: URL: http://www.colorcon.com/pharma/modrel/methocel/literature/prop of solutions.pdf
96. Viriden A, Wittgren B, Larsson A. Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets. Eur J Pharm Sci 2009; 36: 297-309.
97. Dokak C. Hidrofilik Polimerlerle Hazırlanan Kontrollü Salım Sistemleri Üzerinde Çalışmalar. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
98. Gustafsson C, Bonferoni MC, Caramella C, Lennholm H, Nyström C. Characterisation of particle properties and compaction behaviour of hydroxypropyl methylcellulose with different degrees of methoxy/hydroxypropyl substitution. Eur J Pharm Sci. 1999 ; 9(2): 171-84.
99. Genç L, Oğuzlar C, Güler E. Studies on vaginal bioadhesive tablets of acyclovir. Pharmazie 2000; 55: 297-99.
100. Maggi L, Mastromarino P, Macchia S, Brigidi P, Pirovano F, Matteuzzi D, et al. Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. Eur J Pharm Biopharm 2000; 50(3): 389-95.
101. Karasulu HY, Taneri F, Sanal E, Güneri T, Ertan G. Sustained release bioadhesive effervescent ketoconazole microcapsules tabletted for vaginal delivery. J Microencap 2002; 19(3): 357-62.
102. Karasulu HY, Hilmioğlu S, Metin DY., Güneri T. Efficacy of a new ketoconazole bioadhesive vaginal tablet on Candida albicans. Il Farmaco 2004; 59: 163-7.
103. Cevher E, Sensoy D, Zloh M, Mülazimoğlu L. Preparation and characterisation of natamycin: gamma-cyclodextrin inclusion complex

and its evaluation in vaginal mucoadhesive formulations. J Pharm Sci 2008; 97(10): 4319-35.

104. Poelvoorde N, Verstraelen H, Verhelst R, Saerens B, De Backer E, dos Santos Santiago GL, et al. In vivo evaluation of the vaginal distribution and retention of a multi-particulate pellet formulation. Eur J Pharm Biopharm 2009; 73(3): 280-4.
105. Perioli L, Ambrogi V, Venezia L, Giovagnoli S, Pagano C, Rossi C. Formulation studies of benzydamine mucoadhesive formulations for vaginal administration. Drug Dev Ind Pharm 2009; 31:1-11.
106. Kulp JL, Rosen M, Shera D, Hummel A, Barnhart KT. The search for a candidate vaginal gel: An imaging trial of the distribution of four topical gel formulations in the human vagina. Fertility & Sterility 2007; 88: S52-S53.
107. Narayana RC, Harish NM, Gulzar A M, Prabhakara P, Singh AK, Subrahmanyam EV. Formulation and in vitro evaluation of in situ gels containing secnidazole for vaginitis Yakugaku Zasshi 2009; 129(5): 569-74.
108. Henderson MH, Couchman GM, Walmer DK, Peters JJ, Owen DH, Brown MA, et al. Optical imaging and analysis of human vaginal coating by drug delivery gels. Contraception 2007; 75(2): 142-51.
109. Syed TA, Qureshi ZA, Ahmad SA, Ali SM. Management of intravaginal warts in women with 5-fluorouracil (1%) in vaginal hydrophilic gel: a placebo-controlled double-blind study. Int J STD AIDS 2000; 11(6): 371-4.
110. Shin SC, Kim JY, Oh IJ. Mucoadhesive and physicochemical characterization of Carbopol-poloxamer gels containing triamcinolone acetonide. Drug Dev Ind Pharm 2000; 26: 307-312.
111. Barnhart K, Kulp JL, Rosen M, Shera DM. A randomized trial to determine the distribution of four topical gel formulations in the human vagina. Contraception 2009; 79: 297-303.

112. Brouwers J, Vermeire K, Schols D, Augustijns P. Development and in vitro evaluation of chloroquine gels as microbicides against HIV-1 infection. Virology 2008; 378: 306-310.
113. Akbuğa J. A Biopolymer: Chitosan. Int J Pharm 1995; 1: 3-18.
114. Kaş SH. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. J Microencap 1997; 14: 689-711.
115. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm Res 1998; 15(9): 1326-31.
116. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan.Biomaterials 2003; 24(13): 2339-49.
117. Martin L, Wilson CG, Koosha F, Tetley L, Gray AI, Senel S, Uchegbu IF. The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels. J Control Rel 2002; 80(1-3): 87-100.
118. Ofori-Kwakye K, Fell JT. Biphasic drug release from film-coated tablets. Int J Pharm 2003; 250(2): 431-40.
119. Inoyatov N, Celebi N, Acarturk F. Preparation and evaluation of a prolonged release pentoxifylline tablet with chitosan. Pharmazeutische Industrie 1998; 60: 472-475.
120. Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Caramella C. Chitosan and its salts for mucosal and transmucosal delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2009; 6(9): 923-39.
121. Henriksen I, Green KL, Smart JD, Smistad G, Karlsen J. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. Int J Pharm 1996; 145: 231-240.
122. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. Eur J Pharm Sci 2001; 14(3): 201-7.
123. Senel S, Ikinci G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. Int J Pharm. 2000; 193(2): 197-203.

124. Senel S, Kremer MJ, Kaş S, Wertz PW, Hincal AA, Squier CA Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. Biomaterials 2000; 21(20): 2067-71.
125. Janát-Amsbury MM, Gupta KM, Kablitz CD, Peterson CM. Drug delivery for in vitro fertilization: rationale, current strategies and challenges. Adv Drug Del Rev 2009; 61(10): 871-82
126. Değim IT, Tuğcu-Demiröz F, Tamer-Ilbasmis S, Acartürk F. Development of controlled release sildenafil formulations for vaginal administration. Drug Del 2008; 15(4): 259-65.
127. Kast CE, Valenta C, Leopold M, Bernkop-Schnurch A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. J Control Release 2002; 81: 347-54.
128. Kumar Majeti NVR. A review of chitin and chitosan applications. Reac Func Poly 2000; 46: 1-27.
129. Perioli L, Ambrogi V, Venezia L, Pagano C, Ricci M, Rossi C. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2008: 66: 141-145.
130. Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Gibin S, Caramella C. Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery: Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. Eur J Pharm Sci 2008; 33: 166-176.
131. Değim Z, Değim T, Acartürk F, Erdoğan D, Özoğul C, Köksal M. Rectal and vaginal administrations of insulin-chitosan formulations: An experimantal study in rabbits. J Drug Target 2005; 13: 563-72.
132. Cevher E, Sensoy D, Taha MA, Araman A. Effect of thiolated polymers to textural and mucoadhesive properties of vaginal gel formulations prepared with polycarbophil and chitosan. AAPS PharmSciTech 2008; 9(3): 953-65.

133. Zhang L, Parsons DL, Navarre C, Kompella UB. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. J Control Rel 2002; 85: 73-81.
134. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, Palin KJ. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of Pluronic F-127 solution for controlled drug delivery. J Control Rel 1987; 5: 113-18.
135. Ruel-Gariepy E, Leroux JC. In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. Eur J Pharm Biopharm 2004; 58: 409-426.
136. Chang JY, Oh YK, Choi HG, Kim YB, Kim CK. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. Int J Pharm 2002; 241(1): 155-63.
137. Chang JY, Oh YK, Kong HS, Kim EJ, Jang DD, Nam KT, Kim CK. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. J Cont Rel 2002; 82: 39-50.
138. Liu Y, Zhu YY, Wei G, Lu WY. Effect of carrageenan on poloxamer-based in situ gel for vaginal use: Improved in vitro and in vivo sustained-release properties.Eur J Pharm Sci. 2009; 37(3-4): 306-12.
139. Mayol L, Quagli F, Borzacchiello A, Ambrosio L, Rotonda M. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. Eur J Pharm Biopharm 2008; 70: 199-206.
140. Bilensoy E, Çırpanlı Y, Şen M, Doğan L, Çalış S. Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu:cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. J Incl Phenom Macrocycl Chem 2007; 57: 363-370.
141. Siewert M, Dressman J, Brown CK, Shah VP. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. AAPS PharmSciTech. 2003; 4: E7.
142. Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls;

In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation [online] 2009 [cited 17 October 2009] Available from: URL: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070930.pdf

143. Sandri G, Rossi S, Sandri A, Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC. et al. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. Eur J Pharm Sci 2004; 21: 352-359.
144. Eyk AD, Bijl P. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. Int J Pharm 2005; 305: 105-11.
145. Bechgaard E, Riis KJ, Jorgensen L. The development of an Ussing chamber tecnique for isolated human vaginal mucusa and the viability of the in vitro system. Int J Pharm 1994; 106: 237-42.
146. Owen DH, Peters JJ, Katz DF. Comparison of the rheological properties of Advantage-S and Replens. Contraception 2001; 64(6): 393-6.
147. Jones DS, Lawlor MS, Woolfson AD. Rheological and muchoadhesive characterisation of polymeric systems composed of poly(methylvinylether-co-maleic acid) and poly(vinylpyrrolidone), designed as platforms for topical drug delivery. J Pharm Sci 2003; 92: 995-1007.
148. Tırnaksız F, Robinson JR. Rheological, mucoadhesive and release properties of pluronic F-127 gel and pluronic F-127/polycarbophil mixed gel systems. Pharmazie 2005; 60: 518–523.
149. Cevher E, Taha M, Orlu M. Evaluation of mechanical and mucoadhesive properties of clomiphene citrate gel formulations containing carbomers and their thiolated derivatives. Drug Del 2008; 15 (1): 57-67.
150. Barnhart KT, Pretorius ES, Timbers K, Shera D, Shabbout M, Malamud D. Distribution of a 3.5-mL (1.0%) C31G vaginal gel using magnetic resonance imaging. Contraception 2005; 71: 357-361.

151. Barnhart KT, Stolphen A, Pretorius ES., Malamud D. Distrubiton of a spermicide containing nonoxynol-9 in the vaginal canal and the upper female reproductive tract. Hum Reprod 2001; 16: 1151-54.
152. Cidofovir [online]. 2009 [cited 17 October 2009] Available from: URL:www.drugs.com/ppa/cidofovir.html+drugs+com+cidofovir&cd=2&hl=tr&ct=clnk&gl=tr
153. Cundy KC. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. Clin Pharmacokinet 1999; 36(2): 127-43.
154. Gross G. Do We need antivirals for genital Herpes Simplex Virus and Human Papillomavirus infection? Int J Antimicrobial Agents 1999; 12: 1-3.
155. Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, Cox T, Fife K, Moscicki AB, et al. External genital warts: diagnosis, treatment and prevention. Clin Infec Disease 2002; 35: 210-24.
156. Lin P, Torres G, Tyring SK. Changing paradigms in dermatology: antivirals in dermatology. Clin Dermatol 2003; 21: 426-46.
157. Park JS, Oh YK, Kang MJ, Kim CK. Enhanced mucosal and systemic immune response folloving intranasal immunization with Human Papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine in thermosensitive mucoadhesive delivery systems. J Med Virol 2003; 70: 633-41.
158. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. Virus Res 2002; 89: 249-61.
159. Breitburd F, Salmon J, Orth G. The rabbit viral skin papillomas and carcinomas: a model for the immunogenetics of HPV-associated carcinogenesis. Clin Dermatol 1997; 15: 237-47.
160. Yen-Moore A, Straten MV, Carrasco D, Evans TY, Tyring SK. Cutaneous viral ınfections in HIV-infected individuals. Clin Dermatol 2000; 18: 423-32.

161. Rinker MH., Shenefelt PD. Warts, nongenital. American Academy of Dermatology [online]. 2001 [cited 2009 august 19]. Available from: URL:(http://www.emedicine.com/derm/topic457.htm)
162. Clercq ED. Antiviral drugs in current clinical use. J Clin Virol 2004; 30: 115-33.
163. VISTIDE® (cidofovir injections), Gilead Sciences, Inc., 2000. Part Number: RM-1282.
164. Clercq ED, Antiviral drugs: current state of the art. J Clin Virol 2001; 22: 73-89.
165. Santoyo S, Jalon G, Ygartua P, Renedo MJ, Blanco-Prieto MJ. Optimizaton of topical cidofovir penetration using microparticles. Int J Pharm 2002; 242: 107-13.
166. Santoyo S, Jalon EG, Campanero MA, Ygartua P. Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC. J Pharm Biomed Anal 2002; 29: 819-26.
167. Afouna MI, Fincher TK, Zaghloul AA. Reddy I. Effect of azone upon the ın vivo antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 ınfections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice. Int J Pharm 2003; 253: 159-68.
168. Martinelli C, Farese A, Mistro AD, Giorgini S, Ruffino I. Resolution of recurrent perianal condylomata acuminata by topical cidofovir in patients with HIV infection. Eur. Acad. Dermatol. Venereol 2001; 15: 568-9.
169. Orlando G, Fasolo MM, Beretta R, Merli S, Cargnel A. Combined surgery and cidofovir is an effective treatment for genital warts in hiv-infected patients. AIDS 2002; 15: 447-50.
170. Davis MDP, Gostout BS, McGovern RM. Large plantar wart caused by Human Papillomavirus-66 and resolution by topical cidofovir therapy. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 340-43.

171. Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Chagraoui H, Maggiorella, L, Thierry J, et al. Antiviral agent cidofovir restores P53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. Oncogene 2002; 4: 2334-46.
172. Snoeck R, Noel JC, Muller C, De Clercq E, Bossens M. Cidofovir, a new approach for the treatment of cervix ıntraepithelial neoplasia grade III (CIN III). J Med Virol 2000; 60: 205-9.
173. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E. Inhibiting effects of cidofovir (HPMPC) on the growth of the human cervical carcinoma (SiHa) xenografts in athymic nude mice. Oncol Res 1998; 10: 533-9.
174. Van CE, Snoeck R, Van Ranst M, Fiten P, Opdenakker G, Geboes K, et al. successful treatment of a squamous papilloma of the hypopharynx-esophagus by local injections of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl methoxypropyl) cytosine. Med Virol 1995; 45: 230-5.
175. Reuter JD, Gomez D, Brandsma JL, Rose JK, Roberts A. optimization of cottontail rabbit papilloma virus challenge technique. J Virol Methods 2001; 98: 127-34.
176. Abrams P. Andersson KE. Great drug classes. BJU International 2002; 100: 987-1006.
177. Brunton LL. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. The McGraw-Hill Companies Inc; 2006. s. 195.
178. Gupta S, Sathyan G, Mori T. New perspectives on the overactive bladder: pharmacokinetics and bioavailability. Urology 2002; 60: 78-80.
179. Dmochowski RR, Appell RA. Advancements in pharmacologic management of the overactive bladder. Urology 2000; 56: 41-9.
180. Andersson KE. Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. Lancet Neurol 2004; 3: 46-53.
181. Ouslander MD, Joseph G. Management of overactive bladder. N Engl J Med 2004; 350: 786-99.

182. Abrams P, Cardozo L, Fall M. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the ınternational continence society. Neurourol Urodyn 2002; 21: 167-78.
183. Hu TW, Moore K, Subak L. Economics of incontinence. içinde: Abrams P, Cardozo L, Khoury S, Wein A. editors. Incontinence. 2 nd ed. Plymouth: Health Publications; 2002. s. 3-20.
184. Srikrishna S, Robinson D, Cardozo L, Vella M. Management of overactive bladder syndrome. Postgrad Med J 2007; 8: 481–86.
185. Benjamin J, Epstein G, John G, Gums, Emerson M. Agents for the management of overactive bladder. Am Fam Physician 2006; 74: 2061-8.
186. Zorzitto ML, Holliday PJ, Jewett S, Herschorn SS, Fernie GR. Oxybutynin Chloride for geriatric urinary dysfunction: A double-blind placebo-controlled study. Age Ageing 1989; 18: 195-200.
187. Miller KL. Urinary incontinence in elderly women. Primary Care Update for OB/GYNS. 2003; 10: 242-6.
188. Kuteesa W, Moore KH. Anticholinergic drugs for overactive bladder. Australian Presciber 2006; 29(1): 22-4.
189. Sık İdrara Çıkmanın Yarattığı Sorunlar. Aylık Güncel Eczacılık Dergisi 2004; 128: 17-18.
190. Hedge SS, Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. Life Sciences 1999; 64: 419-28.
191. Oki T, Toma-Okura A, Yamada S. Advantages for transdermal over oral oxybutynin to treat overactive bladder: muscarinic receptor binding, plasma drug concentration, and salivary secretion. JPET 2006; 316: 1137–45.
192. ÜROPAN® Tablet, Koçak Farma İlaç ve Kimya sanayi AŞ. 23.10.1992, 162/25.

193. Andersson KE. Drug theraphy for urinary incontience. Balliere's Clinical Obsterics and Gynaecology 2000; 14(2): 291-313.
194. Woolfson AD, Malcolm RK, Gallagher RJ. Design of a Silicone Reservoir Intravaginal ring for the delivery of oxybutynin. J Control Rel 2003; 91: 465-76.
195. Douchamps J, Derenne F, Stockis A, Gangji D, Juvent M, Herchuel A. The pharmacokinetics of oxybutynin in man. Eur J Clin Pharmacol 1988; 35: 515–20.
196. Zobrist RH, Schmid B, Feick A, Quan D, Sanders SW. Pharmacokinetics of the R- and S-enantiomers of oxybutynin and N-desethyloxybutynin following oral and transdermal administration of the racemate in healthy volunteers. Pharm Res 2001; 18: 1029–34.
197. Yarker YE, Goa KL, Fitton A. Oxybutynin a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. Drugs Aging 1995; 6: 243-62.
198. Lukkari E, Taavitsainen P, Juhakoski A, Pelkonen O. Cytochrome P450 specificity of metabolism and ınteraction of oxybutynin in human liver microsomes. Pharmacol Toxicol. 1998; 82: 161-6.
199. Goldenberg MM. An extended-release formulation of oxybutynin chloride for the treatment of overactive urinary bladder. Clin Ther 1999; 21: 634-42.
200. Birns J, Lukkari E, Malone-Lee JG. A Randomized controlled trial comparing the efficacy of controlled-release oxybutynin tablets (10 mg once daily) with conventional oxybutynin tablets (5 mg twice daily) in patients whose symptoms were stabilized on 5 mg twice daily of oxybutynin. BJU Int 2000; 85: 793-98.
201. Davila GW. Transdermal oxybutynin: A new treatment for overactive bladder. Expert Opin Pharmacother 2003; 4: 2315-24.
202. Laustsen G, Wimett L. Drug approval highlights for 2003. Nurse Pract. 2004; 29: 8-15.

203. OXYTROL™, Oxybutynin Transdermal Sistem, WATSON Pharma. Inc., A Subsidiary of Watson Pharmaceuticals, Inc., Corona, CA 92880, USA. Date of Issuance: February 2003.
204. Dmochowski RR, Sand PK, Zinner NR, Gittelman MC, Davilla GW, Sanders, SW. Comparative efficacay and safety of transdermal oxybutynin and oral tolteredine versus placebo in previously treated patients with urge and mixed urinary incontinence. Urology 2003; 62: 237-42.
205. Appell RA, Chancelor MB, Zobrist RH, Tomas H, Sanders SW. Pharmacokinetics, metabolism, and saliva output during transdermal and extended-release oral oxybutynin administration in healthy subjects. Mayo Clin Proc 2003; 78: 696-702.
206. Gupta S, Sathyan G, Mori T. New perspectives on the overactive bladder: pharmacokinetics and bioavailability. Urology 2002; 60: 78-80.
207. Malcolm K, Woolfson D, Russell J, Tallon P, McAuley L, Craig D. Influence of silicone elastomer solubility and diffusivity on the in vitro release of drug from intravaginal rings. J Control Release 2003; 90: 217-25.
208. Schröder A, Levin RM, Kogan, BA, Das AK, Kay F, Mahashabde A. Absorption of oxybutynin from vaginal ınserts: drug blood levels and the response of the rabbit bladder. Urology 2000; 56: 1063-7.
209. Levin RM, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Leggett RE. Effectiveness of vaginally administered oxybutynin on rabbit bladder function. Urology 2003; 61: 1273-7.
210. Alemdaroğlu C, Değim Z, Celebi N, Zor F, Oztürk S, Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. Burns 2006; 32(3): 319-27.

211. Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Filipović-Grcić J, Martinac A, Jalsenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. J Control Release. 2005; 106(1-2): 34-43.
212. Schmolka IR. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. J Biomed Mater Res 1972; 6: 571–582
213. Kumbar SG, Kulkarni AR, Aminabhavi M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent, J Microencapsul. 2002; 19(2): 173-80.
214. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. Pharm Res. 1997; 14(10): 1431-6.
215. Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park JB, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. Int J Pharm. 2002; 249(1-2): 165-74.
216. Bozkir A, Saka OM. Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. J Drug Target. 2004; 12(5): 281-8.
217. Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. J Control Rel. 1996; 39: 17-25.
218. Colowıck PC, Kaplan NO. Methods in Enzymology. V:LVIII Cell Culture, 1979: 132-152.
219. Varma MVS., Kaushal AM., Garg S., Rapid and selective UV spectrophotometric and RP-HPLC methods for dissolution studies of oxybutynin immediate-release and controlled-release formulations, J. Pharm. Biomed. Analy. 2004; 36: 669-74.

220. Woolfson AD, Malcolm RK, Gallagher RJ. Design of a Silicone Reservoir Intravaginal Ring for the Delivery of Oxybutynin, J Control Rel.2003; 91: 465-76.
221. Nicoli S, Penna E, Padula C, Colombo P, Santi P, New transdermal bioadhesive film containing oxybutynin: in vitro permeation across rabbit ear skin. Int. J. Pharm. 2006; 325: 2-7.
222. Massoud R, Federici G, Casciani S, Stasi SD, Fucci G, Giannantoni A, Cortesepavelic C, Extraction and determination of oxybutynin in human bladder samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chrom B: Biomedical Sciences and Applications 1999; 734: 163-67.
223. Luner PE, Kirsch LE, Majuru S, Oh E, Joshi AB, Wurster DE, Redmon MP. Preformulation studies on the S-isomer of oxybutynin hydrochloride, an Improved Chemical Entity (ICE). Drug Dev Ind Pharm 2001; 27(4): 321-9.
224. Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Tırnaksız F. Modern Farmasötik Teknoloji, 2. Baskı. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını. Mattek Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.; 2009. s. 183-222.
225. GINDY A, Emara S, Mesbah MK, Hadad GM. Spectrophotometric and liquid chromatographic determination of fenofibrate and vincopocetine and their hydrolysis products. IL Pharmaco 2005; 60: 425-38.
226. Andrews GP, Donnelly L, Jones DS, Curran RM, Morrow RJ, Woolfson AD, Malcolm RK. Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery. Biomacromolecules. 2009; 10(9): 2427-35.
227. Karavana SY, Güneri P, Ertan G. Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: Preparation, rheological,

textural, mucoadhesive and release properties. Pharm Dev Technol. 2009 Apr 17. [Epub ahead of print]

228. Baloğlu E, Karavana SY, Şenyiğit ZA, Güneri T. Thermosensitive and mucoadhesive vaginal gel formulations of econazole nitrate. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7-10 April 2008, Barcelona.
229. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, Faurisson F, Rouveix B. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. Int J Pharm. 1999; 192(2): 183-93.
230. Bilensoy E, Rouf MA, Vural I, Sen M, Hincal AA. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole:beta-cyclodextrin complex. AAPS PharmSciTech. 2006; 7(2): E1-8.
231. Pose-Vilarnovo B, Rodríguez-Tenreiro C, Rosa dos Santos JF, Vázquez-Doval J, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, Torres-Labandeira JJ. Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. J Control Rel 2004; 94(2-3): 351-63.
232. Ansari M, Kazemipour M, Aklamli M. The study of drug permeation through natural membranes. Int J Pharm. 2006; 327(1-2): 6-11.
233. Varma MV, Kaushal AM, Garg S. Influence of micro-environmental pH on the gel layer behavior and release of a basic drug from various hydrophilic matrices. J Control Release. 2005; 103(2): 499-510.
234. Jia Y, Joly H, Omri A. Liposomes as a carrier for gentamicin delivery: development and evaluation of the physicochemical properties. Int J Pharm. 2008 Jul 9;359(1-2):254-63. Epub 2008 Mar 30.
235. Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes.Eur J Pharm Biopharm. 2007 Aug;67(1):86-95. Epub 2007 Feb 12.

236. Çilek A. İnterlökil 2'nin Pulmoner Yoldan Uygulanabilecek Lipozom Formülasyonunun Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008.
237. Çelebi N, Çilek A. Investigation of stability of Interleukin-2 liposome formulation by SDS-Page Analysis. PB-P-008, P:186, 69 International Congress of FIP, Responsibilitiy for Patient Outcomes- are You Ready? 3-8 September 2009, İstanbul.
238. Zeng XM, Martin GP, Marriot C. The controlled delivery of drugs to the lung. Int J Pharm 1995; 124: 149-64.
239. Alemdaroğlu C, Degim Z, Celebi N, Sengezer M, Alömeroglu M, Nacar A. Investigation of epidermal growth factor containing liposome formulation effects on burn wound healing. J Biomed Mater Res A. 2008; 85(1): 271-83.
240. Salvati A, Ristori S, Oberdisse J, Spalla O, Ricciardi G, Pietrangeli D, Giustini M, Martini G. Small angle scattering and zeta potential of liposomes loaded with octa(carboranyl)porphyrazine. J Phys Chem B. 2007 Sep 6;111(35):10357-64.
241. Lasic DD. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol. 1998; 16(7): 307-21.
242. Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Schubert R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. Int J Pharm. 2001 May 21;219(1-2):139-49.
243. Mutlu NB. Rivastigminin Lipozom Formülasyonunun Geliştirilmesi Ve Hücre Kültürlerinden Geçişinin İncelenmesi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
244. Yetkin G. Transforming Growth Faktör Alfa'nın Değişik Formülasyonlarının Gastrointestinal Sistemdeki Stabilitesinin İncelenmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2002.
245. Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Jalsenjak I. Liposomes containing drugs for treatment of vaginal infections. Eur J Pharm Sci 1999 ; 8(4): 345-51.

246. Steele G. Preformulation Predictions from Small Amounts of Compound as an Candidate Drug Selection. In: Gibson M. editor. Pharmaceutical Preformulation and Formulation. 1 st ed. Florida,: Interpharm/CRC; 2004.p.21-88.
247. McAllister SM, Alpar HO, Teitelbaum Z, Bennett DB. Do interactions with phospholipids contribute to the prolonged retention of polypeptides within the lung? Adv Drug Del Rev 1996; 19: 89-110.
248. Yeeprae W, Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M, Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of cationic liposomes. Pharmazie 2005; 61: 102-5.
249. Pavelić Z, Skalko-Basnet N, Schubert R, Jalsenjak I. Liposomal gels for vaginal drug delivery. Methods Enzymol. 2004;387:287-99.
250. Lasch J, Bouwstra J. Interaction of external lipid (lipid vesicles) with the skin. J. Liposome Res 1995; 5: 543–569.
251. Mourtas S, Haikou M, Theodoropoulou M, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study.J Colloid Interface Sci. 2008 ; 317(2): 611-9.
252. Jain SK, Singh R, Sahu B. Development of a liposome based contraceptive system for intravaginal administration of progesterone. Drug Dev Ind Pharm 1997; 23(8): 827–830.
253. Ning M, Guo Y, Pan H, Chen X, Gu Z. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of liposomal/niosomal gel delivery systems for clotrimazole. Drug Dev Ind Pharm. 2005; 31(4-5): 375-83.
254. Xu Y, Hanna MA. Electrosprayed bovine serum albumin-loaded tripolyphosphate cross-linked chitosan capsules: synthesis and characterization. J Microencapsul. 2007; 24(2): 143-51.
255. Shu XZ, Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. Int J Pharm. 2000; 201(1): 51-8.

256. Shu XZ, Zhu KJ. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. J Microencapsul. 2001; 18(2): 237-45.
257. Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Aral C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres. J Pharm Sci. 2002; 91(5): 1245-51.
258. Değim Z. Use of microparticulate systems to accelerate skin wound healing. J Drug Target 2008; 16(6): 437-48.
259. Jones DS, Irwin CR, Woolfson AD, Djokic J, Adams V**.** Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. J Pharm Sci 1999; 88: 592-598.
260. Jones DS, Woolfson A.D., Brown A.F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. Int J Pharm. 1997; 151: 223-233.
261. Jones DS, Woolfson AD, Djokic J, Coulter WA.Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. Pharm Res. 1996 Nov;13(11):1734-8.
262. Jones DS, A. Woolfson D, Brown AF, O'Neill MJ. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. J Control Rel 1997; 49: 71-79.
263. Peppas NA, Buri PA. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. J Control Rel. 1985; 2: 257-275.
264. Chary RB, Vani G, Rao YM. In vitro and in vivo adhesion testing of mucoadhesive drug delivery systems. Drug Dev Ind Pharm 1999; 25(5): 685-90.
265. Koffi AA, Agnely F, Ponchel G, Grossiord JL. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive

poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. Eur J Pharm Sci 2006; 27(4): 328-35.

266. Değim Z, Celebi N, Sayan H, Babül A, Erdoğan D, Take G. An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. Amino Acids. 2002; 22(2): 187-98.
267. Değim T, Eğlen B, Ocak O. A sustained release dosage form of acyclovir for buccal application: an experimental study in dogs. J Drug Target. 2006; 14(1): 35-44.
268. Chou EC, Whitbeck C, Borow A, Burden O, Levin RM. Inhibition of hyperreflexia by vaginally administered oxybutynin: a novel rabbit model. J Urol. 2004; 171: 958-62
269. McCrery RJ, Appell RA. Oxybutynin: an overview of the available formulations. Ther Clin Risk Manag. 2006; 2(1): 19-24.
270. Wuest, M. Oxybutynin, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference 2008; 21:1-13.
271. Cartwright R, Cardozo L. Transdermal oxybutynin: sticking to the facts. Eur Urol. 2007; 51(4): 907-14.
272. Ito Y, Oyunzul L, Yoshida A, Fujino T, Noguchi Y, Yuyama H, Ohtake A, Suzuki M, Sasamata M, Matsui M, Yamada S. Comparison of muscarinic receptor selectivity of solifenacin and oxybutynin in the bladder and submandibular gland of muscarinic receptor knockout mice. Eur J Pharmacol 2009; 615(1-3): 201-6.
273. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome ofoxidative damage to nucleic acids, Bioessays, 2004; 26(5): 533–542.

11. EKLER

EK1

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

09/11/2004

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/062-15520
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-04.033 kod numaralı ve ***"Kontrollü Salım Yapan Biyoadezif Vajinal Şekilleri Üzerinde Çalışmalar II."*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-04.033 and entitled ***"Studies on bioadhesive controlled release vaginal dosage forms II."*** is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

EK 2

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

11/01/2005

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 05 - 405
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-04.046 kod numaralı ve ***"Cidofovirin Topik Etkili Biyoadezif Vajinal İlaç Şekillerinin Geliştirilmesi"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-04.046 and entitled ***"Development of Topical Bioadhesive Cidofovir Vaginal Drug Delivery Systems."*** is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

12. TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her konuda destekleyen tez danışman hocam **Prof.Dr. Füsun Acartürk'**e

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarını, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen hocalarım **Prof.Dr.Nevin Çelebi'ye** ve **Prof.Dr. İlbeyi Ağabeyoğlu'**na,

Katkılarından dolayı **Prof.Dr.Tanver Doğanay'**a,

Çalışmalarımda karşılaştığım her sorunda yardımını esirgemeyen **Prof.Dr.Tuncer Değim'**e**,**

Çalışmalarım sırasında vermiş oldukları destek ve yardımlardan dolayı **Sayın Doç.Dr. Figen Tırnaksız'**a ve **Doç.Dr. Zelihagül Değim'**e**,**

Tecrübeleri, anlayışları ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan ve beni motive eden **Doç.Dr. Sevgi Takka** ve **Yrd.Doç.Dr.Zeynep Şafak Teksin'**e**,**

Mukoadezyon çalışmalarım sırasında bütün özverisiyle bana yardımcı olan **Yrd.Doç.Dr. Erdal Cevher** ve **Uygar Karsan'**a,

İn vivo çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı **Prof.Dr.Seyyal Rota, Doç.Dr.Gülendam Bozdayı ve Dr.Neslihan Gürbüz'**e**,**

Hücre kültürü çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı **Prof.Dr. Aykut Özkul** ve **Veteriner Hekim Hümay Akın'**a,

Histoloji çalışmalarındaki katkılarından dolayı **Prof.Dr.Deniz Erdoğan, Doç.Dr.Çiğdem Elmas** ve **Dr.Güleser Göktaş'**a,

Tükrük bezi çalışmalarımdaki katkılarından dolayı **Doç.Dr. ŞULE Coşkun Cevher, Gülçeri Güleç** ve **Filiz Bircan**'a,

Özellikle lipozom formülasyon çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı **Dr.Ecz. Ayşe Çilek Karaca**'ya

SEM görüntülerinin elde edilmesindeki katkılarından dolayı **Doç.Dr. Uğur Tamer'**e**,**

Emeği ve sabrıyla her zaman beni destekleyen bütün zor zamanlarımda yardımıma koşan ve özellikle DSC çalışmalarındaki

katkılarından dolayı sevgili oda arkadaşım **Uzm.Ecz.Sibel İlbasmış Tamer'**e**,**

Her çağırdığımda yardımıma koşan **Uzm.Ecz.Başaran Mutlu'ya,**

Çalışmalarım sırasındaki anlayışları ve destekleri için bölüm arkadaşlarım **Uzm.Ecz. Tuba İnceçayır, Uzm.Ecz. Evren Odabaşıoğlu ve Uzm.Ecz. Şeyda Akkuş'**a,

Yardımlarından dolayı **Fatma Çelik**'e,

Her zaman yardıma hazır olan arkadaşlarım **Dr.Ali Murat İrat, Dr.Gökçen Eren ve Uzm.Ecz. Can Tufan'**a**,**

Yardımlarıyla yükümü hafifleten **Fatoş Çimel'**e,

Bütün imkansızlıkları benim için olduran **Sayın Ali Çakıcı ve Özge Çakıcı'**ya**,**

Her nefesimde varlığı bana güç veren annem **Hayriye TUĞCU'**ya,

Yürüdüğüm bu zorlu yolda elimi bırakmayan sevgili eşim **Uzm.Ecz. Hakan Demiröz'**e**,**

Ve son olarak ondan çaldığım her saniye için özür dileyerek sevgili kızım **Tuğçe Demiröz'**e

TEŞEKKÜR EDERİM...

13.ÖZGEÇMİŞ

Adı	: Fatmanur
Soyadı	: Tuğcu Demiröz
Doğum Yeri ve Tarihi	: Ürgüp, 21.06.1976

Eğitimi	:
2001 -	***Doktora,*** Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara
1999 – 2001	***Yüksek Lisans***, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Yüksek Lisans Tezi "Doğal Polimerler Kullanılarak Kolona Hedeflendirilmiş İlaç Şekillerinin Geliştirilmesi."
1994 – 1998	**Lisans**, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:
Farmasötik Bilimler Ankara Derneği (FABAD)
Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
Kontrollü Salım Sistemleri Derneği
American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)

Bilimsel Etkinlikleri :

A. Araştırma Makaleleri

1. DINÇ, E., SERIN, C., **TUĞCU-DEMIRÖZ F.**, DOĞANAY, T., "Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer", International Journal of Pharmaceutics, 250, 339-350, 2003.
2. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.**, ACARTÜRK, F., TAKKA, S., KONUŞ, Ö. L., "In vitro and in vivo evaluation of mesalazine-guar gum matrix tablets for colonic drug delivery", Journal Of Drug Targeting, 12(2), 105-112, 2004.
3. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.**, ACARTÜRK, F., TAKKA, S., "Investigation of colon-specific dosage forms of ondansetron prepared with natural polymers", Pharmazie, 61 (11), 916-919, 2006.
4. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.**, ACARTÜRK, F., TAKKA, S., KONUŞ, Ö. L., **"**Evaluation of alginate based mesalazine tablets for intestinal drug delivery", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 67 (2), 491-497, 2007.

5. DEĞİM,T., **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** İLBASMIŞ, S., ACARTÜRK, F., "Development of Controlled Release Sildenafil Formulations for Vaginal Administration", Drug Delivery, 15, 259-265, 2008.

B. Derleme Makaleleri

1. TUĞCU-DEMİRÖZ, F., ACARTÜRK, F., "Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler", FABAD, Far. Bil.Derg., 27, 117-134, 2002.

C. Sunulan Bildiriler

1. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., TAKKA, S., " Investigation of the Colon-Specific Dosage Forms using Sodium Alginate", 61st International Congress of FIP, Singapore, 1-6 September 2001, p. 81.
2. ACARTÜRK, F., **TUĞCU-DEMIRÖZ, F.,** TAKKA, S., KONUŞ,Ö.L., "In vitro and in vivo evaluation of colon-specific guar gum matrix tablets of Mesalamine", 7th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Noordwijk aan Zee, The Netherlands, 3/5 April 2002, Abtracts p.67-70 (Proceeding J. Control. Rel., 87, 1-3, 225-228, 2003).
3. **TUĞCU-DEMIRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., TAKKA, S., KONUŞ, Ö.L., "In-vivo evaluation of colon-specific matrix tablets with mesalamine and sodium alginate in healthy volunteers", Proc.4th World Meeting, APGI, Florence, Italy, 8/11 April 2002, Abtracts p.99-100.
4. DİNÇ,E., SERİN,C., **TUĞCU-DEMİRÖZ,F.,** DOĞANAY,T., "Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer", International Symposium on Scientific and Regulatory Aspects of Dissolution and Bioequivalence, Athens, Grece, 12/14 April 2002, Abtracts p.200.
5. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., TAKKA, S., "Investigation of the colon- specific matrix tablets of ondansetron with natural polymers", 11th International Pharmaceutical Technology Symposium, 9-11 September 2002, İstanbul, Turkey, Abtracts p.208.
6. DEMİRCİGİL, B.T., **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** SAYAR, E., CEYHAN, T., CEVHEROĞLU, Ş., "Simultaneous Determination Of Paracetamol And Chlorzoxazone In Pharmaceutical Preparations By Second Order UV-Derivative Spectrometry And Drug Dissolution Studies" 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 June 2003, Ankara, Turkey, Abstracts p.172.
7. ACARTÜRK, F., DEĞİM,T., **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** İLBASMIŞ, S., "Vaginal Controlled Release Sildenafil Tablets", 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in Drug Delivery, 2 September-1 October 2003, Versailles-France, Abstract p.150.

8. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** İLBASMIŞ, S., DEĞİM,T., ACARTÜRK, F., "Preparation of Controlled Release Sildenafil Containing Vaginal Systems", 12TH International Pharmaceutical Technology Symposium, 12-15 September 2004, İstanbul, Turkey, Abtracts p.249.
9. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., DEĞİM,T., "Stability Tests of 5-Aminosalicylic Acid Containing Solutions And Colon Specific Tablets", 12th International Pharmaceutical Technology Symposium, 12-15 September 2004, İstanbul, Turkey, Abtracts p.171.
10. CELKAN, A., ACARTÜRK, F., GÖKÇORA, N., **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.**, ESEN, B., GÜNER, L., "In Vitro and In Vivo evaluation of Guar Gum-Based Colon specific Dosage Forms of Theophylline", 1st Pharmaceuticals Sciences Fair & Exhibition, 12-17 June 2005, Nice, France.
11. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., "PREPARATION OF CONTROLLED RELEASE OXYBUTYNIN CONTAINING BIOADHESIVE VAGINAL GEL", 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 7-10 April 2008, Barcelona, Abtracts p.267.
12. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., "CONTROLLED RELEASE OF CIDOFOVIR FROM BIOADHESIVE VAGINAL CHITOSAN GEL", 14th International Pharmaceutical Technology Symposium, 06-10 September 2008, Antalya, Abtracts p.30.
13. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., "INVESTIGATION OF MUCOADHESIVE PROPERTIES OF VAGINAL GEL FORMULATIONS: AN IN VITRO EVALUATION USING TEXTURE ANALYZER", 2nd Pharmaceuticals Sciences Fair & Exhibition, 08-12 June 2009, Nice, France p.138.
14. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., "DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF A LIPOSOMAL VAGINAL DELIVERY SYSTEM FOR OXYBUTYNIN", 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 18-22 July 2009, Copenhagen, Denmark, p.809.
15. ACARTÜRK, F.,**TUĞCU-DEMİRÖZ, F.**, "CHARACTERISATION AND IN VITRO EVALUATION OF BIOADHESIVE LIPOSOME GELS OF CIDOFOVIR", 69th International Congress of FIP, Main Theme: Responsibility For Patient Outcomes-Are You Ready?, 03-08 September 2009, İstanbul, Türkiye, p:DIV-P-007
16. **TUĞCU-DEMİRÖZ, F.,** ACARTÜRK, F., **"**Liposomal Gels for Vaginal Drug Delivery of Cidofovir", 3rd BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 26-28 October 2009, Antalya.

D. Çalışılan Araştırma Projeleri

TÜBİTAK, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) Tarafından Desteklenen Araştırma Projeleri:

1. **"**Doğal Polimerler Kullanilarak Kolona Hedeflendirilmiş İlaç Şekillerinin Geliştirilmesi", Proje No: SBAG-2306, 2000-2002. Proje tamamlandı.
2. "Kontrollü Salım yapan Biyoadezif Vajinal İlaç Şekilleri Üzerinde Çalışmalar", Proje No: SBAG-2807 (104S324), 2005-2008. Proje tamamlandı.

Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenen Araştırma Projeleri:

1. **"**Doğal polimerler kullanarak kolona hedeflenmiş ilaç şekillerinin geliştirilmesi", proje no: 11/2001-09, 2001-2003**.** Proje tamamlandı.
2. "İnfertility (Kısırlık) tedavisinde Sildenafil: oral ve vajinal olarak uygulanabilecek formülasyonların geliştirilmesi üzerinde çalışmalar", Proje No: 02/2004-26, 2004. Proje tamamlandı.
3. **"**Cidofovirin Topik Etkili Biyoadezif Vajinal İlaç Şekillerinin (sc) veya İntralezyonal Olarak Uygulanan Çözelti Şeklindeki Preparatı ile Karşılaştırılması", Proje No: BAP 02/2006-08, 2006-2009, Proje tamamlandı.

E. Alınan Ödüller

TUĞCU-DEMİRÖZ, F., "Doğal Polimerler Kullanılarak Kolona Hdeflendirilmiş İlaç Şekillerinin Geliştirilmesi" (Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Füsun ACARTÜRK): 11th Inter. Pharm. Technol. Symp.(IPTS-2002), İstanbul, Turkiye, Eylül 11-13, 2002, **"En İyi Bilim Uzmanlığı Tezi Ödülü, IPTS-2002".**

TUĞCU-DEMİRÖZ, F., "In vivo Evaluation of Colon-specific Matrix Tablets with Mesalamine and Sodium Alginate in Healty Volunteers, 10th International Conference on Pharmaceutical Technology, Florence,Italy, 8-11 April 2002, p,99-100. "**Travel Grant"** from The Nagai Foundation, Tokyo, Yayoi 2-4-16, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032-JAPAN.