



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

**DOKTORA
TEZİ**

**MANTAR ENFEKSİYONUNDA KULLANILACAK
TOPIKAL TAŞIYICI SİSTEMLER ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

ESRA KODAN

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2024



**MANTAR ENFEKSİYONUNDA KULLANILACAK TOPİKAL TAŞIYICI
SİSTEMLER ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Esra KODAN

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra KODAN
12/01/2024

MANTAR ENFEKSİYONUNDA KULLANILACAK TOPİKAL TAŞIYICI SİSTEMLER ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

(Doktora Tezi)

Esra KODAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Çalışmanın amacı, tırnak mantarı enfeksiyonunun tedavisinde topikal olarak kullanılan siklopiroks ve üre içeren bijel formülasyonlarının geliştirilmesi, karakterizasyonlarının yapılması, in-vitro biyouyumluluk ve in vitro antifungal çalışmalarla in-vitro/ex- vivo etkinliklerinin değerlendirilmesidir. Öncelikle bijel formülasyonu için hidrojel ve organojel sistemleri hazırlandı. Bijelin dış fazı hidrojel, iç fazı damlalar halinde olan organojelden oluşmaktadır. Siklopiroks iç faz olan organojele, üre de dış faz olan hidrojele yüklendi. Organojel ve hidrojel çeşitli oranlarda karıştırıldı ve optimum formülasyon elde edebilmek için istatistiksel deney tasarımı yapıldı. Hazırlanan formülasyonlardan damla büyüklüğü en küçük olan ve faz ayrışması görülmeyen formülasyonlar (B1, B5 ve B8) seçildi. Bu optimum formülasyonlar fiziksel görünüş, damla boyutu, etkin madde miktar tayini, viskozite, viskoelastisite ve yapı analizi özellikleri, in-vitro salım, ex-vivo permeasyon çalışmaları, in-vitro antifungal etkinlik, in-vitro biyouyumluluk çalışmaları ve stabilite açısından incelendi. Tüm sonuçlara bakıldığında B1 formülasyonunun tırnak ve bitişiğindeki deriye uygulanabilmesi için uygun viskozitede olduğu dokularda birikiminin MIC değerinden yüksek olduğu, in-vitro antifungal aktiviteye de sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak siklopiroks ve üre içeren bijel formülasyonlarının başarılı şekilde geliştirildi.

Bilim Kodu : 1020

Anahtar Kelimeler : Siklopiroks, tırnak mantarı, bijel, topikal tedavi

Sayfa Adedi : 217

Danışman : Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

STUDIES ON TOPICAL CARRIER SYSTEMS TO BE USED IN FUNGAL INFECTION

(Ph. D. Thesis)

Esra KODAN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

The aim of the study is to develop and characterize bijel formulations containing ciclopirox and urea, which are used topically in the treatment of nail fungal infection, and to evaluate their in-vitro/ex-vivo activities with in-vitro biocompatibility and in-vitro antifungal studies. First of all, hydrogel and organogel systems were prepared for bijel formulation. The outer phase of bijel consists of hydrogel and the inner phase consists of organogel in the form of drops. Ciclopirox was loaded into the organogel, which is the internal phase, and urea was loaded into the hydrogel, which is the external phase. Organogel and hydrogel were mixed in various proportions and a statistical experimental design was made to obtain the optimum formulation. Among the prepared formulations, those with the smallest drop size and no phase separation (B1, B5 and B8) were selected. These optimum formulations were examined in terms of physical appearance, droplet size, active ingredient quantification, viscosity, viscoelasticity and structure analysis properties, in-vitro release, ex-vivo permeation studies, in-vitro antifungal activity, in-vitro biocompatibility studies and stability. Considering all the results, it was seen that the B1 formulation had an appropriate viscosity to be applied to the nail and adjacent skin, its accumulation in tissues was higher than the MIC value, and it also had in-vitro antifungal activity. As a result, bijel formulations containing ciclopirox and urea were successfully developed.

Science Code : 1020
Key Words : Ciclopirox, nail fungus, bijel, topical treatment
Page Number : 217
Supervisor : Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

TEŞEKKÜR

Akademik bilgisiyle her çıkmazda yolumu aydınlatan, hayat tecrübesiyle de her daim örnek aldığım, doktoradaki şansım olarak gördüğüm Sayın Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ'a; tez izleme jürimde yer alan ve çalışmalarımı tecrübeleriyle destekleyen Sayın Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER ve Sayın Doç. Dr. Ulya BADILLI hocalarıma, takıldığım her noktada kapısını rahatça çalabildiğim Sayın Doç. Dr. Serdar TORT'a, doktora dönemim boyunca her an desteklerini hissettiğim Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA, Sayın Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN, Sayın Prof. Dr. Tuba İNCEÇAYIR, Sayın Prof. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ, Sayın Doç. Dr. Başaran MUTLU AĞARDAN, verdikleri doktora dersleriyle akademik hayatıma katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ, Sayın Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK, Sayın Prof. Dr. Tuncer DEĞİM, ve bölüm sekreteri olmaktan öte olan Fatma ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaştan öte olan, uzakta olsalar bile desteklerini her daim hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur OKTAY ve Dr. Öğr. Üyesi Tuba TAŞKAN'a, asistan olduğum süre boyunca desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hazal Ezgi GÜLTEKİN, Dr. Öğr. Üyesi Sıla GÜLBAĞ PINAR, Dr. Öğr. Üyesi Yasin TURANLI, Dr. Öğr. Üyesi M. Ozan TOKSOY, Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre YALÇIN, Dr. Ecz. Duygu ÖZDAL, Dr. Ecz. Gamze RÜZGAR, Ecz. Aysel YILMAZ, Arş. Gör. Sinem Saar, Arş. Gör. Ayşegül Yıldız, Dr. Ecz. Burcu TİMUR, Arş. Gör. Seval OLGAÇ'a, fakülteden ayrıldıktan sonra kolum kanadım olan Arş. Gör. Emre TUNCEL'e ve ex-vivo çalışmalarımı yapmam için sığır toynağı temin eden Dr. Araş. Gör. Duygu YILMAZ USTA ve eşi Utku USTA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Polarize ataçmanlı mikroskop çalışmalarında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Erem BİLENSOY ve Dr. Bio. Cem Varan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi BAP- 02/2020-22 kodlu proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi'ne, mikrobiyoloji çalışmalarında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Berrin Özçelik, sıçan deri örneklerinin tedariginde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mürşide Ayşe Demirel ve sitotoksiste çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Esra Emerce hocalarıma ve desteklerinden dolayı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundaki çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Neredeyse tezimle yaşıt olan canım oğlum Mehmet Tunç KODAN'a, her zaman desteğini hissettiğim, hayat arkadaşım Ahmet KODAN ve ailesine, bugünlere gelmemde bana her fırsatı tanıyan canım annem Havva AKÇA ve canım babam Mehmet AKÇA'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tırnak Bölgesinin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2. Tırnak Mantarı (Onikomikoz).....	5
2.2.1. Tırnak mantarı tipleri	6
2.3. Tedavi Yöntemleri	7
2.3.1. Topikal tedavi.....	8
2.3.2 Topikal tedavinin avantajları	12
2.4. Topikal Tedaviyi Etkileyen Değişkenler	12
2.4.1. Formülasyonun özellikleri	13
2.4.2. Tırnak mantarı için partiküler taşıyıcı sistemlerin kullanımı	14
2.4.3. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri	15
2.5. Tırnak Plağına Penetrasyonu Artırma Yöntemleri.....	16
2.5.1. Tırnak plağının aşındırılması	17
2.5.2. Tırnak plağının mikroporasyonu.....	18

	Sayfa
2.5.3. Tırnak plağının kimyasal olarak yumuşatılması	18
2.5.4. Hidrasyon	20
2.5.5. İyontoforez	20
2.6. Topikal İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Jeller	21
2.6.1. Hidrojel ve organojel sistemleri	23
2.6.2. Bijel sistemleri	26
2.7. Bijellerin karakterizasyonu	31
2.7.1. Görüntüsel özelliklerin incelenmesi.....	31
2.7.2. pH tespiti	31
2.7.3. Jel oluşup oluşmadığının tespiti	31
2.7.4. Akış özellikleri ve viskozitenin incelenmesi.....	32
2.7.5. Damlaların incelenmesi.....	34
2.7.6. Hidrojel ve organojel arasındaki etkileşimin incelenmesi	36
2.7.7. Stabilite çalışmaları.....	38
2.7.8. Ex-vivo penetrasyon çalışmaları ve dokudaki etkin madde miktarının/yüzdesinin belirlenmesi çalışmaları.....	39
2.7.9. İn-vitro etkin madde salım çalışmaları.....	42
2.7.10. İn-vitro antifungal aktivite (mikrobiyolojik) çalışmaları	47
2.7.11. İn-vitro biyouyumluluk (Sitotoksosite) çalışmaları	48
2.7.12. İn-vivo çalışmalar.....	49
2.8. Siklopiroks	50
2.8.1. Siklopiroksun yapısı ve özellikleri.....	50
2.9. Üre.....	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59
3.1. Gereç	59

	Sayfa
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	59
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	59
3.1.3. Kullanılan yazılımlar.....	60
3.2. Yöntem.....	60
3.2.1. Çalışmalarda kullanılan tampon çözelti ve hazırlanması.....	60
3.2.2. Etkin madde ve yardımcı maddelerin karakterizasyon çalışmaları.....	61
3.2.3. Siklopiroksun miktar tayini yöntemi ve validasyonu	62
3.2.4. Ürenin miktar tayini yöntemi ve validasyonu.....	65
3.2.5. Bijel formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu.....	68
3.2.6. Hidrojel, organojel ve bijel formülasyonlarında in-vitro salım çalışmaları.....	88
3.2.7. Bijel formülasyonlarında ex-vivo permeasyon çalışmaları ve dokularda miktar tayini.....	90
3.2.8. Bijel formülasyonlarının toynağı şişirme derecesinin tespiti.....	93
3.2.9. Bijel formülasyonlarında bekletilen toynakların SEM görüntüsü	93
3.2.10. Bijel formülasyonlarında in-vitro antifungal aktivite çalışmaları.....	94
3.2.11. Bijel formülasyonlarında in-vitro sitotoksosite çalışmalar	99
3.2.12. Stabilité çalışmaları.....	100
4. BULGULAR	103
4.1. Siklopiroks ve Ürenin Fizikokimyasal Özelliklerin Belirlenmesine Ait Bulgular.....	103
4.1.1. Siklopiroks ve ürenin erime noktası tayini.....	103
4.1.2. Siklopiroks ve ürenin FTIR spektrumu.....	104
4.1.3. Siklopiroks ve ürenin çözünürlük çalışmalarına ait bulgular.....	105
4.1.4. Partisyon katsayısının belirlenmesine ait bulgular.....	105
4.2. Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyon Bulguları	106

Sayfa

4.2.1. Siklopiroksun HPLC analiz yöntemine ait bulgular	106
4.2.2. Ürenin HPLC analiz yöntemine ait bulgular.....	113
4.3. Hidrojel, Organojel ve Bijel Formülasyonların Geliştirilmesi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	119
4.4. Hidrojel, Organojel ve Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	147
4.5. Bijel Formülasyonlarında Ex-vivo Permeasyon Çalışmaları ve Dokularda Miktar Tayinine Ait Bulgular	155
4.6. Bijel Formülasyonlarının Toynağı Şişirme Derecesinin Tespitine Ait Bulgular	159
4.7. Bijel Formülasyonlarında Bekletilen Toynakların SEM Görüntüsüne Ait Bulgular.....	159
4.8. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Antifungal Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	160
4.9. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	162
4.10. Stabilitate Çalışmalarına Ait Bulgular	163
5. TARTIŞMA.....	165
5.1. Siklopiroks ile Yapılan Çalışmalar	165
5.1.1. Siklopiroksun erime derecesi tayini	165
5.1.2. Siklopiroksun FTIR analizi	165
5.1.3. Siklopiroksun çözünürlük çalışmaları.....	165
5.1.4. Siklopiroksun partiyon katsayısının belirlenmesi	166
5.1.5. Siklopiroksun HPLC analiz yöntemine ait yapılan çalışmalar	166
5.2. Üre ile Yapılan Çalışmalar.....	167
5.2.1. Ürenin erime derecesi tayini	167
5.2.2. Ürenin FTIR analizi	167
5.2.3. Ürenin çözünürlük çalışmaları	167

Sayfa

5.2.4. Ürenin HPLC analiz yöntemine ait yapılan çalışmalar.....	167
5.3. Bijel Formülasyonların Geliştirilmesi için Yapılan Çalışmalar.....	168
5.3.1. Hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesine için yapılan çalışmalar.....	168
5.3.2. Organojel formülasyonlarının geliştirilmesi için yapılan çalışmalar.....	169
5.3.3. Bijel formülasyonlarında yapılan çalışmalar	170
5.4. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Salım Çalışmasına Ait Değerlendirmeler	179
5.5. Bijel Formülasyonlarında Ex-vivo Permeasyon Çalışmaları ve Dokularda Miktar Tayinine Ait Değerlendirmeler	180
5.6. Bijel Formülasyonlarının Toynağı Şişirme Derecesinin Tespitine Ait Değerlendirmeler	185
5.7. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Antifungal Aktivite Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler	185
5.8. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler	187
5.9. Stabilitate Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler.....	188
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	189
KAYNAKLAR.....	191
ÖZGEÇMİŞ.....	215

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tırnak plağının temel kimyasal bileşimi ve temel özellikler.....	5
Çizelge 2.2. Tırnak mantarının oral tedavisinde kullanılan bazı etkin maddeler	8
Çizelge 2.3. Türkiye’de tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılan piyasada bulunan ürünler	11
Çizelge 2.4. Tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılan bazı etkin maddeler ve çalışılan ilaç şekilleri/taşıyıcı sistemler	12
Çizelge 2.5. Hidrojel ve organojel hazırlarken kullanılan maddelere bazı örnekler	23
Çizelge 2.6. Bijellerin hazırlanmasında en sık kullanılan değişkenler	29
Çizelge 2.7. Organojel ve hidrojellerin hazırlanmasında etkili olan bazı parametreler..	30
Çizelge 2.8. Bijel formülasyonlarında yapılan ex-vivo penetrasyon çalışmasına ait veriler	41
Çizelge 2.9. Bijel formülasyonlarında yapılan in-vitro salım çalışmasına ait veriler.....	44
Çizelge 2.10. Siklopiroksun tırnak mantarı için kullanılan dermal ticari ürünlerine bazı örnekler	52
Çizelge 2.11. Siklopiroksun kullanıldığı bazı çalışmalarda geliştirilen/kullanılan formülasyonlar	53
Çizelge 2.12. Üre’nin dermal ticari ürünlerine bazı örnekler	55
Çizelge 3.1. Hidrojel ve Organojel Yapısında Kullanılan Maddeler	68
Çizelge 3.2. Hidrojel formülasyonlarının bileşenleri ve %’leri	69
Çizelge 3.3. Organojel hazırlanmasında kullanılan Aerosil 200 ve %’leri.....	70
Çizelge 3.4. Organojel hazırlanmasında kullanılan GMS ve %’leri.....	71
Çizelge 3.5. Hazırlanan hidrojel formülasyonlarının bileşenleri ve %’leri	72
Çizelge 3.6. Hazırlanan organojel formülasyonlarının bileşenleri ve %’leri.....	72
Çizelge 3.7. Hazırlanan bijellerin formülasyon bileşenleri	75
Çizelge 3.8. Hazırlanan bijel formülasyonlarının karakterizasyon sonuçları	76

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.9. Tam faktöriyel tasarımdaki faktör, seviye ve cevaplar.....	77
Çizelge 3.10. Tam faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan bijel formülasyonlar	79
Çizelge 3.11. Hazırlanan formülasyonlarda yapılan çalışmalar	80
Çizelge 3.12. Sterilite çalışmasında kullanılan örnekler.....	96
Çizelge 3.13. Silindir-agar difüzyon yönteminde kullanılan örnekler.....	97
Çizelge 3.14. İn-vitro sitotoksiste çalışmalarında kullanılan formülasyonlar	100
Çizelge 4.1. Siklopiroksun çözünürlük değerleri	105
Çizelge 4.2. Siklopiroksun su fazında kalan miktarı	106
Çizelge 4.3. Siklopirokse ait kalibrasyon verileri.....	108
Çizelge 4.4. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda deney içi kesinlik sonuçları	109
Çizelge 4.5. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda deneyler arası kesinlik sonuçlar	110
Çizelge 4.6. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları	111
Çizelge 4.7. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C' deki stabilite sonuçları ..	111
Çizelge 4.8. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C' deki stabilite sonuçları ..	112
Çizelge 4.9. Üreye ait kalibrasyon verileri	115
Çizelge 4.10. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda deney içi kesinlik sonuçları.....	116
Çizelge 4.11. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda deneyler arası kesinlik sonuçlar	117
Çizelge 4.12. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları.....	117
Çizelge 4.13. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C' deki stabilite sonuçları.....	118
Çizelge 4.14. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C' deki stabilite sonuçları.....	118
Çizelge 4.15. H1 ve H2 Formülasyonlarının 25 °C' deki viskozite ölçümüne ait sonuçları.....	119
Çizelge 4.16. O1 ve O2 Formülasyonlarının 25 °C' deki viskozite ölçümüne ait sonuçlar.....	120
Çizelge 4.17. Hidrojel ve organojellere ait K değerleri	121

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.18. Bijel formülasyonlarının pH değerleri.....	141
Çizelge 4.19. Optimum bijel formülasyonlarının damla boyutları ve PDI değerleri.....	142
Çizelge 4.20. Optimum bijel formülasyonlarının etkin madde içerik değerleri	143
Çizelge 4.21. Optimum bijellere ait viskozite verileri	143
Çizelge 4.22. Optimum bijel formülasyonlarının yapı analizi sonuçları	144
Çizelge 4.23. Optimum bijel formülasyonlarının yayılabilirlik kuvveti/dayanıklılık ve yayılabilirliğe karşı yaptığı iş	146
Çizelge 4.24. Optimum bijelleri oluşturan hidrojellerin içerikleri	148
Çizelge 4.25. Optimum bijelleri oluşturan organojellerin içerikleri.....	149
Çizelge 4.26. İn-vitro ve ex-vivo çalışmalarda siklopiroks ve ürenin saptanma durumu	150
Çizelge 4.27. Optimum bijel formülasyonları ve ticari kremden siklopiroksun salım sonuçları.....	150
Çizelge 4.28. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin salım sonuçları	151
Çizelge 4.29. Optimum bijel formülasyonların siklopiroksa ait kinetik değerlendirme sonuçları.....	153
Çizelge 4.30. Optimum bijel formülasyonların üreye ait kinetik değerlendirme sonuçları.....	154
Çizelge 4.31. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun ex-vivo permeasyon çalışması sonuçları.....	155
Çizelge 4.32. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun toynak membranından geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı değerleri	156
Çizelge 4.33. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin ex-vivo permeasyon çalışması sonuçları.....	156
Çizelge 4.34. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin toynak membranından geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı değerleri	157
Çizelge 4.35. Optimum bijel, ticari krem ve cılanın sıgır toynak membranında kalan siklopiroks ve üre miktarı	158
Çizelge 4.36. Optimum bijel, ticari krem ve cılanın sıçan sırt derisinde kalan siklopiroks ve üre miktarı	158

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.37. Optimum formülasyonların toynaktaki ağırlık artışı	159
Çizelge 4.38. Agar dilüsyon yöntemi formülasyonların inhibisyon zonları	161
Çizelge 4.39. HaCaT hücrelerinin geliştirilen formülasyon ve etkin maddeler ile uygulanması sonrası in-vitro sitotoksisite sonuçları.....	162
Çizelge 4.40. Başlangıçta ve 3. ayda optimum formülasyonların 25 °C ve 40 °C' deki K ve n değerleri	163
Çizelge 4.41. Başlangıç ve 3. ayda optimum formülasyonların pH değerleri	163
Çizelge 4.42. Başlangıç ve 3. ayda optimum formülasyonların etkin madde içerik değerleri	164

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tırnak bölgesinin şematik görünümü	4
Şekil 2.2. Tırnak plağının tabakalarının şematik gösterimi	4
Şekil 2.3. Tırnak mantarının tedavi seçenekleri ve tedavideki değişik yaklaşımlar.....	7
Şekil 2.4. Bijel hazırlanmasının şematik gösterimi	27
Şekil 2.5. Siklopiroksun kimyasal yapısı.....	51
Şekil 2.6. Ürenin kimyasal yapısı	54
Şekil 3.1. Texture profil analizi, birinci ve ikinci kompresyon periyodu grafiği	85
Şekil 3.2. Yayılabilirlik çalışması grafiği	87
Şekil 3.3. Strat-M membranın çok katmanlı yapısı	89
Şekil 4.1. Siklopiroks ve ürenin erime derecesi tayini.....	103
Şekil 4.2. Ekin maddeler ve formülasyondaki diğer maddelerin DCS termogramları ...	104
Şekil 4.3. Siklopiroksun IR spektrumu	104
Şekil 4.4. Ürenin IR spektrumu	105
Şekil 4.5. pH 7,4 tampon ortamına ait HPLC kromatogramı	107
Şekil 4.6. Propilen glikole ait HPLC kromatogramı.....	107
Şekil 4.7. Tween 80'e ait HPLC kromatogramı	107
Şekil 4.8. Siklopiroksun (50 µg/mL) pH 7,4 tampon ortamındaki HPLC kromatogramı.....	108
Şekil 4.9. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle kalibrasyon doğrusu.....	109
Şekil 4.10. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C' deki stabilite grafiği	112
Şekil 4.11. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C' deki stabilite grafiği	113
Şekil 4.12. pH 7,4 tampon ortamına ait HPLC kromatogramı	113
Şekil 4.13. Propilen glikole ait HPLC kromatogramı.....	114

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Tween 80'e ait HPLC kromatogramı	114
Şekil 4.15. Ürenin (100 µg/mL) pH 7,4 tampon ortamındaki HPLC kromatogramı	114
Şekil 4.16. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle kalibrasyon doğrusu..	115
Şekil 4.17. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C' deki stabilite grafiği.....	118
Şekil 4.18. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C' deki stabilite grafiği.....	119
Şekil 4.19. H1 ve H2 Formülasyonlarının 25 °C' deki kayma hızlarına karşılık kayma gerilimi grafiği	120
Şekil 4.20. O1 ve O2 Formülasyonlarının 25 °C' deki kayma hızlarına karşılık kayma gerilimi grafiği	120
Şekil 4.21. 1 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	122
Şekil 4.22. 2 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	122
Şekil 4.23. 3 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	123
Şekil 4.24. 4 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	123
Şekil 4.25. 5 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	123
Şekil 4.26. 6 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	124
Şekil 4.27. 7 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	124
Şekil 4.28. 8 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	124
Şekil 4.29. 9 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	125
Şekil 4.30. 10 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	125
Şekil 4.31. 11 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	125
Şekil 4.32. 12 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	126
Şekil 4.33. Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği.....	126
Şekil 4.34. Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki In kayma hızına karşı In viskozite grafikleri.....	128
Şekil 4.35. B1 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	129

Şekil	Sayfa
Şekil 4.36. B5 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	130
Şekil 4.37. B8 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	130
Şekil 4.38. B2 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	130
Şekil 4.39. B3 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	131
Şekil 4.40. B4 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	131
Şekil 4.41. B6 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	131
Şekil 4.42. B7 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu	132
Şekil 4.43. Deney tasarımı sonrası hazırlanan bijel formülasyonlarının 25 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafikleri	133
Şekil 4.44. Optimum bijel formülasyonlarının 25 °C'deki kayma hızına karşı viskozite grafikleri	134
Şekil 4.45. Deney tasarımı sonrası hazırlanan bijel formülasyonlarının 25 °C'deki In kayma hızına karşı In viskozite grafikleri.....	135
Şekil 4.46. B1 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi.....	136
Şekil 4.47. B5 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi.....	136
Şekil 4.48. B8 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi.....	137
Şekil 4.49. B1 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi	137
Şekil 4.50. B5 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi	138
Şekil 4.51. B8 formülasyonuna ait 32 °C'de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi	138
Şekil 4.52. B1 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi.....	139
Şekil 4.53. B5 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi.....	139
Şekil 4.54. B8 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi.....	140
Şekil 4.55. B1 formülasyonuna ait TPA grafiği	144

Şekil	Sayfa
Şekil 4.56. B5 formülasyonuna ait TPA grafiği	145
Şekil 4.57. B8 formülasyonuna ait TPA grafiği	145
Şekil 4.58. B1 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği	146
Şekil 4.59. B5 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği	146
Şekil 4.60. B8 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği	147
Şekil 4.61. Hidrojellerden ürenin salım grafiği	148
Şekil 4.62. Organojellerden siklopiroksun salım grafiği	149
Şekil 4.63. Optimum bijel formülasyonları ve ticari kremden siklopiroksun salım grafiği	151
Şekil 4.64. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin salım grafiği	152
Şekil 4.65. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun ex-vivo permeasyon grafiği	155
Şekil 4.66. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin ex-vivo permeasyon grafiği	157
Şekil 4.67. Formülasyon ve etkin maddelerin HaCat hücrelerine 48 saat maruz bırakılması sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi	162

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Kullanılan polarize ataçmanlı mikroskop.....	82
Resim 3.2. Viskoelastisite tayini için kullanılan reometre	83
Resim 3.3. TPA analizi için kullanılan cihaz.....	84
Resim 3.4. Yayılabilirlik deney düzeneği.....	87
Resim 3.5.Toynakların kesilme aleti	91
Resim 3.6.Tamponda bekletilen toynak membranları	91
Resim 3.7. Dilüsyonların yapıldığı petriler.....	95
Resim 3.8. Üremenin olup olmadığının kontrolü için etüvde bekletilen örnekler.....	95
Resim 3.9. Petri kutusuna yerleştirilen 6 porselen silindir	98
Resim 3.10. Petri kutusuna yerleştirilen 3 porselen silindir	98
Resim 4.1. Farklı rpm’lerde karıştırılan bijelin mikroskop görüntüsü	121
Resim 4.2. Optimum bijellerin fiziksel görünüşü	141
Resim 4.3. Optimum bijellerde tüp çevirme metodu	142
Resim 4.4. B1formülasyonu ile temas eden toynak membranı.....	159
Resim 4.5. B5 formülasyonu ile temas eden toynak membranı.....	160
Resim 4.6. B8 formülasyonu ile temas eden toynak membranı.....	160
Resim 4.7. B5 no’lu bijelin 3. aydaki görüntüsü	163

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simge	Açıklamalar
%	Yüzde
√	Karekök
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
Js	Akı
L	Litre
Log K	Partisyon Katsayısı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mPa	Milipaskal
N	Newton
nm	Nanometre
P	Permeabilite Katsayısı
rpm	Dakikada Devir Sayısı
s	Saniye
sa	Saat
W	Yapılan Toplam İş

Kısaltmalar**BS****CLSI****CMC****DoE****DSC****FTIR****HLB****HPMC****ICH****LOD****LOQ****ORT****P407****PDI****PVA****PVP****SEM****S.H****S.S****UV****Açıklamalar**

Bağıl Sapma

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü

Karboksimetil Selüloz

Deney Tasarımı

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi

Hidrofilik – Lipofilik Denge

Hidroksipropil Metil Selüloz

Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu

Duyarlılık Sınırı

Saptama Sınırı

Ortalama

Polokamer 407

Polidispersite İndeksi/Partikül büyüklüğü dağılımı

Polivinil Alkol

Polivinil Prolidon

Taramalı Elektron Mikroskobu

Standart Hata

Standart Sapma

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Tırnak mantarı, tırnak hastalıklarının büyük bir çoğunluğunu oluşturan mantar enfeksiyonudur. Çoğunlukla dermatofit, küf ve maya gibi patojenler sebep olmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı da oldukça yüksektir. Hastalık tırnağın kalınlaşması ve renk değişikliğiyle karakterize edilmektedir. Bu durum hasta bireylerin sosyal yaşantısını etkilemektedir.

Tedavi gelişen teknoloji ile birlikte oldukça değişti. Tırnağın tamamen yerinden sökülmesiyle yapılan tedavi yerini, oral-topikal antifungal ajanlara ve çeşitli cihazların kullanılmasına bıraktı.

Tedavide amaç, uygulama yolundan bağımsız olarak etkin maddenin patojeni etkili bir şekilde öldürmesi için tırnağa yayılması, enfekte bölgeye yeterli miktarda ulaşmasıdır. Tırnak mantarı tedavisinde klinik ve mikolojik tedavinin birlikte yani eş zamanlı olması gerekmektedir. Klinik tedavi, enfekte tırnağın yerine sağlıklı tırnağın büyümesi olarak tanımlanırken, mikolojik tedavi ise, tırnakta patojenin tamamen öldürüldüğünü gösteren mikrobiyolojik kontrol olarak tanımlanmaktadır.

Tedavi, patojenin tırnağa tutulum bölgesi, hastalığın ilerlemesine bağlı olarak belirlenmektedir. Genellikle oral ve topikal tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Tırnak mantarı için ülkemizde tedavide kullanılan ticari ürünler tablet, kapsül ve cila şeklindedir. Tedavi süresi uzun ve başarı oranı da düşük olduğundan oral bir antifungal ajan, topikal cila ile kombine olarak reçete edilmektedir. Oral tedavi, sıklıkla yan etki oluşturduğu için hastalığın görülme sıklığı yüksek olan bağışıklık sistemi baskılanmış, kronik olarak ilaç kullanan ve yaşlı hastalarda güvenle kullanılamamaktadır.

Topikal tedavi uygulama kolaylığı ile hasta uyuncunun yüksek olması, yan etkinin düşük ya da hiç olmaması, sistemik dolaşıma geçmediği için aynı anda ilaç kullanımına izin vermesi gibi avantajlara sahiptir. Fakat formülasyondaki etkin maddenin hastalık ile daha da kalınlaşan tırnağın keratin dokusundan enfekte bölgeye geçişi düşük olduğundan kolay ve güvenli olarak kullanılsa bile tek başına tedavi başarısı düşüktür.

Topikal tedaviyi etkileyen birçok değişken bulunmaktadır. Bunlardan birisi de formülasyonun özellikleridir. Bu yüzden tez kapsamında hazırlayacağımız formülasyon tedavi açısından avantaj sağlayacak şekilde seçildi.

Bijel sistemler hem sulu hem de yağlı yapısıyla hidrofilik ve lipofilik etkin maddelerin formüle edilebilme potansiyeli için son zamanlarda araştırmalara sıklıkla konu olmaktadır. Formülasyon hazırlama kolaylığı, yüksek stabiliteleri gibi de avantajları vardır.

Tez kapsamında bijel formülasyonların geliştirilme amacı, etkin maddenin tırnağın sıkı ve kalınlaşmış dokusundan daha kolay ve fazla miktarda geçmesidir. Yağlı kısımda siklopiroks, sulu kısımda da tırnaktaki keratin dokusunu aralaması için üre kullanılarak bijel formülasyonları geliştirildi. Organojelin hidrojel içinde damlalar oluşturmasıyla yüzey alan artacak ve siklopiroks iç fazdan daha kolay difüzlenerak çıkabilecektir. Ayrıca dış faz hidrojel yani sulu jelden oluşmaktadır. Suyun en iyi penetrasyon artırıcı olarak kabul edildiği düşünüldüğünde bu durum avantaj oluşturmaktadır. Yapılan literatür taramasında antifungal etkin madde olan siklopiroks ve üre içeren bir çalışmaya rastlanmadı. Bu açıdan çalışmamız özgün nitelik taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

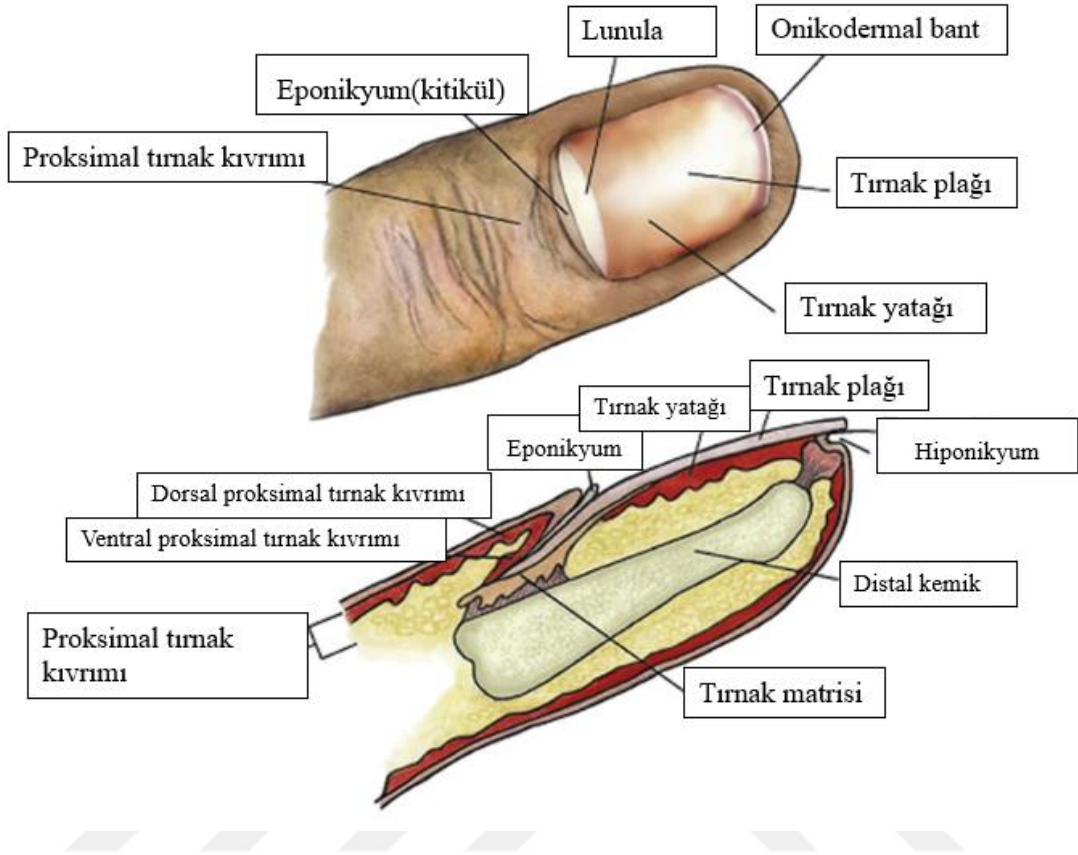
2.1. Tırnak Bölgesinin Yapısı ve Özellikleri

Tırnak bölgesi farklı kısımlar ve yapılardan oluşur. Tırnak ve bitişiğindeki yapılar Şekil 2.1’de verildi ve bu yapılar tırnak bölgesini oluşturmaktadır [1]. Tırnak plağının kenarında, iki taraflı kama şeklinde içe doğru katlanan yapı tırnak kıvrımıdır. Tırnak matriksinde (tırnak kökü) bulunan canlı dokudaki hücrelerin bölünmesi ile tırnak plağı oluşur. İnce, yumuşak ve keratinize olmamış epitelden oluşan tırnak yatağının görevi, tırnak plağının büyümesini sağlamak ve büyüyen tırnak plağını tutmaktır.

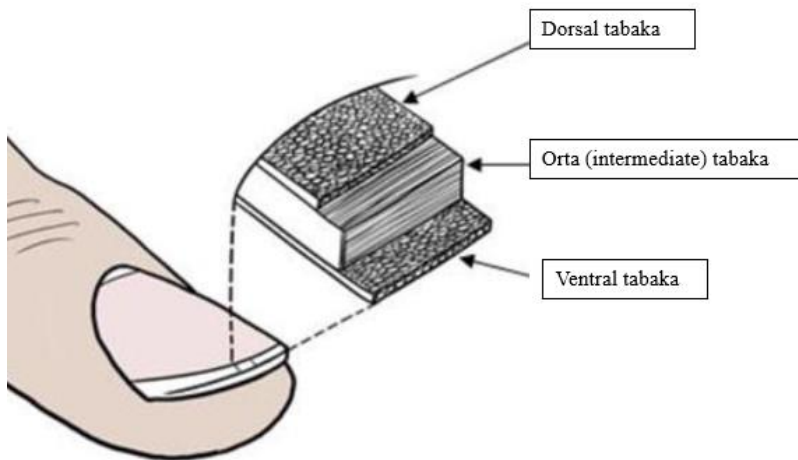
Tırnak plağı ve serbest kenarının altında bulunan hiponikyum, tırnak dokusunu mikroorganizma, kimyasal maddeler ve olabilecek tüm zararlara karşı korur [1].

Sert, elastik, yarı saydam ve konveks şekilli tırnak plağı, üst üste dizilen hücre tabakalarından oluşur. Tırnak plağındaki canlı olmayan hücre tabakaları, desmozomlar, granüller ve çok sayıdaki hücreler arası bağlantı ile birbirine sıkıca bağlıdır. Dıştan içe doğru dorsal, orta (intermediate) ve ventral olarak isimlendirilen, kalınlıkları 3:5:2 oranlarında değişen, Şekil 2.2’de de gösterildiği gibi 3 tabaka tırnak plağını oluşturur [2]. Tırnak plağının en kalın tabakası olan orta tabaka diğer tabakalara göre yumuşak ve daha esnektir. Dorsal tabaka birkaç hücrenin birleşmesiyle oluşmuştur. Tırnak plağını tırnak yatağına bağlayan en içteki ventral tabaka ise bir iki hücre tabakasından oluşur [2].

Birden fazla sayıda keratinize hücreden oluşan tırnak dokusu, kalın yapısı nedeni ile etkin maddelerin penetrasyonunu sınırlandırmaktadır [1]. Tırnak enfekte olduğunda keratin dokunun kalınlaşmasından dolayı, etkin madde moleküllerinin penetrasyonu daha da zorlaşır. Etkin madde moleküllerinin enfekte bölge olan tırnak yatağına zor penetrasyonunun, onikoliz (tırnak plağının tırnak yatağından ayrılması) nedeniyle de olduğunu gösteren çalışmalar vardır [1, 3]. Tırnak mantarında onikoliz var ise formülasyon tırnak plağının tırnak yatağından ayrıldığı kısma uygulanabilir; bu uygulama tedavi etkinliğini artıracak niteliktedir.



Şekil 2.1. Tırnak bölgesinin şematik görünümü



Şekil 2.2. Tırnak plağının tabakalarının şematik gösterimi

Tırnak plağının kimyasal bileşimi ve bazı temel özellikleri Çizelge 2.1’de verildi [4, 5, 6]. Tırnak plağının ana yapısını keratin oluşturmaktadır. Saçın yapısında da bulunan sert keratin proteinleri yapının %80’ini oluştururken, kalan %20’lik kısmını yumuşak keratin proteinleri oluşturmaktadır [6]. Tırnak plağının ventral kısmında yumuşak keratin proteinleri, dorsal kısımda sert keratin proteinleri bulunur. Ventral kısımda yoğun olarak disülfid bağlarını içeren sistein amino asiti bulunmaktadır. Bu yapı ventral kısmın şişmesini zorlaştırır ve bu da tırnak plağının bariyer yapısını güçlendirir. Dorsal tabaka ise suyun geçişine engel oluşturmaktadır. Tırnağın esneklik, elastiklik ve geçirgenliğini etkileyen su içeriği, relatif nem %100 olduğunda bile en fazla %35 olmaktadır [4]. Tırnak plağının su içeriğinin lipit içeriğinden daha fazla olması, plağın lipofilik membrandan çok hidrofilik membran gibi davranmasının temel sebebidir [2, 6, 7].

Tırnağın büyüme hızı el tırnaklarında yaklaşık 3 mm/ay, ayak tırnaklarında ise 1 mm/ay olarak rapor edilmişse de, bu hız birçok faktörden etkilenecek değişebilmektedir. Sağlıklı bir ayak tırnağı ortalama 12- 18 ay içinde tamamen büyüüp yenilenirken, bu süre sağlıklı bir el tırnağı için yaklaşık 6 aydır [8, 9].

Çizelge 2.1. Tırnak plağının temel kimyasal bileşimi ve temel özellikler

Karakteristikler	Normal değerler
Su içeriği	%9-35
Lipit içeriği	%0,1-1
Keratin dokudaki disülfid bağları	%10,6
Kalınlık (µm)	50-1000
Maksimum şişme kapasitesi	%25
Su geçirgenliği	1,94 mg/cm ²

2.2. Tırnak Mantarı (Onikomikoz)

Tırnak plağı ve tırnak yatağının en yaygın hastalığı olan onikomikoz, tırnak rahatsızlıklarının neredeyse yarısını oluşturur [10]. Avrupa’da nüfusun yaklaşık %10-30’unu etkilediği bildirilirken, görülme sıklığı ülkelere göre farklılık göstermektedir [11]. Tırnak mantarındaki en belirgin bulgu, tırnak plağının kalınlaşması ve sarı benzeri bir renk almasıdır [10].

Tırnak mantarının oluşmasına neden olan ve görülme sıklığını etkileyen faktörler:

- Toplumsal tesislerin (yatılı okullar, askeri alanlar, bakım evleri) ve sağlık kulüplerinin kullanımı ile enfeksiyonun bulaşma olasılığının artması
- Yaşlı popülasyonun artması
- Dar ayakkabı kullanımı
- İmmün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı
- İyatrojenik immünoşüpresyonun artması
- AIDS ve HIV enfeksiyonunun yayılması [3, 5, 10, 11].

Tırnak mantarının yaklaşık %85'ine dermatofitler sebep olurken, %15'ini küf ve çok az bir kısmını da mayalar oluşturur [12]. Ayak tırnağı el tırnağına göre daha çok etkilenir; daha yavaş uzadığı için tedavi süresi daha uzundur ve onikomikozisin tedavisi de zordur [13].

2.2.1. Tırnak mantarı tipleri

Hastalığa neden olan mikroorganizmanın türü ve hastalıklı bölge göz önüne alınarak onikomikozun tipi belirlenmektedir. Sınıflandırma ise genellikle patojenin enfekte ettiği bölgeye göre yapılmaktadır [10, 13].

Distal ve Lateral Subungual Onikomikoz: Tırnak yatağı ve hiponikyumda başlayan mantar enfeksiyonu zamanla proksimal tırnak yatağı ve ventral tırnak plağına doğru ilerler.

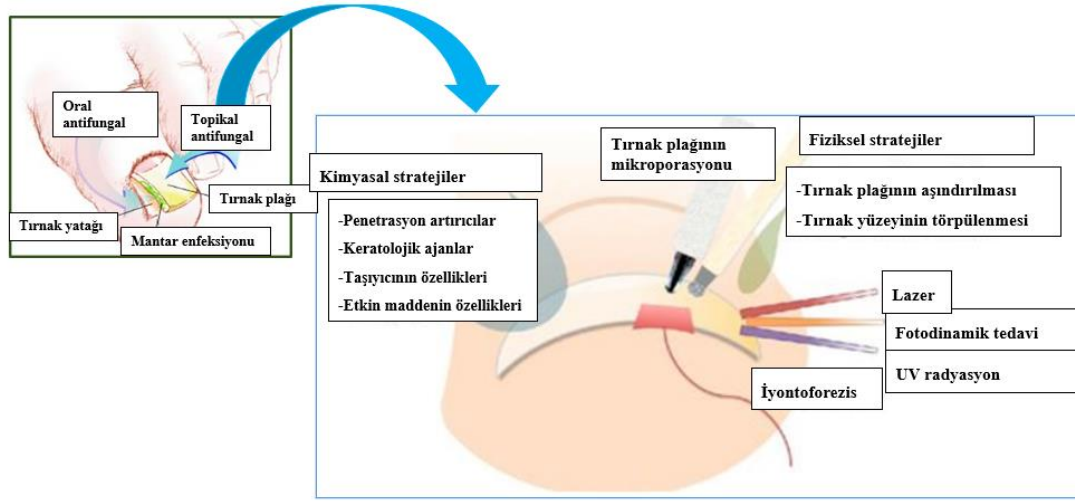
Yüzeysel Beyaz Onikomikoz: Enfeksiyon, tırnak plağının dış kısmında opak, beyaz veya sarı renkli bölgeler oluşmasıyla karakterizedir.

Proksimal Subungual Onikomikoz: Proksimal tırnak kıvrımı enfekte olur ve mikroorganizma yeni oluşan tırnak plağına penetre olur. Hastalık ilerledikçe lunulada beyaz bir renk meydana oluşur.

Total Distrofik Onikomikoz: Tırnağın tamamı enfekte olmuştur.

2.3. Tedavi Yöntemleri

Tırnak mantarı tedavisinde değişik tedavi şekilleri (oral, topikal) ve değişik yaklaşımlar bulunmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Tırnak mantarının tedavi seçenekleri ve tedavideki değişik yaklaşımlar

Geçmişte tırnak mantarı tedavisi, avulsiyon olarak da bilinen bir yöntem olan enfekte tırnağın cerrahi işlemle sökülmesi ile yapılmırdı [10]. Çok sık kullanılan ve hasta uyuncu düşük olan bu yöntem, günümüzde yerini ilaç tedavisine bıraktı.

Tırnak mantarının ilaçla tedavisinde antifungal ilacın (oral ya da topikal), hangi yol ile uygulanırsa uygulansın, mikroorganizmayı etkili bir şekilde öldürmesi için tırnak ve bitişindeki dokuya nüfuz edebilmesi, tırnak yatağına penetre olabilmesi ve enfekte alanda etkili konsantrasyona ulaşabilmesi gerekmektedir.

Tırnak mantarı tedavisinde hastalığın takibi klinik gözlem/takip ve mikolojik kontrol ile gerçekleştirilir. Tırnağın sağlıklı büyümesi klinik gözlemi oluştururken; mikolojik kontrol hasta tırnaktan alınan örneklerin mikrobiyoloji çalışmalarında negatif sonuç vermesi olarak tanımlanır. Ayak tırnağının büyüyerek yenilenme süresi uzun olduğundan, ayak mantarı tedavisinin klinik cevap süresi uzundur ve sabır gerektirir. Tedavi süresince sağlıklı tırnak plağının büyümesi takip edilirken dokuda mikroorganizma varlığı da takip edilmelidir [10, 11, 14].

Tırnak mantarının ilaçla tedavisinde oral ve topikal tedavi seçenekleri mevcuttur. İlaçla tedavi seçeneklerinden en etkili olanı oral tedavidir.

Oral tedavide sıklıkla kullanılan etkin maddeler Çizelge 2.2’de verildi. Kullanılan etkin maddeler arasından griseofulvin ve ketokonazol, düşük tedavi etkinlikleri ve daha iyi alternatiflerinin olmasından dolayı günümüzde tercih edilmemektedir [13].

Oral tedavinin uygulanmasında tedavinin başarısını etkileyen bazı zorluklar bulunmaktadır. Bunlar, toksisite, ilaç etkileşimleri, kontrendikasyonlar, yüksek tedavi maliyeti, mikroorganizmanın direnç kazanması, uzun tedavi süresi ve hastalığın nüks etmesidir [1, 9].

Çizelge 2.2. Tırnak mantarının oral tedavisinde kullanılan bazı etkin maddeler

Etkin madde	Türkiye ilaç pazarındaki durum
Flukonazol	Var
Griseofulvin	Var
İsavukonazol	Yok
İtrakonazol	Var
Ketokonazol	Var
Terbinafin	Var
Pramikonazol	Yok
Posakonazol	Yok
Ravukonazol	Yok
Vorikonazol*	Yok
Albakonazol*	Yok

* Geliştirilmekte olan ilaçlar

Bu tez çalışmasında tırnak mantarının topikal tedavisinde etkili bir formülasyon geliştirilme çalışmaları yapıldığı için topikal tedavi daha detaylı anlatıldı.

2.3.1. Topikal tedavi

Oral tedavide görülen yan etkiler topikal tedavide yok denecek kadar azdır ve topikal tedavide uygulanan formülasyondaki etkin madde doğrudan hedef enfekte bölgeye uygulandığı için etkin maddenin penetrasyonu ve difüzyonu, oral tedaviye nazaran daha hızlı gerçekleşir [13]. Topikal tedavi bazı kısıtlamalara sahiptir. Bu nedenle bu tedavi

tırnak mantarı hastalığının başlangıcında, 1 ya da 2 tırnak enfekte olduğunda ya da oral tedavinin kullanılmadığı hastalarda tercih edilmektedir.

Topikal tedavinin sıklıkla kullanıldığı durumlar aşağıda sıralandı:

- Yüzeysel beyaz tırnak mantarı gözlenen hastalarda,
- Oral tedavinin iyileştiremediği küflerin sebep olduğu tırnak mantarında,
- Oral tedaviyi yan etki ya da ilaç etkileşimi gibi çeşitli sebeplerden dolayı kullanamayan hastalarda,
- Tırnağın yarısından azının enfekte olduğu tırnak mantarı hastalarında,
- Oral tedavi ile kombine olarak ya da tedavi sonrasında tamamen iyileşme sağlanabilmesi için topikal ürünle tedaviye devam edilmesinin gerektiği durumlarda [14].

Topikal tedavide uygulanan formülasyondaki etkin madde, tırnağın sıkı keratinize yapısını aşmak ve enfekte bölgeye etkili konsantrasyonda ulaşmak zorundadır. Etkin maddenin enfekte alana geçmesi birçok faktörlerden etkilendiğinden, bu durum topikal tedavinin etkinliğinin değişmesine neden olabilmektedir. Tedavi başarısını artırmak için topikal ve oral tedavinin birlikte kullanılmasına sıklıkla başvurulmaktadır [15]. Oral ve topikal olarak yapılan tırnak mantarı tedavisinde çeşitli kısıtlamaların olması, her hasta için güvenli ve etkili olarak kullanılamaması farklı tedavi seçeneklerinin araştırılmasına yol açtı.

Tedavide 2008'den beri çeşitli cihazların kullanılması yeni bir dönemi başlattı. Bu cihazlar ile lazer ışını, fotodinamik tedavi ve ultraviyole (UV) ışını topikal olarak uygulanmaktadır. Tırnak mantarı tedavisinde lazer ışınının kullanılmasıyla enfekte bölge mikroorganizmadan tamamen temizlenemese de sağlıklı tırnağın büyümesi sağlanabilmektedir [16-19]. Bu da ilaç ile yapılan tedaviye (oral/topikal) ek olarak lazer ışınının kullanılmasının tedavi başarısını artıracağını gösterir niteliktedir. Tırnak mantarı tedavisinde "Food and Drug Administration (FDA) tarafından kabul edilmiş farklı lazer cihazları bulunmaktadır [20]. İlgili cihaz ile yapılan tedavide, enfekte alan hedef alındığından hasta dokunun dışındaki bölgelerde herhangi bir fotokimyasal, fototermal ve fotomekanik hasar oluşmamaktadır. Bu tedavi seçeneğinde lazer ışınının enerji seviyesi ayarlanabilmektedir. Dalga boyu, uygulama süresi ve sıklığı tedavinin başarı oranını etkilemektedir. Neodymium katkılı itriyum alüminyum granat (Nd: YAG), titanyum safir ve diyot lazer gibi lazer kaynakları tırnak mantarı tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavide kullanılacak lazer çeşidi ve ışınının

şiddeti hekim tarafından, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmanın çeşidi ve enfeksiyonun şiddetine göre belirlenmektedir [10, 21].

Yapılan bir çalışmada efinafonazolün %10'luk çözeltisi ve lazer ışını (1064 nm neodimyum katkılı itriyum alüminyum granat lazer) kombine ve tek tek enfekte alana uygulandı. Lazer ışını ve topikal antifungal etkin maddenin birlikte uygulanmasıyla tırnağın sağlıklı büyüdüğü ve mikroorganizmanın tamamen yok edildiği gösterildi. Bu kombine tedavide, tedavi süresi de kısaldı [22].

Cihaz kullanılan bir diğer tedavi seçeneği olan fotodinamik tedavide çeşitli fotoduyarlaştırıcılar kullanılmaktadır; kullanılan fotoduyarlaştırıcı tedavi başarısını doğrudan etkilemektedir. Fotodinamik terapi (PDT), fotoduyarlaştırıcıların kullanımına dayanmaktadır. Belli dalga boyunda oksijen varlığında, hücre ölümüne neden olan reaktif oksijen üretimi ile ilgili mikroorganizma yok edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, cihaz kullanılmadan 12 saat önce enfekte alana %40'luk üre merhemi, ardından fotoduyarlaştırıcı olarak metil amino levulinat uygulandı. Bu kombine tedavide tam bir iyileşmenin sağlandığı klinik ve mikolojik olarak gösterildi [19]. Aynı tedavi prensibiyle yapılan bir diğer çalışmada da enfekte bölgeye önce %20'lik üre merhemi uygulanıp üzeri 10 saat boyunca plastik bir sargı ile kapatıldı. Fotoduyarlaştırıcı olarak 5-amino levulinik asit kullanılarak yapılan tedavi sonrasında hastalığın tamamen yok edildiği ve kültürde herhangi bir mikroorganizma olmadığı gösterildi [23].

Tedavide UV-C ışınının kullanılması mikroorganizmalar üzerinde fungusit etki göstermektedir. İn-vitro ve ex-vivo olarak yapılan çalışmalarda UV-C ışınının kullanılmasıyla, mevcut mikroorganizma konsantrasyonunun dokuda enfeksiyona sebep olamayacak kadar azaldığı gösterildi [24].

UV-C ışını kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, hasta tırnağa yaklaşık 30 gün boyunca belirli bir dozda ışın uygulanması sonucunda tırnak mantarında iyileşme olduğu gösterildi [25]. Tedavide başarılı olduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen, başka bir çalışmada ise UV-C ışınının, hasta tırnağın yoğun keratinize yapısından enfekte alana ulaşamayacağı belirtilmiş ve tırnak mantarı tedavisinde etkili olamayacağı ifade edildi [26].

Topikal ilaç ile yapılan tedavide etkinliğin artırılması için hasta tırnaklara yaklaşık %40 üre içeren bir formülasyonun, üstü kapatılarak 10 gün boyunca uygulanması önerilmektedir. Bu işlemle tüm tırnak plağı tırnak yatağından ayrılmakta ve proksimal tırnak kıvrımı düzelip sağlıklı tırnağın oluşumu sağlanmaktadır [27].

Tırnak mantarı tedavisi için araştırma amaçlı değişik ilaç şekillerinin çalışıldığı görülmektedir. Ticari preparatlar, etkin maddenin çözeltisi (cila şeklinde), emülsiyon ya da yarı katı sistem (merhem) şeklindedir (Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4).

%8 siklopiroks içeren tırnak cılası, %10 efinakonazol çözeltisi ve %5 tavaborol çözeltisi sağlık otoriteleri tarafından onaylandı [28].

Türkiye ilaç pazarında tırnak mantarı tedavisinde kullanılan ürünler tablet, kapsül, krem ve cila formülasyonunda bulunmaktadır.

Çizelge 2.3. Türkiye’de tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılan piyasada bulunan ürünler

Etkin madde	Ticari isim*	İlaç şekli
Siklopiroks	Miclast tırnak cılası	Cila
Siklopiroks	Nibulen tırnak cılası	Cila
Siklopiroks	Opilox tırnak cılası	Cila
Siklopiroks	Siroksil tırnak cılası	Cila
Siklopiroks	Tineax tırnak cılası	Cila
Amorolfın	Funginail tırnak cılası	Cila
Amorolfın	Loceryl tırnak cılası	Cila
Tiokonazol	Dermo-rest % tırnak çözeltisi	Cila
Tiokonazol	Dermo-trosyd tırnak çözeltisi	Cila
Naftifin HCl	Naxoder krem (%1)	Krem
Naftifin HCl	Dermifin krem (%1)	Krem
Naftifin HCl	Funderyl krem (%1)	Krem

*RX Media Pharma

Çizelge 2.4. Tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılan bazı etkin maddeler ve çalışılan ilaç şekilleri/taşıyıcı sistemler

Etkin madde	Preparat tipi	Referans
Siklopiroks	Çözelti (tırnak cilası), jel, yama	[29-31]
Terbinafin- terbinafin HCl	Termojel, lipozomal film, çözelti, jel, mikroemülsiyon, spray (transferzom), jel (lipozom-etozum), yama, krem	[31-35]
Amorolfın	Çözelti (tırnak cilası), jel, yama (patent)	[31, 36]
Butenafin	Emülsiyon (krem)	[37]
Tiokonazol	Nanokapsül, çözelti	[38, 39]
Klotrimazol	Emülsiyon (krem)	[40]
Flukonazol	Mikroemülsiyon, Çözelti (tırnak cilası)	[41, 42]
Ketokonazol	Nanoemüljel	[43]
Sertakonazol	Nanovezikül, yama	[44-46]
Bifonazol	Emülsiyon (krem, merhem)	[47]
Oksikonazol	Emülsiyon (losyon)	[48]
Efinakonazol	Mikroemülsiyon, çözelti	[49, 50]
İtrakonazol	Mikroemülsiyon, çözelti, jel	[51-53]
Vorikonazol	Çözelti, jel	[54, 55]
Mikonazol	Toz, çözelti (tırnak cilası), Emülsiyon (krem)	[56, 57]
Naftifin HCl	Çözelti (tırnak cilası)	[58, 59]
Tavaborol	Çözelti, mikroemülsiyon	[60, 61]
Lulikonazol	Çözelti, krem	[57, 62]

2.3.2 Topikal tedavinin avantajları

- Kullanımı pratik ve uygulaması kolaydır.
- Gerektiğinde tedavi kolayca sonlandırılır.
- Preparat daha seçici bir şekilde hedef bölgeye uygulanır.
- Oral kullanımda görülebilecek gastrointestinal yan etki engellenir.
- Hasta uyuncu yüksektir ve hasta kendisi kolaylıkla tedaviyi devam ettirebilir.
- Oral tedaviye göre daha düşük günlük doz ile etkinlik sağlanır [63,64].

2.4. Topikal Tedaviyi Etkileyen Değişkenler

Tırnak mantarı tedavisinde amaç, uygulanan topikal formülasyondan etkin maddenin tırnak plağı yüzeyine yayılması ardından plağa penetre olması, plakta difüzlenerak tırnak

yatağına ulaşması ve bu bölgelerdeki konsantrasyonunun minimum etkili derişimin (MIC) üzerinde olmasıdır. Belirtilen bu aşamalar oldukça zor olmakla birlikte, bu durum uygun formülasyonların geliştirilmesiyle mümkün kılınabilmektedir.

Topikal tedavide etkin maddenin tırnak plağı ve bitişindeki dokuya uygulanmasından sonra enfekte alana gereken dozda ulaşmasını etkileyen çeşitli değişkenler vardır. Bu değişkenler, formülasyonun özellikleri, etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri, tırnak plağının özellikleri ve penetrasyon artırıcı yöntemlerin uygulanması olarak sınıflandırılabilir [1, 5, 7, 20]. Tırnak plağının özellikleri Bölüm 2.1’de anlatıldı.

2.4.1. Formülasyonun özellikleri

Tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılan antifungal etkin maddelerin formülasyonu için çok farklı ilaç şekilleri kullanılabilir. En bilinen ilaç şekillerinden çözeltiler (organik çözücü içeren tırnak cilası), emülsiyonlar (krem, losyon) ve merhemler, sıklıkla ticari ürünlerde kullanılmaktadır.

Çözelti yapısında olan cila formülasyonu fırça ile enfekte bölgeye uygulandıktan sonra tırnak plağı üzerindeki formülasyondan çözücü buharlaşır ve tırnak üzerinde etkin maddeyi yüksek oranda içeren bir film tabakası oluşur. Bu mekanizma sayesinde tırnak plağı ve enfekte tırnak yatağı arasındaki konsantrasyon gradienti artar. Formülasyondaki etkin maddenin ilk olarak tırnak plağına penetrasyonu daha sonra plak içinde difüzyonu gerçekleşir [7].

Topikal tedavide formülasyonun tedavi etkinliğini artıracak şekilde formüle edilmesi gerekmektedir. Tırnağın hidrasyonu, tırnak plağındaki keratin dokusunun aralanmasını sağladığından plağın etkin maddeye karşı geçirgenliğini artırmaktadır. Bu nedenle su içeren formülasyonlar önemlidir. Formülasyon su içermez ya da az içerirse bu durum tırnak plağının geçirgenliğini istendiği gibi artırmayabilir. Yapılan bir çalışmada su içermeyen formülasyonların kullanıldığı durumlarda tırnak plağına penetrasyonun düşük olduğu bildirildi [8]. Bu konu ile ilişkili olarak hidrojel sistemlerin, su içeriyor olmaları nedeni ile, bu amaç için kullanılabileceği düşünülmüş ve tez çalışmamızda hidrojel içeren bijel ile çalışılmaya karar verildi. Bu konu ileride ayrıntısıyla açıklanacaktır.

2.4.2. Tırnak mantarı için partiküler taşıyıcı sistemlerin kullanımı

Yapılan çalışmalar partiküler taşıyıcı sistemlerin, formülasyondaki antifungal maddelerin tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir. Nanokapsül, nanoemülsiyon, nanovezikül, katı lipit nanopartikül, lipozom, etozom, mikroemülsiyon gibi farklı pek çok taşıyıcı sistemin antifungal etkin maddelerin tırnak plağına, plaktan da tırnak yatağına penetrasyonunu artırıp artırmadığı yapılan çalışmalarla incelendi.

Flores ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada, antifungal etkin madde olarak tiokonazol kullanıldı. Çalışmada kitozan nanokapsülü ve film oluşturan cila formülasyonu hazırlanmış ve bu formülasyonlar ticari ürün olan tırnak cılası ile karşılaştırıldı. Nanokapsül formülasyonları etkin maddenin uzatılmış salımını sağlarken; cila formülasyonunun ticari ürüne göre etkin maddenin tırnak plağına daha yüksek oranda penetre olmasını sağladığı saptandı [38].

Yapılan diğer bir çalışmada da ketokonazol yüklü nanoemülsiyonlar in-vitro salım, penetrasyon ve antifungal aktivite açısından ticari ürün olan tırnak cılası ile kıyaslandı. Nanoemülsiyon formülasyonunun yapılan çalışmaların tümünde daha iyi bir etkinlik gösterdiği bulundu [65].

Amra ve Momin tarafından yapılan çalışmada ise ketokonazol içeren mikroemülsiyon in-vitro salım ve antifungal aktivite açısından ticari krem formülasyonu ile kıyaslanmış ve mikroemülsiyonun yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğu gösterildi [43].

Ketokonazolün kullanıldığı bir diğer çalışmada da etkin madde içeren oleojel ve bijel gibi değişik jel sistemleri, ticari krem formülasyonu ile in-vitro salım çalışması yapılarak karşılaştırıldı. Hazırlanan formülasyonların ticari krem formülasyonuna göre daha yüksek in-vitro salım profili gösterdiği bulundu. Wróblewska ve diğerlerinin yaptıkları in-vitro ve ex-vivo çalışmalarla ketokonazol gibi lipofilik antifungal etkin maddeler için bijel ya da oleojel gibi yağ içeren formülasyonların ilaç taşıyıcı sistem olarak başarılı şekilde kullanılabileceği gösterildi [66].

Bseiso ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada etkin madde olarak sertakonazol ve penetrayon artırıcı olarak N-asetil sistein, tiyoglikolik asit, tiyoüre ve etanol kullanılarak nanovezikül formülasyonu hazırlandı. Geliştirilen formülasyonlar krem şeklindeki ticari krem formülasyonu ile mikrobiyolojik etkinlik açısından karşılaştırıldı. Nanovezikül formülasyonunun antifungal aktivitesinin diğerlerinden daha yüksek olduğu bulundu [46].

Yapılan başka bir çalışmada, farklı olarak tırnak cilası lipozom içerecek şekilde hazırlandı. Ayrıca penetrasyon artırıcı olarak %1'lik tiyoglikolik asitin tırnak plağından geçen terbinafin HCl miktarını nasıl etkilediği incelendi. Lipozom içeren ve sadece penetrasyon artırıcı içeren 2 cila formülasyonundan, lipozom içeren tırnak cilası ile tırnak plağına etkin madde penetrasyonunun çok daha yüksek olduğu bildirildi [67].

Başka bir çalışmada aynı etkin madde, lipozom ve etozoma yüklendi. Bu sistemler Karbopol, kitozan ve Poloksamer 407 jelleri içinde dağıtıldı. Jel yapıcı ajan olarak Poloksamer 407'nin kullanılması ile etkin maddenin tırnak plağına daha yüksek oranda penetre olduğu gösterildi [33]. Daha sonra aynı çalışma grubu Eudragit L100S ve Pullulan polimerlerini kullanarak, film formülasyonları hazırladı. Çalışmada terbinafin HCl'i lipozoma yüklemişler sonra Pullulan ile lipozom içeren film formülasyonu hazırlamışlardır. İn-vitro salım, ex-vivo penetrasyon ve in-vivo antifungal aktivite açısından bu formülasyonun, diğer formülasyonlardan daha iyi sonuç verdiği saptandı [67].

Rocha ve diğerleri, antifungal etkin madde olarak vorikonazol, penetrasyon artırıcı olarak üre kullanarak katı lipit nano partikül hazırlamışlardır. Katı lipit nano partikül formülasyonlarının etkin madde salımını geciktirdiği ve ürenin tırnak plağına penetrasyon üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı bildirildi [68].

2.4.3. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri

Etkin maddenin tırnak plağından tırnak yatağına doğru geçişini yani penetrasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biri molekül ağırlığıdır. Etkin maddenin plak içine penetrasyonu ve plaktaki difüzyonu molekül ağırlığı arttıkça güçleşmektedir [20]. Molekül ağırlığına ek olarak etkin maddenin lipofilitesi de tırnak plağı içindeki hareketini etkilemektedir. Tırnak plağına penetrasyon ve plaktan da tırnak yatağına difüzyon, hidrofilik etkin maddeler ile daha kolay gerçekleşmektedir. Bu durumun temel sebebi tırnak plağının hidrofilik yapıda olmasıdır [1, 20]. Walters ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada tırnak plağının hidrofilik yapısından dolayı su ve polar alkollerin tırnak plağında daha kolay difüzelebildiği saptandı. Ayrıca bu çalışmada, su oranı yüksek bir formülasyonun kullanılması ile tırnak dokusunun hidrasyonunun arttığı ve keratin dokunun aralandığı; yani keratinize dokunun aralanmasını sağladığı ve etkin madde moleküllerinin daha kolay difüzelebildiği gösterildi. Hidrofilik etkin madde molekülleri için tırnaktan

penetrasyon ve difüzyon olayı bu şekilde açıklanırken, lipofilik moleküllerin tırnak plağının %0,1-1 arasında değişen lipit içeriği aracılığıyla difüzyona uğradığı düşünülmektedir. Antifungal etkin maddeler genellikle suda çözünürlükleri düşük yani lipofilik maddelerdir. Buna bağlı olarak, topikal uygulanan lipofilik antifungal etkin maddelerin tırnak yatağına ulaşmalarının çok zor olduğu belirtilmektedir. Bu sebeple polar etkin maddelerin non-polar etkin maddelere göre tırnak plağına daha fazla penetre olabildiği ifade edilmektedir [1, 8].

Topikal tedavide etkin maddenin tırnak plağındaki penetrasyonunu etkileyen bir diğer değişken ise etkin maddenin elektriksel yüküdür. Tırnağın yapısındaki keratinin izoelektrik noktası yaklaşık ~5,0'tir. Yani tırnak dokusu, pH 5'in üzerinde negatif, pH 5'in altında pozitif yükü yüküdür [7]. Bu durumda, etkin maddenin kendisinin "+" ya da "-" yüklü olması tırnak plağına penetrasyonunu doğrudan etkileyebilir. Yapılan çalışmalarda topikal olarak tırnak dokusuna uygulanan formülasyonun pH'sının 5'in üzerinde olduğunda "-" yükü yüklenmiş etkin madde moleküllerinin, tırnak plağı tarafından itildiği ve plaktan penetrasyonlarının daha zor gerçekleştiği bildirildi [69].

Ayrıca hidrofilik noniyonize etkin madde moleküllerinin tırnağa penetrasyonu ve tırnak plağındaki difüzyonu daha kolay gerçekleşmektedir. Asidik etkin maddeler kendi pKa değerlerinden daha düşük pH değerlerinde, bazik etkin maddelerde kendi pKa değerlerinden daha yüksek pH değerlerinde noniyonize durumdadır. Bu durum göz önüne alındığında, asidik ilaçlar asit pH'da, bazik ilaçlar da bazik pH'da olan bir ürün içinde tırnak yatağına daha kolay penetre olur. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında tırnak mantarının topikal tedavisinde kullanılacak formülasyonun yapı ve özelliklerinin tedavi etkinliği açısından çok büyük öneme sahip olduğu söylenebilir.

Penetrasyonu ve difüzyonu etkileyen bir diğer faktör de etkin madde moleküllerinin iyonik veya noniyonik olması durumudur. Yapılan bir çalışmada, noniyonik etkin madde moleküllerinin iyonik etkin madde moleküllerine göre tırnak plağına penetrasyonlarının yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu gösterildi [70].

2.5. Tırnak Plağına Penetrasyonu Artırma Yöntemleri

Tırnak mantarında, topikal tedavinin etkinliğini artırmak için formülasyon içindeki antifungal etkin maddenin tırnak plağına penetrasyonunun artırılması gerekmektedir.

Bunun bir yöntemi tırnağa ve bitişiğindeki dokulara afinite gösteren ve daha iyi difüzlenebilen etkin madde molekülleri sentezlemektir [71]. Efinakonazol bu duruma örnektir. Tırnak plağındaki keratine yüksek affinite gösteren etkin madde moleküllerinin, bağlandıkları yapıdan çok zor ayrılmaları nedeniyle tırnak yatağındaki enfekte bölgeye difüzyonu çok zordur ve bu durum tedavinin etkinliğinin düşmesine ve tedavi süresinin uzamasına neden olur. Tedavide hedef, etkin madde moleküllerinin keratine ilgisinin yüksek olmasıdır. Bu sayede etkin madde molekülleri hızlı bir şekilde tırnağa penetre olarak plakta birikecektir. Ancak tırnaktan ayrılma da kolay olmalıdır. Sonuçta serbest moleküller tırnak yatağına doğru difüzlenebilecektir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, siklopiroks ve amorolfine göre nispeten yeni bir molekül olan efinakonazol, keratine ilgisi nedeni ile keratin dokusuna bağlanabilmekte ve sonra diğer etkin madde moleküllerine göre daha hızlı bir şekilde keratin dokusundan ayrılıp tırnak yatağına doğru difüzlensebilmektedir [11]. Bu özellikteki etkin madde molekülleri tedavi etkinliği açısından avantajlı durumdadır.

Tırnak mantarı tedavisinde var olan moleküllerin tırnak plağına penetrasyonunu artırmanın fiziksel ve kimyasal yolları bulunmaktadır [1, 4, 8, 13, 20, 72].

Bu yollar/yöntemler temel olarak 5 grupta incelenmektedir:

- a. Tırnak plağının aşındırılması
- b. Tırnak plağının mikroporasyonu
- c. Tırnak plağının kimyasal olarak yumuşatılması
- d. Hidrasyon
- e. İyontoforez.

2.5.1. Tırnak plağının aşındırılması

Topikal tedavide etkin madde moleküllerinin tırnak plağına penetre olmasındaki ilk ve en önemli engel dorsal tabakadır (Bkz. Şekil 2.2). Dorsal tabakanın aşındırılarak inceltilmesi, etkin maddenin tırnak yatağına ulaşmasını kolaylaştırır. Bu yolla, tırnak yatağına olan difüzlenseme mesafesi azaltılarak daha fazla etkin madde molekülünün hedefe ulaşacağı belirtildi. Tırnak plağının aşındırılmasının plaktaki mevcut mikroorganizma sayısını da azaltacağı düşünülmektedir [73]. Kronik hastalarda (diyabet gibi) tırnak mantarının topikal

tedavisinde formülasyon tatbik edilmeden önce tırnak plağının aşındırılarak kalınlığının 1-2 mm azaltılmasının tedaviyi olumlu etkilediğini gösteren çalışmalar vardır [74]. Bu çalışmalardan birinde aşındırılmış tırnak plağına uygulanan 5-fluorourasil, flurbiprofen gibi etkin maddelerin in-vitro transungual penetrasyonunun yaklaşık 2 kat arttığı gösterildi [75].

2.5.2. Tırnak plağının mikroporasyonu

Tırnak plağına penetrasyonu artırmada kullanılan bir başka yöntem de tırnak plağında fiziksel olarak μm boyutunda delik açmaktır. Bu yöntemde tırnak yatağına zarar vermeden sadece tırnak plağında, özel bir cihazla (PathFormer), belirli boyutlarda delik açılmaktadır [74]. Bu teknik ve cihaz esasen tırnak plağının altında oluşan hematoma boşaltmak için geliştirildi. Tedavide etkin maddelerin tırnak plağına penetrasyonunu artırmak için kullanılmasındaki en büyük sıkıntı, tırnakta çok sayıda delik açılmasının zorunlu olmasıdır. FDA tarafından tedavide kullanılması önerilen bu cihaz, bireylerde kullanım sırasında ve sonrasında herhangi bir ağrı ya da acı oluşturmaması nedeniyle, tercih edilebilmektedir [76]. Antifungal etkin madde olarak terbinafinin kullanıldığı bir çalışmada, tedavi öncesinde bu cihaz kullanılarak tırnak plağında mikro boyutta delikler açıldı. Daha sonra krem formülasyonu uygulandı. Bu uygulamanın, etkin maddenin penetrasyonunu artırdığı, bu sayede de tedavi etkinliğini iyileştirdiği gösterildi [34]. Mikroporasyon tekniğinin kullanıldığı bir başka çalışmada da, kadavra tırnağında işlem uygulandı; siklopiroks içeren ticari tırnak cilası tırnak plağına sürüldü. Por oluşturuldu ve oluşturulmayan kadavra tırnağına etkin madde penetrasyonu ve plakta difüzyonu incelendi. Çalışmada delik oluşturulan tırnaktan etkin maddenin penetrasyonunun yaklaşık üç dört kat arttığı gösterildi [77].

2.5.3. Tırnak plağının kimyasal olarak yumuşatılması

Keratini yumuşatan değişik kimyasal maddelerin kullanımı ile etkin madde penetrasyonunu ve difüzyonunu artırmak mümkündür. Bu maddeler, topikal tedavide kullanılacak etkin madde ile aynı formülasyonda bulunabilir. Bu durum uygulama ve tedavi etkinliği açısından büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu maddeler tırnak plağındaki

keratin dokusunda bulunan disülfid, amid ve hidrojen bağlarını hedef alarak plakta yeni porlar oluşturmaktadırlar. Tiyoller/merkaptanlar, sülfidler, hidrojen peroksit, üre, keratolitik enzimler, keratolitik maddeler, 2-n-nonil-1,3-dioksolan (SEPA) sıklıkla tırnak plağını yumuşatmak için denenilen/kullanılan penetrasyon artırıcılardandır. Tırnak plağına etkin madde penetrasyonunu artırmak için kullanılan N-asetilsistein, merkaptotetanol, N- (2-merkaptopropiyonil)-glisin (MPG), piriton, tiyoglikolik asit ve sülfidler, tırnağın keratin dokusundaki disülfid bağlarını kırarlar. Bu durumda keratinin etkin madde moleküllerine karşı gösterdiği direnç azalır. Bu sayede tırnaktan etkin madde emiliminin artırıldığını gösteren çalışmalar vardır [20]. Bir çalışmada, farklı keratin yumuşatıcılar kullanılarak amorolfin HCl içeren tırnak cilası hazırlandı. Etkin madde penetrasyon çalışması sığır toynak membranları kullanılarak yapılmış ve en etkili penetrasyon artırıcının tiyoglikolik asit olduğu gösterildi [78]. Tırnak plağının keratin yapısındaki disülfid bağlarını kıran hidrojen peroksit gibi oksitleyici bir maddenin de üre ile kombine kullanılması ile sinerjik etki oluşabileceği bildirildi. Keratolitik bir enzim olan keratinazın da tırnağın bariyer özelliklerini zayıflattığı ve tırnağa penetrasyonu artırdığını gösteren bir çalışma vardır [79]. Tırnak plağında benzer etki mekanizmasına sahip olan papain, üre ve salisilik asidin tırnak plağının keratin yapısını aralayarak etkin maddenin önündeki engeli ortadan kaldırdığı ve daha fazla miktarda etkin maddenin tırnak dokusundan geçişine olanak sağladığı gösterildi [80].

Üre ve salisilik asit gibi keratolitik maddeler tırnak keratinindeki disülfid bağlarını kırarlar. Bu ajanların tırnak plağını yumuşatarak doku içinde suyun difüzyonunu kolaylaştırdığı, bu sayede de etkin madde penetrasyonunu artırdığı bilinmektedir [20]. Tırnak mantarı tedavisinde üre bu özelliğinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca üre, N-asetil sistein gibi farklı kimyasal penetrasyon artırıcılarla kombine halde kullanıldığında, tırnaktan etkin madde penetrasyonunda ve difüzyonunda sinerjik bir etki oluşturmaktadır [13, 29].

Sodyum sitrat, potasyum fosfat, sodyum fosfat ve amonyum karbonat gibi inorganik tuzların da tırnaktan etkin maddelerin penetrasyonunu artırdığı bildirildi. Nair ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, kullanılan farklı inorganik tuzlar arasından sodyum fosfatın, terbinafin HCl'nin tırnağa penetrasyonunu artırmada en etkili tuz olduğu kanıtlandı [81]. Yüksek derişimdeki asit çözeltisinin de tırnaktan emilimi artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [82]. %20 tartarik asit çözeltisinin ve %10 fosforik asit jelinin tırnak plağında çok sayıda mikro boyutta gözenek oluşturduğu ve bu sayede tırnak plağının yüzey alanının arttığı; suyun difüzyonu kolaylaştığı için tırnağın hidrasyonunun arttığı ve etkin maddenin

tırnağa penetrasyonu için ideal bir tırnak plağı olduğu bildirildi. Tırnak plağındaki bu gözeneklilik ve yüzey alanı artışı ile etkin madde içeren formülasyonun plağa adezyonunun artması ve tırnak yüzeyine yapışmasının kolaylaşması da sağlandı. Tırnak plağına asit uygulanması ile terbinafin HCl'in tırnak dokusu içindeki penetrasyon ve difüzyonu yaklaşık altı, yedi kat arttı [81]. Tırnağa penetrasyonun araştırıldığı başka bir çalışmada da penetrasyon artırıcı olarak polietilen glikol (PEG)'ler kullanıldı; farklı molekül ağırlığındaki PEG'leri (%30 a/a) içeren jel formülasyonları hazırlanarak, terbinafinin tırnağa penetrasyonu in-vitro olarak incelendi. Düşük molekül ağırlıklı PEG'lerin (200 ve 400) etkin madde molekülünün tırnak plağına penetrasyonunu, plak içindeki difüzyonunu ve tırnak plağındaki birikimini artırdığı; yüksek molekül ağırlıklı PEG'lerin (1000-3350) etkin madde penetrasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterildi. Etkin madde penetrasyonundaki bu artışın, düşük molekül ağırlıklı PEG'lerin tırnak plağının şişmesine yol açmaları nedeni ile olduğu bildirildi. Bu özelliklerinden dolayı düşük molekül ağırlıklı PEG'lerin topikal formülasyonlarda etkili bir penetrasyon artırıcı olarak kullanılabileceği bildirildi [83].

2.5.4. Hidrasyon

Tırnak plağının hidrasyonu, plağın elastikiyetini ve geçirgenliğini değiştirerek, tırnağa penetrasyonu ve tırnak içinde etkin madde difüzyonunu artıracak şekilde etkilemektedir. Bağlı nemin etkin madde penetrasyonundaki etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, bağlı nemin %80'den fazla olmasının etkin madde penetrasyonunda kayda değer bir artışa neden olduğu bildirildi. Ortamın bağlı neminin %15'ten %100'e artırılması ile ketokonazolün tırnak dokusundaki penetrasyonunun yaklaşık 3 kat arttığı gösterildi [78]. Tırnak plağının hidrasyonunun artırılması, su içeren formülasyonlarla sağlanmaktadır.

2.5.5. İyontoforez

Etkin maddelerin deriden penetrasyonunu artırmak için elektrik akımının kullanıldığı bir teknik olarak bilinen iyontoforez tekniği, tırnak mantarının tedavisinde de kullanılmaktadır. İyontoforezin tırnak plağına penetrasyonunu artırmada kullanılabilmesi, etkin maddenin iyonik özelliğine ve molekül boyutuna bağlıdır [84]. Elektrik akımının

uygulanması ile iyonik molekülün tırnak plağındaki difüzyonu pasif transporta göre artmaktadır.

Manda, Sammeta, Repka ve Murthy yaptıkları çalışmada, terbinafin HCl'in proksimal tırnak kıvrımından tırnak matriksine penetrasyonunu iyontoforez uygulayarak incelemiş ve penetrasyonun artışına bağlı olarak tırnak matriksindeki etkin madde konsantrasyonunun MIC değerinden çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [85]. Yine bu tekniğin kullanıldığı bir çalışmada tırnağa etkin madde penetrasyonunda hiponikyum bölgesi incelenmiş; model maddenin 24 saat sonraki miktarının iyontoforez uygulanmasıyla kontrol grubuna göre yaklaşık 54 kat daha fazla olduğu bulunmuştur [86].

2.6. Topikal İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Jeller

Jeller, değişik dokulara (deri, tırnak veya mukoza gibi) uygulanmak üzere formüle edilmiş yarı katı sistemlerdir. Jeller, jel yapıcı ajanların üç boyutlu bir matris oluşturacak şekilde bir dispersiyon ortamı veya çözücü içinde dağıldığı sistemlerdir. USP jelleri, sıvı tarafından çevrelenen, küçük inorganik moleküllerin veya büyük organik moleküllerin dispersiyonlarından oluşan yarı katı bir sistem olarak tanımlamaktadır [87, 88]. Jel yapıcı ajanlar farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir ve çözücünün hareketini engeller [89].

Jel sistemlerin en önemli özelliği, katı benzeri özellik göstermeleridir [90]. İlaç formülasyonunda jeller, biyouyumlu jel yapıcılarla hazırlanır ve sıklıkla kullanılan dermal ilaç şekilleridir. Jeller üç boyutlu kompleks yapılardır ve bir jel sisteminin bileşenleri arasındaki etkileşimler, reolojik özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir.

Jel Sistemlerin Avantajları:

- Hem polar hem de polar olmayan etkin maddeler için kullanılabilirler.
- Diğer yarı katı dozaj formlarına göre jellerin formüle edilmesi oldukça kolaydır.
- Uygulama bölgesinde koruyucu bir tabaka oluştururlar. Jellerin uygulama bölgesinde kalma süresi farklılık gösterebilir. Genellikle bu durum kullanılan jel oluşturucunun yapısına bağlıdır.
- Yayılabilirlik özellikleri iyidir.

- Genellikle toksik değildirler.
- Hidrojellerde çözücü buharlaşmasından sonra cilt üzerinde ince bir film tabakası oluşur. Bu olay tabaka içindeki etkin maddenin %'sini ve dolayısıyla termodinamik aktivitesinin artmasını sağlar.
- Stabil sistemlerdir.
- Etkin maddenin kontrollü salımını sağlayabilirler [87, 91].

Jel Sistemlerin Dezavantajları:

- Hidrojellerde su içeriği, mikrobiyal stabiliteyi zorlar.
- Özellikle hidrojellerde bekleme ile çözücü, jel matrisden ayrılıp faz ayrışmasına neden olabilir.
- Formülasyondan çözücünün buharlaşması, jelin kurumasına neden olabilir.
- Jellerden etkin madde salımı zor olabilir, bu yoğunlukla viskozite ile ilgili bir durumdur.
- Bazı jellerin reolojisi sıcaklık nedeniyle değişebilir [87, 91].

Jellerin Sınıflandırılması:

Jellerin özellikleri kullanılan polimerin ve çözücünün yapısına, dağılan faz oranına göre değişir. Bu durum jellerin reolojik özelliklerini ve fiziksel yapılarını etkiler. Farmasötik teknolojide jeller genellikle sıvı bileşenin polaritesine göre hidrojel ve organojel olarak sınıflandırılırlar [63, 87, 91]. Hidrojeller, sürekli fazı polar bir çözücü, genellikle su olan jellerken, organojeller (veya oleojeller) sürekli fazı organik çözücüler, doğal/sentetik yağ gibi apolar sıvılar olan jellerdir.

Hidrojel ve organojellerde kullanılan yardımcı maddeden bazıları Çizelge 2.5'te verildi [92].

Tez çalışmamızda hidrojel, organojel ve bijel hazırlanmış olduğundan bu bölümde sadece bu jel sistemlerden bahsedilecektir.

Çizelge 2.5. Hidrojel ve organojel hazırlarken kullanılan maddelere bazı örnekler [89, 100]

Hidrojel	(dağılım ortamı: su)		Organojel	(dağılım ortamı: sıvı yağ)
	Polimerler		Sıvı yağı jelleştiren maddeler (Organojelatörler)	Sıvı yağ
Aljinat	HPMC	Karbopol 934	Sorbitan monostearat (Span 60)	Orta zincirli trigliseritler ve izopropil miristat
Jelatin	Poloksamer 407	Karbopol 940	Sorbitan monopalmitat (Span 40)	Ayçiçek yağı
Guar zamkı	PVA, PVP	Karbopol 974P	Sorbitan monooleat (Span 80)	Balık yağı
Pektin	NaCMC	Karbopol 971P	Gliseril monostearat (GMS)	Susam yağı
Kitozan			Stearik asit	Badem yağı
			Setil alkol, stearik alkol	Zeytin yağı
			Lesitin	Soya fasülyesi yağı
			Mumlar	Sıvı parafin

2.6.1. Hidrojel ve organojel sistemleri

Hidrojeller

Hidrojel oluşturan polimerler, zincirlerindeki amino ($-NH_2$), karboksilik asit ($-COOH$), hidroksil ($-OH$), amid ($-CONH$), sülfü ($-SO_3H$) gibi gruplardan dolayı su ile kolayca etkileşime girerek suyu tutma kapasitesi yüksek olan (hidrofilik) yapılardır [87, 89].

Hidrojellerin oluşum mekanizmalarından bazıları aşağıda verildi [93-95].

-Fiziksel çapraz bağlama yoluyla [ısıtma/soğutma (polietilen glikol-polilaktik asit hidrojel), iyonik etkileşim (kitosan-polilizin, kitosan-gliserol fosfat tuzu ve kitosan dekstran hidrojelleri), kompleks koaservasyon (polikasyonik kitosanlı polianyonik ksantan), H-bağlama, dondurma-çözdürme].

-Kimyasal çapraz bağlama (çapraz bağlayıcılar kullanarak). Doğal ve sentetik polimerlerin çapraz bağlanması, fonksiyonel grupların ($-OH$, $-COOH$ ve $-NH_2$ gibi) aldehit (örn. glutaraldehit, adipik asit dihidrazid gibi) çapraz bağlayıcılarla reaksiyonu yoluyla elde edilebilir.

Genel olarak kimyasal çapraz bağlı hidrojellerin bağları daha sağlam ve güçlüdür. Fiziksel çapraz bağlı hidrojel, kimyasal çapraz bağlayıcıların bulunmamasından dolayı biyolojik olarak uyumlu ve daha güvenlidir.

Hidrojel, yüksek oranda su içermesi, elastik olması, doku ile uyumlu olması birçok farklı alanda kullanılmalarını sağladı [89, 96]. Hidrojel, doğal, yarı-sentetik veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanabilir [89]. Sentetik polimerlere Karbopol, Polivinil Alkol (PVA) ve Polivinil Prolidon (PVP), yarı sentetik polimerlere Hidroksipropil metilselüloz (HPMC) ve doğal polimerlere aljinat, jelatin, guar sakızı ve pektin örnek olarak verilebilir (Bkz. Çizelge 2.5). Doğal polimerlerle hazırlanan hidrojel genellikle biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik değildir. Doğal polimerler (nişasta, aljinat ve agaroz gibi polisakkaritler) ve kollajen, jelatin gibi proteinler, kopolimerizasyon ile modifiye edilebilirler. Böylece daha iyi özelliklere sahip jeller elde edilmiş olur [92].

Hidrojel fiziksel, kimyasal veya biyokimyasal uyaranlarla jel-sol faz geçişine uğrayabilir. Fiziksel uyarımlar sıcaklık, elektriksel ve manyetik alan, çözücü bileşimi, ışık gibi koşullardır. Kimyasal uyarımlar pH, iyonik güç, spesifik kimyasal bileşikler olabilmektedir. Enzimlerin ve amino asitlerin de biyokimyasal uyaran olabileceği bildirildi [97]. Hidrojel oluşturan yapılar birçok farklı şekilde sınıflandırılabilir. Bu sınıflama polimer yapısına (homopolimerler ve kopolimerler), jel oluşturunca molekülün bağlanma şekline (fiziksel olarak bağlı veya kimyasal olarak çapraz bağlı), bozunma durumuna (biyobozunur, bozunmaz), kaynaklarına (doğal, sentetik veya hibrit) ve fiziksel özelliklerine göre olabilmektedir [89, 97].

Hidrojel, topikal taşıyıcı sistem olarak, hazırlanma kolaylığı, yağlı olmayan yapıları, iyi yayılabilirlik, SC hidrasyonunu artırma ve uygulandıktan sonra kolaylıkla su ile yıkanıp uzaklaştırılabilmesi gibi birçok avantaja sahip olması, yüksek hasta uyuncunu da beraberinde getirmektedir. Ancak hidrofobik etkin maddeleri çözme güçleri yeterli olmayabilir. Bu nedenle bu grup maddeler için tercih edilmeyebilirler. Hidrofilik özellikteki etkin maddeler için taşıyıcı sistem olarak rahatlıkla kullanılırlar [98].

Organojeller

Organojeller, jel yapıcı ajan aracılığıyla organik sıvı fazın, kendiliğinden oluşan üç boyutlu ağ tarafından immobilize edildiği yarı katı sistemlerdir. Organojeller, organik sıvı fazın

yağ/lipofilik sıvı olduğu oleojeller olarak da bilinirler. Bu sistemler opak veya şeffaf, viskoelastik özelliklere sahiptirler. Bu jellerin yapısı, viskoz akıcı özellikten yarı katı sistemlere kadar değişebilmektedir. Düşük kayma hızında, katı gibi davranırlar ve elastik özelliklere sahiptirler, ancak kayma gerilimi üç boyutlu yapının fiziksel bağlarını bozacak kadar yüksek olması durumunda akışkan hale gelirler [99, 100].

Organojellerin oluşum mekanizmaları:

Organojel oluşumunda farklı mekanizmalar üzerinde durulmuştur [100, 101]. Bunlardan bazıları aşağıda belirtildi:

- Apolar çözücüye katı organojelatör eklenir ve erime sıcaklığına kadar (~60/70 °C) ısıtılır. Organojelatör molekülleri sıcaklığın düşmesi ile 3 boyutlu bir ağ yapısı oluşur ve çözücüyü molekülleri arasına hapseder. Sıvı yağı jelleştiren maddenin bu sıvı yağdaki çözünürlüğü önemlidir. Bu durum oluşan organojelin fiziksel stabilitesini etkiler [100, 102-104]. Bu jellerin önemli bir özelliği termoreversibl olmalarıdır. Sıcaklıkları çözelti-jel geçiş sıcaklığının üzerine çıktığında katı benzeri yapılarını kaybederek akmaya başlarlar. Sıcaklığın düşmesi ile bu fiziksel etkileşimler tekrar kurulur ve sistem zor akan veya yarı katı duruma geri döner.

- Apolar çözücü içerisine eklenen monomerlerin polimerizasyonu sonucu organojel oluşur. Oluşan ağ yapısı apolar çözücü hareketliliğini engellenmiş olur. Bu organojeller kimyasal bağlar (kovalent bağı) ile oluşurlar. Kovalent bağlar geri dönüşümsüz olarak organojel yapısını oluşturur. Bu organojeller seyreltiklerinde veya sıcaklık değişimine maruz kaldıklarında genellikle akıcı duruma dönüşmezler ve matrisleri sağlam ve dirençlidir.

Sıvı yağ/apolar çözücüyü jelleştiren madde organojelatör olarak adlandırılır. Organojelatörler, düşük molekül ağırlıklı veya polimerik yapıda büyük molekülü olabilir. Düşük molekül ağırlıklı organojelatörlere 12-hidroksistearik asit, sorbitan monostearat, sorbitan monopalmitat gibi maddeler örnek olarak verilebilir. Düşük konsantrasyonlarda bile, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri veya elektrostatik etkileşimler ile jel yapıyı oluştururlar. Bu fiziksel etkileşimler, sıvı yağın jelleşmesine neden olur.

Polimerik organojelatörlere poli(metil) akrilat polimerleri (Eudragit), hidrokarbon jel (Plastibase), akrilik asit ko-polimerleri gibi polimerler örnek olarak verilebilir. Bunlar, lineer zincirden aşırı dallanmış zincirlere kadar değişebilen bir yapıya sahip bileşiklerdir. Çok düşük konsantrasyonlarda bile sıvı yağların jelleşmesini sağlayabilirler.

Organojeller susuz yapılarından dolayı mikrobiyal kontaminasyona dirençli olmaları, hazırlanma kolaylığı, lipofilik yapıları sayesinde SC etkin maddelerin penetrasyonunu artırabilmeleri gibi çeşitli avantajlara sahiptir.

Organojellerin hasta uyuncunu düşüren dezavantajı ise yağlı yapısı nedeniyle uygulandıktan sonra ciltte yapışkan bir his bırakmasıdır [66, 98, 105].

Birçok organojel bileşeninin (yağ asitleri, düşük HLB'li yüzey aktif maddeler, alkoller, dimetilsülfoksit, uçucu yağlar, terpenler, terpenoidler) deriden penetrasyonu artırması, iritan olmaması gibi avantajları vardır. Ayrıca formülasyonda lipofilik etkin madde genellikle çözündüğü için etkin maddenin deriye partiyonunun artırılması mümkün olabilmektedir.

2.6.2. Bijel sistemleri

1990'lı yıllarda ortaya çıkan bijeller, hidrojel, organojel ve diğer jel sistemlerin dezavantajlı yönlerini ortadan kaldırmayı hedefleyen sistemlerdir. Bu sistemler, iki jelin herhangi birine göre daha iyi özelliklere sahiptir. Bijeller, hidrojel içinde organojel (O/H), ya da organojel içinde hidrojel (H/O) yapısında olabilir. Bijeller genellikle, sistemin her iki fazının ışığı saçma/dağıtma etkisi sonucu opak ya da beyaz sistemler olarak görünürler. Bijeller viskoziteleri oldukça yüksek yarı katı sistemlerdir.

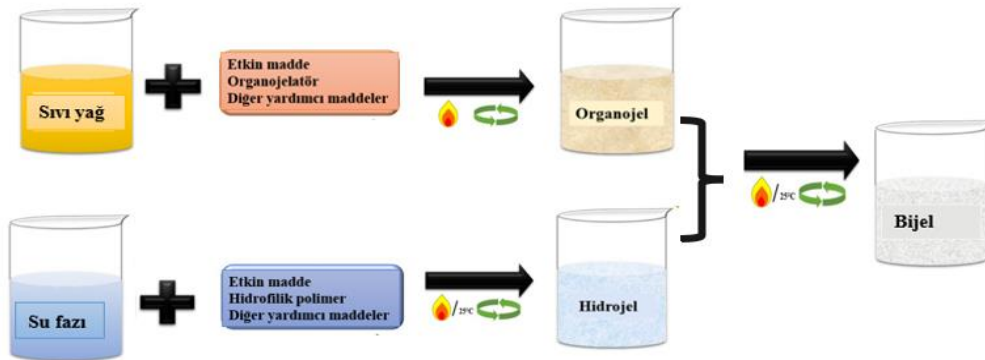
Bijel Sistemlerin Avantajları:

- Hem hidrojel hem de organojelin avantajlarına sahip sistemlerdir.
- Hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeler için ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler.
- Kontrollü ilaç salımı sağlayabilirler.
- Dış fazı hidrojel olan bijeller yüksek hasta uyuncuna sahiptir. Yağlılık hissi daha azdır.
- Zorlayıcı koşullar altında faz ayrışımı görülebilse de emülsiyonlarla karşılaştırıldığında daha iyi fiziksel stabiliteye sahiptirler. Hem sulu hem de yağlı fazların jel olması sayesinde sistemde oluşan iç faz damlacıklarının flokülasyonu ve agregasyonu gözlenmez.
- Oda sıcaklığında 6–12 aya kadar saklandığında faz ayrışmasına uğramazlar [104, 106].

Bijel sistemlerin hazırlanmaları:

Etkin madde taşıyıcısı olarak en sık karşılaşılan bijel sistemi, yağ fazı yani organojelin, sulu faz olan hidrojel içinde dağıtıldığı sistemlerdir. Çok sık tercih edilmese de hidrojin organojel içinde dağıldığı sistemler de çalışıldı. Bijellerin hazırlanmasında öncelikle hidrojel ve organojel Şekil 2.4'te de görüldüğü gibi ayrı ayrı hazırlanır [92]. Bundan sonra bu iki jel yapının bir araya getirilmesinde 2 yolun izlendiği görülmektedir:

- Hidrojel ve organojel ayrı ayrı hazırlandıktan sonra oda sıcaklığı ya da 4 °C'de 24 saat bekletilir. Bekletme süresi sonunda jeller karıştırılır ve bijel hazırlanır.
- Hidrojel ve organojel ayrı ayrı hazırlandıktan sonra bekletilmeden jeller karıştırılır ve bijel hazırlanır. Daha sonra fazlar arası dengenin sağlanması için bijeller oda sıcaklığı ya da 4 °C'de 24 saat bekletilir.



Şekil 2.4. Bijel hazırlanmasının şematik gösterimi

Bijeller, hidrojel ve organojelin birbiri içinde dağıtıldığı sistemler olduğu için matris içinde matris olan karmaşık yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır [92].

Organojel, hidrojel ve bijeli hazırlamak için uygulanan işlem parametreleri aşağıda verildi [92].

İşlem parametreleri

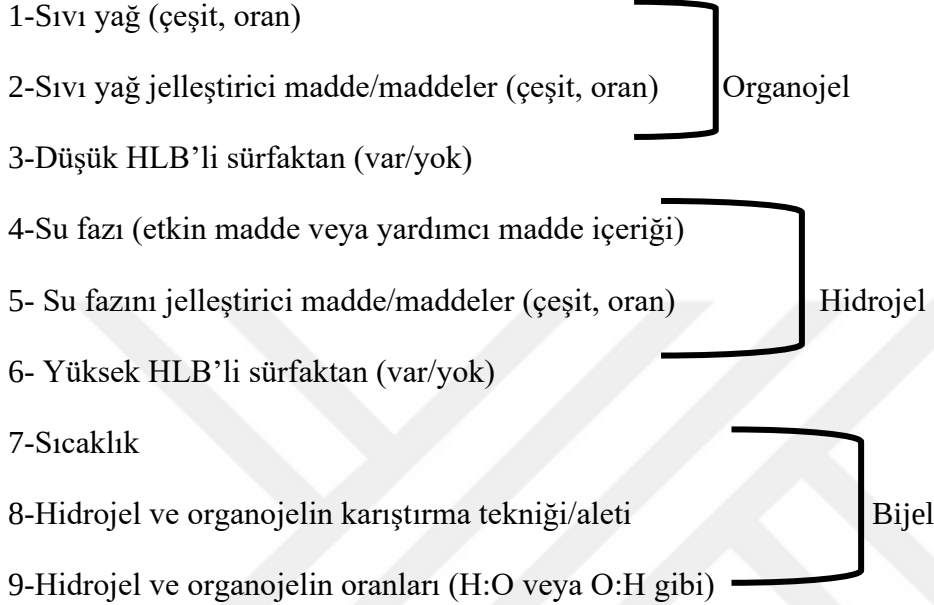
1-Karıştırma hızı

2-Karıştırma tekniği

3- Sıcaklık (var/yok)

Bu işlem parametrelerinin yanısıra aşağıda bildirilen değişkenler bijellerin özelliklerini etkilemektedir:

Değişkenler



Organojeller genellikle ısı enerjisi verilerek hazırlanır.

Yapılan bir çalışmada bijel hazırlamak için mikrodalga enerjisi kullanıldı. Mikrodalga enerjisinin özellikle hazırlama süresinde kısalma ve düşük enerji tüketimi gibi nedenlerden dolayı endüstriyel üretimde avantajlı olabileceği bildirildi [107].

Yapılan başka bir çalışmada ise araştırmacılar bijel hazırlamak için gama radyasyon ile çapraz bağlamayı kullanmışlardır. Çalışmada zeytinyağı + sorbitan monopalmitat organojeli ve sterculia sakızı + poliakrilamid hidrojelini içeren bijel hazırlandı. Organojel hazırlanmasında klasik ısıtma tekniği kullanıldı. Organojel hidrojele eklendi. Bijelin dış fazını hidrojel oluşturmaktadır. Kütle homojen hale gelmesi için 100 rpm'de 4 saat karıştırıldı. Daha sonra gama radyasyon odasında belirli bir süre (13.92 kGy sabit ışınlama dozunda) ışımaya maruz bırakıldı. En son adım olarak bijel sabit ağırlığa gelene kadar $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ lik etüvde kurutuldu [92, 108].

Bijel hazırlanması sırasında organojel ve hidrojelini oranı, karıştırma sıcaklığı ve karıştırma hızı gibi temel işlem parametreleri sistemin özelliklerini etkilemektedir.

Organojel/hidrojel oranı, organojel ve hidrojeldeki maddelerin yapısı ve oranı, etkin maddenin bijel sisteminden salınmasını etkilemektedir [109].

Bijel sistemlerinin hazırlanmasında olası değişkenler Çizelge 2.6'da ve bu konudaki bazı literatür örnekleri Çizelge 2.7'de gösterildi [92].

Çizelge 2.6. Bijellerin hazırlanmasında en sık kullanılan değişkenler

Organojel/hidrojel oranı	Karıştırma sıcaklığı (°C)	Karıştırma hızı (rpm)
1/99	25	50
5/95	50	100
10/90	50-55	500
15/85	60	600
20/80	60-70	800
25/75	70	1000
30/70		1200
40/60		6000
50/50		12000
		16000
		23000

Çizelge 2.7. Organojel ve hidrojellerin hazırlanmasında etkili olan bazı parametreler

Organojel				Hidrojel			
Jelleştirici madde (%) (organojelatör)	Sıvı yağ	Sıcaklık (°C)	Karıştırma hızı (rpm)	Polimer	Sıcaklık (°C)	Karıştırma hızı (rpm)	Referans
Candelilla mumu (%2), 12-hidroksi stearik asit (%2)	Ayçiçeği yağı Sıvı parafin	85 °C	200 rpm	Na poliakrilat (%1)	25 °C	300 rpm	[110]
Balmumu (%3), Balmumu (%6)	Migliyol	80 °C	Verilmemiştir.	Na poliakrilat (%2)	25 °C	Verilmemiştir.	[111]
Polikosanol (%5-LMWO- yağ alkolü), GMS (%5)	Zeytin yağı	85 °C	200 rpm	Pektin (%3)	25 °C	500 rpm	[112]
Balmumu (%10)	Balık yağı	70 °C	300 rpm	HPMC (%3) Na aljinat (%3)	25 °C	500 rpm	[113]
Balmumu (%10)	Balık yağı	70 °C	300 rpm	Karbopol (%2)	25 °C	500 rpm	[114]
Sorbitan monostearat (%20), Sorbitan monostearat (%22)	Soya yağı	60 °C	500 rpm	HPMC K4M(%3-5)	65 °C	500 rpm	[115]
Sorbitan triasetat (% 20)	Badem yağı	60 °C	100 rpm	Aljinat (%3)	Verilmemiştir.	300 rpm	[116]
Sorbitan Monostearat (% 10-15-20-30)	Jojoba yağı+ Çay ağacı yağı	70 °C	500 rpm	Karbopol (%1)	Verilmemiştir.	Verilmemiştir.	[117]
Sorbitan mono stearat	Badem yağı	60 °C	100 rpm	Karbopol (%1)	25 °C	400 rpm	[118]
Stearik asit/lesitin (%20)	Soya yağı	95 °C	Verilmemiştir.	Peynir altı suyu konsantresi (%15-%25)	25 °C	Verilmemiştir.	[119]
Gliseril stearat/polikosanol (%25-%50)	Zeytin yağı	85 °C	200 rpm	Pektin (%1,25)	25 °C	500 rpm	[120]
Compritol 888 (Gliseil dibehenat-%20)	Oleik asit	55-65 °C	Verilmemiştir.	Karbopol 971P (%10)	37 °C	Verilmemiştir.	[121]
GMS /lesitin (%25)	Kanola yağı	90 °C	Verilmemiştir.	Jelatin (%1)	70 °C	Verilmemiştir.	[122]

2.7. Bijellerin karakterizasyonu

Bijeller ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, hazırlanan bu sistemlerde aşağıda belirtilen incelemelerin yapıldığı görülmüştür:

2.7.1. Görüntüsel özelliklerin incelenmesi

-Homojenite

-Renk

-Pürüzsüzlük [117, 123-125].

2.7.2. pH tespiti

pH ölçümü topikal formülasyonların kalitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir parametredir.

Dermal amaçla kullanılan bijellerin pH'sının deriye zarar vermeyecek pH'da olması gerekir. Dış fazı hidrojel olan bijellerin pH'sının 5,0 ile 7,0 arasında olduğu değişik çalışmalarda bildirildi [110, 123, 126-128].

2.7.3. Jel oluşup oluşmadığının tespiti

Jelleşmenin olup olmadığının test edilmesinde ucuz ve pratik bir teknik kullanılmaktadır. Bu teknik, içinde örnek bulunan bir test tüpünü veya flakonu ters çevirip içindeki kütlenin kendi ağırlığı ile akıp akmadığının görsel olarak kontrol edilmesini içermektedir. Örnek akmıyorsa jelin oluştuğu kabul edildi [106, 117, 119, 125, 128-130].

2.7.4. Akış özellikleri ve viskozitenin incelenmesi

Reolojik çalışmalar yarı katı formülasyonların değerlendirilmesinde kullanılan önemli çalışmalardır. Sıcaklıkla formülasyonun viskozitesi ve yapısal değişikliklerinin belirlenmesine imkân verir.

Formülasyonda gözle görünür bir değişiklik olmasa bile, bu çalışmalar formülasyonun iç yapısındaki değişiklikleri gösterir ve stabilitesini anlamamıza yardımcı olur.

Bijel sistemler nonlinear akış özelliğine sahiptirler ve artan kayma hızı ile değişen (genellikle azalan) bir viskozite gösterirler. Bu çalışmada hazırlanan sistemlerin viskozitelerinin belirlenmesinde Power law/Ostwald de Waele eşitliği kullanıldı [136]. Bu eşitlik aşağıda gösterildi (Eş. 2.1).

$$\ln \eta = \ln K + (n-1) \cdot \ln \dot{\gamma} \quad (2.1)$$

$\dot{\gamma}$: Kayma hızı (s^{-1})

η : Viskozite (mPa.s)

n : Akış davranış indeksi (power law index)

K : Akış yoğunluğu indeksi (consistency index) (mPa.s)

Akış davranış indeksi (n) Newton akış gösteren sistemlerde 1, pseudoplastik akış gösteren sistemlerde 0 ile 1 arasında (sistem karıştırıldıkça viskozitesi azalan bir sistem) ve kayma ile viskozitesi artan sistemlerde de 1'den büyük (dilatant akış) olmaktadır.

Bijel sistemler viskoelastik davranış gösterir. Bijeldeki organojel oranı ne kadar fazlaysa, strese bağlı akabilme yeteneğinin o kadar az olduğu ve sistemin katı davranışının (elastik yapı) baskın olduğu gösterildi. Ayrıca organojel oranı arttıkça sistemin sertlik, koheziflik, adheziflik özellikleri artarken, yayılabilirlik ve sürülme gibi özellikleri de azalmaktadır. Bijellerin viskozitesi artan kayma hızında azalmasına rağmen, jel yapı ve elastik özelliklerinin korunduğu bildirildi [131].

Yapılan bir çalışmada Karbopol 940 + su (500 rpm, 25 °C ve 2 saat) hidrojel, balık yağı+imikimod+ balmumu (300 rpm, 70 °C ve 15 dk.) organojeli hazırlandı ve farklı hidrojel:organojel (90:10, 70:30 ve 50:50) oranlarında (800 rpm, 25 °C ve 15 dk.) bijeller

hazırlandı. Hazırlanan bijel formülasyonlarının viskozitesi (η) ve kayma gerilimi (τ), kayma hızının (γ) bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Hazırlanan formülasyonların (hidrojel, organojel ve bijel) psödoplastik davranış gösterdiği görüldü. Hazırlanan hidrojin yüksek viskoziteye, organojelin ise daha düşük viskoziteye sahip olduğu saptandı. Bijel formülasyonlarında hidrojel:organojel oranındaki değişikliklerin, reolojik özellikleri ve viskoziteyi çok etkilediği bildirildi. Hidrojeldeki polimer konsantrasyonunda bijel formülasyonlarının viskozitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) etkisi olduğu saptandı [132].

Hidrojelde bulunan polimerin tipi bijelin reolojik özelliklerini etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada dallanmış hidrofilik polimer içeren bijellerin lineer yapıllara göre daha yüksek stabiliteye sahip bijelleri oluşturabildiği gösterildi [133].

Yapılan başka bir çalışmada, hidrojel/organojel oranındaki artışın, sistemin viskozitesinde azalmaya neden olduğu gösterildi. Bijellerin optimum viskoelastik özellikte olabilmeleri için de belli miktarda organojel içermeleri gerektiği bildirildi. Bijellerin yapı profili (texture p.) analizlerinde, bijel içerisindeki hidrojel oranı ne kadar fazla ise, sertlik ve adezivliğinin o kadar düşük olduğu; yayılabilirliğinin daha iyi olduğu bildirildi [111].

Yapılan diğer bir çalışmada poloksamer 407 hidrojel ve bir polietilen + sıvı parafin organojeli içeren bijellerin reolojik ölçümleri, bir rotasyonel reometre kullanılarak 32 °C’de gerçekleştirildi. Power-law modeli kullanılarak, akış davranış indeksi (n) ve akış yoğunluk indeksi (K) hesaplandı. Formülasyondaki organojellerin, bijellerin yapısını etkilediği görülmüştür. Akış davranış indeksinin 0,1 ile 0,2 arasında olması, sistemin psödoplastik akışa uyduğunu gösterdi. Formülasyondaki organojel oranı arttıkça akış davranış indeksinin arttığı, akış yoğunluğu indeksinin ise azaldığı ve yapının zayıfladığı bildirildi [134].

Soni ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada Karbopol 940 + propilen glikol + etanol + doksisisiklin hiklat (etkin madde) + su (500 rpm, 70 °C) hidrojel ve Span 60 + zeytinyağı + retinoik asit (antioksidan) (300 rpm, 70 °C) organojeli ile bijel formülasyonları hazırlandı. Reolojik çalışmada, Power law/Ostwald de Waele modeli kullanıldı. Bijel formülasyonlarının akış davranış indeksi (n) değerlerinin 0,5 ile 0,6 arasında değiştiği, bu durumda formülasyonların psödoplastik olduğu bildirildi. Organojel miktarının artması ile yapışkanlığın arttığı ve bijelin yayılabilirliğinin azaldığı gösterildi [128].

Yapılan bir çalışmada Polivinil Alkol (PVA) ve Polivinil Prolidon (PVP) (%1-3-5) hidrojenleri ile ayçiçek yağı + Span 40 (%9) organojeli kullanılarak bijeller (50 °C, 1200 rpm) hazırlandı. Bijel formülasyonunu hazırlarken farklı konsantrasyonlarda PVA ve PVP kullanılması bijellerin mekanik özellikleri üzerindeki etkisi incelendi. Etkin madde yüklü PVP ve PVA bijellerinin viskozite- kayma hızı grafikleri oluşturuldu. Hazırlanan bijellerden PVA içerenlerin PVP içerenlere göre daha yüksek viskoziteye sahip olduğu bulundu. Bunun, çalışmada kullanılan PVA'nın PVP'ye göre daha yüksek moleküler ağırlık ve daha uzun zincir uzunluğuna sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür [135]. Bijellerin viskozitesi polimer konsantrasyonunun artmasıyla arttı. Bijellerin akış davranışı Ostwald- de Waele/power law matematiksel eşitliği kullanılarak belirlendi. Bijellerin non-Newtonian, shear-thinning akış profiline uyduğunu gösterdi. Sertlik veya sıkılık, değerleri de ölçüldü. Bijellerin sertliğinin viskozite çalışmaları ile uyumlu olduğu bulunmuştur. PVA bijellerinin PVP bijellerine göre daha sert olduğu saptandı. Bunun nedeninin PVA'nın molekül ağırlığının daha yüksek olmasına dolayısıyla da kompakt yapıya sahip bijeller oluşturmasıyla ilgili olduğu düşünüldü. Formülasyonların adhesiflik değeri, yüksek polimer yüzdesinde yüksek bulundu [136].

Bijelin özellikleri, yüzey aktif madde kullanımı ile değişebilmektedir. Yapılan bir çalışmada farklı HLB değerlerine sahip yüzey aktif maddeler kullanılmış ve bu durumun bijelin özelliklerine etkisi incelendi. Farklı sükröz esterlerine sahip bijellerin benzer jelleşme sıcaklıklarına sahip olduğu bulundu. HLB'si düşük olan bijelin viskozitesinin daha yüksek olduğu bildirildi [122].

2.7.5. Damlaların incelenmesi

Bijellerde, dağılan jel fazının damlalar halinde olduğu değişik çalışmalarda gösterildi. Bu çalışmalarda damla boyutunun tespiti de mikroskopik tekniklerle yapıldı.

Yapılan bir çalışmada Karbopol 940 hidrojenli ve sorbitan monostearat/badem yağı organojelinden oluşan bijellerin, %1,5 (a/h) metilen mavisi kullanılarak optik mikroskop görüntüsü alındı. Organojelin düzenli ve oval şekilli küçük damlacıklar halinde karbopol hidrojenli içinde dağıldığı gösterildi. Damlacıkların boyutlarının 5µm'den küçük olduğu bildirildi [118].

Aynı araştırma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada badem yağı + sorbitan monostearat organojeli ve Karbopol + propilen glikol + etanol + su hidrojel ile (hidrojel/organojel oranı=80:20, 70:30 ve 60:40) bijel formülasyonları hazırlandı. Organojelin damlacıklar halinde karbopol hidrojel içinde dağıldığı ve boyutlarının 5 µm'den büyük olduğu saptandı. Hidrojel/organojel oranı 60:40 olan bijelde, organojelin hidrojel içinde damla oluşturmayıp düzensiz olarak dağıldığı belirtildi. Bijel içindeki organojel oranı arttığında damlaların homojen dağılımdan uzaklaşıp heterojen/düzensiz yapı oluşturduğu sonucuna varıldı [123].

Yapılan başka bir çalışmada ise balık yağı + balmumu organojeli, HPMC (%3) ve Na aljinat (%3) hidrojelleri ile farklı oranlarda karıştırılarak bijeller hazırlandı. Hazırlanan bijeller, Sudan 3 boyası ile boyanmış ve her iki jel yapının polarize ataçmanlı optik mikroskop ile görüntüsü alındı. HPMC hidrojel + balık yağı organojelinden oluşan bijelde, dış faz olan organojel içinde dağılan hidrojel damla boyutları 25–200 µm arasında değişirken, Na aljinat hidrojel + balık yağı organojelinden oluşan bijellerde, damla boyutlarının 50-500 µm arasında değiştiği görüldü [113].

Yapılan bir çalışmada yağ ve organojelatör tipi ne olursa olsun, hazırlanan bijellerin dış fazlarının hidrojelden oluştuğu görüldü. Mikroskop görüntüsünde yağ damlacıklarının düzensiz şekilde dağıldığı saptandı. Organojelatör olarak 12-hidroksistearik asit (12HSA) kullanıldığında, bijellerin iç fazını oluşturan yağ damlacıklarının aglomeratlar oluşturduğu, kandelilla mumu kullanıldığında ise damlaların daha homojen dağıldığı görüldü. Bu durumun sebebinin, 12HSA'nın oluşturduğu organojellerin viskozitesinin yüksek ve bijel hazırlama sırasında yağlı fazın daha zor disperse olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bijellere polarize ışık altında bakıldığında ise yağ damlacıklarının etrafında kristallerin oluştuğu görülmüştür. Kristallerin yağ/su arayüzeyine adsorbe olarak, stabiliteyi artıran bir fiziksel tabaka görevi gördüğü iddia edildi [110].

Floresan mikroskobu da hidrojel içinde organojel damlalarının oluşumunu göstermek ve bu sistemlerde damlacık boyutunu belirlemek için kullanıldı. Bu incelemenin yapıldığı bir çalışmada PVA ve PVP (%1-3-5) hidrojelleri ile ayçiçek yağı/Span 40 (%9) organojeli kullanılarak bijeller hazırlandı. Görüntüleme için Rodamin B ve florol sarı 088 sırasıyla su ve yağ fazlarında çözüldü. Dış fazın mikroskop ile kırmızı olarak görüntülenmesi, dış fazın hidrojelden oluştuğunu ispatlarken, organojelin damlacıklar halinde dış fazda dağılması da bijel yapısının oluştuğunu gösterdi. Bu şekilde floresan mikroskop ile damla boyutuna ek olarak dış faz tespiti de yapılabileceği bildirildi. Çalışmada ortalama damla boyutunun

8,0–13,0 μm arasında olduğu saptandı. PVA bijellerin ortalama damla boyutunun, PVP bijellerden daha küçük olduğu görüldü [136].

Floresan mikroskopun kullanıldığı başka bir çalışmada, Karbopol hidrojel ve bir floresan boya (izotiyosiyanat, %0,1) ile Jojoba yağı + çay ağacı yağı + Span 60 organojeli farklı oranlarda kullanılarak bijeller hazırlandı. Görüntüler organojelin hidrojel içinde damla halinde dağıldığını gösterdi. Düşük oranlarda organojel içeren bijellerin damla boyutlarının daha küçük ve sayıca daha az olduğu bildirildi [117].

Yapılan bir çalışmada Poloksamer 407 hidrojel ve polietilen + sıvı parafin organojel içeren bijellerin yapısı optik mikroskop ile incelendi. Bijel formülasyonundaki oranojel oranı arttıkça damlacıkların boyutunun büyüdüğü ve şeklinin de düzensizleştiği görüldü. Hazırlanan bijellerin 38 μm , 67 μm , 80 μm ve 100 μm damla boyutuna sahip oldukları, ayrıca 80 μm ve 100 μm damla boyutuna sahip olan bijellerin hızlandırılmış stabilite çalışmalarında faz ayrışmasına uğradıkları bildirildi [134].

2.7.6. Hidrojel ve organojel arasındaki etkileşimin incelenmesi

Bu incelemeler Fourier Transform Infrared (FTIR) ve termal analiz yöntemleri ile yapıldı. Yapılan bir çalışmada FTIR kullanılarak, Karbopol hidrojel ile badem yağı organojelinden oluşan bijel incelendi ve kimyasal etkileşimin meydana gelmediği sonucuna varıldı [123]. FTIR ayrıca bijellerin yapısındaki hidrojen bağının öneminin de anlaşılmasını sağladı [126]. Hem hidrojeldeki polimer konsantrasyonunun hem de jellerin oranının, bijellerin FTIR spektrumunu etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlandı [132, 136].

Yapılan bir diğer çalışmada hidrojel, organojel ve bijeldeki fonksiyonel grupların etkileşimlerini anlamak için FTIR analizi yapıldı. Bijelin (hidrojel/organojel 40:60) spektral profilinin organojelin spektral profiline daha çok benzediği görüldü. 3400 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı sudan gelen hidrojen bağını göstermektedir. Beklendiği gibi bu bant hidrojel ve bijelde bulunurken, organojelde bulunmamaktadır. Hazırlanan bijelde, hidrojelden daha az su olması bijeldeki su bandının şiddetinin daha az olmasına neden olmuştur. Bu durumun sadece su içeriğinin farklı olması ile açıklanamayacağı bildirildi. Hidrojinin iç fazda hapsedilmesi nedeniyle ve dış fazın organojel olmasından dolayı, bağların tam tespit edilemediği ileri sürüldü [106]. Yapılan başka bir çalışmada da bijeldeki hidrojel oranının azalmasıyla 3400 cm^{-1} 'deki titreşim yoğunluğunun azaldığı

bildirildi. Bu beklenen bir durumdur çünkü hidrojel miktarı azaldıkça su içeriği de azalmaktadır [132].

Termal analiz (DSC), bijeldeki su moleküllerinin buharlaşma sıcaklığını, organojelin eridiği sıcaklığı belirlemek [132, 136] ve bijeli oluşturan yapıların olası etkileşimini tespit için [126] ve ayrıca etkin maddenin organojel fazında çözünme durumunu incelemek için kullanıldı [87].

Bir çalışmada Karbopol/susam yağı bijellerin ısıtma döngüsü sırasında biri organojelin erimesiyle diğeri sistemdeki suyun buharlaşmasıyla iki endotermik pik; soğutma döngüsü sırasında organojelin katılaşmasıyla ilgili bir ekzotermik pik görüldü [137]. Aynı şekilde yapılan başka bir termal analiz çalışmasında Polivinil Prolidon (PVP) ve Polivinil Alkol/ayçiçek yağı bijellerinde, organojelin erimesi ve suyun buharlaşması ile ilişkili iki karakteristik endotermik pik görüldü [136].

Formülasyon çalışmalarında etkin maddenin çözünmesi, kristal veya amorf durumda olup olmadığını anlamak için de DSC analizi yapılmaktadır. Çalışmamızda da bu inceleme yapıldı [138].

Yapılan bir çalışmada DSC analizi ile bijeldeki organojel oranının artmasıyla erime sıcaklığının arttığı görüldü [117].

Diferansiyel termogravimetri (DTG) ve termogravimetrik analiz (TGA) de bijellerin karakterizasyonu için kullanıldı. Yapılan bir çalışmada sıcaklık arttıkça kütlede %3'lük ağırlık kaybı saptandı; bunun da bijeldeki suyun buharlaşmasından kaynaklandığı düşünüldü. Ayrıca analiz sırasında sıcaklık arttıkça bijelde bulunan polimer bozunmaya başladı [108].

Diğer bir çalışmada DTG kullanılarak bijellerde faz ayrımının görüleceği sıcaklık da tespit edildi; TGA ile de bijel sistemindeki suyun buharlaşması ile ağırlık kaybı incelendi; organojel oranı artırıldığında bijellerde daha yüksek termal stabilite görüldüğü bildirildi [113].

Başka bir çalışmada jelatin bazlı hidrojel ve gliserol monostearat/kanola yağı organojelini içeren bijellerin DSC ve TGA analizleri yapıldı. Bijeldeki organojelin erime, hidrojeldeki serbest ve bağlı suyun buharlaşma ve faz ayrımı sıcaklıkları tespit edildi. Yüksek sıcaklıkta (102 °C) jelatinin hidrojelden ayrıldığı; sistemin fiziksel stabilitesinin bozulduğu sonucuna varıldı [122].

Başka bir çalışmada organojelin erimesiyle ilgili endotermik pikin, bijelde saptanan erime piki ile yaklaşık aynı olduğu gözlemlendi. Bu durum organojelin hidrojel ile karıştırıldıktan sonra termal davranışının değişmediğini gösterdi [131, 139].

2.7.7. Stabilite çalışmaları

Bijeller 2 fazlı sistemlerdir. Viskoziteleri yüksek olmasına rağmen fiziksel stabiliteleri düşük olabilmektedir. Bu nedenle bijellerin incelendiği çalışmalarda bu sistemlerin, yukarıda anlatılan bazı özelliklerinin zamanla değişimi incelendi.

Çalışmalardan birinde $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65 \pm \%5$ BN ve $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75 \pm \%5$ BN’de gerçekleştirilen üç aylık stabilite çalışmasında bijellerin renk, görünüş, pH, viskozite ve yayılabilirlik özellikleri açısından stabil oldukları gösterildi [126].

Diğer bir çalışmada da hızlandırılmış stabilite testi olarak donma-çözülme yöntemi ve uzun süreli stabilite gerçekleştirilmiş ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65 \pm \%5$); 3 ay boyunca organoleptik özellikler, pH ve etkin madde içeriğinde önemli bir değişiklik olmaksızın bijellerinin stabil oldukları bildirildi [117].

Başka bir çalışmada donma-erime yönteminde 15 dakika dondurma ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve ardından 15 dakika ısıtmadan ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$) oluşan 5 döngü uygulandı. Beş döngünün sonunda, bijellerde organoleptik değişiklik olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65 \pm \%5$ BN’de 6 ay boyunca bijelin fiziksel stabilitesi takip edildi. Hızlandırılmış stabilite çalışmalarında yüksek oranda organojel içeren bijellerin, stabilitesinin daha iyi olduğu bildirildi. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’deki stabilite çalışmalarında yüksek oranda organojel içeren bijellerin yapısal bütünlük ve fiziksel özelliklerinin değişmediği belirtildi. Yüksek organojel içeren bijellerin her iki stabilite çalışmasında da 6 ay boyunca stabil olduğu gösterildi [127, 137].

Mazurkeviciute ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada Poloksamer 407 hidrojel ve polietilen+sıvı parafin organojeli içeren bijeller terbinafin HCl ve siklopiroks olaminden bir tanesini içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan bijellerin stabilitesi, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%60$ BN ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%75$ BN’de 6 ay boyunca takip edilmiş ve belirli aralıklarla reolojik, mikroskobik görüntü ve organoleptik özellikleri kontrol edildi. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%60$ BN’de 6 ay boyunca organoleptik özelliklerde herhangi bir değişiklik gözlenmemesi, bijellerin oda sıcaklığında en az 6 ay boyunca stabil olduğunu gösterdi. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%75$ BN’de bazı bijel formülasyonlarında viskozite düşmüş bir süre sonra faz ayrışması gözlemlendi. Bu

formülasyonların düşük stabilitelerinin nedeni diğerlerine göre sıcaklık nedeniyle azalan viskozite ve daha büyük damlacık boyutlarına sahip olması olarak açıklandı [134].

Yapılan başka bir çalışmada, ketoprofen yüklü bijeller ve ticari jel, 6 saat boyunca günışığına maruz bırakılarak hızlandırılmış fotostabilite çalışması yürütüldü. Bijel sistemindeki ketoprofenin daha dayanıklı olduğu bildirildi. Sonuç olarak bijel formülasyonunun ticari ürüne göre etkin maddenin stabilitesini artırdığı sonucuna varıldı [118].

2.7.8. Ex-vivo penetrasyon çalışmaları ve dokudaki etkin madde miktarının/yüzdesinin belirlenmesi çalışmaları

Ex-vivo penetrasyon çalışmalarının hayvan deri ve dokuları ile Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldığı görülmektedir. Bu amaçla sığır, fare, sıçan ve domuz gibi hayvanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalardan bazıları Çizelge 2.8’de verildi.

Yapılan bir çalışmada Karbopol hidrojel ve balık yağı organojelinden oluşan bijel, imikimod içerecek şekilde hazırlandı. Bijel ve ticari krem formülasyonunun sıçan sırt derisi kullanılarak ex-vivo penetrasyonu incelendi. Sonrasında tape stripping metodu ile SC, dermis ve epidermiste kalan etkin madde miktarı saptanmış ve karşılaştırıldı. Ticari krem ile, deriden geçen ve deri katmanlarında kalan etkin madde miktarı bijel formülasyonuna göre yüksek bulundu. Ancak imikimod deride iritasyona neden olan bir maddedir. Bijel formülasyonunun kontrollü salım özelliği ile deri yüzeyinde salım yapan, deriden geçen ve deride kalan etkin madde miktarını deride reaksiyon oluşturmayacak ama tedavi edecek miktarda tutabileceği belirtildi. Bu nedenle bijel formülasyonunun tedavide güvenli olarak kullanılabileceği bildirildi [140].

Yapılan başka bir çalışmada Koenzim Q10 (CoQ10) ile hidrojel, organojel ve bijel formülasyonları hazırlandı. Daha sonra CoQ10’un, domuz kulak derisi kullanılarak ex-vivo penetrasyon çalışması gerçekleştirildi. SC’un kalınlığının insan derisine benzer olması sebebiyle ex-vivo penetrasyon çalışmalarında membran olarak domuz kulak derisinin seçildiği belirtildi. CoQ10 + balmumu + balık yağı (70 °C, 300 rpm, 15 dk.) organojeli, CoQ10 + Karbopol (25 °C, 500 rpm, 2 saat) hidrojel ve bijel (H:O-50:50) hazırlandı. Franz difüzyon hücresi kullanıldı; çalışma 37 °C, 300 rpm’ de 24 saat gerçekleştirildi. Çalışma başladıktan 24 saat sonra, Franz difüzyon hücresindeki deri alınmış; deri

yüzeyinde kalan formülasyon bir spatula ile temizlendi. Sonuç olarak, bijel formülasyonu ile ($0,514 \pm 0,072 \text{ mg/cm}^2$), organojel ($0,351 \pm 0,034 \text{ mg/cm}^2$) ve hidrojel formülasyonlarına ($0,350 \pm 0,04 \text{ mg/cm}^2$) göre daha yüksek akı elde edildiği bildirildi. Hidrojel ve organojelde akı karşılaştırıldığında değerlerin neredeyse aynı olduğu görüldü. Bijel ile saptanan yüksek akının, her iki jelin birlikte sinerjik etkisinden kaynaklandığı belirtildi. Ayrıca balık yağında bulunan EPA veya DHA yağ asitlerinin muhtemelen SC'daki sıkı lipitleri gevşetip derinin bariyer gücünü azalttığı sonucuna varıldı. Deride kalan etkin madde miktarı, en yüksek bijel formülasyonunda sonra sırasıyla organojel ve hidrojel formülasyonlarında bulundu [114].

Yapılan bir çalışmada terbinafin içeren bijel formülasyonları hazırlandı. HPMC + su, hindistan cevizi yağı + Span 80 + Span 20'den oluşan bijel formülasyonu hazırlandı. Keçi vajina membranından Franz difüzyon hücresi kullanılarak 37°C 'de 6 saat, penetrasyon çalışması gerçekleştirildi. Bijel ile membrandan geçişin 6 saat boyunca devam ettiği görüldü. Bijel formülasyonunda bulunan organojelin etkin madde salımını yavaşlattığı ve kontrollü bir salım sağladığı sonucuna varıldı. Salım kinetiği için Higuchi eşitliği kullanıldı ve difüzyon kontrollü geçişin gerçekleştiği bildirildi. Bijel formülasyonlarının kullanılmasıyla etkin maddenin daha uzun süre salınması ve bu sayede etkili bir tedavinin sağlanacağı düşünüldü [125].

Çizelge 2.8. Bijel formülasyonlarında yapılan ex-vivo penetrasyon çalışmasına ait veriler

Etkin madde	Kullanılan teknik	Kullanılan deri	Alıcı odacık	Sıcaklık	Karıştırma hızı	Deney süresi	Referans
Diklofenak dietilamin	Franz difüzyon hücresi	İnsan	pH 7,4 fosfat tamponu:metanol (70:30)	32 °C	Verilmemiştir.	24 saat	[121]
Diltiazem HCl	Franz difüzyon hücresi	Tavşan	pH 5,5 fosfat tamponu	32 °C	50 rpm	6 saat	[141]
İzotretinoin	Franz difüzyon hücresi	Keçi	pH 7,2 fosfat tamponu	37 °C	300 rpm	24 saat	[117]
İmikimod	Franz difüzyon hücresi	Fare	PBS	37 °C	300 rpm	48 saat	[132]
KoenzimQ10	Franz difüzyon hücresi	Domuz	Setrimid+BHA	37 °C	300 rpm	24 saat	[114]
Terbinafin	Franz difüzyon hücresi	Keçi vajina dokusu	Simüle edilmiş vajina sıvısı	37 °C	100 rpm	4 saat	[125]
Terbinafin	Franz difüzyon hücresi	Keçi vajina dokusu	Simüle edilmiş vajina sıvısı	37 °C	100 rpm	4 saat	[142]

2.7.9. İn vitro etkin madde salım çalışmaları

Bijel formülasyonlarından in-vitro etkin madde salım çalışmalarında Franz difüzyon hücresi ve genellikle selüloz membran kullanıldığı saptandı. Bu çalışmalar hazırlanan formülasyonların kalitesini değerlendirmek ve in-vivo çalışmaları taklit etmek için sıklıkla yapılmaktadır. Bijeller ile yapılan çalışmalardan bazıları Çizelge 2.9’da verildi.

Bir çalışmada in-vitro salım çalışması, Franz difüzyon hücresi ve selüloz membran kullanılarak, 6 saat 32 °C’de yapıldı. Çalışmada sıvı parafin + polietilen organojel ve Poloksamer 407 hidrojelinden oluşan bijel, etkin madde olarak da siklopiroks olamin (CPO) ve terbinafin HCl (TFH) kullanıldı. TFH, suda çok az çözünen hidrofobik bir maddedir. Ancak Poloksamer 407, TFH’nin çözünürlüğünü artırdığı için formülasyonlardan TFH salım miktarı, hidrojelde yüksek olarak bulundu. Bijeldeki organojel oranı arttığında viskozite ve her iki maddenin salım yapan miktarı azaldı. Organojelin bijellerden etkin madde salımını yavaşlattığı ve etkin maddenin etkisini uzatmak için bijellerin kullanılabileceği bildirildi [134].

Yapılan başka bir çalışmada guar zımkı hidrojel ve susam yağı + sorbitan monostearat organojeli, siprofloksasin ile bijeller hazırlandı. Siprofloksasinin in-vitro salımı, Franz difüzyon hücresi kullanılarak, fosfat tamponunda (pH 7,2) gerçekleştirildi. Siprofloksasin yüklü bijellerden etkin maddenin kontrollü olarak salım yaptığı ve salımın da formülasyonların bileşimine bağlı olduğu bildirildi. Siprofloksasinin bijellerden salım yapması için önce etkin maddenin organojelden hidrojele geçmesi gerekmektedir. Organojeldeki siprofloksasinin lipofilik yapısından dolayı, salımının yavaş olacağı belirtildi. Organojel oranının artmasıyla formülasyon siprofloksasin için depo görevi görmüş ve kontrollü bir etkin madde salımı gözlemlendi. Sulu faz (hidrojel) yağ damlacıklarını çevreleyen hidrofilik zar gibi görev gördü ve yağ damlacıklarından siprofloksasinin salımı zorlaştı. Salım bu nedenle sıfır derece salım kinetiğine uydu [127].

Başka bir çalışmada stearik asit + pirinç kepeği yağı organojeli ve demirhindi sakızı hidrojel ve moksifloksasin HCl ile bijeller hazırlandı. Hazırlanan hidrojel, organojel ve bijellerde 37 °C’de diyaliz torba kullanılarak in-vitro salım çalışması yapıldı. İn-vitro salım çalışmasının sonuçları, formülasyondaki hidrojel ve organojel oranına bağlı olarak etkin madde salımının değiştiğini gösterdi. Etkin madde salımı organojelden en az düzeyde gerçekleşti. Bijel içindeki hidrojel oranının artmasıyla birlikte formülasyondan etkin

maddenin salım hızında bir artış olduğu saptandı. Moksifloksasin HCl'nin suda çözünür bir etkin madde olması nedeniyle hidrojelden salım yüksek bulundu [130].

Yapılan bir çalışmada Karbopol + dietilen glikol monoetil eter (Trancutol P) hidrojel ve kaprilik/kaprik asit trigliserit (Tegosoft CT) + Compritol + ibuprofen organojeli ile bijel hazırlandı. 32 °C'de Franz difüzyon hücresinden selüloz membran kullanılarak 6 saat in-vitro salım yapıldı. İbuprofenin hazırlanan jel sistemlerden salım yapmasının jelin ağ yapısından ve viskoelastik özelliklerinden dolayı kontrollü bir şekilde gerçekleştiği bildirildi. Salım çalışması 6 saat sürdü. Salım hızının, hazırlanan jel formülasyonlarının bileşimine bağlı olduğu bulundu. İbuprofenin bijelden salım yapması için, öncelikle içinde çözündüğü iç faz olan organojelden sulu hidrojele geçmesiyle olmaktadır. Bundan sonra ise molekülün konsantrasyon gradientine bağlı olarak difüzyonu gerçekleşmektedir. Organojelden salımda etkin madde, yağlı fazda sıkışıp kalmaktadır [143].

Farklı bir çalışmada Karbopol 940 + propilen glikol + etanol + doksisisiklin hiklat (etkin madde) + su hidrojel ve Span 60 + zeytinyağı + retinoik asit (antioksidan) organojeli ile bijel formülasyonları hazırlandı. İn-vitro salım çalışması, 37 °C'de selüloz membrandan 7 saat yapıldı. Bijelden etkin madde salımının organojel oranına bağlı olduğu saptandı. Organojel oranı arttıkça, bijelden etkin madde salımı azaldı. Formülasyon etkin madde için depo görevi görmekte ve difüzyon kontrollü etkin madde salımı olmaktadır [128].

Yapılan bir çalışmada Poloksamer 407 + su + siklopiroks olamin hidrojel, silikon dioksit + sıvı parafin organojeli ile bijel elde edildi. Bu sistem daha sonra polisorbitat 80 içerecek şekilde de hazırlandı. Hazırlanan bijellerde Franz difüzyon hücresi ile selüloz membran kullanıldığı 6 saat in-vitro salım çalışması yapıldı. Formülasyondaki polisorbitat 80, etkin maddenin çözünmesini kolaylaştırmak için denendi. Polisorbitat 80'in kullanıldığı bijellerde siklopiroks olamin, lipofilik bir madde olduğundan misel içinde kalmış ve bu nedenle de formülasyondan salımı daha düşük bulundu. Bu salım profilinin etkin maddenin enfekte bölgede uzun süre kalmasının gerektiği antifungal formülasyonlar için uygun olacağı belirtildi [144].

Çizelge 2.9. Bijel formülasyonlarında yapılan in-vitro salım çalışmasına ait veriler

Etkin madde	Kullanılan teknik	Kullanılan zar	Alıcı odacık	Sıcaklık	Karıştırma hızı	Deney süresi	Referans
Metronidazol	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	12 saat	[129]
Metronidazol	Diyaliz torbası	-	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	12 saat	[136]
Maravirok + Tenofovir	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	%1 Kolliphor EL	37 °C	100 rpm	20 saat	[126]
Diklofenak dietilamin	Franz difüzyon hücresi	Strat-M	pH 7,4 fosfat tamponu:metanol (70:30)	32 °C	Verilmemiştir.	24 saat	[121]
İbuprofen	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	0,1 M NaOH	32 °C	500 rpm	6 saat	[143]
Diltiazem HCl	Franz difüzyon hücresi	Selüloz (Selofan)	pH 5,5 fosfat tamponu	32 °C	50 rpm	6 saat	[141]
Moksifloksasin HCl	Diyaliz torbası	-	Su	37 °C	100 rpm	5 saat	[130]
İzotretinoin	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,2 fosfat tamponu	32 °C	100 rpm	24 saat	[117]
Siklopiroks olamin + Terbinafin HCl	Franz difüzyon hücresi	Selüloz (Kuprofan)	pH 7,4 fosfat tamponu	32 °C	Verilmemiştir.	6 saat	[134]
Kuersetin	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	50 rpm	60 saat	[145]
Parasetamol	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 5,8 fosfat tamponu	32 °C	100 rpm	7 saat	[115]
Flurbiprofen	Franz difüzyon hücresi	Selüloz (selofan)	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	50 rpm	8saat	[146]

Çizelge 2.9. (devam) Bijel formülasyonlarında yapılan in-vitro salım çalışmasına ait veriler

Siprofloksasin		Diyaliz torbası	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	24 saat	[147]
İmikimod	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	Setrimid çözeltisi	37 °C	300 rpm	48 saat	[113]
Siprofloksasin	USP Aparatus 1	Verilmemiştir.	pH 1,2 (2 saat) pH 7,2 (6 saat)	37 °C	100 rpm	8 saat	[139]
Siprofloksasin	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,2 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	6 saat	[127]
Metronidazol	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,2 fosfat tamponu	32 °C	Verilmemiştir.	10 saat	[131]
Ketokonazol	USP Aparatus 2	Diyaliz torbası	pH 5,5 fosfat tamponu	32 °C	75 rpm	6 saat	[66]
Metronidazol	USP Aparatus 2	Diyaliz torbası	pH 6,8 fosfat tamponu	37 °C	75 rpm	5 saat	[148]
Metronidazol	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 7,2 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	12 saat	[137]
İyot	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	Simüle edilmiş vücut sıvısı	37 °C	100 rpm	2 saat	[149]
Doksisiklin hiklat	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 5,5 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	7 saat	[128]
Na Diklofenak	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 5,4 fosfat tamponu	32 °C	750 rpm	6 saat	[150]
Mometason furoat	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	pH 5,5 fosfat tamponu	32 °C	50 rpm	8 saat	[151]
Moksifloksasin HCl	USP Aparatus 1	Verilmemiştir.	pH 6,8 fosfat tamponu	37 °C	100 rpm	3 saat	[152]
Ketoprofen	Franz difüzyon hücresi	Selüloz (selofan)	pH 7,4 fosfat tamponu	37 °C	50 rpm	8saat	[153]

Çizelge 2.9. (devam) Bijel formülasyonlarında yapılan in-vitro salım çalışmasına ait veriler

Siprofloksasin	Franz difüzyon hücresi	Selüloz (selofan)	%5 asetik asit çözeltisi	32 °C	500 rpm	6 saat	[154]
Siplopiroks olamin	Franz difüzyon hücresi	Selüloz	Su	Verilmemiştir.	Verilmemiştir.	6 saat	[144]

2.7.10. İn-vitro antifungal aktivite (mikrobiyolojik) çalışmaları

Tez çalışmamızda tırnak mantarı hastalığının tedavisi amaçlandığı için geliştirilen formülasyonlarda mikrobiyolojik çalışmalara da yer verildi. Antifungal etkin madde içeren bijellerde yapılan mikrobiyolojik çalışmalara bazı örnekler aşağıda verildi.

Yapılan bir çalışmada sıvı parafin + polietilen organojeli ve Poloksamer 407 hidrojelinden oluşan bijeller, etkin madde olarak siklopiroks olamin ya da terbinafin HCl (TFH) içerecek şekilde hazırlandı. Çalışmada agar difüzyon tekniği kullanıldı; *Microsporum canis*'e karşı in-vitro antifungal aktivite inhibisyon bölgesi çapı ölçülerek değerlendirildi. Çalışma bijel formülasyondan salım yapan etkin madde miktarının antifungal aktivite için yeterli olup olmadığının anlaşılması için yapıldı. Etkin madde içermeyen bijellerin *M. canis*'e karşı hiçbir antifungal etkisinin olmadığı, etkin madde içeren diğer tüm bijellerin, mantara karşı büyük ölçüde antifungal etki gösterdiği bildirildi. TFH içeren bijellerdeki inhibisyon çapının, siklopiroks olamin içeren bijellere göre daha büyük olduğu görüldü [134].

Yapılan başka bir çalışmada guar zamlı hidrojel ile susam yağı + sorbitan monostearat organojeli ve siprofloksasin ile bijel hazırlandı. Siprofloksasin yüklü bijellerin *Bacillus subtilis*'e karşı in-vitro antimikrobiyal etkinliği katı besiyeri kullanılarak değerlendirildi. İnkübasyon sonrası inhibisyon bölgeleri ölçüldü. Etkin madde organojelde bulunduğu için organojel oranı yüksek olan bijel ile daha düşük etkin madde salımı gerçekleşti. Hidrojel oranı yüksek olan bijelde daha büyük bir salım saptandı. Sonuç olarak etkin maddenin hazırlanan bijel formülasyonları ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirildi [127].

Yapılan diğer bir çalışmada terbinafin içeren bijel formülasyonları hazırlandı. HPMC + su, zeytin yağı + Span 80 + Span 20 karışımından oluşan bijel formülasyonları hazırlandı. Agar disk difüzyon tekniği ile etkin maddenin antibakteriyel aktivitesi değerlendirildi. Hazırlanan bijellerin *C. albicans*'ı etkili şekilde inhibe ettiği görüldü. Yapılan bu çalışma ile topikal bakteriyel vajinozis tedavisinde bijel formülasyonların etkili bir şekilde kullanılabileceği anlaşıldı [125].

Yapılan bir çalışmada Poloksamer 407 + su + siklopiroks olamin hidrojel ve silikon dioksit + sıvı parafin organojeli kullanılarak bijel hazırlandı. Daha sonra bu sistem polisorbata 80 içerecek şekilde de hazırlandı. Bijelin dermatofit *Microsporum canis*'e karşı antifungal aktivitesi, agar jel difüzyon yöntemiyle değerlendirildi. Test edilen tüm

formülasyonların antifungal etkinlik sağladığı bulundu. Farmasötik madde içermeyen formülasyonların hiçbirini inhibisyon göstermedi [144].

Benzer şekilde bir çalışmada Karbopol hidrojel, Jojoba yağı + çay ağacı yağı + Span 60 organojeli ve izotretinoin içeren bijeller hazırlandı. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite çalışması gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda bijelin, ticari ürüne göre daha geniş bir inhibisyon alanı oluşturduğu bulundu [155].

2.7.11. İn-vitro biyoyumluluk (Sitotoksite) çalışmaları

İn-vitro biyoyumluluk çalışmaları, geliştirilen formülasyonların canlı hücreler üzerinde güvenle kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için yapılan çalışmalardır [147].

Stearik asit + susam yağı organojeli ve Stearik asit + soya fasülyesi yağı organojeli, jelatin + Tween 80 hidrojelinin kullanıldığı bir çalışmada etkin maddede olarak siprofloksasin kullanıldı. Bijel eldesi için çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanıldı. Çalışmada hücre serisi olarak, insan epidermal keratinosit hücreleri (HaCaT) ve kontrol grubu olarak fosfat tamponu kullanıldı ve HaCaT hücrelerinde hücre canlılığı kontrol edildi. Çalışma sonunda kontrol grubu ile formülasyonlar neredeyse aynı hücre canlılığı ve çoğalması gösterdi. Bu da geliştirilen formülasyonların biyoyumlu olduğunu ve güvenle kullanılabileceğini gösterdi [147].

Yapılan başka bir çalışmada guar zımkı hidrojel (70 °C, 1000 rpm), susam yağı + sorbitan monostearat organojeli (70 °C, 500 rpm), siprofloksasin içeren bijel (70 °C, 1000 rpm) hazırlandı. Hazırlanan bijellerin in-vitro biyoyumluluk çalışması, HaCaT hücreleri kullanılarak MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi ile saptandı. Hücrelerin çoğalması, formülasyonların toksik olmadığını gösterdi. Hücrelerin mikroskop görüntüleri de bijel süzüntülerinin inkübasyonun ardından hücrelerin morfolojisinde bir değişiklik oluşturmadığını gösterdi [127].

2.7.12. İn-vivo çalışmalar

Bijel formülasyonları ile yapılan in-vivo çalışmalarda ya sistemik ya da lokal etkinin incelendiği görülmüştür.

Bir çalışmada Span 60 + soya yağı organojeli, HPMC hidrojel ve diltiazem HCl'yi (DH) içeren bijelin dermal uygulandıktan sonra sistemik antihipertansif etkinliği incelendi. Çalışma sıçanlarda yapıldı. İn-vivo çalışma süresince DH içeren jeller hipertansif sıçanlarda, ortalama arteriyel kan basıncında anlamlı düşüş gösterdi. Sonuçlara bakıldığında, antihipertansif etkinin hidrojel>bijel >Span 60 organojel şeklinde sıralandığı gösterildi. Bu durum, formülasyondan DH salımını kolaylaştıran hidrojellerin hidrofilik yapısına bağlandı. Organojellerden salımın ve dolayısıyla da antihipertansif etkinin düşük olması, DH salımını engelleyen lipofilik yapıya bağlandı. Yapılan çalışma ile etkin maddelerin oral kullanımdaki yan etkilerinin önüne geçilmesi ve doz sıklığının azaltılmasının gerektiği durumlarda bijel formülasyonların güvenli olarak kullanılabileceği belirtildi [141].

Diğer bir çalışmada Karbopol 940 + propilen glikol + etanol + doksisisiklin hiklat + su ile hidrojel formülasyonu hazırlandı. Span 60 + zeytinyağı + retinoik asit ile organojel formülasyonu da hazırlandı. Daha sonra bu jeller kullanılarak bijeller formüle edildi. Hazırlanan bijel formülasyonlarının ve ticari merhem formülasyonunun antibakteriyel aktivitesi karşılaştırmak için tavşanların kulağında *Propionibacterium acnes* (P. acnes) kültürü ile akne oluşturuldu. Bir gruba ticari merhem, diğer gruba ise bijel formülasyonu uygulandı. Tedaviye günde 2 kez, 20 gün boyunca devam edildi; bijel formülasyonunun, ticari merheme göre akne alanının daha fazla küçülmesini sağladığı için daha etkili olduğu bildirildi [128].

Yapılan bir diğer çalışmada hazırlanan bijeller ile imikimodun kontrollü salımının sağlanması sonucu dermal yan etkilerinin azaltılması amaçlandı. Karbopol 940 + su hidrojel, balık yağı + imikimod + balmumu organojeli ile bijeller hazırlandı. Yapılan ex-vivo çalışmalarda deride daha fazla etkin madde birikmesini sağlayan bijel seçilmiş ve bu formülasyon ile in-vivo deri kanseri çalışması yapıldı. Çalışmada fareler kullanıldı. Farelerde deneysel deri tümörü oluşturulmuştur. Tüm gruplar 8 hafta boyunca gözlemlendi. Ticari imikimod kremi ve imikimod içeren balık yağı bijeli ile tedavi edilen farelerde, tümörlerin tamamen yok olduğu görülmese de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör boyutlarının önemli ölçüde küçüldüğü gözlemlendi. Tümörler

mikroskop ile daha yakından incelendiğinde, tümörden kaynaklanan cilt lezyonlarında iyileşmenin cilt onarımına doğru ilerlediği ve etkin madde içermeyen bijel formülasyonunda, tümörde küçülme görülmediği bildirildi [132].

Yapılan başka bir çalışmada Karbopol 940 hidrojel ve sorbitan monostearat + badem yağı organojeli ile imikimod içeren bijel hazırlandı. Fareler dermal uygulama sonrası lokal ve sistemik toksisite semptomları açısından gözlemlendi. Deri toksisitesi değerlendirildi, sonuçlar fotoğraflandı ve deri irritasyon puanları Draize skorlama sistemi kullanılarak kaydedildi. Uygulamadan sonraki ilk 48 saat boyunca hiçbir deri toksisitesi (kızarıklık, ödem), tahriş veya iltihaplanma belirtisi gözlemlenmedi. Bu sonuçlar, test edilen bijel formülasyonunun dermal kullanım için güvenli olarak kullanılabileceğini gösterdi [123].

2.8. Siklopiroks

2.8.1. Siklopiroksun yapısı ve özellikleri

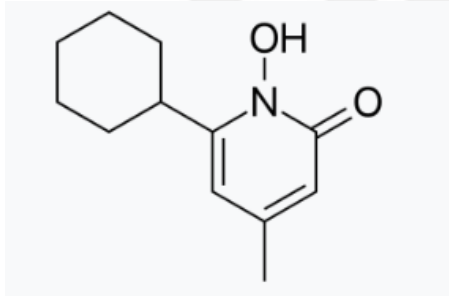
Siklopiroks, tırnak mantarı enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu sentetik bir hidrokspiridon grubu antifungal ajandır [156].

Etki mekanizmasını mantarların büyümesi için gerekli enzimlerin inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir [7]. Dermatofitlere, dermatofit olmayan küflere, ve bakterilere karşı hem fungisit hem fungistatik etki göstermektedir [157]. Türkiye ve Dünya ilaç pazarında bulunan bazı örnekler Çizelge 2.10'da verildi.

Siklopiroks, 6-sikloheksil-1-hidroksi-4-metilpiridin-2(1H)-on olarak isimlendirilir. Kapalı formülü $C_{12}H_{17}NO_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 207,269 g/mol'dür. Kimyasal formülü Şekil 2.5'te gösterildi. CAS numarası 29342-05-0, pKa'sı 6,84, LogP'si 2,2.

Siklopiroksun 25 °C'de sudaki çözünürlüğü farklı çalışmalarda 0,22 mg/mL [158], 0,283 mg/mL [159] ve 0,27 mg/mL [156] olarak bildirildi.

Siklopiroksun kullanıldığı çalışmalarda kullanılan/geliştirilen formülasyonlara ait bazı özellikler Çizelge 2.11’de verildi. Bu çizelgede gösterilen ilaç şekillerinin dışında adhesif özellikli yama sisteminin de denendiği bir çalışmada saptandı. Bu çalışmada, farklı adhesif matrislerden, siklopiroksun (%10) domuz toynak membranına penetrasyonu incelendi. Alıcı odacıkta çözelti yerine Poloksamer jeli kullanıldı. Siklopiroks içeren 1 cm²’lik adhesif matris, domuz toynağının dorsal tarafına yapıştırıldı. Domuz toynağının ventral tarafı da plastik penetrasyon odasının verici odacık tarafına gelecek şekilde yerleştirildi. Sıcaklık 32 °C’de sabit tutuldu. Numune alma zamanında toynağa temas eden Poloksamer jeli toplandı. Daha sonra aynı yere yeni poloksamer jeli yerleştirildi. Toplanan Poloksamer jellerinde etkin madde analizi yapıldı. Siklopiroksun toynaktan geçişinin, hidroksil grup içeren akrilik yamada en yüksek olduğu bulundu [156].



Şekil 2.5. Siklopiroksun kimyasal yapısı

Çizelge 2.10. Siklopiroksun tırnak mantarı için kullanılan dermal ticari ürünlerine bazı örnekler

Türkiye İlaç Pazarında**	Dünya İlaç Pazarında***
-Miclast tırnak cilası* (Pierre Fabre) (Metilvinil eter ve maleik asit monobütilesterin kopolimeri, etil asetat, izopropanol) -Nibulen tırnak cilası seti* (Sanofi) (Metilvinil eter ve maleik asit monobutil ester kopolimeri, etil asetat, 2-propanol) -Opilox tırnak cilası seti* (Farma-Tek) (Metilvinil eter ve maleik asit monobutil ester kopolimeri, etil asetat ve izopropil alkol) -Siroksil tırnak cilası seti* (Abdi-İbrahim) (Metilvinil eter ve maleik asit monobutil ester kopolimeri), etil asetat, izopropil alkol) -Tineax tırnak cilası seti* (Solebio İlaç) (Metilvinil eter ve maleik asit monobutil ester kopolimeri, etil asetat ve izopropil alkol)	-Ciclopirox Treatment Kit (Acella Pharm.) Siklopiroks tırnak cilası (%8) + Penetrasyon artırıcı karışım (Ure, NaOH, PG, HEC, disodyum EDTA kafur, mentol, ökaliptol) -Ciclodan Kit Topical Solution (Medimetriks Pharmaceuticals, Inc.) Siklopiroks tırnak cilası (%8) + Penetrasyon artırıcı karışım (Ure, NaOH, PG, HEC, disodyum EDTA kafur, mentol, ökaliptol) -Siklopiroks tırnak cilası %8, Kit (Brookstone Pharm.) Siklopiroks tırnak cilası (%8) +Tırnak törpüsü+ %5 topikal tokoferol kapsül -PediPirox-4 Nail Kit (Pedinol Pharmacal, Inc.) Siklopiroks tırnak cilası (%8)+ Tırnak Törpüsü -Ciclodan Topical Solution (Medimetriks Pharmaceuticals, Inc.) Siklopiroks tırnak cilası (%8) - CNL8 Nail Kit (Innocutis Holdings LLC) Siklopiroks tırnak cilası (%8) +Tırnak törpüsü -Penlac Nail Lacquer (Aventis Pharmaceuticals Inc.-Dermik Laboratories) Siklopiroks tırnak cilası (%8) -Ciclopirox-Urea Kit/Pedipak Kit Siklopiroks tırnak cilası (%8) + Ure merhemi (% 20)

*80mg

**RX Media Pharma

***WEBMD,Drugs

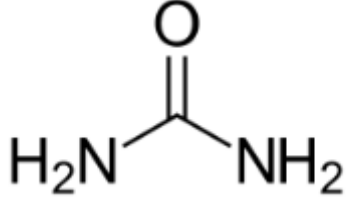
Çizelge 2.11. Siklopiroksun kullanıldığı bazı çalışmalarda geliştirilen/kullanılan formülasyonlar

Etkin madde	İlaç taşıyıcı sistem	Formülasyondaki maddeler	Referanslar
Siklopiroks olamin	Jel	Poloksamer 407, Propilen glikol, İsopropil alkol, MCT-oil	[160]
Siklopiroks olamin	Jel	Poloksamer 407, Propilen glikol, İsopropil alkol, MCT-oil	[161]
Siklopiroks olamin	Jel	Poloksamer 407, Propilen glikol, İsopropil alkol, MCT-oil	[162]
Siklopiroks olamin	Jel	HPMC, Kitosan, Poloksamer 407	[163]
Siklopiroks olamin	Bijel	Poloksamer 407, Sıvı parafin, Polietilen	[134]
Siklopiroks olamin	Siklopiroks çözeltisi (pH 7,4 fosfat tamponu + %0,5 SLS*)	Papain, Resorsinol, Sodyum sülfat Sodyum tiyosülfat, Oksalik asit Salisilik asit, Tiyoglikolik asit Gliserin, PEG-400, Propilen glikol Üre, Glisin, Tiyoüre, N-asetil-l-sistein, Tween-20, Poloksamer-188 Poloksamer 407, Brij-58, Brij-78, Hidrojen peroksit, Metanol, Sodyum lauril sülfat, Sodyum hidroksit	[164]
Siklopiroks olamin	Siklopiroks çözeltisi	Su	[165]
Siklopiroks olamin	Hidroalkolik cila	Siklodekstrin, Poloksamer 407, N-asetil sistein, metil-β-siklodekstrin, hidroksipropil-β-siklodekstrin, etanol, su	[166]
Siklopiroks olamin	Cila	Metillenmiş β-siklodekstrin, Poloksamer 407, N-asetil sistein	[29]
Siklopiroks olamin	Cila	Eudragit, Triasetin, Kolliphor CS 20, Tween 80, Etanol:su karışımı	[167]
Siklopiroks	Cila	Hidroksipropil β siklodekstrin, Pluronic F127, Etanol:su karışımı SLS*	[158]
Siklopiroks	Cila	Hidroksipropil kitosan, Setostearil alkol, Etil alkol, Etil asetat, Su	[30]
Siklopiroks olamin	Cila	Metillenmiş β-siklodekstrin, Poloksamer 407, N-asetil sistein	[168]
Siklopiroks	Cila	Hidroksipropil kitosan	[169]
Siklopiroks	Jel (Proniosom)	Karbopol 934, kolesterol, lesitin, etanol, pH 7,4 fosfat tamponu, Span 20-40-60-80	[170]

*Sodyum lauril sülfat

2.9. Üre

Ürenin formülü $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 'dir. Karbamid olarak da bilinmektedir. Molekül ağırlığı 60,06 g/mol'dür. Kimyasal yapısı Şekil 2.6' da gösterildi. CAS numarası 57-13-6, pKb'sı 0,18 ve ürenin çözünürlüğü 1,36 g/mL olarak verildi [203, 204].



Şekil 2.6. Ürenin kimyasal yapısı

Türkiye ve Dünya ilaç pazarında üre içeren çok sayıda ticari ürün vardır. Bunlardan bazıları Çizelge 2.12'de verildi.

Çizelge 2.12. Üre'nin dermal ticari ürünlerine bazı örnekler

Türkiye İlaç Pazarında*	Dünya İlaç Pazarında**
- Excipial Hydro Emülsiyon (Eczacıbaşı İlaç) -Repial %40 Deriye Uygulanacak Emülsiyon Ürepial Hydro %10 Deriye Uygulanacak Emülsiyon Ürepial Lipo %10 Deriye Uygulanacak Emülsiyon (Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.) - Excipial Lipo %4 Emülsiyon (Eip Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş.) -Elspar Lipo %4 Deriye Uygulanacak Emülsiyon Elspar %10 Krem Elspar Hydro %2 Deriye Uygulanacak Emülsiyon Elspar Hydro %10 Deriye Uygulanacak Emülsiyon Elspar Lipo %10 Deriye Uygulanacak Emülsiyon (Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş.) -Ürederm %40 Emülsiyojel, 200 G Ürederm Hydro %5 Krem Ürederm %10 Merhem Ürederm Hydro %10 Emülsiyon Ürederm Lipo %10 Emülsiyon Ürederm %20 Krem (Orva İlaç San. ve Tic. A.Ş.)	Urea Nail Gel %45 (Akron Pharma - %45 Üre, kafur, disodyum EDTA, okaliptüs yağı, hidroksietil selüloz, mentol, propilen glikol ve saf su) Urea Cream % 40 (Laser Pharmaceuticals, LLC - %40 üre, Stearat-25, Stearat-6, setil alkol, stearil alkol, metil paraben, propil paraben, propilen glikol, ksantan zamkı ve saf su) MeTopic Cream % 41 (Method Pharm.- % 41 üre, Stearat-25, Stearat-6, setil alkol, stearil alkol, mineral yağ, propilen glikol, NaOH, ksantan zamkı ve saf su) Urea Cream % 20 (AVKare- %20 üre, setil alkol, karbomer, gliserin, gliseril stearat, mineral yağ, stearil alkol, beyaz vazelin, triasetin, saf su) Hydro 35 (Exeltis - %35 üre, dimetikon, etil paraben, gliserin, laktik sit, metil paraben, polisorbata 20, povidon, propilen glikol, propil paraben, stearik asit, fenoksietanol, saf su) Ureacin-20 (Pedinol- %20 üre, stearik asit, PEG-2, stearat SE, mineral yağ, gliserin, sodyum borat, DMDM hidantoin, trietanolamin, NaOH, propil paraben, laktik asit, trisodyum EDTA, diazolidinil üre, saf su) Umecta % 40 Nail Film Pen-Süspansiyon (Innocutis H.) Urea Nail Stick %50 (Exact-P- %50 üre, akrilat kopolimeri, karbomer, setil alkol, disodyum EDTA, dl-alfatokoferi asetat, gliserin, laktik asit, linoleik asit, mineral yağ, PEG-6, polisorbata 60, sodyum hidroksit çözeltisi, stearik asit, titanyum dioksit, çinko undesilenat, saf su) Urea Lotion % 40 (Trimity Pharm.- %40 üre, propilen glikol, karbomer, vazelin, gliserol, gliseril stearat, mineral yağ, setil alkol, ksantan zamkı, NaOH, saf su) Umecta mousse (Innocutis-% 40 üre, karbomer, stearik asit, shea yağı ekstresi, butan, soya fasülyesi yağı, isobutan, laureth 4, ayçiçek yağı, polisorbata-20, propan, trietanolamin, saf su)

*RX Media Pharma

**WEBMD,Drugs

Dermal yoldan etkinliği ve güvenliğinden dolayı üre çok uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ürenin derideki etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Üre birçok ticari preparatta etkin madde olarak bulunmaktadır. Derinin nem dengesinin sağlanmasında gerekli bir maddedir. Derinin su bağlama kapasitesini artırdığı, keratolitik etki oluşturduğu, antibakteriyel ve proteolitik aktivite gösterdiği bildirildi [171]. SC'daki hidrojen bağlarının kırılmasına ve epidermal keratinin gevsemesine neden olduğu belirtildi. Doymuş re çözeltisinin uygulanmasından 1 hafta sonra SC tabakasının mekanik özelliklerinde belirgin değişiklikler oluştuğu bildirildi [172].

Düşük moleküler ağırlığına sahip olan ürenin kozmetik ve dermatolojik preparatlarda stabil halde kalması için düşük pH gereklidir. Bu, re içerikli kremlerin bilinen bir dezavantajdır ve deride yanma hissine neden olabilir. Özellikle egzamalı deri için bu bir sorun oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada düşük pH'lı üre kremi uygulamasından yarım saat sonra, el derisinin pH değerinin 6,5'ten 4,8'e düştüğü bildirildi. Ürenin (%10) topikal formülasyonlarda deriyi nemlendirip, yumuşattığı bilinmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (>%10) ise keratolitik etki göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda üre içeren formülasyonlarının deri kuruluğu ve diğer hiperkeratotik durumları gidermek için kullanılabileceği bildirilmektedir [173]. Yapılan alışmalar, ürenin, protein yapısının denatürasyonunu ve böylece keratinin yapısında konformasyonel değişiklikleri indükleyebileceğini gösterdi [174]. Wahlberg ve Swanbeck, yaptıkları in-vivo çalışmada %20 üre kreminin insan derisinden penetrasyonunu incelemişler ve 24. saatin sonunda ürenin yaklaşık %1'inin emildiğini bulmuşlardır [175].

Yapılan başka bir in-vivo çalışmada ürenin domuz derisinden penetrasyonu araştırıldı. Ürenin deriye çok hızlı penetre olduğu; kısa bir süre sonra serumda tespit edilebildiği ancak serumdaki toplam üre miktarının çok az olduğu bildirildi. Bu veriler, SC'un ürenin sistemik dolaşıma erişmesini engelleyecek kadar etkili bir bariyer olduğunu doğrulamaktadır [141b].

Üre uzun süredir tırnak mantarı tedavisi için kullanılmaktadır. %30'un üzerindeki konsantrasyonlarda, tırnak plağını yumuşatan ve böylece etkin madde penetrasyonunu artıran ayrıca hastalıklı tırnakların tırnak yatağından ayrılmasını kolaylaştıran/destekleyen keratolitik bir ajandır [176].

Bir çalışmada üre, hidrojen peroksit ve tiyoglikolik asit kombinasyonunun tırnaklara ön işlem olarak uygulanmasıyla, terbinafinin tırnakta difüzyonunun on kat arttığı bildirildi.

Ayrıca, bu ön işlemin siklopiroks ve amorolfinin fungusidal aktivitesini de artırdığı gösterildi [177].

Ürenin, beraber kullanıldığı bifonazol veya flukonazol tedavisinde monotedaviye göre klinik açıdan daha üstün etki oluşturduğu gösterildi [42, 47]. Baran ve Tosti, tırnak mantarı görülen hastalara günde iki kez %40 üre uygulamasının tırnağın dokudan kimyasal olarak ayrılmasına neden olduğunu; anestezi ihtiyacı veya kanama olmadan mantarla enfekte olmuş tırnağın uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığını gösterdi [27]. Benzer şekilde topikal üre kremi ile tırnağın kimyasal olarak uzaklaştırılabildiği ve topikal etkin maddelerin penetrasyonunu artırdığı için antifungal tedavide etkinliğin artışına neden olduğu bildirildi [178].





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

-Siklopiroks.....	Farmatek, Türkiye
-Üre	Merck, ABD
-Silikon dioksit (Aerosil 200).....	Evonik,Almanya
-Salisilik asit.....	Sigma, ABD
-Gliseril monostearat (GMS).....	BASF, Almanya
- Propilen glikol.....	Aklarkimya, Türkiye
- Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80).....	Merck, ABD
-Sorbitan monooleat (Span 80).....	Merck, ABD
-Orta zincirli trigliserit (Miglyol 812).....	IOI Oleochemicals,Almanya
-Karbomer/karboksipolimetilen (Carbopol 974P).....	Lubrizol, ABD
-Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, ABD
-Sodyum hidroksit pellet.....	Merck, ABD
-Asetonitril (>%99,9 Absolu HPLC grade).....	Merck, ABD
-Etanol (>%99,9 Absolu HPLC grade)	Merck, ABD
-Metanol (>%99,9 Absolu HPLC grade).....	Merck, ABD

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

- Diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC 60)	Shimadzu, Japonya
- Fourier transform infrared spektrofotometre (FTIR)...Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD	
- Rotasyonel viskozimetre.....	DV-III Rheometer, Brookfield, ABD
-Reometre.....	Anton paar, Avusturya
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	Quanta 400, Fei, ABD
- Floresan mikroskop.....	Olympus, Japonya
-Polarize ataçmanlı mikroskop	Leica DM EP, Almanya
- Doku profili analiz (Texture Analyzer) cihazı.....	TA-XT Plus, Texture Analyser, İngiltere
- UV spektrofotometre cihazı.....	Cary 60, Agilent Technologies, ABD
- Stabilitate test kabinleri.....	TK-252, Nüve, Türkiye

-pH metre	Milwaukee (MA 920B/1), ABD
-Santrifüj cihazı	Selecta Mixatase, İspanya
-Etüv	Heraeus KT-500, Almanya
-HPLC C18 Kolon (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm).....	Xtimate Welch, ABD
-HPLC (100 mm x 4,6 mm, 3,5 µm).....	Hilic Silica Kolon-Ultisil Welch, ABD
-Ultrasonik banyo.....	Branson 221, Almanya
-Partikül büyüklüğü ölçüm aleti.....	Malvern Zetasizer Nano, İngiltere
-Membran Filtre (0,22 µm; 0,45 µm).....	Chromxpert, İsviçre
-Diyaliz Membran (Cut off: 12000 Da)	Sigma, ABD
-Strat-M Membran.....	Merck, ABD
-Ağaç rendesi.....	Stanley, ABD
-Dijital kumpas.....	Mitutoyo, Japonya
-Isıticılı Manyetik Karıştırıcı.....	Velp Scientifica VTF, İtalya
-Vorteks.....	Benchmark (Benchmixer, Tayvan)
-Otomatik pipet.....	Microlit, ABD
-IKA Eurostar 20 high speed digital mekanik karıştırıcı.....	IKA, Almanya

3.1.3. Kullanılan yazılımlar

Doku Profil Analiz Yazılımı	Texture Exponent (2.0.6.0)
İstatistiksel Analiz Yazılımı.....	GraphPad Prism 9.0.0, GraphPad Software Inc., ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda kullanılan tampon çözelti ve hazırlanması

Fosfat tamponu (USP XXXI)

I. Monobazik potasyum fosfat çözeltisi (0,2 M)

KH₂PO₄.....27,22 g

Distile su.....y.m.....1000 ml

II. Sodyum hidroksit çözeltisi (0,2 M)

NaOH.....8 g

Distile su.....y.m.....1000 mL

pH 7,4 fosfat tamponu hazırlanışı: I. çözeltiden 50 mL ve II çözeltiden 39,1 mL alındı karıştırılıp, distile suyla 200 mL hacme tamamlandı ve pH 7,4 tampon çözeltisi hazırlandı.

3.2.2. Etkin madde ve yardımcı maddelerin karakterizasyon çalışmaları

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri

DSC analizleri formülasyon geliştirme aşamasında kullanılan etkin maddeler ve yardımcı maddelerin erime derecelerinin tespiti ve aralarında geçimsizlik olup olmadığının belirlenmesi için yapılan karakterizasyon çalışmalarından birisidir.

Özel hazırlanmış alüminyum ölçüm kapları (pan) içine maddeler konularak, DSC termogramı azot akımı altında (N_2 akışı 100 mL/dk), sıcaklık artışı 10 °C/dk olacak şekilde çekildi. Çalışmamızda etkin madde olarak kullanılan siklopiroks ve ürenin öncelikle DSC termogramları alınarak erime noktaları belirlendi. Sonrasında bunların fiziksel karışımları (1:1) ile DCS termogramları alındı. Aynı çalışma kullanılan yardımcı maddelerin fiziksel karışımlarıyla da (1:1) yapıldı.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR)

Siklopiroks, üre ve kullanılan yardımcı maddelerin fourier transform infrared spektrumu 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında belirlendi ve yapıda bulunan bağlar saptandı.

Siklopiroksun çözünürlük tayini

Antimikotik etki için, siklopiroksun tırnak ve deri yüzeyinden daha alt katmanlarına geçmesi gerekmektedir. Alt katmanların pH'sı fizyolojik pH olduğu için çözünürlük, in-vitro salım ve ex-vivo permeasyon çalışmaları pH 7,4 fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

Çözünürlük için siklopiroksun aşırı miktarı (20 mg) 10 mL suda ve fosfat tamponunda dağıtıldı. Örnekler 3 paralel hazırlandı; 25 °C'de ve su banyosu kullanılarak 32 °C'de 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 24 saatin sonunda alınan örnekler 0,22 μm membran filtre kullanılarak süzüldü ve HPLC'de analiz edildi.

Siklopiroksun partisyon katsayısının tayini

Siklopiroksun 32 °C’de, yağ fazı olarak oktanol ve su fazı olarak distile su arasındaki yağ/su partisyon katsayısı (K) hesaplandı. 100 mL yağ fazı (oktanol) ve 100 mL su manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında fazların birbirine doyması için karıştırıldı (24 saat). Daha sonra fazlar ayrıldı. Bu işlem sonucu elde edilen su fazında siklopiroksun 190 µg/mL (C₀) derişimdeki çözeltisi hazırlandı. Altı adet balonjojenin her birine daha önce su ile doyurulmuş 10 mL yağ fazı ve 10 mL Siklopiroksun çözeltisi konuldu ve manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırıldı. Sırasıyla herbir balon jojedeki karışım sırasıyla 1., 2., 4., 6., 8., ve 24. saatlerde santrifüj tüplerine alınıp, 4000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilip fazların ayrışması sağlandı. Daha sonra ayırma hunisinde su fazı ayrılarak UV spektrofotometrede absorbansı okundu. Elde edilen derişimlerden hareketle partisyon katsayısı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Eş. 3.1). Zamana karşılık hesaplanan logK değerleri grafiklendi.

$$\text{LogK}=\log(C_{\text{oktanol}}/C_{\text{su}}) \quad (3.1)$$

C_{su} : C₀-C₂₄ (C₀: ilk konst. C₂₄ : son konst.)

K: Partisyon Katsayısı

C: Konsantrasyon

Ürenin çözünürlük tayini

Ürenin çözünürlüğü distile suda 25 °C’de tayin edildi.

Ürenin aşırı miktarı (20 g) 10 mL suda dağıtıldı. Örnekler 3 paralel hazırlandı ve 25 °C’de 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 24 saatin sonunda alınan örnekler 0,22 µm membran filtre kullanılarak süzöldü ve HPLC’de analiz edildi.

3.2.3. Siklopiroksun miktar tayini yöntemi ve validasyonu

Siklopiroksun miktar tayini için UV Spektroskopi ve HPLC yöntemi kullanıldı. Özellikle düşük miktarların ölçülmesine imkân verdiği için siklopiroksun HPLC yöntemi ile miktar tayini yöntemi geliştirildi ve validasyonu yapıldı. Validasyon sırasında elde edilen

sonuçların ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS) ve bağıl sapması (BS) hesaplanarak, BS değerinin %2'den küçük olması kabul sınırı olarak değerlendirildi.

İn-vitro salım ve ex-vivo permeasyon çalışmalarında pH 7,4 fosfat tamponu kullanıldığı için miktar tayini ve validasyon çalışmaları bu tamponda yapıldı. Bunun yanı sıra bu çalışma suda da gerçekleştirildi.

Miktar tayini için 3,5 μ m, 150x4,6 boyutlarında C18 HPLC kolonu (Xtimate -Welch) kullanıldı. Mobil faz olarak metanol:10mM pH 7,4 fosfat tamponu (70:30 h/h) karışımı kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 0,8 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 30 μ L olacak şekilde ayarlandı. Dalga boyu taraması yapıldı ve 305 nm'ye ayarlandı. Hesaplarda pik alanı esas alındı.

3 adet stok çözelti (200 μ g/mL) hazırlandı ve seyreltme yapılarak 120 ile 12,5 μ g/mL arasında çözeltilerde ölçümler yapıldı.

Etkin madde tayininde validasyon çalışmaları, kullanılacak yöntemin doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir olup olmadığının kanıtlanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında doğrusalılık, doğruluk, geri elde, kesinlik, özgünlük-seçicilik, duyarlılık- tayin sınırı ve stabilite parametreleri ICHQ2R1 kılavuzuna göre incelendi.

Doğrusallık (linearity)

Doğrusallık parametresi, etkin madde konsantrasyonu ve HPLC'de ölçülen alan değerleri arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunun göstergesidir.

Siklopiroksun 200 μ g/mL'lik stok çözeltisinden 120-12,5 μ g/mL derişim olacak şekilde 7 seyreltme yapılarak örnekler hazırlandı. Bu derişimlere karşılık HPLC'de okunan alan değerleri kullanılarak lineer regresyon ile doğru denklemi bulundu (n=3).

Doğruluk (accuracy) ve geri elde (recovery)

Kullanılan analiz yönteminin doğruluğu, hazırlanan belirli konsantrasyonda etkin madde içeren örneğin alan değeri kullanılarak, doğru denklemden hesaplanan konsantrasyon ile birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. Bu değer geri elde ile hesaplanmaktadır. Hesaplanan geri elde yüzdesi yöntemin doğruluğunu vermektedir ve bu değer %95 olasılıkla önceden belirlenmiş değerle aynı olmalıdır.

Siklopiroksun 80, 100 ve 120 µg/mL derişiminde 3 adet çözeltisi hazırlandı ve doğru denklemi kullanılarak geri elde yüzdeleri hesaplandı. Derişim değerlerinin ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS) ve % bağıl sapma (%BS) değerleri hesaplandı. Hazırlanan her bir derişim için hesaplanan % BS değerinin %2 den küçük olması gerekliliklerine uyup uymadığı kontrol edildi.

Kesinlik (precision)

Kullanılan analiz yönteminin her ölçümünün aynı gün içinde ya da farklı günlerde tekrar edilebilir olup olmadığının göstergesidir.

Sonuçlar standart sapma (SS) ve bağıl sapma (BS) ile değerlendirildi.

Deney içi kesinlik (tekrarlanabilirlik)

Siklopiroksun 100 µg/mL derişimdeki çözeltisi, HPLC’de art arda 10 defa okundu. Elde edilen sonuçların ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS), bağıl sapması (BS) hesaplandı.

Deneyler arası kesinlik (tekrar elde edilebilirlik)

Siklopiroksun 100, 75 ve 50 µg/mL derişiminde çözeltilerine karşılık gelen alan değerleri HPLC’de 3 gün boyunca 3 defa okundu. Elde edilen sonuçların ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS), bağıl sapması (BS) hesaplandı. İstatistiksel hesaplamalar yapılarak %95 güven sınırları içinde üç günlük veriler birbirleriyle karşılaştırıldı ve ortalamalar arası farkın önem testi uygulandı.

Özgünlük (specificity, selectivity)

Özgünlük, kullanılan yöntemin özgünlük tayini için, HPLC’de etkin madde dışında bir pik olup olmadığının saptanmasıdır. pH 7,4 ortamının 305 nm’de HPLC’de pik verip vermediği incelendi. Bu çalışma, ayrıca formülasyonda olan ve suda çözünebilen tüm maddeler için de yapıldı.

Duyarlılık ve tayin sınırları (LOD-LOQ)

Kullanılan analitik yöntemin kesin, güvenilir ve tekrar edilebilir olarak saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri, ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı (Eş. 3.2-3.3).

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S \quad (3.2)$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S \quad (3.3)$$

σ : Kalibrasyon eşitliğinin standart sapma değeri

S: Kalibrasyon doğrusunun eğim

Stabilite (stability)

Siklopiroksun stabil olup olmadığı ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak belirlendi. Siklopiroks çözeltisinin (pH 7,4 fosfat tamponunda) 25 °C’de 24 saat ve formülasyon hazırlarken uygulanacak sıcaklık olan 70 °C’de 3 saat boyunca stabilitesi belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak kontrol edildi.

3.2.4. Ürenin miktar tayini yöntemi ve validasyonu

Ürenin miktar tayininde, UV spektroskopisinde absorbans vermediği için HPLC yöntemi kullanıldı. Validasyon sırasında elde edilen sonuçların ortalaması (xort), standart sapması (SS) ve bağıl sapması (BS) hesaplanarak, BS değerinin %2’den küçük olması kabul sınırı olarak değerlendirildi.

İn-vitro salım ve ex-vivo permeasyon çalışmalarında pH 7,4 fosfat tamponu kullanıldığı için miktar tayini ve validasyon çalışmaları bu tamponda yapıldı. Bunun yanı sıra bu çalışma suda da gerçekleştirildi.

Ürenin miktar tayini için 3,5 µm, 100x4,6 boyutlarında Hilic Silica HPLC kolonu (Ultisil-Welch) kullanıldı. Mobil faz olarak asetonitril: bidistile su (97:3 h/h) karışımı kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 0,8 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 30 µL olacak şekilde ayarlandı. Dalga boyu taraması yapıldı ve 203 nm’ye ayarlandı. Pik alanı esas alındı.

3 adet stok çözeltisi 500 µg/mL derişimde hazırlandı ve seyreltme yapılarak 125 ile 10 µg/mL arasında çözeltilerde ölçümler yapıldı.

Etkin madde tayininde validasyon çalışmaları, kullanılacak yöntemin doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir olup olmadığının kanıtlanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında doğrusalılık, doğruluk, geri elde, kesinlik, özgünlük-seçicilik, duyarlılık- tayin sınırı ve stabilite parametreleri ICHQ2R1 kılavuzuna göre incelendi.

Doğrusallık (linearity)

Doğrusallık parametresi, etkin madde konsantrasyonu ve HPLC’de ölçülen alan değerleri arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunun göstergesidir. Ürenin 500 µg/mL’lik stok çözeltisinden 125-10 µg/mL derişim olacak şekilde 8 seyreltme yapılarak örnekler hazırlandı. Bu derişimlere karşılık HPLC’de okunan alan değerleri kullanılarak lineer regresyon ile doğru denklemi bulundu (n=3).

Doğruluk (accuracy) ve geri elde (recovery)

Kullanılan analiz yönteminin doğruluğu, hazırlanan belirli konsantrasyonda etkin madde içeren örneğin alan değeri kullanılarak, doğru denklemden hesaplanan konsatrasyon ile birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. Bu değer geri elde ile hesaplanmaktadır. Hesaplanan geri elde yüzdesi yöntemin doğruluğunu vermektedir ve bu değer %95 olasılıkla önceden belirlenmiş değerle aynı olmalıdır.

Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 50, 100 ve 150 µg/mL derişiminde 3 adet çözeltisi hazırlanmış ve doğru denklemi kullanılarak geri elde yüzdeleri hesaplandı. Derişim değerlerinin ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS) ve % bağıl sapma (%BS) değerleri hesaplandı. Hazırlanan her bir derişim için hesaplanan % BS değerinin %2 den olması gerekliliklerine uyup uymadığı kontrol edildi.

Kesinlik (precision)

Kullanılan analiz yönteminin her ölçümünün aynı gün içinde ya da farklı günlerde tekrar edilebilir olup olmadığının göstergesidir. Sonuçlar standart sapma (SS) ve bağıl sapma (BS) ile değerlendirildi.

Deney içi kesinlik (tekrarlanabilirlik)

Ürenin 10 µg/mL derişimdeki çözeltisi, HPLC’de art arda 10 defa okundu. Elde edilen sonuçların ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS), bağıl sapması (BS) hesaplandı.

Deneyler arası kesinlik (tekrar elde edilebilirlik)

Ürenin 10, 12,5 ve 5 µg/mL derişiminde çözeltilerine karşılık gelen alan değerleri HPLC’de 3 gün boyunca 3 defa okundu. Elde edilen sonuçların ortalaması (X_{ort}), standart sapması (SS), bağıl sapması (BS) hesaplandı. İstatistiksel hesaplamalar yapılarak % 95 güven sınırları içinde üç günlük veriler birbirleriyle karşılaştırıldı ve ortalamalar arası farkın önem testi uygulandı.

Özgünlük (specificity, selectivity)

Kullanılan yöntemin özgünlük tayini için, HPLC’de etkin madde dışında bir pik olup olmadığının saptamasıdır. pH 7,4 ortamının 203 nm’de HPLC’de pik verip vermediği incelendi.

Bu çalışma ayrıca formülasyonda olan ve suda çözünebilen yardımcı maddeler için de yapıldı.

Duyarlılık ve tayin sınırları (LOD-LOQ)

Kullanılan analitik yöntemin kesin, güvenilir ve tekrar edilebilir olarak saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri, ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı (Eş. 3.4-3.5).

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S \quad (3.4)$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S \quad (3.5)$$

σ : Kalibrasyon eşitliğinin standart sapma değeri

S: Kalibrasyon doğrusunun eğim

Stabilite (stability)

Ürenin stabil olup olmadığı ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak belirlendi. Stok çözeltileri hazırlandı. 25 °C’de ve formülasyon hazırlarken uygulanacak sıcaklık olan 70 °C’deki stabilitesi 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak kontrol edildi.

3.2.5. Bijel formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu

Bijel formülasyonları genellikle hidrojel ve organojelin ayrı ayrı hazırlanıp sonrasında iki jelin yüksek sıcaklık ve yüksek hızda karıştırıldığı sistemlerdir. Sıcaklık ve karıştırma hızı çok önemlidir. Amaç, bir jelin diğer jel içinde mümkün olan en küçük damla boyutu oluşturacak şekilde dağılması ve bu sistemin fiziksel stabilitesinin iyi olmasıdır. Bu nedenle hidrojel ve organojel yapısındaki jelleştirici ajanlar, varsa sürfaktan maddeler ve oranları bijel formülasyonunun yapısı ve özelliklerinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda önce literatür taraması ile organojel ve hidrojel hazırlanmasında kullanılan bazı polimerler, organojelleştirici ajanlar, yağlar belirlendi ve bu maddeler ile çalışmaya başlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Hidrojel ve Organojel Yapısında Kullanılan Maddeler

Hidrojel hazırlanmasında kullanılacak maddeler
Distile su
Üre
Karbopol 974
Propilen glikol
Organojel hazırlanmasında kullanılacak maddeler
Migliyol 812 (sıvı yağ)
Aerosil 200
Gliseril monostearat (GMS)

Bu çalışmada önce hidrojel ve organojel ayrı ayrı hazırlandı ve karakterizasyon çalışmalarıyla bijel hazırlamaya uygun olan ve olmayan formülasyonlar belirlendi.

Hidrojel formülasyonlarının hazırlanması

Hidrojel formülasyonları oda sıcaklığında hazırlandı. Kullanılan %'ler literatür taraması ve yapılan bazı ön çalışmalar ile belirlendi. Ürenin bu jel içinde olması planlandı. Dünya pazarında ürenin, %20-50 konsantrasyon aralığında antifungal etkinlikteki krem/jellerle birlikte kullanımı ya da tek başına nemlendirici etkisinden faydalanmak için krem formunda kullanımı bulunmaktadır (Bkz. Çizelge 2.12). Ürenin yaklaşık %20 oranında kullanıldığında antifungal etkin maddenin enfekte alana geçişini artırdığını gösteren çalışmalar saptandı [179]. Bu sebepten dolayı hidrojel formülasyonları %40 oranında üre içerecek şekilde hazırlandı. Bijel formülasyonu geliştirmek için başlangıçta yapılan çalışmalarda hidrojel ve organojel 50:50 oranında kullanıldı. Bu orana göre hidrojel ve organojel karıştırıldığında (50:50) bijeldeki ürenin yüzdesi %20 olmaktaydı.

Çizelge 3.2'de verilen %'ler ile hidrojeller hazırlandı.

Hazırlama: Karbopol 974P, propilen glikol tartıldı ve distile su olan behere konuldu. Manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de, 25 °C'de 3 saat karıştırıldı. Bu süre sonunda homojen viskoz bir sıvı elde edildi. Sonra üre karışıma eklendi. 1 saat daha 500 rpm'de karıştırıldı. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek oluşan hava kabarcıklarının çıkması sağlandı. Ürenin alkali bir madde olması nedeniyle Karbopol 974P'nin jelleşmesi için başka bir alkali madde kullanılmadı.

Karbopol 974P %'si 0,5 ve 0,75 oranında olan hidrojellerdeki su miktarının hem Karbopol 974P'yi jelleştirmek hem de üreyi çözmek için yeterli olmadığı saptandı. Bu nedenle H3 ve H4 formülasyonları çalışma planından çıkarıldı. Bu sistemlerde Karbopol 974P topaklar halinde kaldı ve üre süspansiyon durumundan çözelti durumuna geçemedi.

Çizelge 3.2. Hidrojel formülasyonlarının bileşenleri ve %'leri

Hidrojel formülasyonları	Karbopol 974P (%)	Üre (%)	Propilen glikol (%)	Su (%)	Tektür jel oluşumu
H1	0,125	40	10	49,875	+
H2	0,25	40	10	49,75	+
H3	0,5	40	10	49,5	-
H4	0,75	40	10	49,25	-

Organojel formülasyonlarının hazırlanması

Organojeller 70 °C’de ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de verilen jelleştirici ajanlar ve Migliol 812 (sıvı yağ) kullanılarak hazırlanmaya çalışıldı. Organojel hazırlama sıcaklığı olan 70 °C’ye, jelleştirici ajanların erime noktası ve yapılan literatür taraması göz önüne alınarak karar verildi [114].

Sıvı yağ jelleştirici olarak önce Aerosil 200 denendi [66]. Bu madde ile Migliol 812 ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 70 °C’de 500 rpm’de 20 dk. karıştırıldı. Sıcaklık arttıkça Migliol 812’de jelleştirici ajanın çözündüğü görüldü. Homojen karışımın 25 °C’ye gelmesi ve oluşan hava kabarcıklarının çıkması için sistem ağzı kapalı şekilde 24 saat bekletildi.

Çizelge 3.3. Organojel hazırlanmasında kullanılan Aerosil 200 ve %’leri

Formülasyon	Aerosil 200 (%)	Migliol 812 (%)
A1	3	97
A2	4	96
A3	5	95
A4	6	94

Aerosil 200’ün kullanıldığı organojelin oda sıcaklığında da sıcakken olduğu gibi berrak ve çözelti halinde olduğu görüldü. Oda sıcaklığında jel kütle oluşmadığı için jelleştirici ajan olarak Aerosil 200’ün kullanıldığı formülasyonlar çalışma planından çıkarıldı.

Daha sonra jelleştirici ajan olarak kullanılan GMS ile çalışılmaya başlandı [122, 180]. Karışım, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 500 rpm’de 20 dk. karıştırılarak 70 °C’ye ısıtıldı. Sıcaklık arttıkça Migliol 812’de jelleştirici ajanın eridiği görüldü. Karışım homojen hale geldiğinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıdan alındı ve sıcaklığın 25 °C’ye gelmesi, oluşan hava kabarcıklarının çıkması için ağzı kapalı şekilde 24 saat bekletildi.

GMS’nin kullanıldığı organojellerin sıcakken berrak ve akışkan olduğu görüldü. Oda sıcaklığına geldiğinde katı, sarımsı, jel kütlenin oluştuğu gözlemlendi. Bu jellerin akış özellikleri incelendi. %15 ve %20 GMS içeren organojellerin, viskozitesi kayma hızı arttıkça artış gösterdi. Dilatant akış özelliği nedeniyle bijel hazırlama aşamasında zorluk oluşturacağı için bu iki jel çalışma planından çıkarıldı.

Çizelge 3.4. Organojel hazırlanmasında kullanılan GMS ve %'leri

Formülasyon	GMS (%)	Migliyol (%)
O1	5	95
O2	10	90
O3*	15	85
O4*	20	80

*Dilatant akış

Bijel formülasyonların geliştirilmesinde esas hedef, üreyi jelleşmiş dış su fazında bulunduran (hidrojel), siklopiroksu da jelleşmiş yağ damlaları içine hapsetmiş olan (organojel) yarıkatı/viskozitesi oldukça yüksek, yapı olarak emülsiyona benzer jel sistemi geliştirmektir (organojel/hidrojel).

Hazırlanan bijelin dış fazının hidrojel (su fazı) olması, tırnak mantarı tedavisinde keratinize tırnağın yumuşaması ve tırnaktaki porların genişlemesi, siklopiroksun enfekte dokuya daha kolay geçmesini sağlayacağı için tercih edildi. Bu yüzden organojel (yağ fazı-iç faz) hidrojele azar azar karıştırılarak eklendi. Dış faz hem seyreltme hem de Sudan III ile boyama tekniği kullanılarak kontrol edildi ve dış fazın hidrojelden (su fazı) oluştuğu belirlendi.

Literatür taramasında hidrojel ve organojel ile bijel hazırlanırken hem sürfaktanların kullanıldığı hem de sürfaktanın kullanılmadığı çalışmaların olduğu görüldü [121, 123, 146, 180, 181].

Bu nedenle önce herhangi bir sürfaktan kullanmadan böyle bir sistemin oluşup oluşmayacağı incelendi [113].

Öncelikle organojel ve hidrojel sürfaktan kullanmadan ayrı ayrı hazırlandı sonra oda sıcaklığındaki her 2 jel başlangıç olarak 50:50 oranında 6000 rpm'de karıştırıldı. Ancak biraz bekleme ile sistemde hazırlama sonrası hemen faz ayrışması oluştuğu tespit edildi. Bu yöntem ile dayanıklı bir bijel hazırlanamayacağına karar verildi. Daha sonra ayrı ayrı hazırlanan her iki jel organojelin hazırlama sıcaklığı olan 70 °C'ye getirildi ve sıcakta karıştırılarak bijel hazırlandı. Bu teknikle bijelin oluştuğu ancak kısa bir süre sonra yine faz ayrışması oluştuğu gözlemlendi.

Ön çalışmalar sonucunda sürfaktan kullanarak bijel hazırlanmasına karar verildi [127]. Kullanılacak sürfaktanların oranları, sistemin HLB değeri 10'dan büyük olacak şekilde belirlendi.

Süpfaktan olarak hidrojel için Tween 80 ve organojel için ise Span 80 kullanıldı [127, 147]. Süpfaktan içeren hidrojel formülasyonu için Karbopol 974P, propilen glikol ve Tween 80 suyun içine bu sıraya göre sürekli karıştırılarak ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 3 saat, 500 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Sonra üre karışıma eklendi. Oluşan jel 1 saat daha karıştırıldıktan sonra oluşan hava kabarcıklarının çıkması için 24 saat bekletildi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Hazırlanan hidrojel formülasyonlarının bileşenleri ve %’leri

Hidrojel formülasyonları	Karbopol 974P (%)	Üre (%)	Propilen glikol (%)	Süpfaktan-Tween 80 (%)	Su (%)
H1	0,125	40	10	5	44,875
H2	0,25	40	10	5	44,75

Süpfaktan içeren organojel formülasyonu hazırlarken GMS ve Span 80, Migliyo1 812 bulunan behere konuldu. Isıtıcı manyetik karıştırıcıda 70 °C’de GMS’in Migliyo1 812 içinde eriyip homojen karışım oluştuktan sonra, kütle manyetik karıştırıcıdan alınarak sıcaklığının 25 °C’ye gelmesi, oluşan hava kabarcıklarının çıkması için 24 saat bekletildi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Hazırlanan organojel formülasyonlarının bileşenleri ve %’leri

Organojel formülasyonları	GMS (%)	Süpfaktan-Span 80 (%)	Migliyo1 812 (%)
O1	5	5	90
O2	10	5	85

Bijel hazırlama: Öncelikle organojel ve hidrojel 50:50 oranında karıştırılmaya karar verildi. Bu sistemin HLB değeri hesaplandı. Süpfaktan ile hazırlanan organojel ve hidrojel karıştırmanın ve damla oluşumunun daha kolay olabilmesi için 70 °C’ye ısıtıldı. Sonra organojel, hidrojele Ultra turrax kullanılarak (6000 rpm) eklendi. Bu şekilde hazırlanan bijellerde faz ayrımı görülmeyişi tespit edildi. Bu sebeple bijellerin, hidrojel ve organojelin süpfaktan içerecek şekilde ve sıcakta hazırlanmasına karar verildi.

Daha sonra bijellerin hazırlanmasında işlem parametrelerinin sistem üzerindeki etkisini incelemek ve tekniği standart hale getirmek için bir dizi çalışma gerçekleştirildi.

İncelenen parametreler:

- Karıştırma oranları (organojel/hidrojel)
- Karıştırma sıcaklığı ve
- Karıştırma hızı.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hidrojel:organojel 50:50 oranında kullanıldı. Ancak literatürde bu oranın çok farklı olarak kullanılabildiği tespit edildi [111, 113, 120, 123]. Bu çalışmada faz oranlarının bijel özelliklerini nasıl etkileyeceğini görebilmek için 50:50 oranına ek olarak 60:40 ve 40:60 oranları da kullanılarak bijel formülasyonları hazırlandı.

Karıştırılma sıcaklığına karar verilirken; organojelin 70 °C ve hidrojin oda sıcaklığında olduğu; organojel ve hidrojin 70 °C’de olduğu denemeler yapıldı. Bu denemeler ışığında karıştırılan 2 ayrı jelin sıcaklığının farklı olmasının faz ayrışmasına sebep olduğu ve sıcaklıklarının 70 °C olmasının faz ayrışması olmaması için belirleyici nedenlerden biri olduğu tespit edildi. Bu sebeple organojel hazırlama sıcaklığı olan 70 °C’nin iki fazın karıştırılma sıcaklığı olmasına karar verildi [147, 182].

Bundan sonra karıştırma sıcaklığı olarak belirlenen 70 °C’de siklopiroks ve ürenin kimyasal stabilitesi incelendi. Her iki etkin madde de bu sıcaklıkta stabil bulundu.

Karıştırma hızı bijel hazırlama aşamasındaki önemli işlem parametrelerinden birisidir. Bunun nedeni iç fazı oluşturacak jelin damlacık boyutu üzerinde etkili olmasıdır. Bu aşamada amaç, en küçük damla boyutunu ve en küçük PDI değerini oluşturacak bir karıştırma hızını saptamaktır. Önce basit bir ön çalışma olarak 50:50 oranına sahip bijel (2 no’lu) ile değişik karıştırma hızları denendi ve mikroskopta damla oluşup oluşmadığı incelendi. Oldukça viskoz olan sistemi manyetik karıştırıcı ile homojen şekilde karıştırmak zor olacağı için, karıştırıcı olarak Ultra Turrax kullanıldı. Bu bijel 1000-1500-2000-2500-3000-4000 ve 6000 rpm kullanılarak hazırlandı. Damlacık boyutu tespiti için bijeller su ile seyreltildi ve organojel damlaların boyutu incelendi. Görüntüsel olarak en küçük damlaların 6000 rpm’de olduğu tespit edildiğinden karıştırma hızı 6000 rpm olarak belirlendi. Yapılan bu çalışmalardan sonra karıştırma hızı ve karıştırma sıcaklığı sabit tutuldu (6000 rpm ve 70 °C).

Sonuç bijel hazırlama yöntemi: Organojel ve hidrojel ayrı ayrı hazırlandı. Her iki jel oluşan hava kabarcıklarının çıkması için oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Daha sonra jeller ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 70 °C'ye ısıtıldı. Hidrojin üzerine organojel azar azar eklendi (6000 rpm). Karıştırmaya 2 dakika boyunca devam edildi. Karıştırma sırasında oluşan hava kabarcıklarının çıkması için oluşan bijel sistem 24 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Çalışmada, hidrojel ve organojel formülasyonları daha önce belirtildiği gibi değişik oranlarda karıştırıldı. Elde edilen bijellerin içerikleri Çizelge 3.7'de verildi. Hazırlanan bijellerin HLB değerleri hesaplandı ve bijellerin akış özellikleri ve damla boyutları belirlendi. Bu değerler Çizelge 3.8'de verildi.



Çizelge 3.7. Hazırlanan bijellerin formülasyon bileşenleri (rpm: 6000, sıcaklık 70 °C)

Bijel kodları	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O/H oranı	(40/60)	(50/50)	(60/40)	(40/60)	(50/50)	(60/40)	(40/60)	(50/50)	(60/40)	(40/60)	(50/50)	(60/40)
HLB değeri	14,3	14,3	14,3	13,7	13,7	13,7	14,3	14,3	14,3	13,7	13,7	13,7
Carbopol 974	0,075	0,0625	0,05	0,075	0,0625	0,05	0,15	0,125	0,1	0,15	0,125	0,1
Propilen glikol	6	5	4	6	5	4	6	5	4	6	5	4
Üre	25	20	16	25	20	16	24	20	16	24	20	16
Tween 80	3	2,5	2	3	2,5	2	3	2,5	2	3	2,5	2
D.su	25,925	22,4375	17,95	25,925	22,4375	17,95	26,85	22,375	17,9	26,85	22,375	17,9
GMS	2	2,5	3	4	5	6	2	2,5	3	4	5	6
Span 80	2	2,5	3	2	2,5	3	2	2,5	3	2	2,5	3
MCT-oil	36	45	54	34	42,5	51	36	45	54	34	42,5	51

Çizelge 3.8.Hazırlanan bijel formülasyonlarının karakterizasyon sonuçları

Karakterizasyonlar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
K±SH (mPa.s)	719,9±0,1	1226,6± 0,05	2391,1± 0,035	2560± 0,089	7664,5± 0,07	7996,6± 0,07	698,7± 0,055	1591,34± 0,05	7026,8± 0,03	8284,36± 0,05	0966,5± 0,1	13165,8± 0,05
n	0,65	0,73	0,64	0,60	0,50	0,68	0,83	0,72	0,59	0,50	0,51	0,65
Damla boyutu-r (nm)	1243	1042	685,6	458,7	665	1071	1105	929,1	3233	835,4	609,1	1491
PDI	1,00	0,737	0,797	0,460	0,707	0,849	0,767	0,838	1,00	0,779	0,756	1,00
Faz ayrışması*	yok	Yok	yok	Yok	yok	yok	var	var	yok	yok	yok	yok

* Santrifüj (8000 rpm 15 dk/ 1162,75 xg)

Çizelge 3.7’de, ön çalışmalarda hazırlanan bijel bileşenleri, HLB değerleri, organojel/hidrojel oranı ve kullanılan bijellerin içeriği verildi. Bildirilen içeriklerde bijeller, ‘sonuç bijel hazırlama yöntemi’ ile hazırlandı. Çalışmada, bijel sistemlerin temel özellikleri olan viskozite ve damla boyutunu, çok sayıda değişkenin etkilediği ön çalışmalarla gösterildiği için bu aşamada amaca yönelik bir sistemi en az sayıdaki formülasyon çalışması ile elde etmek amacıyla 2^3 faktöriyel tasarım yapılmasına karar verildi. Bu amaçla bijel oluşumu için önce formülasyon bileşenlerinin alt ve üst sınırları belirlendi. Bijel formülasyonunu optimize etmek için Design Expert® Yazılımı kullanılarak 2^3 (2 seviye, 3 faktör) tam faktöriyel tasarım yapıldı. Formülasyon bileşenlerinden Karbopol 974P, gliserol monostearat ve Migliyol 812 oranları faktör (girdi değişkeni) olarak seçilirken, alt ve üst sınırlar da seviye olarak seçildi (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Tam faktöriyel tasarımdaki faktör, seviye ve cevaplar

Faktörler	Seviyeler (%)	Cevaplar
Karbopol 974P oranı	0,05	Viskozite + Damla boyutu
	0,15	
Gliserol monostearat oranı	2	
	6	
Migliyol oranı	33	
	53	

İstatistiksel tasarımda bijel formülasyonunda kullanılan üre konsantrasyonu %20 olarak sabit tutuldu. Bu %, ticari ürünlerde kullanılan % idi. Ayrıca propilen glikol ve sürfaktanların oranları da literatür taramaları sonucunda belirlenen %’ler de sabit tutuldu [118, 123].

Hidrojel formülasyonunda jelleştirici ajan olarak kullanılan Karbopol 974P %’sinin bijel formülasyonun akış özelliklerini ve damla boyutunu doğrudan etkilediği beklenmekteydi. Bu sebeple hidrojel formülasyon bileşenlerinden Karbopol 974P faktör olarak seçildi.

Aynı şekilde organojel formülasyonunda jelleştirici ajan olan GMS ve dağılım ortamı olan Migliyol 812’nin %’si de yine bijellerin viskozitesi ve damla boyutu üzerine önemli derecede etkili olabileceği tahmin edildiği için bu iki oran da faktör olarak seçildi.

Çizelge 3.7’de de görüldüğü gibi seçilen sürfaktan madde oranlarında HLB değeri 13,7 ve 14,3 olarak hesaplandı. Sonuç olarak sürfaktan madde oranlarının HLB değerini anlamlı

derecede etkilemediği görüldü ve tasarım için sürfaktan oranları gereken min. düzeyde (%2,5) sabit tutuldu.

Bu tasarıma göre hazırlanan bijel formülasyonları Çizelge 3.10'da verildi. Hazırlanan formülasyonların önce damla boyutları tespit edildi; sonra fiziksel stabilitenin göstergesi olarak santrifüj (8000 rpm-15 dk) ile faz ayrımı olup olmadığı incelendi. Faz ayrımı olan formülasyonlar elendi. Bu formülasyonların damlacık boyutlarının büyük olduğu da dikkat çekiciydi. Faz ayrışması saptanmayan ve aynı zamanda en küçük damla boyutuna sahip olan B1, B5 ve B8 formülasyonları optimum bijel formülasyonları olarak seçildi.

B1 ve B8 formülasyonları homojen, opak renkli, kremi bijellerdi. Buna karşılık B5 formülasyonu için kullanılan hidrojelde üre tam olarak çözünmediği için sistem partiküler özellikteydi. Dokunulduğunda üre partikülleri hissediliyordu. Bu nedenle B5 formülasyonu, ürenin çözünmediği bir bijel sistemdi. Bu sistem pat olarak değerlendirildi.

Hidrojellerde, Organojellerde ve Bijellerde Yapılan Çalışmalar:

Hazırlanan sistemlerde yapılan kontroller Çizelge 3.11'de verildi. Ayrıntılar alt başlıklar altında anlatıldı.

Çizelge 3.10. Tam faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan bijel formülasyonlar

	Bijel	1*	2	3	4	5*	6	7	8*
Hidrojel elemanları	Carbopol 974 (%)	0,15	0,05	0,15	0,15	0,15	0,05	0,05	0,05
	Propilen glikol (%)	5	5	5	5	5	5	5	5
	Üre (%)	20	20	20	20	20	20	20	20
	Tween 80 (%)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	D.Su (%)	29,85	29,95	33,85	13,85	9,85	13,95	33,95	9,95
Organojel elemanları	Siklopiroks (%)	1	1	1	1	1	1	1	1
	GMS (%)	6	6	2	2	6	2	6	6
	Span 80 (%)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	MCT-oil (%)	33	33	33	53	53	53	33	53
O/H Oranı		0,74	0,74	0,63	1,41	1,67	1,41	0,63	1,67
HLB Değeri		13,11	13,11	14,08	14,53	13,8	14,53	14,08	13,8
Damla boyutu (nm)		531,8	1226	1243	860,2	376,3	1159	2177	457,9
PDI		0,567	1,00	1,00	0,512	0,033	0,064	0,732	0,399
Faz ayrışması (8000 rpm-15 dk)		Yok	Var	Var	Var	Yok	Var	Var	Yok
Viskozite-K (mPa.s)		21764	2413	11857	21100	2032342	11484	249	502810
n		0,64	0,6	0,27	0,61	1,3	0,5	0,68	0,78

*Optimum bijel formülasyonları (B1, B5 ve B8)

Çizelge 3.11. Hazırlanan formülasyonlarda yapılan çalışmalar

[illegible]

Fiziksel görünüş

Hazırlanan sistemlerin fiziksel görünüşü, homojenitesi ve rengi görsel olarak incelendi [123, 126, 138, 155].

Dış faz tespiti

Sudan III, yağda çözünen bir boya maddesidir. Yağda çözünerek yağı kırmızıya boyar. Hazırlanan bijel formülasyonunda su fazı ve yağ fazı bulunmaktadır. Bu çalışmada sistemin dış fazı sulu jel, iç fazı damlacıklar halinde yağ fazıdır. Bijel Sudan III ile karıştırıldı. Dış fazın kırmızıya boyanıp boyanmadığı kontrol edildi.

Emülsiyonlarda olduğu gibi bijel, yapısındaki dış faz ile de seyreltilebilmektedir. Bu yöntem için de bijel su ile seyreltilerek dış fazın su olup olmadığı ampirik olarak da tespit edildi.

Jel oluşup oluşmadığının tespiti

Bijeller hazırlandıktan hemen sonra tüplere dolduruldu. Bijellerin sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde tüpler ters çevrildi ve jel oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

Damlacık boyutu ve dağılımı tespiti

Damla boyutu tayini Malvern Zetasizer aleti ile optimum bijel formülasyonları su ile 1500 kat seyreltilerek yapıldı.

Etkin madde içerik tayini

0,5 g bijel 20 mL su içinde dağıtıldı. Sonra metanol ilavesi ile tümüyle çözelti haline gelmesi sağlandı. Oluşan çözelti 5 dakika vortekslendi ve 0,22 µm membran filtreden süzüldü. Çözelti siklopiroks içeriği ve üre içeriği ilgili analiz tekniği ile HPLC’de analiz edildi [128, 148, 155].

pH

Hazırlanan bijellerin pH değerleri el tipi, jel- pH metre'si kullanılarak ölçüldü [118, 155].

Bijel yapısında kristallanme olup olmadığının tespiti

Optimum bijel yapısında kristal olup olmadığı Resim 3.1'de görülen polarize ataçmanlı mikroskop ile kontrol edildi [110].



Resim 3.1. Kullanılan polarize ataçmanlı mikroskop

Viskozite ölçümü ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi

Hazırlanan jel sistemlerin viskozitesi ve akış özellikleri rotasyonel tip (koni plaka) viskometre (Brookfield DV-III, USA) kullanılarak incelendi [50, 153, 183]. Çalışma oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Örnek miktarı 0,5 mL idi. Formülasyonların farklı kayma hızlarında oluşan kayma gerilimleri, her bir kayma hızı için yeni örnek kullanılarak ölçüldü.

Her bir ölçüm dönme momenti (torque) değeri 10-100 arasında olacak şekilde, formülasyonun durumuna göre, CPE-42 veya CPE-52 numaralı spindle kullanılarak yapıldı. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanarak ortalamaları hesaplandı. Bulunan kayma gerilimine karşı kayma hızı verileri grafiğe geçirildi. Eş. 3.4' de verildiği gibi (Ostwald de Waele eşitliği) n ve K değerleri de hesaplandı. Viskozite değerleri ilgili aletin yazılım programı (Rheocalc V2.4) tarafından da verildi (Eş. 3.4).

$$\ln \eta = \ln K + (n-1) \cdot \ln \dot{\gamma} \quad (3.4)$$

$\dot{\gamma}$: Kayma hızı

η : Viskozite (mPa.s)

n : Akış davranış indeksi (power law index)

K : Akış yoğunluğu indeksi (consistency index) (mPa.s)

Bijeller için bu çalışmanın yanında viskoelastisite özellikleri de incelendi. Viskoelastisite çalışmaları hizmet alımı ile Bilkent-UNAM'da gerçekleştirildi. Çalışma, 40 mm çapındaki çelik prob, 0,3 mm sabit aralık kullanılarak yapıldı [121, 124, 144]. Hazırlanan formülasyonların elastik modül (G') ve viskoz modülü (G'') tayin edildi. Elastik modül sistemin katı benzeri özelliğini tanımlar ve depolanan enerjinin bir ölçüsüdür. Yani formülasyon akıcı haldeyken düşük olup, formülasyonun jelleşerek viskozitesinin artmasıyla artış göstermektedir. Her örnek için çalışma en az üç kez tekrarlandı (Resim 3.2).



Resim 3.2. Viskoelastisite tayini için kullanılan reometre

Jellerin Yapı Profil Analizi Tayini

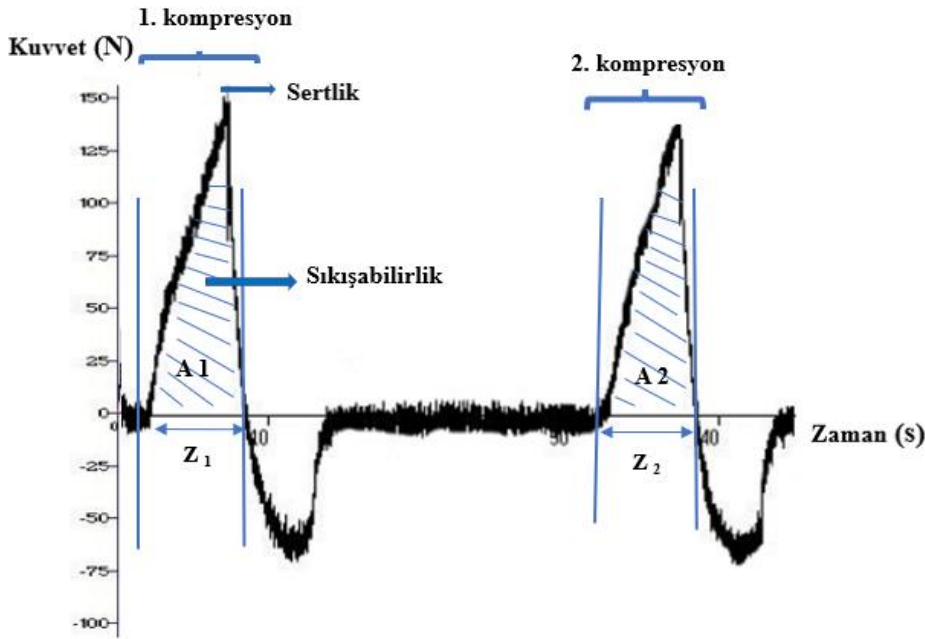
Bijellerin yapı analizi tayini TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK) TM kullanılarak yapıldı [98, 144, 150, 181]. Bu amaçla penetrometre probu (Resim 3.3) kullanıldı ve analizler 25 °C'de yapıldı. Veriler, cihaza ait Texture Exponent 2.0.6.0. yazılım programıyla değerlendirildi.



Resim 3.3. TPA analizi için kullanılan cihaz

Çalışmada cihazın probuna uygun genişliğe sahip behere, yaklaşık 5 cm yükseklik sağlanacak şekilde bijel konuldu. 10 mm çapa sahip prob, 1. periyotta bijelin yüzeyine 2 defa, 2 mm/sn kuvvet hızla 15 mm daldırıldı ve bijelin yüzeyine geri çekildi. İkinci periyotta prob bijele 15 mm daldırıldı ve prob tekrar bijel yüzeyine geri çekilerek ölçüm bitirildi. Cihaz Texture Exponent 2.0.6.0. yazılım programı ile ölçüme ait sertlik ve sıkışabilirlik değerlerini verdi. Bu sonuçlar kullanılarak Eş. 3.5 ve Eş. 3.6 yardımıyla elastikiyet ve kohesiflik değerleri hesaplandı. Her çalışma üç defa tekrarlandı. Cihazın verdiği grafiğin bir örneği Şekil 3.1’de, cihaz da Resim 3.3’te verildi.

Çalışmada bijellerde sertlik, sıkıştırılabilirlik, elastikiyet, adeziflik ve kohezyon özellikleri incelendi.



Şekil 3.1. Texture profil analizi, birinci ve ikinci kompresyon periyodu grafiği

Sertlik (Hardness)

Sertlik, biele uygulanan kuvvet sonucu oluşan deformasyondur. Probun biele uyguladığı ilk kompresyon periyodundaki eğrinin tepe noktasıdır. Bijelin deformasyonu için gerekli sertliği vermektedir.

Sertlik değerinin birimi Newton (N)'dur.

Sıkışabilirlik (Compressibility)

Sıkışabilirlik, penetrometre probunun ilk kompresyon periyodu eğrisinin altında kalan alandır (A_1). Bijelin biçimini deforme etmek için gereken iştir.

Sıkışabilirlik değerinin birimi $N*s$ 'dir.

Adeziflik (Adhesiveness)

Adeziflik, penetrometre probunun ilk kompresyon periyodundaki negatif alandır. Probun yüzeyi ile bijelin yüzeyi arasındaki çekici kuvvetleri yenmek için gereken iştir.

Adeziflik değerinin birimi $N*mm$ 'dir.

Koheziflik (Cohesiveness)

Şekil 3.1’de de görüldüğü gibi, koheziflik; ikinci kompresyon periyodu eğrisinin altında kalan alanın (A_2), birinci kompresyon periyodundaki eğri altında kalan alana (A_1) oranıdır (Eş.3.5). Koheziflik bijellerin molekülleri arasındaki etkileşimi, yapı hakkında bilgi de vererek yansıtır ve birimi yoktur.

$$\text{Koheziflik} = A_2 / A_1 \quad (3.5)$$

A_1 = 1. kompresyon alanı

A_2 = 2. kompresyon alanı

Elastikiyet (Springiness)

Şekil 3.1’de de görüldüğü gibi, elastikiyet; ikinci kompresyon periyodunda maksimum yapısal deformasyon için gerekli zamanın (Z_2), birinci kompresyon periyodundaki maksimum deformasyon için gerekli zamana (Z_1) oranıdır (Eş. 3.6). Elastikiyet değerinin yaklaşık 1 olması sistemin elastik özelliklerinin olduğunu gösterirken, değerin 1’den farklı olması sistemin akma özelliğine sahip olduğunu gösterir.

Elastikiyet değerinin birimi bulunmamaktadır.

$$\text{Elastikiyet} = Z_2 / Z_1 \quad (3.6)$$

Z_2 = 2. kompresyon için geçen süre

Z_1 = 1. kompresyon için geçen süre

Yayılabilirlik (spreadability) tayini

Yayılabilirlik, yarı katı formülasyonlar için önemli parametrelerden birisidir. Ürünün sürülebilirliği ile ilişkili olduğundan hasta uyuncunu ve dolayısıyla da tedavi etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Yayılabilirlik, dış kuvvet etkisiyle sistemin tümünde oluşan deformasyondur.

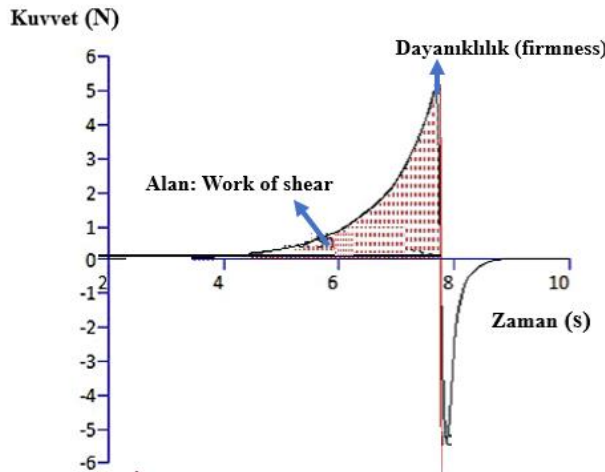
Yayılabilirlik tayini TPA cihazı ile ölçüldü. Cihazın sabit ve hareketli olan kısımları Resim 3.4’te gösterildi. Üstteki koni şeklindeki prob önceden belirlenen ve her ölçüm için aynı

olan bir yükseklikten (23 mm) alttaki sabit koniye doğru indirilir. Ölçümler bu şekilde olacak şekilde cihaz ayarlandı ve kalibre edildi. Bijel formülasyonları alttaki koni içine hava kabarcığı içermeyecek şekilde bir spatül yardımı ile konuldu. Daha sonra hareketli koni, sabit koniyi doldurulan bijele doğru indirildi. Üst koninin inebildiği maksimum derinlik dayanıklılık olarak tanımlanır ve ürünün yüzeyinin deformasyonu için uygulanan kuvvet ile ölçülür. Dayanıklılık ile yayılabilirlik ters orantılı olarak değişmektedir (Şekil 3.2).

Her bijel için ölçüm 3 tekrarlı yapıldı. Çalışma sonunda cihazın kendine ait olan Texture Exponent 2.0.6.0. yazılım programı kullanılarak dayanıklılık ve yayılabilirlik işi (Work of shear) hesaplandı.



Resim 3.4. Yayılabilirlik deney düzeneği



Şekil 3.2. Yayılabilirlik çalışması grafiği

3.2.6. Hidrojel, organojel ve bijel formülasyonlarında in-vitro salım çalışmaları

Optimum bijel formülasyonlarının 1g'ında 10 mg siklopiroks ve 200 mg üre bulunmaktadır. Ticari krem ve cila için verici odacıkta 10 mg siklopiroks içerecek miktar kullanıldı.

Bu çalışmalarda 2 farklı zar ve Franz difüzyon hücreleri kullanıldı.

Zarlar: a. Diyaliz membran

b. Strat-M membran

Ticari cila içinde bulunan organik solvanlar diyaliz membranı erittiğinden bu membranda in-vitro salım çalışması gerçekleştirilemedi.

Strat-M membranın elimizde kısıtlı sayıda olması nedeniyle bu zar sadece bijeller ve ticari ürün için yapılan salım çalışmalarında kullanıldı.

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda/makalelerde deney sıcaklığı ve salım ortamı için farklı koşulların neler olduğu incelendi. Sonuç olarak tez çalışmamıza benzer çalışmalarda in-vitro salım koşullarının birbirinden çok farklı olabildiği saptandı [118, 121, 126, 129]. Çalışmamızda amaç antimikotik etki için, siklopiroksun tırnak ve deri yüzeyinden daha alt katmanlara geçmesidir. Alt katmanların pH'sı fizyolojik pH olduğu için in-vitro salım çalışmaları ve ex-vivo permeasyon çalışmaları pH 7,4 fosfat tamponunda gerçekleştirildi [121, 134]. Formülasyonumuz topikal bir ürün olduğundan çalışma sıcaklığı deri sıcaklığı olan 32 °C olarak belirlendi [50, 113, 126, 143, 184].

Deney koşulları

Numune miktarı: 1 g

Salım alanı: 1 cm²

Alıcı odacık hacmi: 2,5 ml

Salım ortamı: Fosfat tamponu

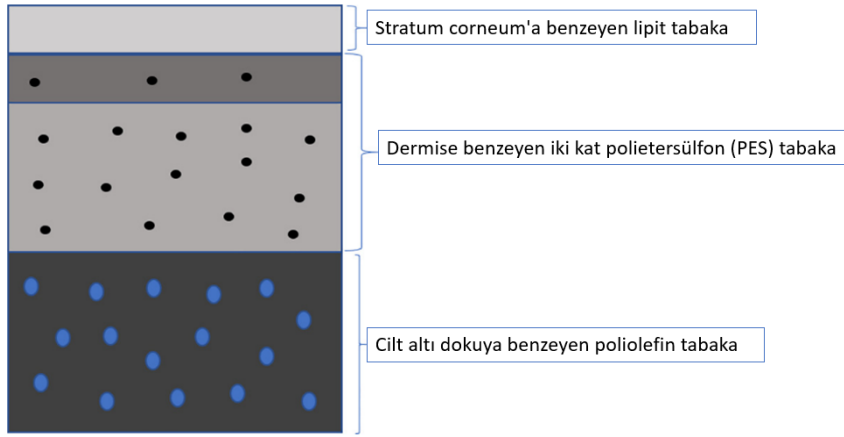
Sıcaklık: 32 °C

Karıştırma hızı: 50 rpm

pH: 7,4

Süre: 24 saat

Not: Strat-M membran, insan derisinin katmanlı ve lipit yapısını taklit edecek şekilde tasarlandı. Strat-M membranın kalınlığı yaklaşık 300 μm 'dir. Membran katmanları, insan derisinin farklı katmanlarını (epidermis, dermis ve deri altı dokusu) taklit edecek şekilde ayarlandı. Kalınlıkları da deriyi taklit edecek şekildedir. Zarın çoklu katmanı, insan derisine benzer bir morfolojiye sahiptir, üstten aşağıya doğru gözenekliliği de artmaktadır. Membranın en dış kısmı (SC'a benzeyen tabaka) patentli sentetik lipit karışımından oluşmaktadır. Bu tabaka, insan SC'unda bulunan lipitlere benzer çeşit ve oranda seramid, kolesterol, serbest yağ asitleri ve diğer bileşenlerden oluşan bir kombinasyonu içermektedir (Resim 3.5).



Şekil 3.3.Strat-M membranın çok katmanlı yapısı

Strat-M membran Franz difüzyon hücresine, membranın lipit tabakası verici odacığa (ürüne) birebir temas edecek şekilde yerleştirilir.

Diyaliz membran (cut off: 12000 Da) 24 saat, pH 7,4 fosfat tamponunda bekletildi. Strat-M membran ise doğrudan Franz difüzyon hücresinin kompartmanlar arasına yerleştirildi ve iki odacığın birbirine sıkı/sızdırmaz şekildeki teması Parafilm aracılığıyla sağlandı.

Hazırlanan bijel, hidrojel, organojeller ve piyasa preparatı, insülin enjektörü yardımı ile difüzyon hücresinin verici odacığına konuldu. Alıcı odacığın karışması için uygun boyutlu magnet kullanıldı. Sink koşulun sağlanması için her örnek alma zamanında alıcı odacıktaki tüm sıvı alındı. Yerine taze pH 7,4 fosfat tamponu kondu. Ayrıca etkin madde doygunluk çözünürlüğünden (C_s) hareketle her zaman aralığındaki çözünürlük ile ($C_t < 0,15C_s$) ortamda sink koşulun sağlandığı kontrol edildi [121, 124, 144].

Örneklerdeki siklopiroks ve üre HPLC’de uygun seyreltmeler yapılarak analiz edildi. Etkin madde salımı sıfır derece, birinci derece, Higuchi salım kinetik modellerine göre incelendi [140]. Çalışmada sonuçlar arasındaki fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.7. Bijel formülasyonlarında ex-vivo permeasyon çalışmaları ve dokularda miktar tayini

Optimum bijel formülasyonlarının 1 g’ında 10 mg siklopiroks ve 200 mg üre bulunmaktadır. Ticari krem ve cila için verici odacıkta 10 mg siklopiroks içerecek miktar kullanıldı.

Hazırladığımız bijel formülasyonunun tırnak ve bitişindeki deriye uygulanması planlandı. Bu nedenle permeasyon çalışmasının hem deri hem de tırnak dokusunda yapılmasına karar verildi. Bu amaçla doku olarak sıçan sırt derisi ve sığır toynağından hazırlanan membran kullanıldı. Sığır toynak membranlarının, insan tırnağına benzer oranda yüksek kükürt içeriğine sahip keratinden oluştuğu ve tırnakta penetrasyon çalışmalarında insan tırnağı yerine deneysel olarak kullanıldığı saptandı [185, 186]. Çalışmamızda bu nedenle sığır toynak membranı kullanıldı.

Tırnak mantarı tedavisinde tırnak ve çevre dokuda biriken etkin madde miktarı kritik öneme sahiptir ve tedavi başarısında belirleyici etkenlerden birisidir [140]. Bu sebeple, çalışmamızda permeasyon çalışması sonrası ilgili dokularda biriken etkin madde miktarları da saptandı.

Deri ve sığır toynak membranının hazırlanması

Deri örnekleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından tedarik edildi. Bu çalışma için daha önceki çalışmalarda kontrol grubu olarak kullanılmış ve ilgili deney sonunda öldürülecek olan sıçanlar kullanıldı. Sıçan sırt derileri tıraşlanarak alındı. Yağ dokusu temizlendikten sonra -80 °C’de muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman dondurucudan çıkarıldı, oda sıcaklığına geldiğinde bekletilmeden çalışmada kullanıldı [187].

Sığır toynağı mezbahadan temin edildi. Toynak ilgili dokudan ayrıldı. Toynağın membran şeklinde kesilmesini kolaylaştırmak için 3 gün distile suda bekletildi [186]. Sonrasında

~150 μm kalınlığında olacak şekilde kesilerek (Resim 3.6 ve Resim 3.7) ex-vivo permeasyon çalışması için hazır hale getirildi. Toynak membranının kalınlığı dijital mikrometre ile ölçüldü (n=12). Ortalama kalınlığın $150 \mu\text{m} \pm 0,30$ olduğu saptandı. Kullanıncaya kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Kullanılmadan önce dondurucudan çıkarılarak, 2 saat pH 7,4 fosfat tamponunda hidrate edildi [50, 158, 186, 188].



Resim 3.5.Toynakların kesilme aleti



Resim 3.6.Tamponda bekletilen toynak membranları

Ex-vivo permeasyon çalışmasının yapılması:

Çalışma için in-vitro salım çalışmasında kullanılan düzenek kullanıldı. Hem siklopiroksun hem de ürenin permeasyon özelliği değerlendirildi. Çalışma ticari krem ve cilada da gerçekleştirildi.

Deney koşullarıSalım alanı: 1 cm²

Alıcı odacık hacmi: 2,5 mL

Salım ortamı: Fosfat tamponu

Sıcaklık: 32 °C

Karıştırma hızı: 50 rpm

pH: 7,4

Süre: 24 saat

Deri örnekleri için SC tabakası verici odacığa, incelenecek ürün/formülasyonla birebir temas edecek şekilde yerleştirildi. Toynak membranı deney için hazırlandıktan sonra diyaliz membran gibi alıcı ve verici kompartman arasına yerleştirildi. İki odacığın birbirine sıkı/sızdırmaz şekilde teması parafilm aracılığıyla sağlandı. Hazırlanan bijeller, insülin enjektör yardımı ile difüzyon hücresinin verici odacığına yerleştirildi. Alıcı odacığın karışması için uygun boyutlu magnet kullanıldı. Sink koşulun sağlanması için her örnek alma zamanında alıcı odacıktaki tüm sıvı alındı. Yerine taze pH 7,4 fosfat tamponu kondu. Ayrıca etkin madde doygunluk çözünürlüğünden (C_s) hareketle her zaman aralığındaki çözünürlük ile ($C_t < 0,15C_s$) ortamda sink koşulun sağlandığı kontrol edildi. Örneklerdeki siklopiroks ve üre HPLC’de uygun seyreltmeler yapılarak analiz edildi.

Ex-vivo permeasyon çalışması sonucunda zamana karşılık alıcı odacığa geçen etkin madde (miktar, %, miktar/alan) saptandı ve grafiğe geçirildi. Sonra varsa gecikme süresi (TL), akı (J_s) hesaplandı. Akı (mg/saat/cm²) hesabı için alıcı odacığa geçen etkin madde miktarının (mg/cm²) zamana (saat) karşı regresyonu yapıldı. Permeabilite de (cm/saat) Eş. 3.7 kullanılarak hesaplandı [124, 148]. Çalışmalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

$$M = S \cdot C_d \cdot D \cdot K \cdot t / h \quad (3.7)$$

M = Zardan geçen miktar (mg)

S = membranın alanı (cm²) C_d = Etkin maddenin verici odacıktaki konsantrasyonu (mg/cm³)D = Etkin maddenin membran içindeki difüzyon katsayısı (cm²/saat)

K = Etkin maddenin membran ile verici odacık arasındaki partiyon katsayısı

t = saat

h = Membran kalınlığı (cm)

Permeabilite (cm/saat) = D.K/h

Dokulardan etkin madde tayini

a. Penetrasyon çalışması sonunda deriler küçük küçük kesilip etanolde 24 saat, 8 °C’ de bekletildi. Santrifüjlendikten sonra süpernatant alındı, HPLC’de dokuda biriken siklopiroks ve üre miktarı analiz edildi.

b. Toynaktaki keratin yapının tam degradasyonu için membranlar 24 saat 25 °C’de distile suda bekletildi. 24 saatin sonunda etkin maddenin çözünmesi için metanol eklendi. Utraturrax ile homojenize edildi. 12 000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan toynakta biriken Siklopiroks ve üre miktarı HPLC’de analiz edildi.

3.2.8. Bijel formülasyonlarının toynağı şişirme derecesinin tespiti

Formülasyonun toynağı şişirme derecesi sadece optimum formülasyonlarda tayin edildi. Bu çalışmada ex-vivo permasyon çalışmaları için hazırlanan toynak membranları kullanıldı. Toynak membranları -80 °C’den alındıktan sonra oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 48 saat etüvde (40 °C) bekletildi ve içindeki suyun uçması sağlandı. Tartıldı. Sonra optimum olarak seçilen formülasyonların içine gömüldü ve 24 saat 32 °C’de bekletildi. Bu süre sonunda distile su ve etanol ile temizlenip, tekrar tartıldı. Toynaktaki ağırlık artışı hesaplandı [55, 62, 189] (Eş. 3.8).

$$\% \text{ Artış} = 100 * (T_{24} - T_0) / T_0 \quad (3.8.)$$

T_{24} =24 saatin sonunda toynak membranının ağırlığı

T_0 =Kurutma sonrası toynak membranının ağırlığı

$T_{24}-T_0$ =Ağırlık artışı

3.2.9. Bijel formülasyonlarında bekletilen toynakların SEM görüntüsü

Optimum bijel formülasyonlarında toynak membranları 24 saat bekletildi. Sürenin sonunda toynak membranları distile su ile yıkandı ve kurulandı. Bilkent-UNAM’da formülasyonda

bekletilen ve bekletilmeyen toynakların görüntüsü alındı. Toynak membranında değişim ve bulunan porların genişleyip genişlemediği kontrol edildi.

3.2.10. Bijel formülasyonlarında in-vitro antifungal aktivite çalışmaları

Bu çalışmalar iki aşamalı olarak gerçekleştirildi.

1.çalışma.....Sterilite çalışması

2.çalışma.....Antifungal aktivite çalışması

1.çalışma formülasyonlar hazırlanırken formülasyonlara herhangi bir mantar kontaminasyonu olup olmadığını tespit etmek için yapıldı. Bir bulaşma olmadığı ispatlandıktan sonra formülasyonlar için antifungal aktivite çalışması gerçekleştirildi.

Bu çalışmalar Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji ABD’da proje ekibimizde bulunan Prof. Dr. Berrin Özçelik ve Arş. Gör. Gülbeyaz Altunboğa tarafından gerçekleştirildi.

Sterilite çalışması: Bu çalışma agar dilüsyon yöntemi ile yapıldı ve maya benzeri funguslardan; *Candida albicans* (ATCC* 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC* 90028) ve *C. krusei* (ATCC* 6258) kullanıldı. Dermatofitlerden, *Trichophyton rubrum* (RSKK* 486), *Epidermophyton floccosum* (RSKK* 3027) ve *Microsporum canis* (NCPF* 637) kullanıldı. Sterilite çalışmasında kullanılan örnekler Çizelge 3.12’de verildi.

Agar dilüsyon metodunda Nutrient Agar (NA), besiyeri kullanıldı. Besiyeri çözeltisi otoklavda (121 °C’de 15 dk) sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Besiyerine (10 ml) 45–50 °C’de ısıtıcıli manyetik karıştırıcı kullanılarak etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonların etanoldeki çözeltileri değişik seyreltme oranlarında (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) ilave edildi (Resim 3.8). Hazırlanan formülasyonları ve ilgili mikroorganizmaları içeren besiyerleri petri kutularına döküldü ve donması için oda sıcaklığında bekletildi. Bunlar sonra 37 °C’deki etüve yerleştirildi (Resim 3.9). Kontrol grubu olarak, formülasyon içermeyen sadece mikroorganizma olan besiyeri içeren petri kutuları kullanıldı. Üremenin olup olmadığı, mayalar için 48 saat ve dermatofitler için ise önerilen 48-72 saat bekletme sonrasında makroskopik olarak belirlendi.



Resim 3.7. Dilüsyonların yapıldığı petriler



Resim 3.8. Üremenin olup olmadığının kontrolü için etüvde bekletilen örnekler

Çizelge 3.12. Sterilite çalışmasında kullanılan örnekler

Örnekler	Siklopiroks (%)	Üre (%)
1 B1 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
2 B5 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
3 B8 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
4 B1*	1	20
5 B5*	1	20
6 B8*	1	20
7 Üre çözeltisi	-	20
8 Siklopiroks çözeltisi	1	-
9 Üre +Siklopiroks çözeltisi	1	20

*etkin maddeleri içeren formülasyonlar

Antifungal aktivite çalışması:

Bu çalışmada maya benzeri funguslardan; *Candida albicans* (ATCC* 10231) ve dermatofitlerden, *Trichophyton rubrum* (RSKK* 486) kullanıldı (*RSKK, NCPF (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu, National Collection of Pathogenic Fungi, ATCC; American type culture collection).

Antimikotik aktivite testinde, mikroorganizmaların üretilmelerinde ve dilüsyonların hazırlığında, Sabouraud sıvı ortam, Sabouraud Dextrose Agar, folin propansülfonik asit ve tamponlanmış hücre kültürü ortamı (RPMI 1640) kullanıldı.

Antifungal aktivite çalışması, minimum inhibisyon bölgesi ölçümü ile gerçekleştirildi. Bu çalışma “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” tarafından bildirilen referans yöntem esas alınarak “Silindir Agar Diffüzyon Yöntemi” ile yapıldı [190-192]. Antifungal aktivitesi incelenecek örnekler Çizelge 3.13’te verildi.

Çizelge 3.13. Silindir-agar difüzyon yönteminde kullanılan örnekler

Örnekler	Siklopiroks (%)	Üre (%)
1 B1 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
2 B5 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
3 B8 (Etkin maddeleri içermeyen)	-	-
4 B1*	1	20
5 B5*	1	20
6 B8*	1	20
7 Üre çözeltisi	-	20
8 Siklopiroks çözeltisi	1	-
9 Üre +Siklopiroks çözeltisi	1	20
10 Ticari ürün (cila)	8	-
11 Ticari ürün (krem)	1	-

*etkin maddeleri içeren formülasyonlar

Antifungal etkinlik çalışması için ATCC (American Type Culture Collection) ve RSKK'ya (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu) ait referans suşlar kullanıldı. Bu amaçla tırnak ve deri mantarı hastalığına neden olan temel mikroorganizmalardan, maya-benzeri bir mantar olan *Candida albicans* ATCC 10231 ve bir dermatofit olan *Trichophyton rubrum* RSKK 486 seçildi.

Öncelikle ilgili mikroorganizmaların kültür süspansiyonları oluşturuldu [193]. Bu amaçla mantar ve dermatofitin üretilmesi için Sabouraud's Liquid Medium ve L-glutamin içeren RPMI 1640 broth (0,165 M morfolinpropan sülfonik asit, pH 7) kullanıldı. İnokulum amaçlı koloni süspansiyonları CLSI kriterlerine göre, süspansiyon yoğunluğu 10^4 ve 10^5 CFU/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan koloni süspansiyonları daha sonra katı besiyeri içeren petri kaplarına steril eküvyon çubuğu kullanılarak yaygın ekim ile ekildi. *Candida albicans* için katı besiyeri olarak Sabouraud's Dekstroz Agar (SDA); *Trichophyton rubrum* için ise Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanıldı. Mikroorganizmalar besiyerine ekildikten sonra, sterilize edilmiş porselen silindirler birbirlerinden ve petri çeperinden eşit uzaklıkta olacak şekilde besiyeri yüzeyine yerleştirildi. İncelenecek formülasyonlar ve ticari ürünler herhangi bir çözücü ile seyreltilmeden kullanıldı. İncelenecek her bir sistem enjektöre çekildi ve silindirlerin katı besiyerine temas eden yüzeyini tümüyle örtecek şekilde porselen silindirlere (1 mL) ilave edilip, petriler inkübasyona bırakıldı. *Candida albicans* için 28 °C' de 7-14 gün (ortalama 10 gün-

inkübasyon süresi); *T. Rubrum* için 28 °C’de 15–20 gün (inkübasyon süresi) sonra oluşan inhibisyon zon çapları kumpas kullanılarak mm olarak ölçüldü. Çalışmanın başında her petriye 6 silindir yerleştirildi (Resim 3.10). Ancak daha sonra bazı petrilerde beklenenden daha yüksek inhibisyon zonunun oluşması nedeniyle zon çaplarının birbiri ile girişim yaptığı gözlemlendi. Bu nedenle bu çalışmalar tekrarlandı ve yeni çalışmalarda 3 porselen silindir kullanıldı (Resim 3.11).



Resim 3.9. Petri kutusuna yerleştirilen 6 porselen silindir



Resim 3.10. Petri kutusuna yerleştirilen 3 porselen silindir

3.2.11. Bijel formülasyonlarında in-vitro sitotoksisite çalışmalar

Bijel formülasyonlarının hücre uyumluluğunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testidir [136, 147, 194]. MTT testi, hücredeki metabolik fonksiyonların değerlendirilerek hücre canlılığının kolorimetrik olarak belirlendiği standart bir testtir. Bu yöntemde, hücreler oksidoredüktaz enzimleri aracılığı ile sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT boyasını indirgeyerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana dönüştürür. Formazan yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görüldüğünden oluşan rengin şiddeti hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmektedir.

Çalışmada bu açıdan incelenen gruplar Çizelge 3.14'te verildi.

Bu çalışmada hücre canlılığının değerlendirilmesi için insan keratinosit hücre hattı (HaCaT, ATCC) kullanıldı [147]. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD'da Doç. Dr. Esra EMERCE tarafından gerçekleştirildi.

Çalışmada, hücreler %10 FBS (fetal bovine serum), %1 antibiyotik (10000 U/mL penisilin – 10 mg/mL streptomisin), %1 L-glutamin ile zenginleştirilmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içerisinde 37 °C'de, %5 CO₂ ve nemli ortam koşulları altında çoğaltıldı. Yeterince çoğalan hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile ilgili kaptan alındı. Tripan mavisinin kullanıldığı yöntem ile hücre sayımı yapıldı. Bu yöntemde özetle, hücreler 1:1 oranında %4'lük tripan mavisi ile karıştırıldı ve Neubauer lamında sayım yapılarak ölü ve canlı hücreler sayılarak mL başına canlı hücre sayısı hesaplandı. Ardından MTT testi için 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa 6000 hücre ekildi. Flaskın %70'ini kapsayacak düzeyde büyüme sağlandığında Çizelge 3.14'te verilen formülasyonların çözeltileri (1:10 dilüsyon-DMSO ile) hücrelerle muamele edildi (seyreltme-1:100).

Çizelge 3.14. İn-vitro sitotoksisite çalışmalarında kullanılan formülasyonlar

Formülasyon	Kullanılan formülasyonlar
1	B1*
2	B5*
3	B8*
4	B1 (etkin maddeleri içermeyen)
5	B5 (etkin maddeleri içermeyen)
6	B8 (etkin maddeleri içermeyen)
7	Üre çözeltisi
8	Siklopiroks çözeltisi
9	Siklopiroks + üre çözeltisi
10	Ticari krem
11	Ticari cila

*etkin maddeleri içeren formülasyonlar

Deney tasarımına negatif kontrol DMSO (%0,2) ve pozitif kontrol de MTT testinde hücrelerde sitotoksisite gösteren ajan olan doksorubisin (0,3/1/3/10 μ M) seçildi ve tüm hücreler 48 saat test maddelerine maruz bırakıldı. Süre sonunda maddeler uzaklaştırıldı ve besiyeri tazelenerek 50 μ l MTT çözeltisi (1g/L) eklendi. Ardından hücreler 3 saat inkübe edildi ve DMSO ile oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanarak mikropalak okuyuculu spektrofotometrede 570 nm'de absorbans değerleri okundu. Deney 3 kez tekrarlandı, her deneyde üçer örnek olacak şekilde çalışıldı (n=9). Negatif kontrol grubuna ait absorbans değerleri %100 kabul edilerek % hücre canlılığı hesaplandı. Doksorubisin için IC₅₀ değeri hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirmelerde GraphPad Prism (GraphPad Prism 7.0.0, GraphPad Software Inc., ABD) yazılımı kullanıldı. % hücre canlılığına ait tanımlayıcı veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi. Kontrole karşı test edilen maddelerin karşılaştırması student t test ile yapıldı. Pozitif kontrolün IC₅₀ hesaplaması doğrusal olmayan regresyon ile belirlendi. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak alındı [137, 147].

3.2.12. Stabilité çalışmaları

Bijel formülasyonları ICH kılavuzuna uygun olarak stabilité çalışması için 25 °C / %60 bağıl nem, 40 °C / %75 bağıl nem ve 4 °C / ortam nemi şartlarını sağlayan iklim

dolaplarında ağızları kapatılarak 3 ay süreyle bekletildi. 4 °C / ortam nemi koşulundaki örneğimizi içeren soğutucunun bozulmasından ve bu durumdan geç haberimiz olmasından dolayı bu koşulda stabilite çalışması gerçekleştirilemedi. Formülasyonlar görünüş, pH, viskozite ve miktar tayini açısından incelenerek stabiliteleri değerlendirildi.



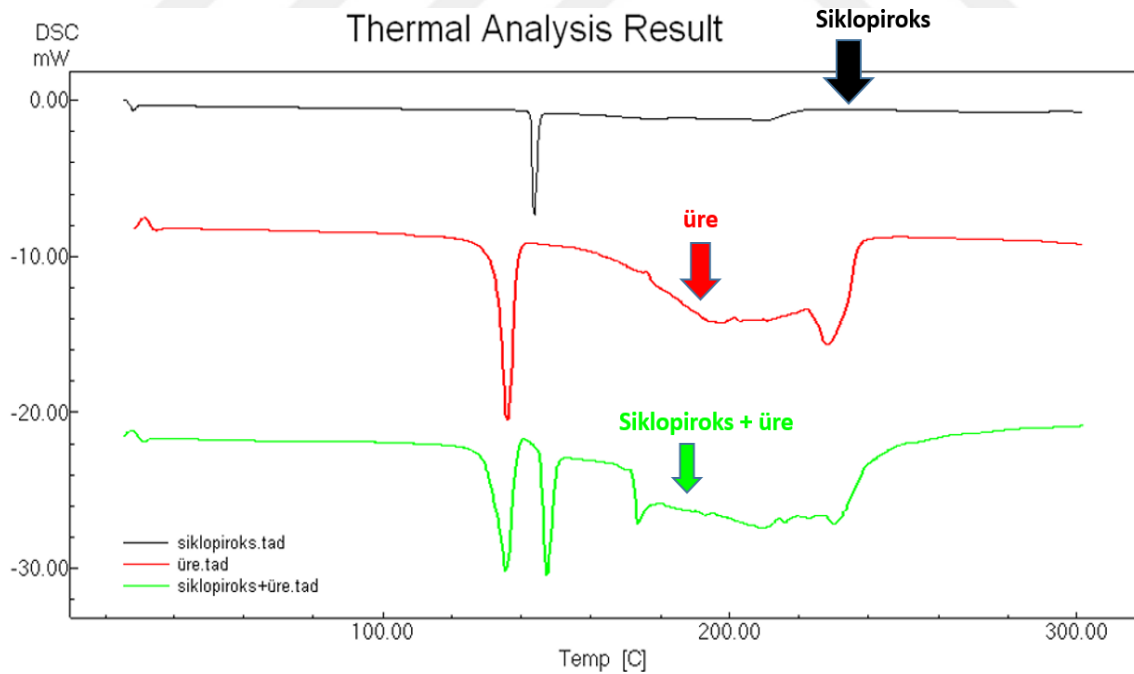


4. BULGULAR

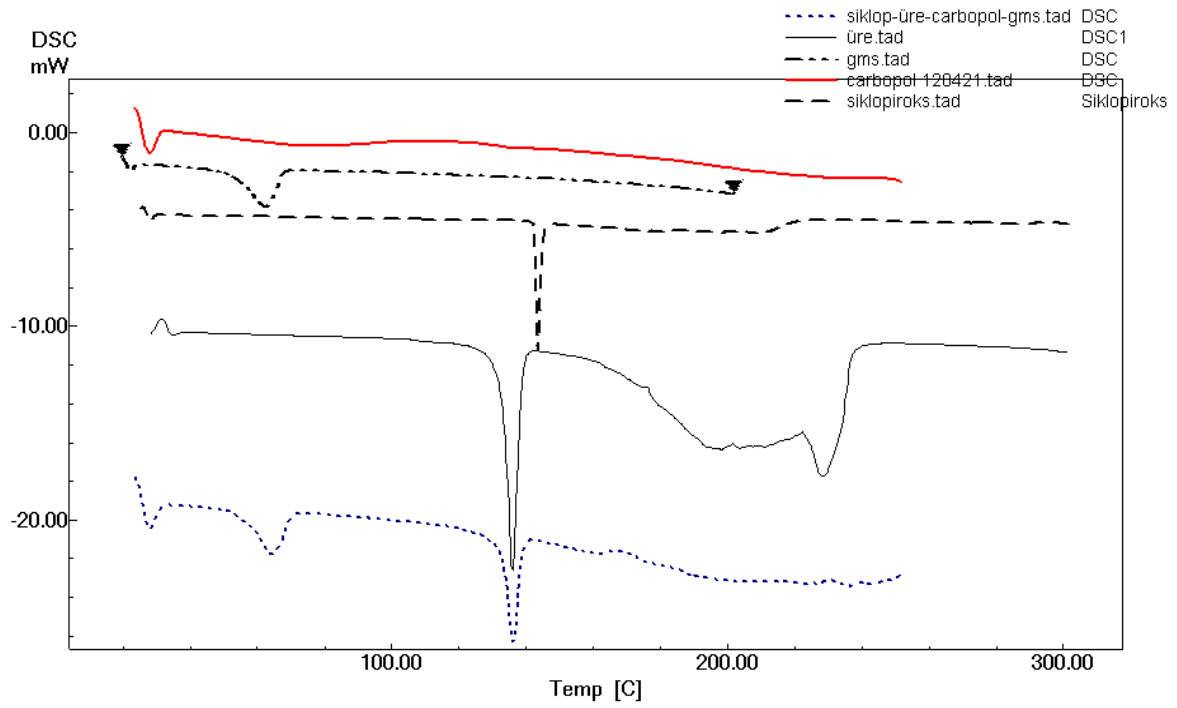
4.1. Siklopiroks ve Ürenin Fizikokimyasal Özelliklerin Belirlenmesine Ait Bulgular

4.1.1. Siklopiroks ve ürenin erime noktası tayini

Siklopiroksun ve ürenin erime derecesi tayini Bölüm 3.2.2’ de anlatıldığı gibi diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) aleti kullanılarak yapıldı. Siklopiroksun ve ürenin DSC termogramı Şekil 4.1’ de gösterildi. 143 °C’ de görülen endotermik pik siklopiroksun, 138 °C’de görülen endotermik pik ürenin erime derecesini göstermektedir. Etkin maddelerin formülasyonda kullanılacak diğer yardımcı maddeler ile bir etkileşime girip girmediğine erime derecelerinin değişip değişmediğine göre karar verilmektedir. Şekil 4.2’ de yardımcı maddeler ile etkin maddeler arasında bir etkileşim olmadığı ispatlandı. Erime derecelerinde herhangi bir kayma görülmemektedir.



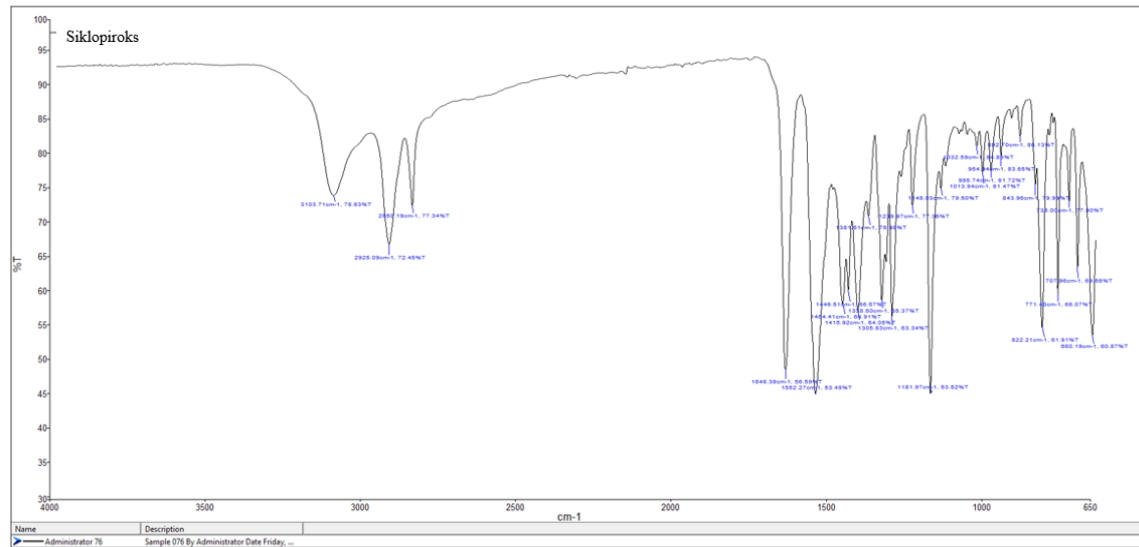
Şekil 4.1. Siklopiroks ve ürenin erime derecesi tayini



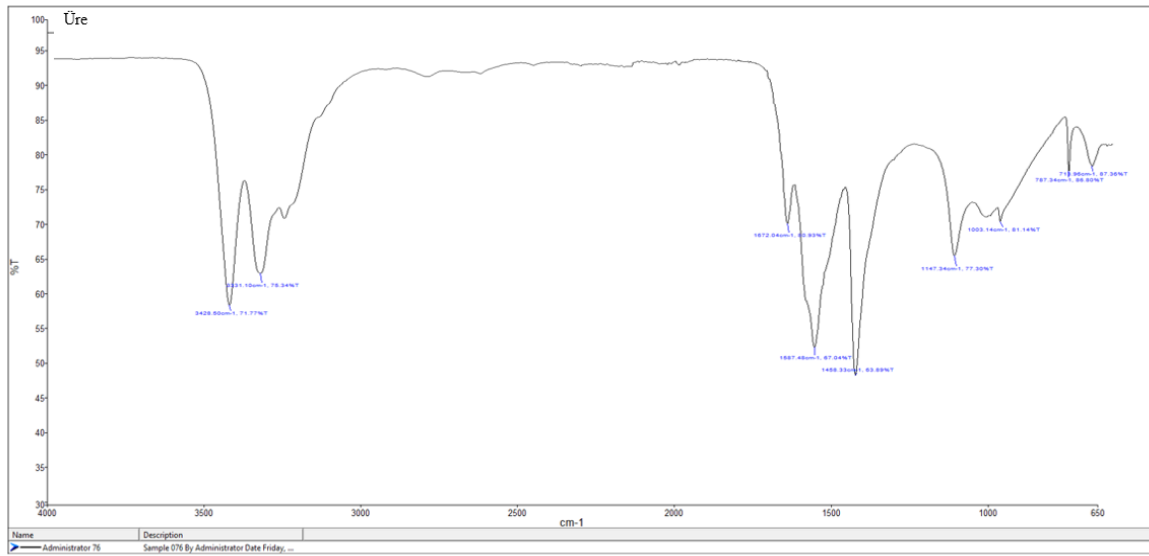
Şekil 4.2. Ekin maddeler ve formülasyondaki diğer maddelerin DSC termogramları

4.1.2. Siklopiroks ve ürenin FTIR spektrumu

Fourier transform infrared (FTIR) spektrumu, Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Siklopiroks ve ürenin spektrumu Şekil 4.3 - 4.4’te verildi.



Şekil 4.3. Siklopiroksun IR spektrumu



Şekil 4.4. Ürenin IR spektrumu

4.1.3. Siklopiroks ve ürenin çözünürlük çalışmalarına ait bulgular

Siklopiroksun 25 °C ve 32 °C’de su ve pH 7,4 tamponda çözünürlük çalışması Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. 25 °C ve 32 °C’de su ve pH 7,4 tampondaki çözünürlüğüne ait ortalama konsantrasyon ve SS değerleri Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. Siklopiroksun çözünürlük değerleri

Ortam	25 °C	32 °C
Su (µg/mL ± SS)	197,98 ± 0,35056	199,12 ± 0,32
pH 7,4 tampon (µg/mL ± SS)	352,586 ± 0,3058	351,019 ± 0,3051

Ürenin 25 °C’de sudaki çözünürlük çalışması Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Ürenin 25 °C’de sudaki çözünürlüğü 1,9 g/mL olarak bulundu.

4.1.4. Partisyon katsayısının belirlenmesine ait bulgular

Siklopiroksun partisyon katsayısı Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi 25 °C’de yapıldı. Çalışmada örnek alınan zaman noktalarında siklopiroksun su fazında olan miktarı Çizelge 4.2’de verildi. Değerler 12. saatten sonra neredeyse sabit olduğu için 24. saatteki

konsantrasyonu esas alınarak K değeri bulundu. Geri kalan siklopiroks da oktanol içerisinde dağıldı. Siklopiroksun oktanol/su partiyon katsayısı 2,2 olarak bulundu.

Çizelge 4.2. Siklopiroksun su fazında kalan miktarı

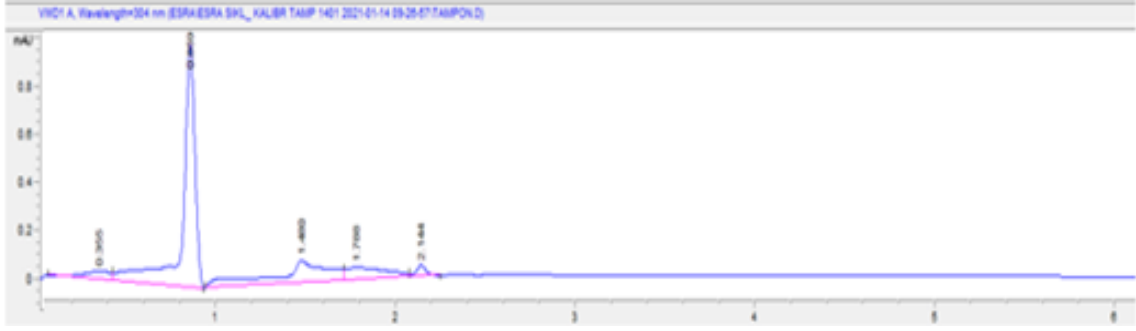
Zaman (sa)	Siklopiroks konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SS}$)
0	$190 \pm 0,004$
1	$2,41 \pm 0,002$
2	$2,44 \pm 0,008$
4	$2,21 \pm 0,024$
6	$2,07 \pm 0,089$
8	$2,03 \pm 0,002$
12	$1,51 \pm 0,004$
24	$1,40 \pm 0,002$

4.2. Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyon Bulguları

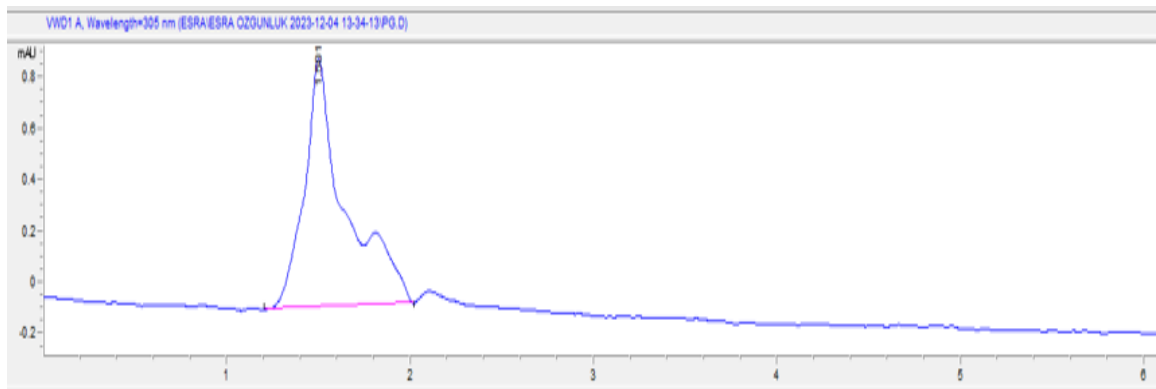
4.2.1. Siklopiroksun HPLC analiz yöntemine ait bulgular

Özgünlük-seçicilik

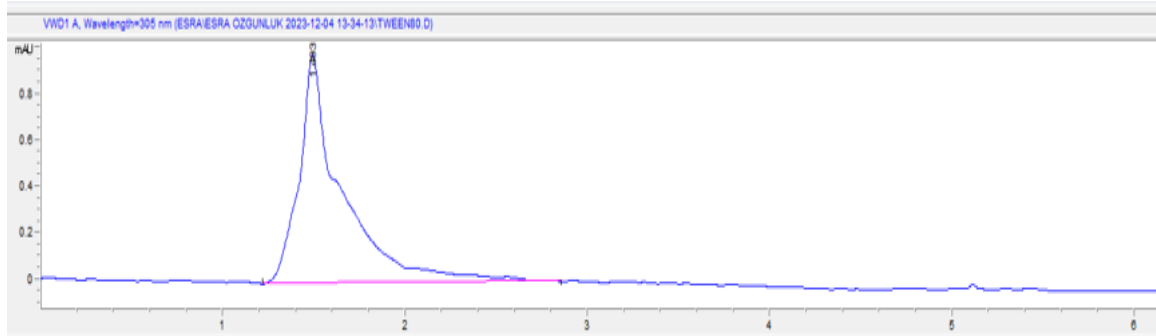
Bölüm 3.2.3'te anlatılan HPLC ile miktar tayini yönteminin siklopiroksa özgü ve seçici olduğu Şekil 4.5-4.8'de gösterildi. Bu çalışma kapsamında formülasyonlarımızda olup suda/pH 7,4 fosfat tamponunda çözünebilen sadece propilen glikol ve Tween 80 için de inceleme yapıldı. Karbopol 974P büyük moleküllü olması nedeniyle ne in-vitro çalışmada kullanılan diyaliz membrandan ne de ex-vivo çalışmada sıçan sırt derisinden geçemeyeceği için bu madde incelemeye alınmadı.



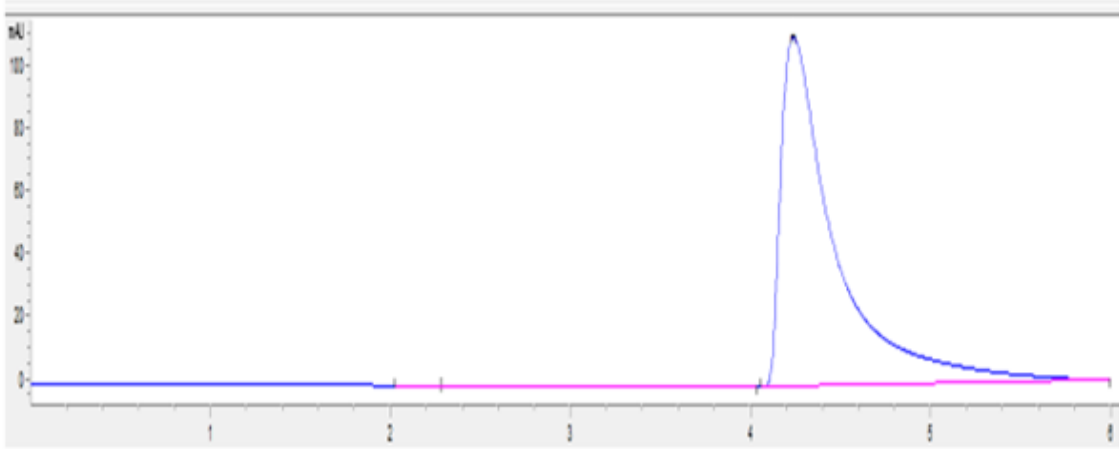
Şekil 4.5. pH 7,4 tampon ortamına ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.6. Propilen glikole ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.7. Tween 80'e ait HPLC kromatogramı



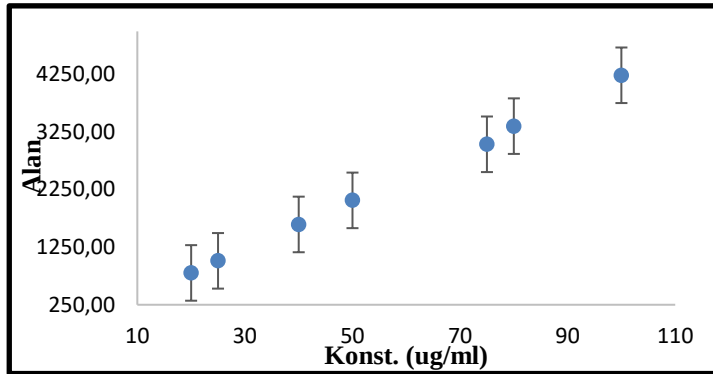
Şekil 4.8. Siklopiroksun (50 µg/mL) pH 7,4 tampon ortamındaki HPLC kromatogramı

Doğrusallık

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi HPLC ile siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki miktar tayininin doğrusallık çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9'de gösterildi.

Çizelge 4.3. Siklopirokse ait kalibrasyon verileri

Kons. (µg/ml)	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ort alan	SS	%B. S	SH
100	4254	4259	4200	4238	32,9	0,78	19,01
80	3274	3388	3400	3354	69,5	2,07	40,14
75	3014	3011	3091	3038	45,3	1,49	26,15
50	2094	2046	2052	2064	25,7	1,25	14,85
40	1628	1666	1644	1646	19,4	1,18	11,17
25	1001	1025	1013	1013	12,0	1,18	6,93
20	805,3	800,2	804,5	803,3	2,7	0,34	1,58



Eğim	42,58
Eğimin Std. Hatası	0,66
Kesişim	62,3
Kesişimin Std. Hatası	41,61
r^2	0,999
Regresyonun Std. Hatası	49,2

Şekil 4.9. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle kalibrasyon doğrusu ($n=3$, $\text{ort} \pm \text{SS}$, $y=42,58x-62,3$)

Deney içi kesinlik

HPLC ile miktar tayini yönteminin tekrarlanabilir olup olmadığını tayin etmek amacıyla yapıldı. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki deney içi kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar Çizelge 4.4’te verildi.

Çizelge 4.4. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda deney içi kesinlik sonuçları

Örnek no	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan derişim ($\mu\text{g/mL}$)
1	100	101,8
2	100	101,6
3	100	101,8
4	100	99,00
5	100	101,8
6	100	101,9
7	100	101,9
8	100	101,4
9	100	101,3
10	100	100,5
Ortalama		101,3
SS		0,93
%BS		0,92
SH		0,53

Deneyler arası kesinlik

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi siklopiroksun 3 farklı konsantrasyonda pH 7,4 fosfat tamponunda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.5'te verildi. Çizelge 4.5'teki veriler kullanılarak yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda $p > 0,05$ bulundu güven sınırları içinde ortalamalar arası farkın önemli olmadığı sonucuna varıldı.

Çizelge 4.5. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda deneyler arası kesinlik sonuçlar

Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	1.Gün- Hesaplanan derişim	2.Gün- Hesaplanan derişim	3.Gün- Hesaplanan derişim	Ortalama	S. S	% B. S	SH
100	101,8	101,3	100,5	101,2	0,63	0,62	0,36
80	79,3	80,1	80,4	79,9	0,5	0,74	0,34
50	50,6	50,5	50,4	50,5	0,09	0,19	0,056

Duyarlılık ve saptama sınırı

Siklopiroksun miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) ve saptama sınırı (LOQ) hesaplandı. Analitik yöntemin duyarlılık sınırı $0,12 \mu\text{g/mL}$, saptama sınırı ise $0,35 \mu\text{g/mL}$ 'dir.

Doğruluk ve geri elde

Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları Çizelge 4.6'da verildi.

Çizelge 4.6. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları

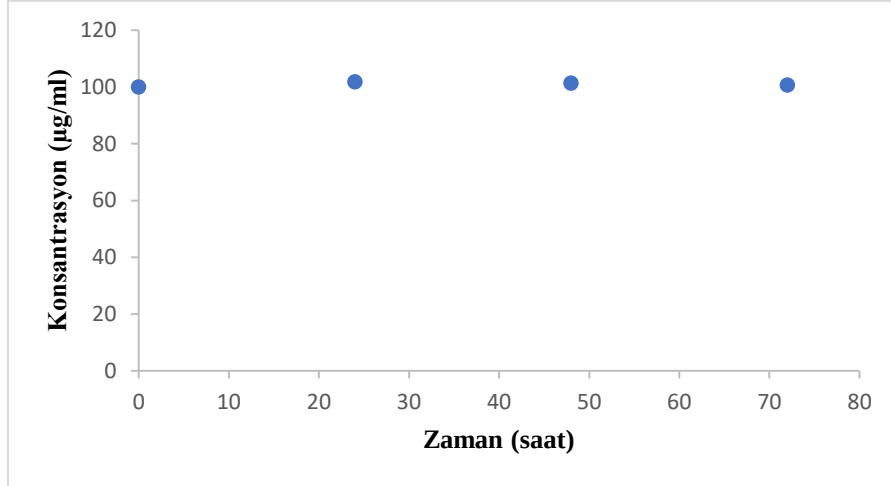
Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	% Geri elde	X _{ort}	S. S	% B. S	SH
100	101,8 101,9 102,1	101,9	101,9	0,126	0,124	0,073
50	50,6 50,8 50,9	101,5	50,7	0,149	0,295	0,086
25	25,04 25,08 25,0	99,8	25,0	0,036	0,145	0,021

Stabilite

Siklopiroksun stabilitesi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi 25 °C'de 72 saat ve 70 °C'de 3 saat boyunca bekletilerek incelendi. Örnekler belirlenen zaman noktalarında alındı ve her bir nokta için konsantrasyon değerleri hesaplandı. Her iki sıcaklıkta da siklopiroksun konsantrasyonunda önemli bir değişiklik olmadı (Çizelge 4.7-4.8 ve Şekil 4.10-4.11).

Çizelge 4.7. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C' deki stabilite sonuçları

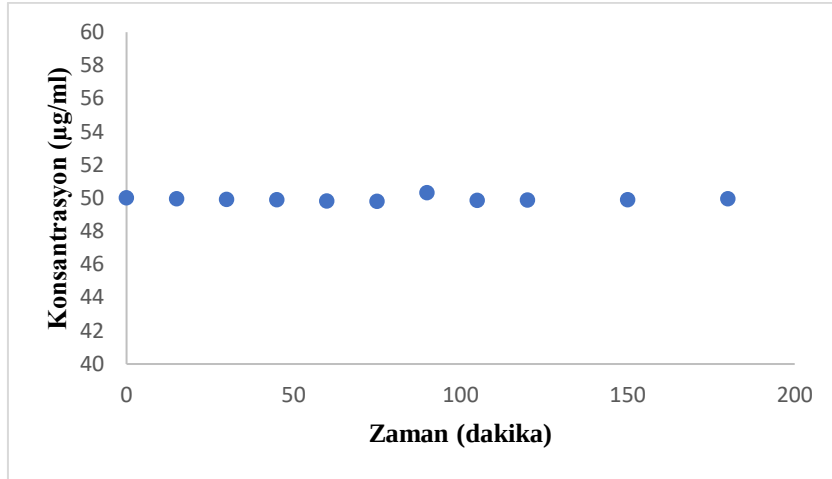
Zaman (saat)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	X _{ort}	S. S	% B. S	SH
24 saat	100	101,8	101,23	0,6	0,59	0,34
48 saat		101,3				
72 saat		100,6				



Şekil 4.10. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C’ deki stabilite grafiği

Çizelge 4.8. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C’ deki stabilite sonuçları

Zaman (dk.)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	X_{ort}	S. S	% B. S	SH
0	50	50,0	49,9	0,1	0,28	0,1
15		49,9				
30		49,9				
45		49,9				
60		49,8				
75		49,8				
90		50,3				
105		49,9				
120		49,8				
150		49,9				
180		50,0				

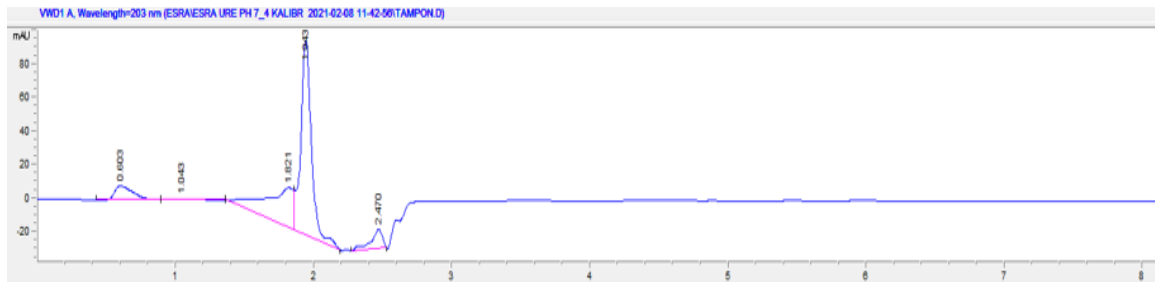


Şekil 4.11. Siklopiroksun pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C’ deki stabilite grafiği

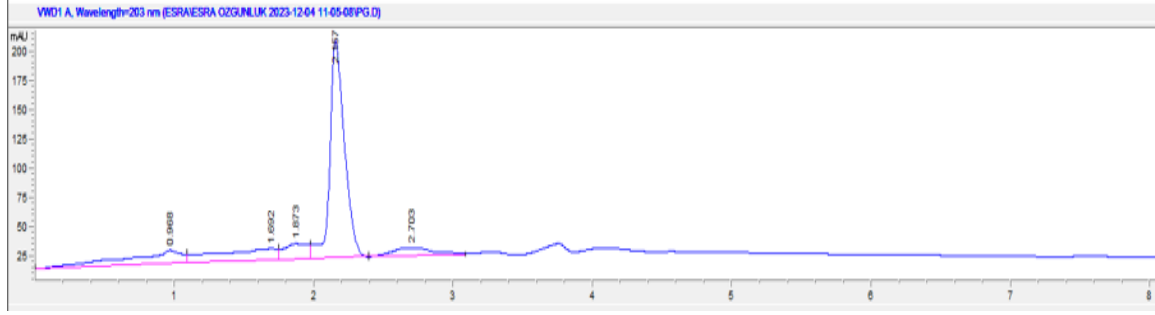
4.2.2. Ürenin HPLC analiz yöntemine ait bulgular

Özgünlük-seçicilik

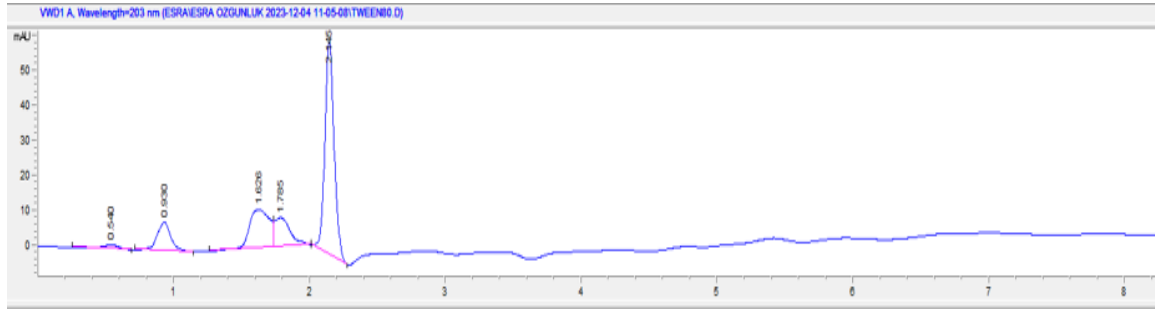
Bölüm 3.2.4’te anlatılan HPLC ile miktar tayini yönteminin üreye özgü ve seçici olduğu Şekil 4.12-4.15’te gösterildi. Bu çalışma kapsamında formülasyonlarımızda olup suda/pH 7,4 fosfat tamponunda çözünebilen sadece propilen glikol ve Tween 80 için inceleme yapıldı.



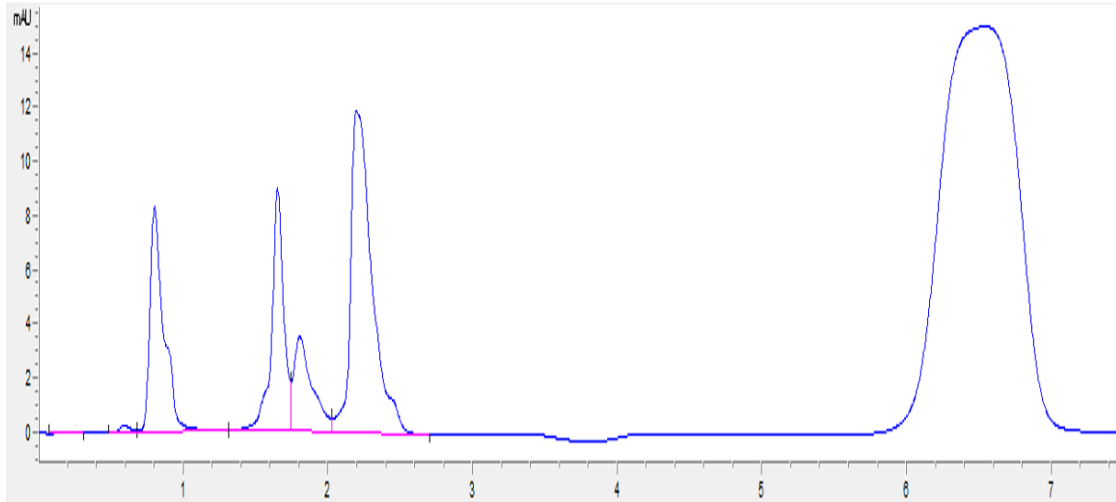
Şekil 4.12. pH 7,4 tampon ortamına ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.13. Propilen glikole ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.14. Tween 80'e ait HPLC kromatogramı



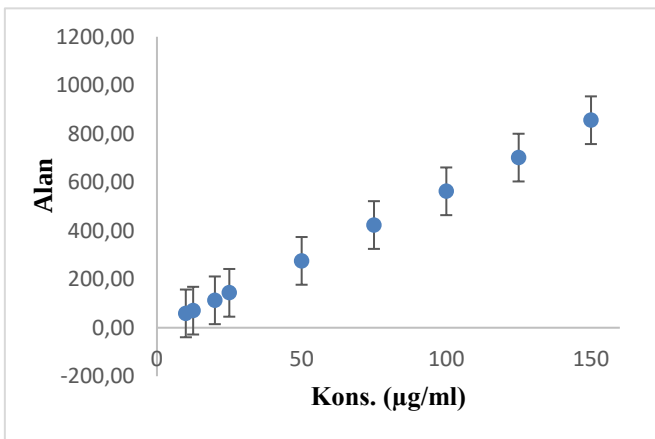
Şekil 4.15. Ürenin (100 µg/mL) pH 7,4 tampon ortamındaki HPLC kromatogramı

Doğrusallık

Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi HPLC ile ürenin pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki miktar tayininin doğrusallık çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.16'da gösterildi.

Çizelge 4.9. Üreye ait kalibrasyon verileri

Kons. (µg/ml)	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Ort alan	SS	%B.S	SH
10	60,3	59,4	57,8	59,16	1,26	2,1	0,73
12,5	72,4	69,4	69,5	70,43	1,70	2,4	0,98
20	114,4	114,7	110,3	113,1	2,45	2,1	1,42
25	148,4	142,1	141,4	143,9	3,85	2,6	2,23
50	275,7	274,1	277,4	275,7	1,67	0,6	0,96
75	429,1	421	420,6	423,6	4,7	1,13	2,77
100	573,6	560,5	553,9	562,6	10,02	1,78	5,79
125	687,4	718,8	698,7	701,6	15,9	2,2	9,18



Eğim	5,6
Eğimin Std. Hatası	0,0248
Kesişim	1,369
Kesişimin Std. Hatası	1,64
r^2	0,999
Regresyonun Std. Hatası	2,86

Şekil 4.16. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda HPLC yöntemiyle kalibrasyon doğrusu ($n=3$, $\text{ort} \pm \text{SS}$, $y=5,6x+1,369$)

Kesinlik

Deney içi kesinlik

HPLC ile miktar tayini yönteminin tekrarlanabilir olup olmadığını tayin etmek amacıyla yapıldı. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki deney içi kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar Çizelge 4.10'da verildi.

Çizelge 4.10. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda deney içi kesinlik sonuçları

Örnek no	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan derişim ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	10,46
2	10	10,51
3	10	10,48
4	10	10,49
5	10	10,33
6	10	10,35
7	10	10,48
8	10	10,44
9	10	10,46
10	10	10,47
Ortalama		10,45
SS		0,58
%BS		0,56
SH		0,033

Deneyler arası kesinlik

Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi ürenin 3 farklı konsantrasyonda pH 7,4 fosfat tamponunda yapılan deneyler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.11'de verildi. Çizelge 4.11'deki veriler kullanılarak yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda $p > 0,05$ bulundu güven sınırları içinde ortalamalar arası farkın önemli olmadığı sonucuna varıldı.

Çizelge 4.11. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda deneyler arası kesinlik sonuçlar

Derişim (µg/ml)	1.Gün- Hesaplanan derişim	2.Gün- Hesaplanan derişim	3.Gün- Hesaplanan derişim	Ortalama	S. S	% B. S	SH
5	5,13	5,09	5,04	5,09	0,047	0,93	0,027
10	10,43	10,33	10,35	10,37	0,052	0,50	0,03
12,5	12,30	12,27	12,28	12,28	0,015	0,12	0,008

Duyarlılık ve saptama sınırı

Ürenin miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) ve saptama sınırı (LOQ) hesaplandı. Analitik yöntemin duyarlılık sınırı 0,47 µg/ml, saptama sınırı ise 1,43 µg/ml'dir.

Doğruluk ve geri elde

Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları Çizelge 4.12'de verildi.

Çizelge 4.12. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda doğruluk ve geri elde sonuçları

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	% Geri elde	X _{ort}	S. S	% B. S	SH
50	48,99 48,7 49,29	98	48,99	0,3	0,6	0,17
100	102,1 99,84 98,66	102,3	100,23	0,179	1,78	1,03
150	153,23 154,27 150,23	101,7	152,58	2,0	1,37	1,2

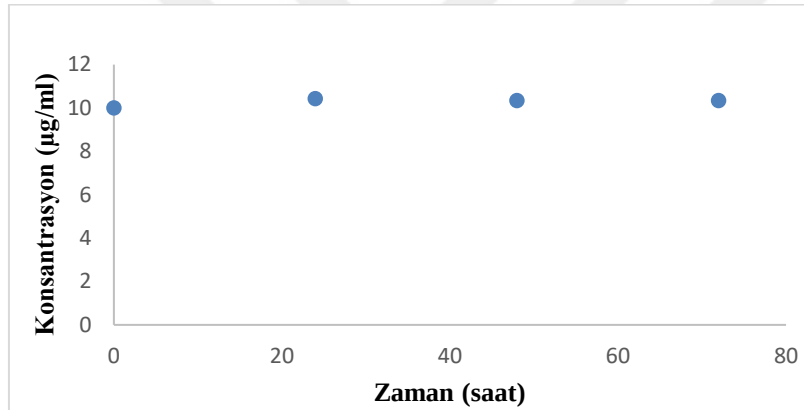
Stabilite

Ürenin stabilitesi Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi 25 °C'de 24 saat ve 70 °C'de 3 saat boyunca bekletilerek incelendi. Örnekler belirlenen zaman noktalarında alındı ve her bir

nokta için konsantrasyon değerleri hesaplandı. Her iki sıcaklıkta da ürenin konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik olmadı (Çizelge 4.13-4.14 ve Şekil 4.17-4.18).

Çizelge 4.13. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C’ deki stabilite sonuçları

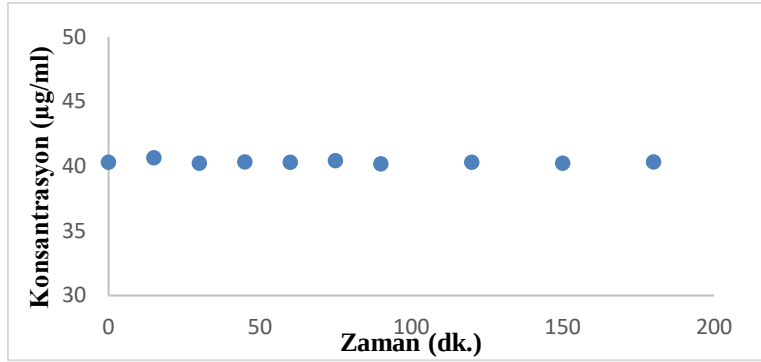
Zaman (saat-gün)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	X_{ort}	S. S	% B. S	SH
0-24 saat (1.gün)	10	10,43	10,37	0,05	0,5	0,028
24-48 saat (2.gün)		10,34				
48-72 saat (3.gün)		10,36				



Şekil 4.17. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 25 °C’ deki stabilite grafiği

Çizelge 4.14. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C’ deki stabilite sonuçları

Zaman (dakika)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	X_{ort}	S. S	% B. S	SH
0	40	40,2	40,3	0,13	0,33	0,078
15		40,6				
30		40,2				
45		40,3				
60		40,2				
75		40,4				
90		40,1				
120		40,2				
150		40,2				
180		40,3				



Şekil 4.18. Ürenin pH 7,4 fosfat tamponunda 70 °C’ deki stabilite grafiği

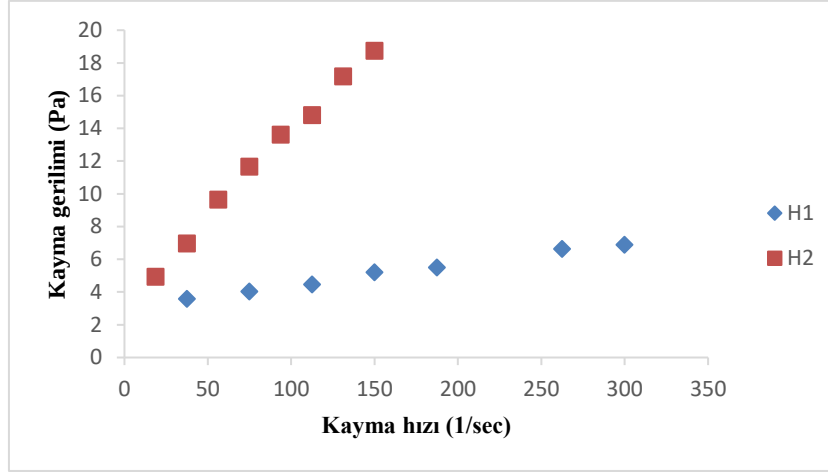
4.3. Hidrojel, Organojel ve Bijel Formülasyonların Geliştirilmesi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Bu bölümde sadece deney tasarımında kullanılan hidrojel (H1 ve H2), organojel (O1 ve O2) ve optimum bijel (B1, B5 ve B8) formülasyonlarına ait veriler Çizelge 4.15-4.17 ve Şekil 4.19-4.20’de sunuldu.

Çizelge 4.15. H1 ve H2 Formülasyonlarının 25 °C’ deki viskozite ölçümüne ait sonuçları

H1*			H2*		
Kayma Hızı (1/sec)	Kayma gerilimi (Pa)	Viskozite (mPa.s)	Kayma Hızı (1/sec)	Kayma gerilimi (Pa)	Viskozite (mPa.s)
37,5	3,581	95,49	18,75	4,93	262,9
75	4,022	53,62	37,5	6,965	185,7
112,5	4,464	39,68	56,25	9,638	171,34
150	5,199	34,66	75	11,649	155,32
187,5	5,494	29,30	93,75	13,611	145,18
262,5	6,622	25,23	112,5	14,813	131,67
300	6,892	22,97	131,25	17,168	130,80

*H1 ve H2 içerikleri Çizelge 3.5’te verildi.

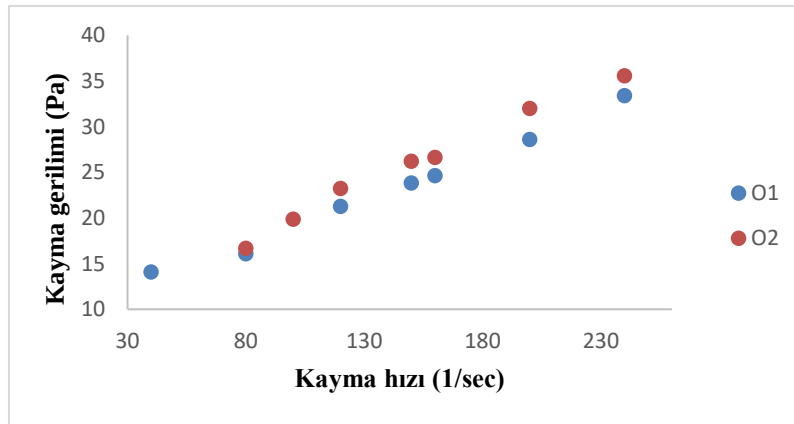


Şekil 4.19. H1 ve H2 Formülasyonlarının 25 °C’ deki kayma hızlarına karşılık kayma gerilimi grafiği

Çizelge 4.16. O1 ve O2 Formülasyonlarının 25 °C’ deki viskozite ölçümüne ait sonuçlar

O1*				O2*		
Kayma Hızı (1/sec)	Hızı	Kayma gerilim (Pa)	Viskozite (mPa.s)	Kayma Hızı (1/sec)	Kayma gerilim (Pa)	Viskozite (mPa.s)
40		14,115	352,875	80	16,705	208,8
80		16,103	201,29	100	19,88	198,8
120		21,272	177,267	120	23,26	193,8
150		23,856	159,04	150	26,242	174,95
160		24,639	153,99	160	26,639	166,49
200		28,627	143,135	200	32,001	160,0
240		33,398	139,158	240	35,603	148,35

*O1 ve O2 içerikleri Çizelge 3.6’da verildi.



Şekil 4.20. O1 ve O2 Formülasyonlarının 25 °C’ deki kayma hızlarına karşılık kayma gerilimi grafiği

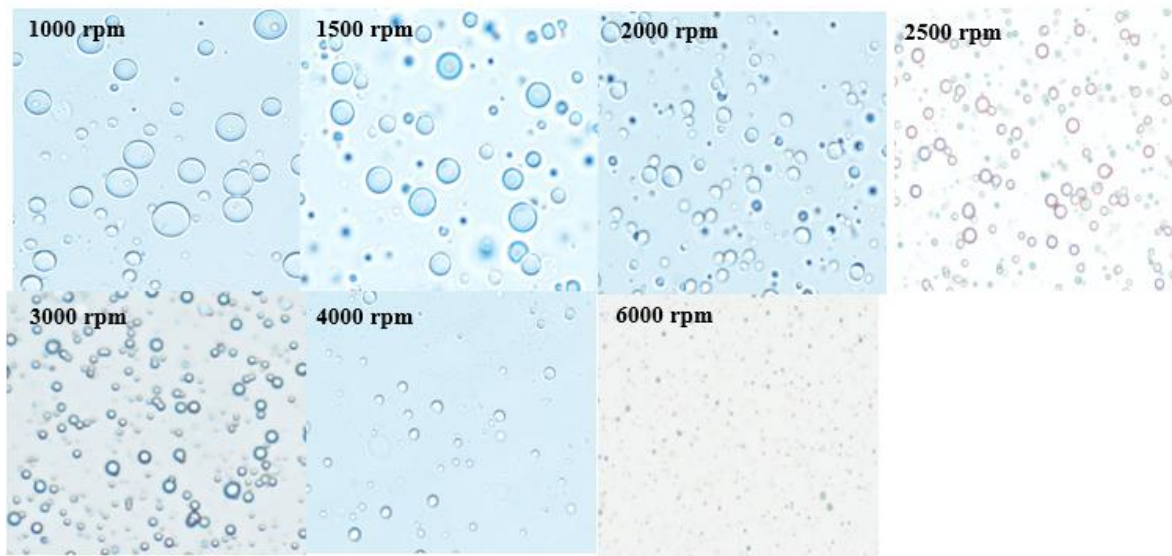
Çizelge 4.17. Hidrojel ve organojellere ait K değerleri

	K	r^2
H1	694,5	0,991
H2	1015,8	0,994
O1	870,15	0,987
O2	2152,05	0,975

Bijel formülasyonları

Çalışmanın başlarında bijellerin hazırlanmasında karıştırma hızına karar vermek için yapılan mikroskop analizi sonuçları Resim 4.1’de verildi.

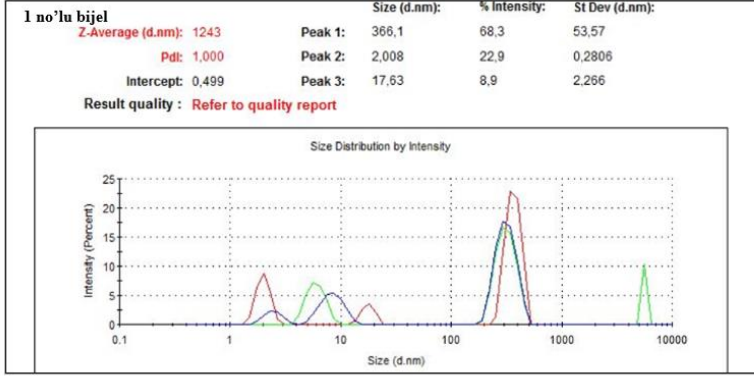
Karıştırma hızı (rpm) olarak 1000-1500-2000-2500-3000-4000 ve 6000 rpm kullanılarak bijeller hazırlandı. Seyreltilerek mikroskop ile damlalar görüntülendi. Karıştırma hızı arttıkça damlaların boyutunun küçüldüğü görsel olarak tespit edildi (Bkz. Resim 4.1). 6000 rpm karıştırma hızı olarak seçildi.



Resim 4.1. Farklı rpm’lerde karıştırılan bijelin mikroskop görüntüsü (O/H-50:50)

Organojel/hidrojel 50:50 oranına ek olarak 60:40 ve 40:60 oranları da kullanılarak bijel formülasyonları hazırlandı (Bkz. Çizelge 3.7). Bu formülasyonların damla boyutu ve damla boyutu dağılımı grafikleri Şekil 4.21-4.32’de viskoziteye ait grafikler de Şekil 4.33-

4.34'te verildi. Hazırlanan bijellerin kayma hızına karşı kayma geriliminden viskoziteleri hesaplandı. Oswald de Waele eşitliği kullanılarak K ve n değerleri hesaplandı. İlgili veriler Çizelge 3.8'de gösterildi. Akış davranış indeksi değerleri 0 ile 1 aralığında bulundu. Hazırlanan tüm formülasyonların psödoplastik akışa uyduğu, kayma ile incelen sistemler olduğu tespit edildi.



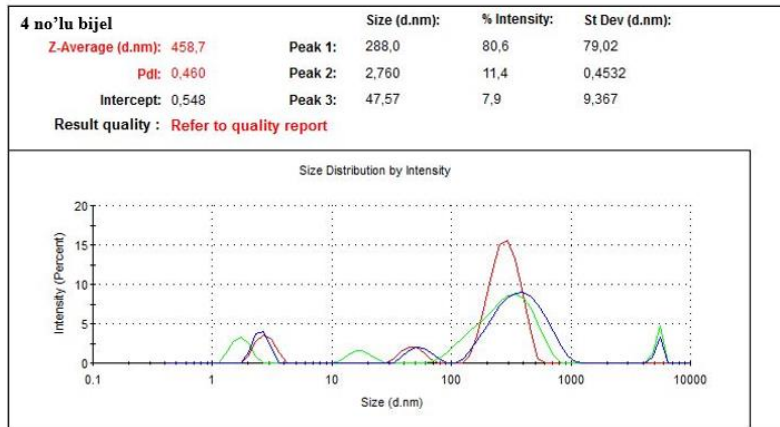
Şekil 4.21. 1 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



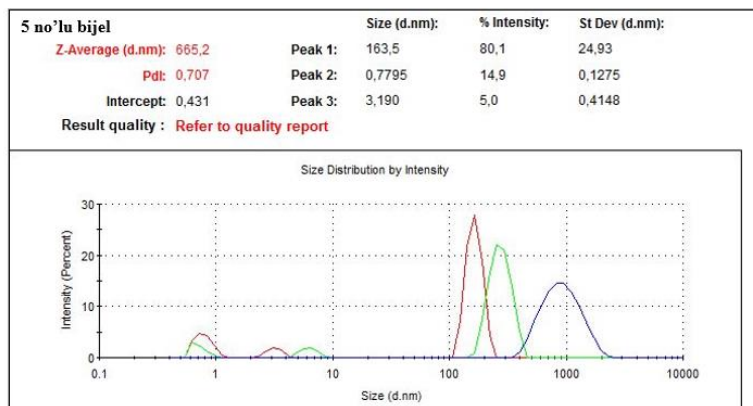
Şekil 4.22. 2 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



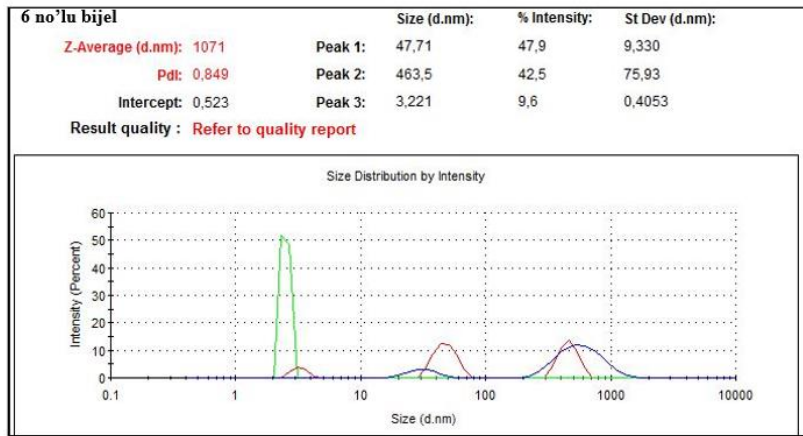
Şekil 4.23. 3 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



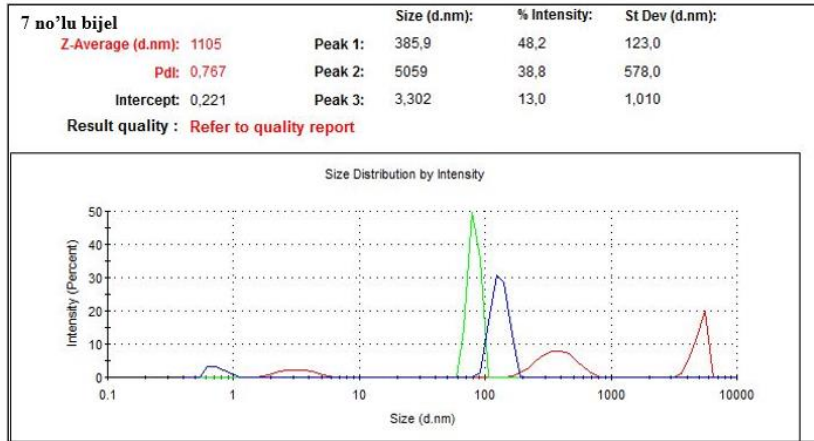
Şekil 4.24. 4 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



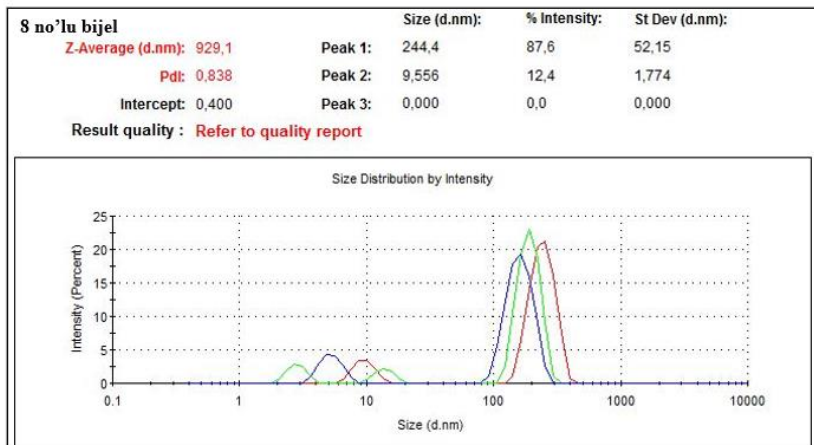
Şekil 4.25. 5 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



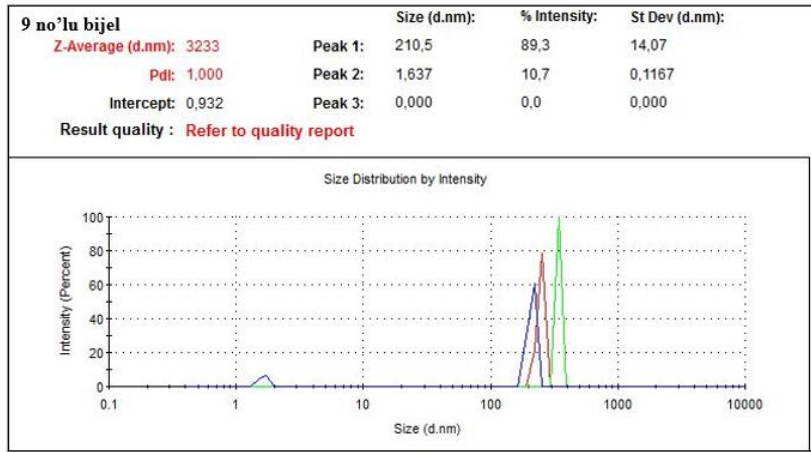
Şekil 4.26. 6 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



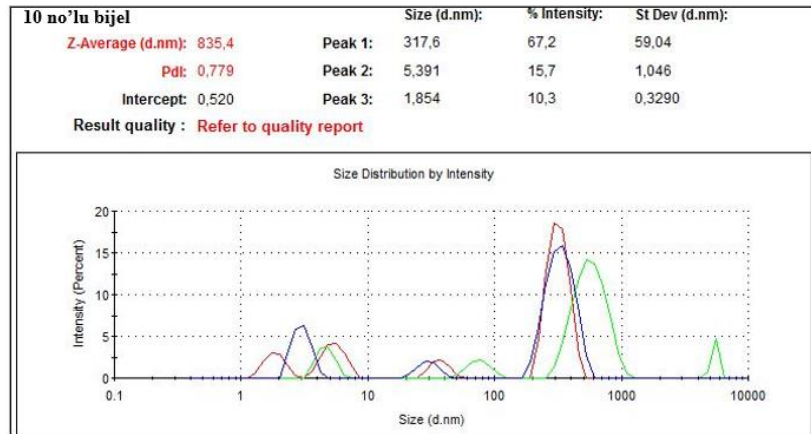
Şekil 4.27. 7 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



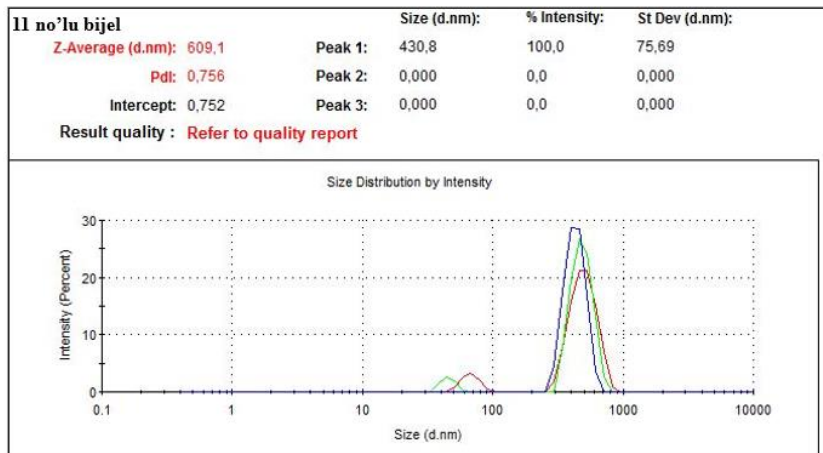
Şekil 4.28. 8 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



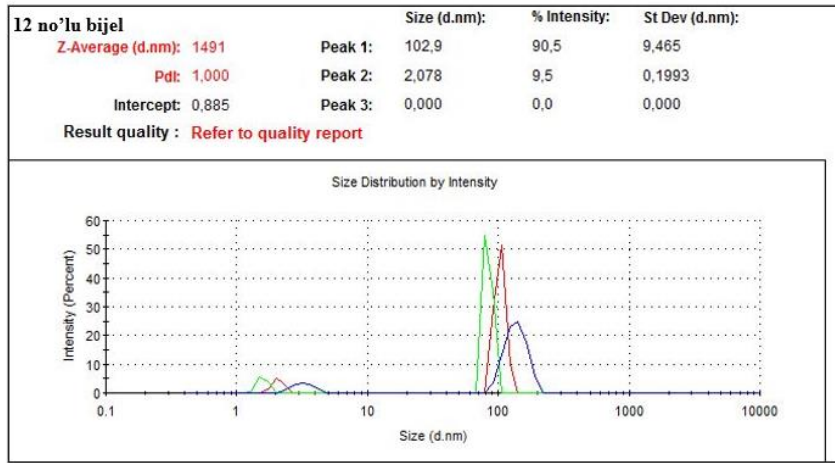
Şekil 4.29. 9 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



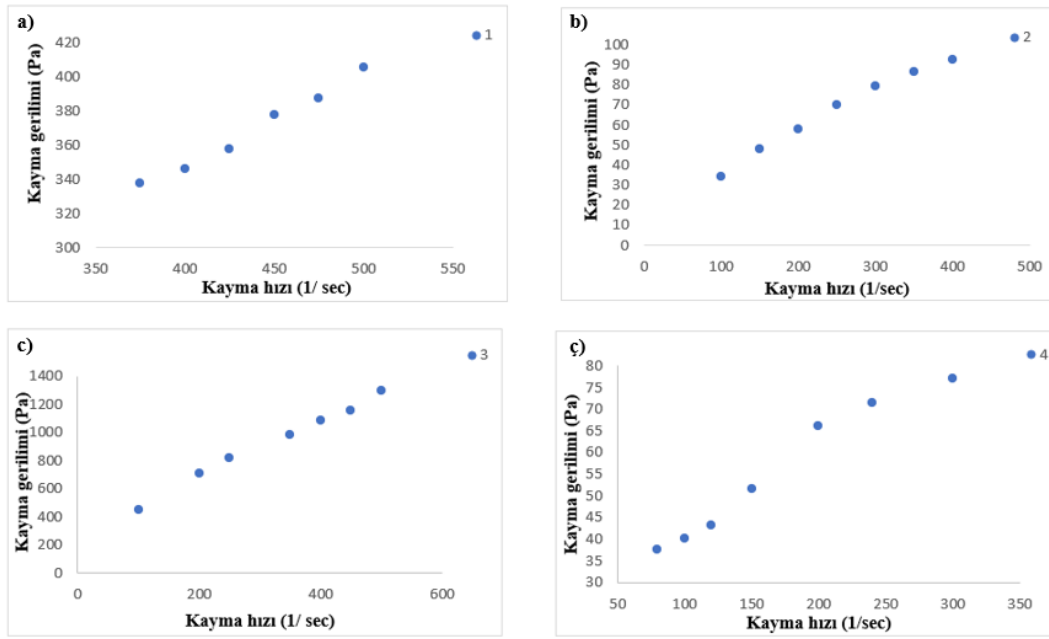
Şekil 4.30. 10 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



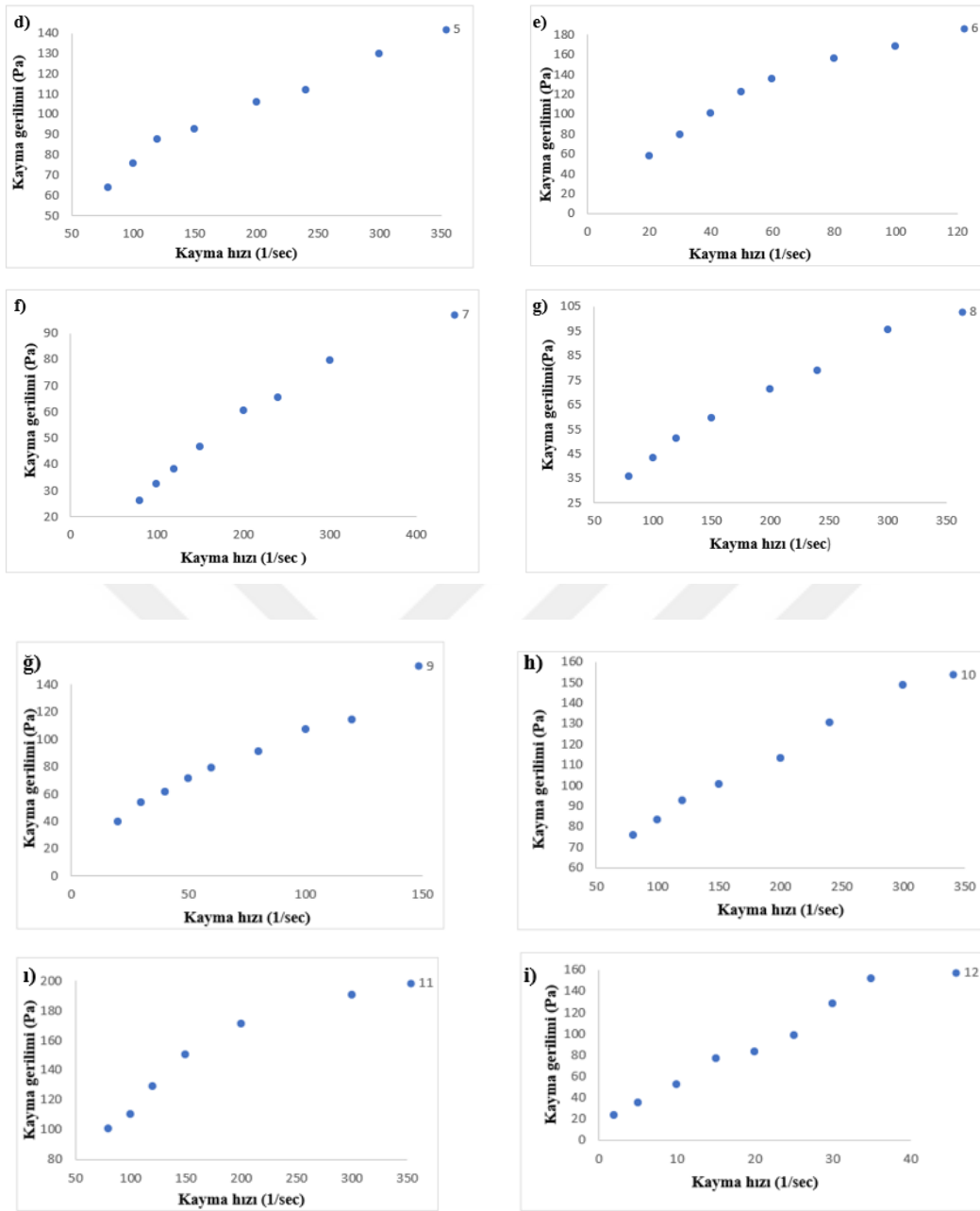
Şekil 4.31. 11 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



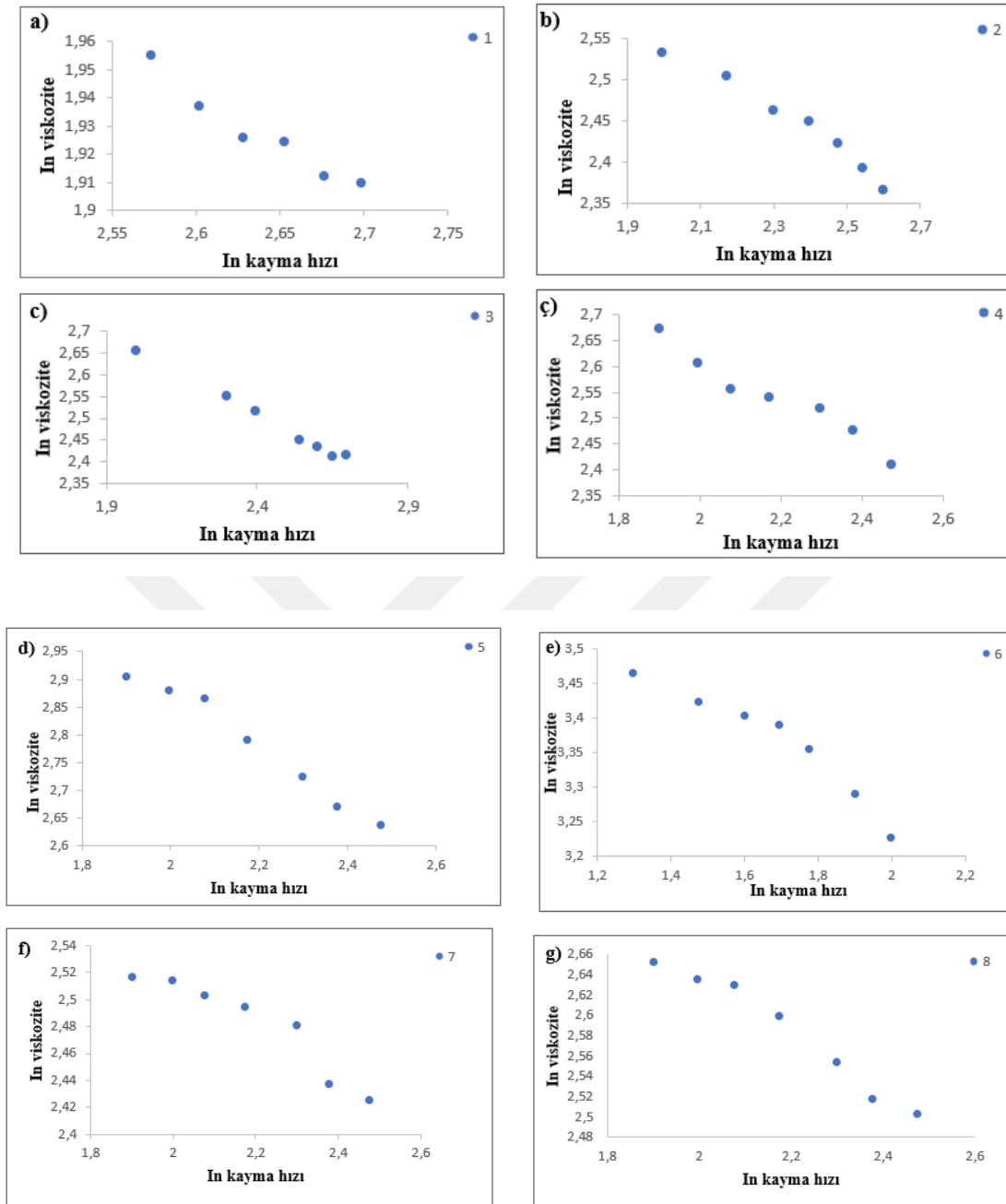
Şekil 4.32. 12 no'lu bijel formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



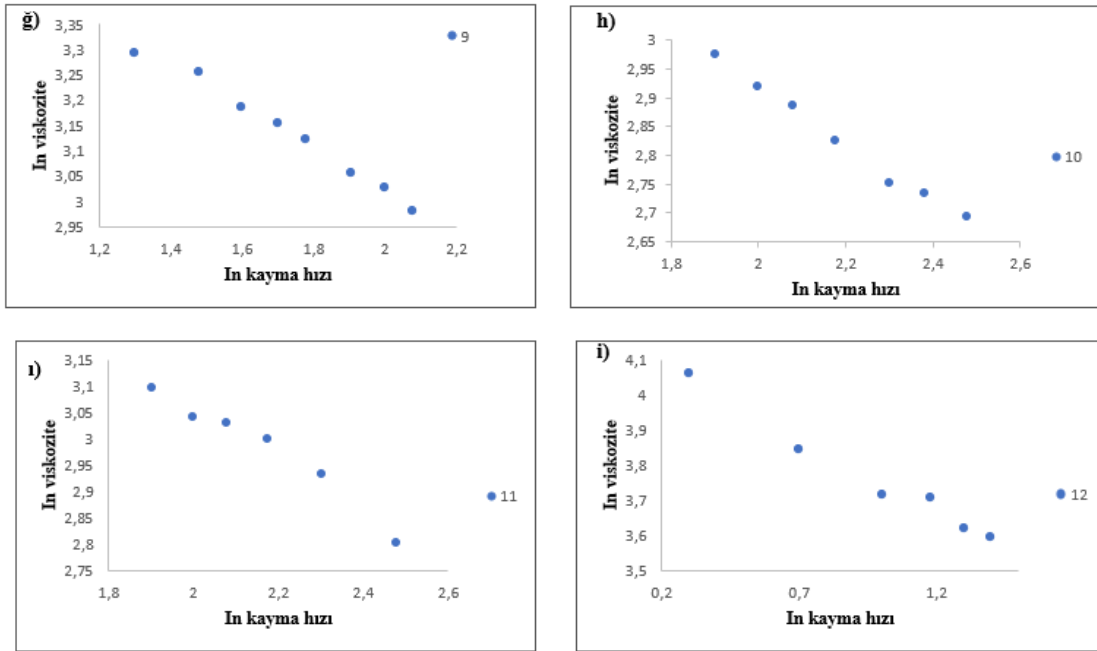
Şekil 4.33. Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği
a)1no'lu b)2no'lu c)3no'lu d)4no'lu



Şekil 4.33. (devam) Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği d)5no'lu e)6no'lu f)7no'lu g)8no'lu ğ)9no'lu h)10no'lu ı)11no'lu i)12no'lu



Şekil 4.34. Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki In kayma hızına karşı In viskozite grafikleri a)1no'lu b)2no'lu c)3no'lu ç)4no'lu d)5no'lu e)6no'lu f)7no'lu g)8no'lu



Şekil 4.34. (devam) Bijel formülasyonlarının 25 °C'deki In kayma hızına karşı In viskozite grafikleri g)9no'lu h)10no'lu i) 11no'lu j)12no'lu

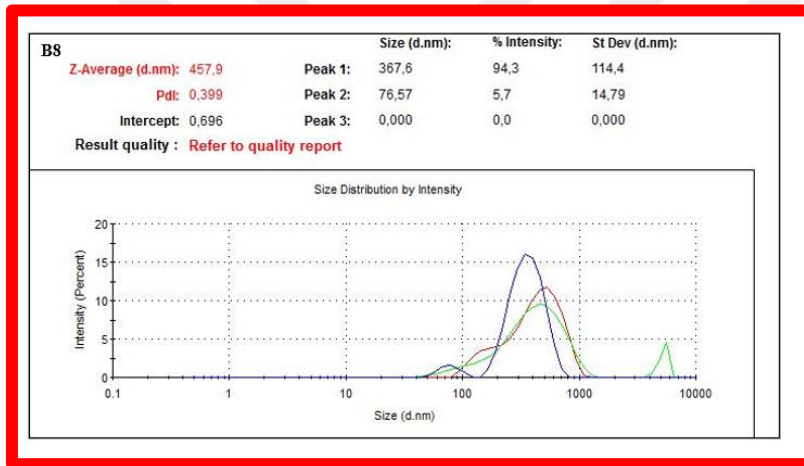
Deney tasarımı sonrası belirlenen Çizelge 3.10'daki 8 bijel formülasyonuna ait damla boyutu ve damla boyut dağılım grafikleri Şekil 4.35-4.42'de, viskozite ve reolojik özelliklerine ait grafikler Şekil 4.43-4.54'te ve ilgili veriler Çizelge 3.10'da verildi.



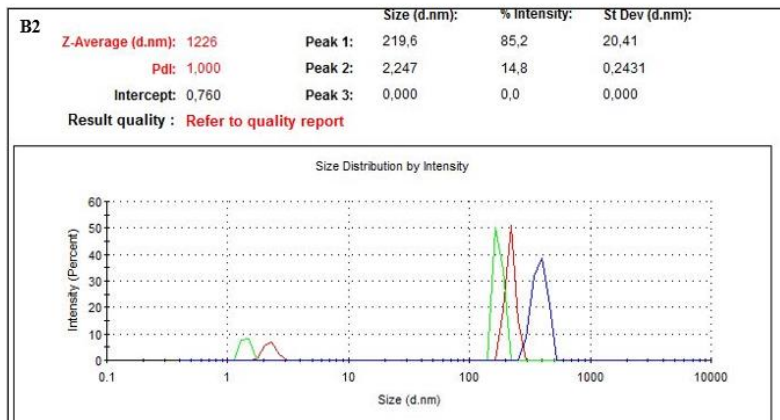
Şekil 4.35. B1 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



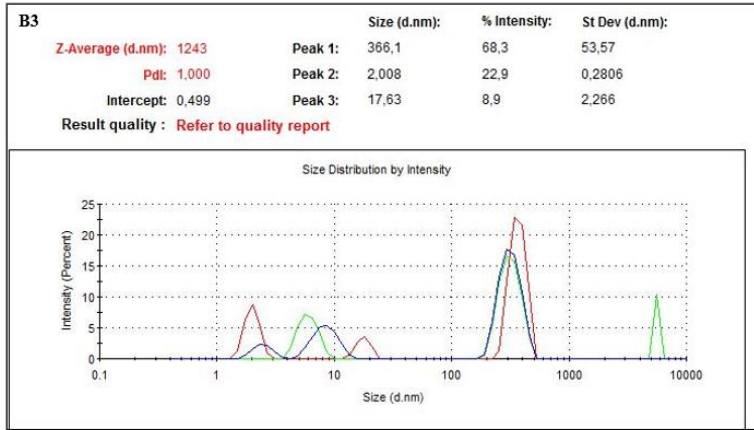
Şekil 4.36. B5 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



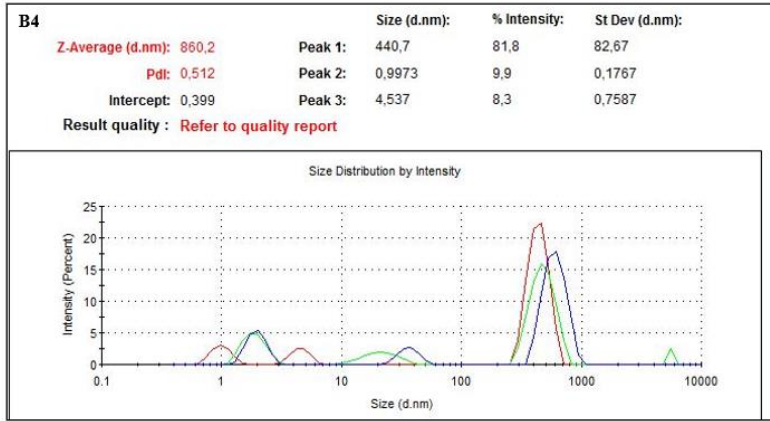
Şekil 4.37. B8 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



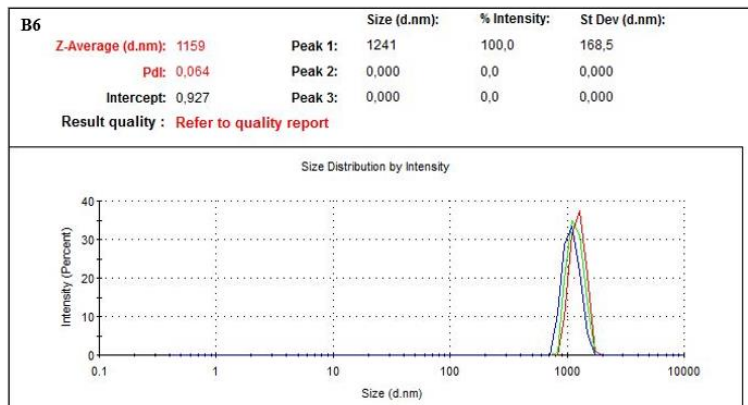
Şekil 4.38. B2 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



Şekil 4.39. B3 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



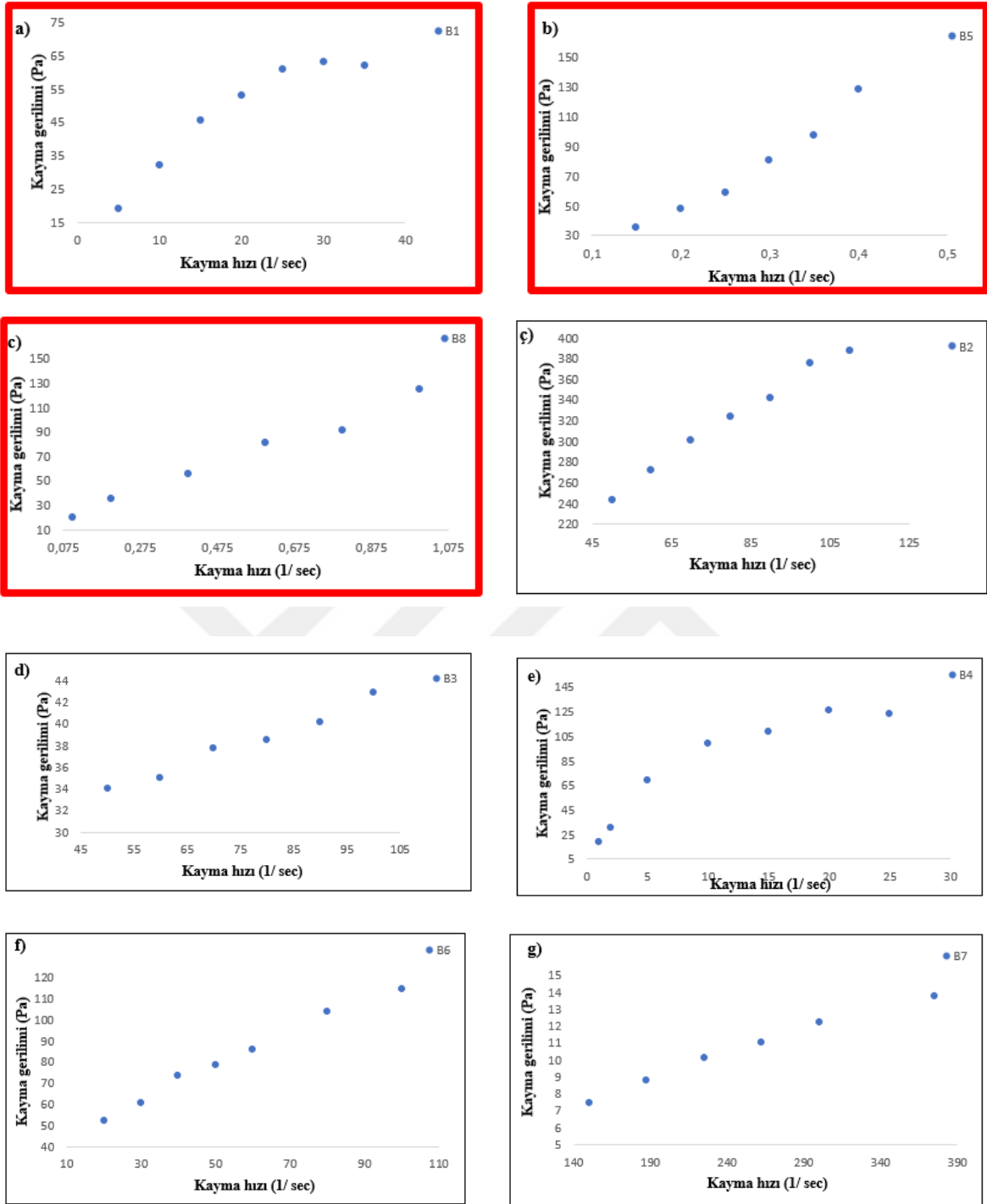
Şekil 4.40. B4 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



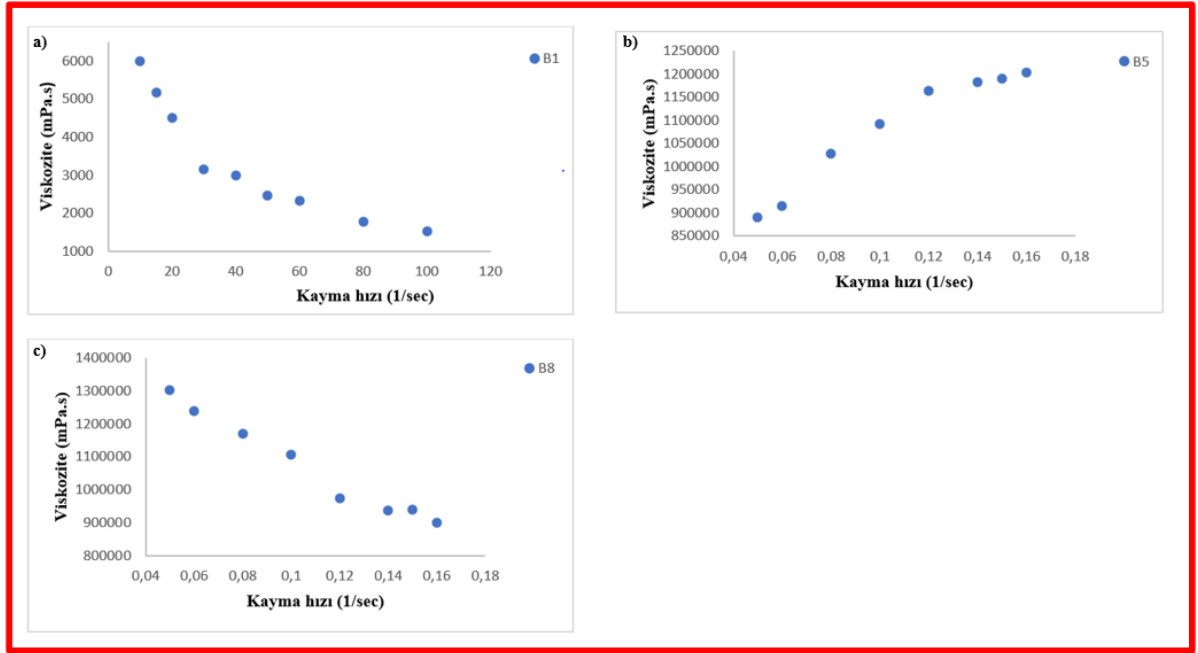
Şekil 4.41. B6 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



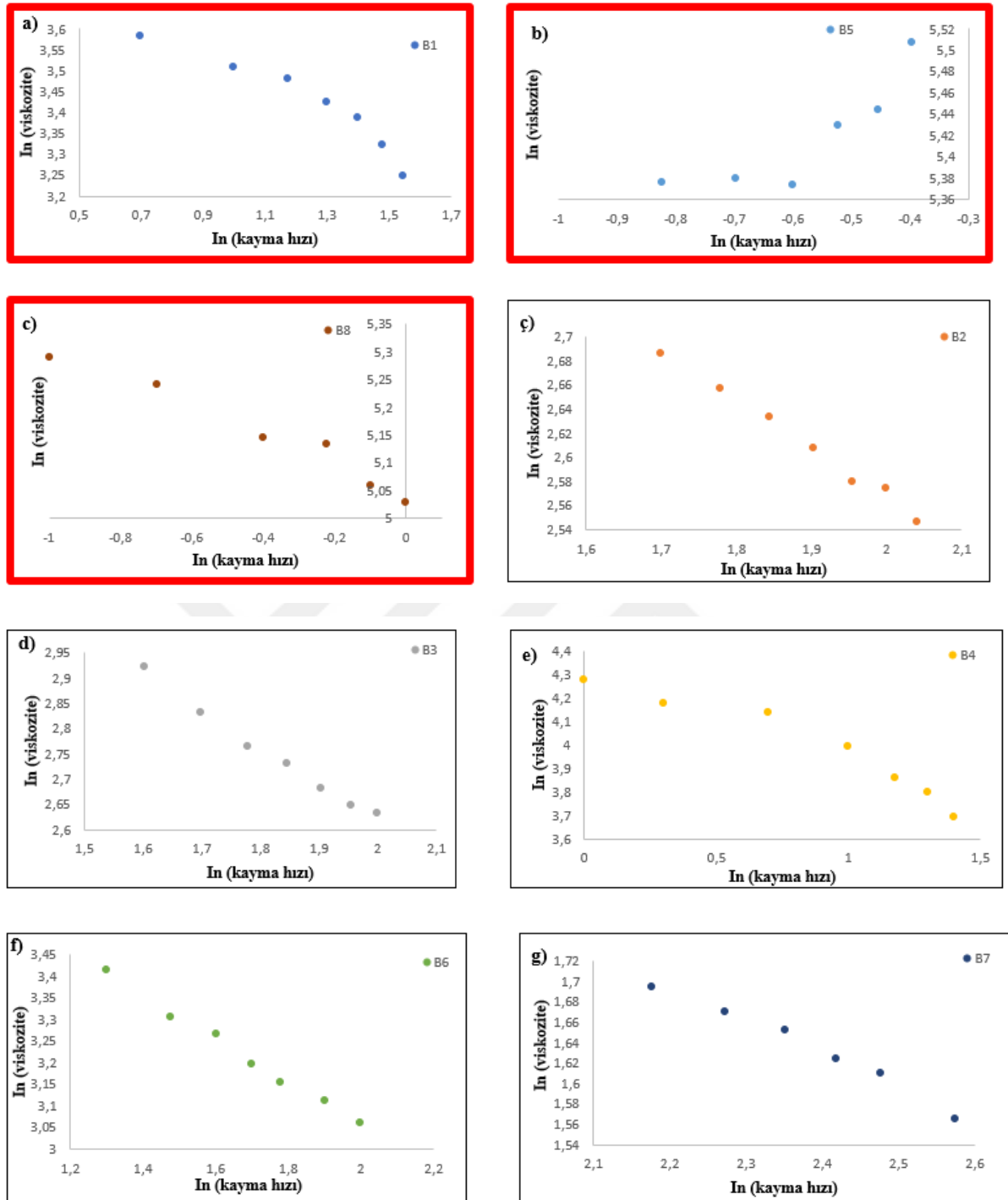
Şekil 4.42. B7 formülasyonunun damla büyüklüğü sonucu



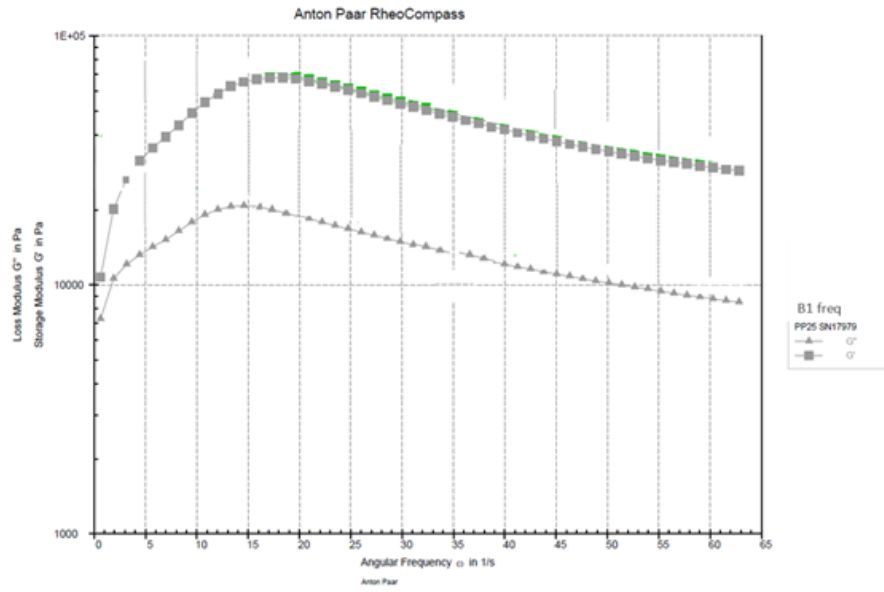
Şekil 4.43. Deney tasarımı sonrası hazırlanan bijel formülasyonlarının 25 °C’deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafikleri a)B1 b)B5 c)B8 ç)B2 d)B3 e)B4 f)B6 g)B7



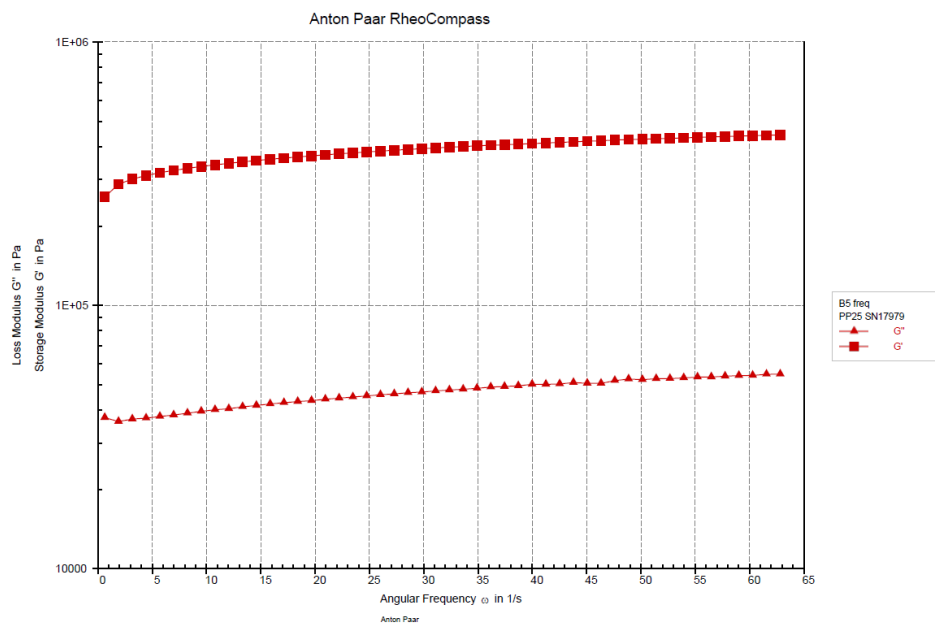
Şekil 4.44. Optimum bijel formülasyonlarının 25 °C’deki kayma hızına karşı viskozite grafikleri a)B1 b)B5 c)B8



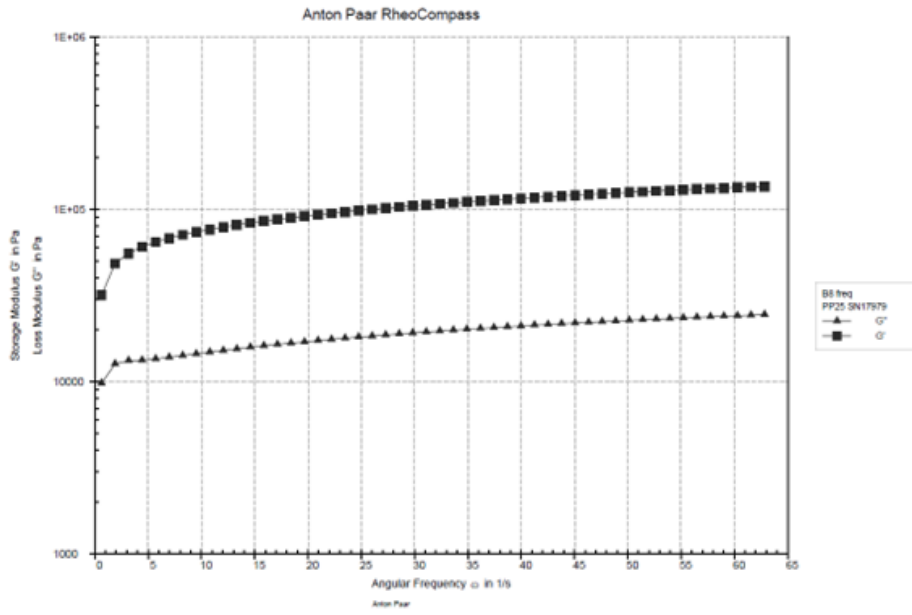
Şekil 4.45. Deney tasarımı sonrası hazırlanan bijel formülasyonlarının 25 °C’deki ln kayma hızına karşı ln viskozite grafikleri a)B1 b)B5 c)B8 ç)B2 d)B3 e)B4 f)B6 g)B7



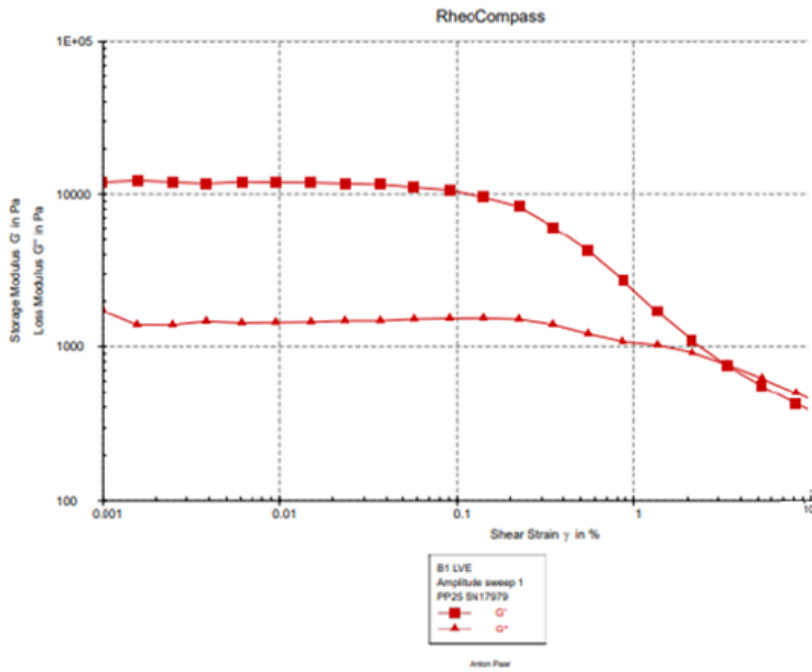
Şekil 4.46. B1 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi



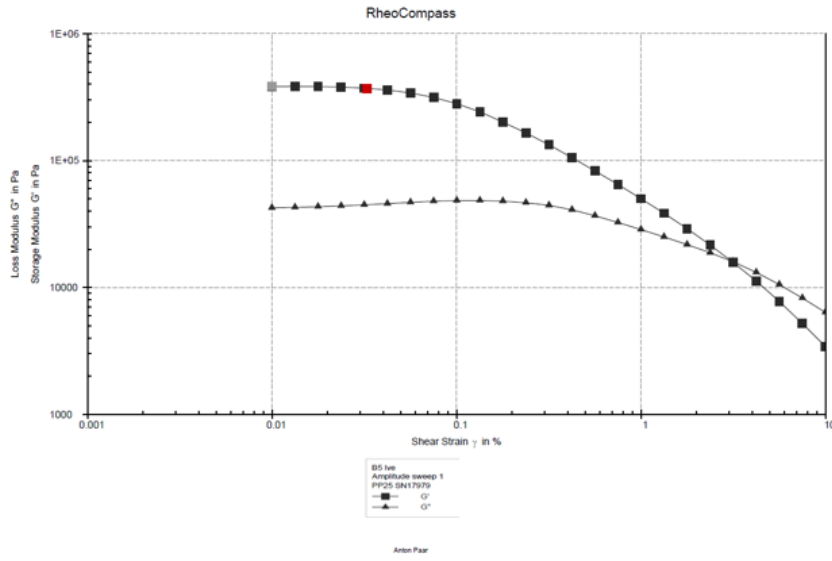
Şekil 4.47. B5 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi



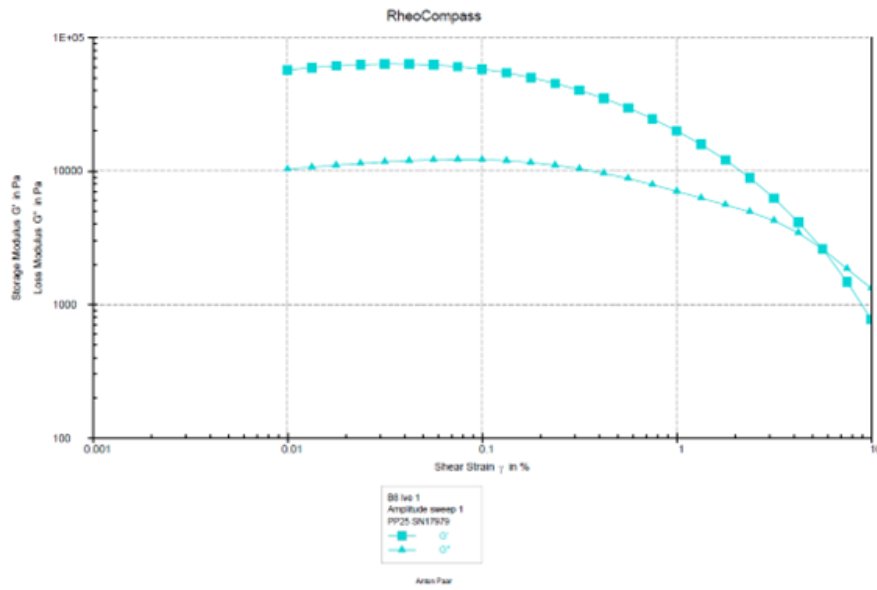
Şekil 4.48. B8 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma hızına (sıklık) bağlı G' ve G'' değişimi



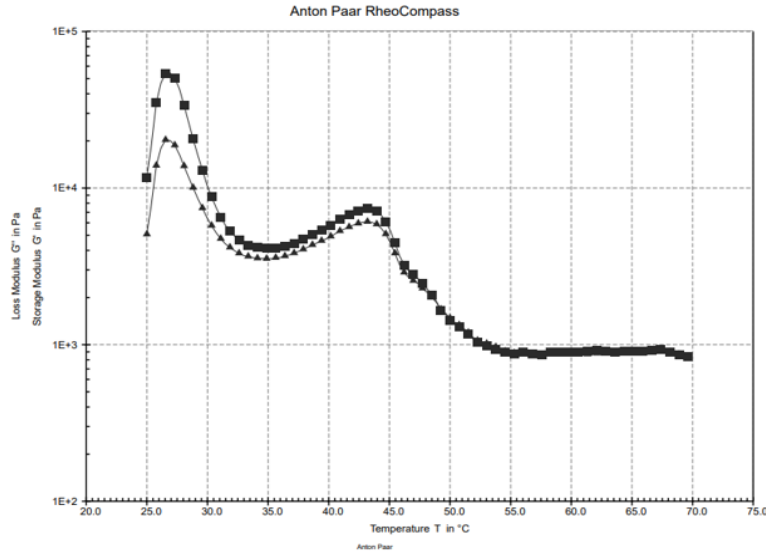
Şekil 4.49. B1 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi



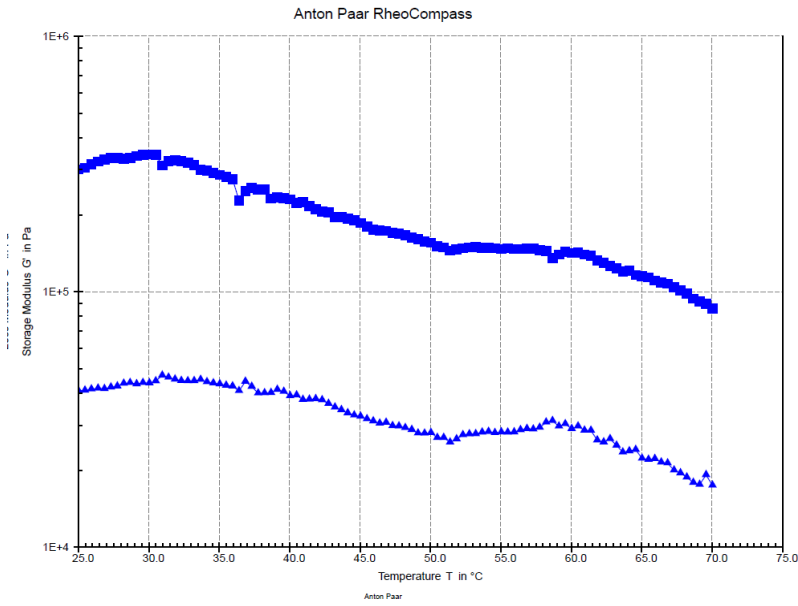
Şekil 4.50. B5 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi



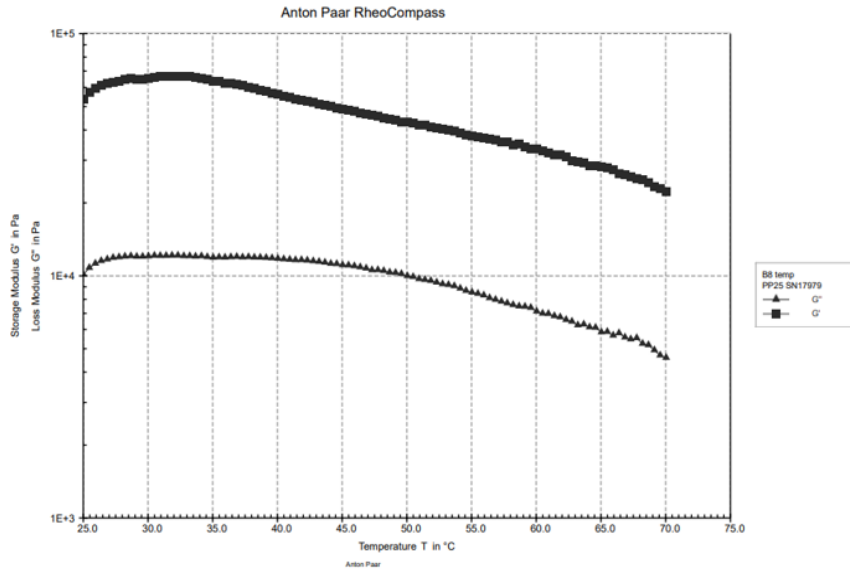
Şekil 4.51. B8 formülasyonuna ait 32 °C’de kayma gerilimine bağlı G' ve G'' değişimi



Şekil 4.52. B1 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi



Şekil 4.53. B5 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi

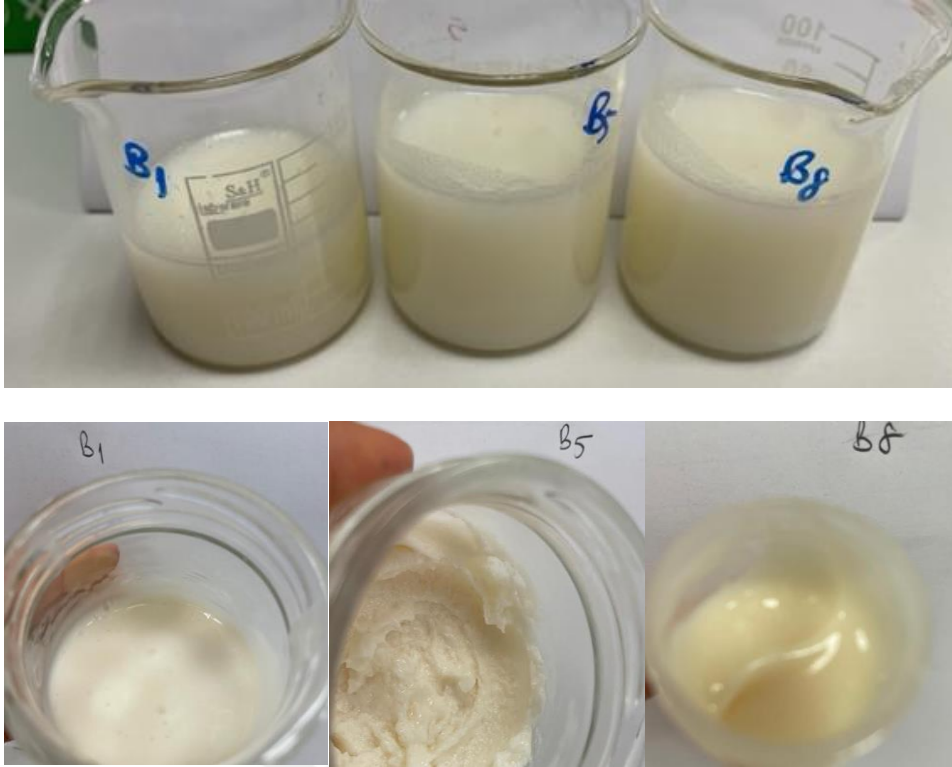


Şekil 4.54. B8 formülasyonuna ait sıcaklık değişimine (25 °C-70 °C) bağlı G' ve G'' değişimi

Bijellerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Fiziksel görünüş

Hazırlanan optimum bijellerin görünüşü, homojenliği ve faz ayrışmasının olup olmadığı incelendi.



Resim 4.2. Optimum bijellerin fiziksel görünüşü (B5 ürenin çözünmediği bijel sistem)

pH

Bijel formülasyonlarının pH'sı deri ve tırnak (topikal) uygulama için uygun bulundu. pH değerleri Çizelge 4.18'de verildi.

Çizelge 4.18. Bijel formülasyonlarının pH değerleri

Bijel formülasyonları	pH $\pm$ SS
B1	5,28 $\pm$ 0,015
B5	5,60 $\pm$ 0,005
B8	6,00 $\pm$ 0,015

Jel oluşup oluşmadığının tespiti

Hazırlanan bijeller bir tüp içine konuldu. Sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde tüp ters çevrildiğinde jel kütlenin akmadığı görüldü.



Resim 4.3. Optimum bijelerde tüp çevirme metodu

Dış faz tespiti

Sudan III belirteci ile karıştırılan bijellerin dış fazlarının kırmızı renk ile boyanmadığı görüldü. Dış faz ile seyreltme metodunda bijellerin su ile seyreltiği tespit edildi.

Damlacık boyutu ve dağılımı tespiti

Optimum formülasyonlara ait damlacık boyutu ve dağılımı grafikleri Şekil 4.35-4.42’de verileri ise Çizelge 4.19’da verildi.

Çizelge 4.19. Optimum bijel formülasyonlarının damla boyutları ve PDI değerleri

	Damla boyutu (nm)	PDI
B1	531,8	0,567
B5	376,3	0,033
B8	457,9	0,399

Bijel yapısında kristalleşme olup olmadığının tespiti

Polarize ataçmanlı mikroskop ile optimum bijel formülasyonları içinde kristal oluşmadığı görüldü.

Etkin madde içerik tayini

Bijel formülasyonlarından siklopiroks ve üre içeriği Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı gibi tayin edildi. ICH Q3 kılavuzuna göre etkin maddenin formülasyon içinde %95-%105 arasında bulunması beklenmektedir. Sonuç olarak etkin madde içerik tayini sonuçlarımız bu aralık içinde bulundu.

Çizelge 4.20. Optimum bijel formülasyonlarının etkin madde içerik değerleri

Bijel formülasyonları	Etkin madde içeriği (%ort. $\pm$ SS)	
	Siklopiroks	Üre
B1	98 $\pm$ 0,096	99,9 $\pm$ 0,00048
B5	99,5 $\pm$ 0,0251	98 $\pm$ 0,0006
B8	98,5 $\pm$ 0,076	100 $\pm$ 0,0012

Viskozite ölçümü ve reolojik özelliklerin belirlenmesi

Optimum bijellerin reolojik özelliklerine ait veriler Çizelge 4.21’de ve grafikler Şekil 4.43-4.54’te verildi.

Çizelge 4.21. Optimum bijellere ait viskozite verileri

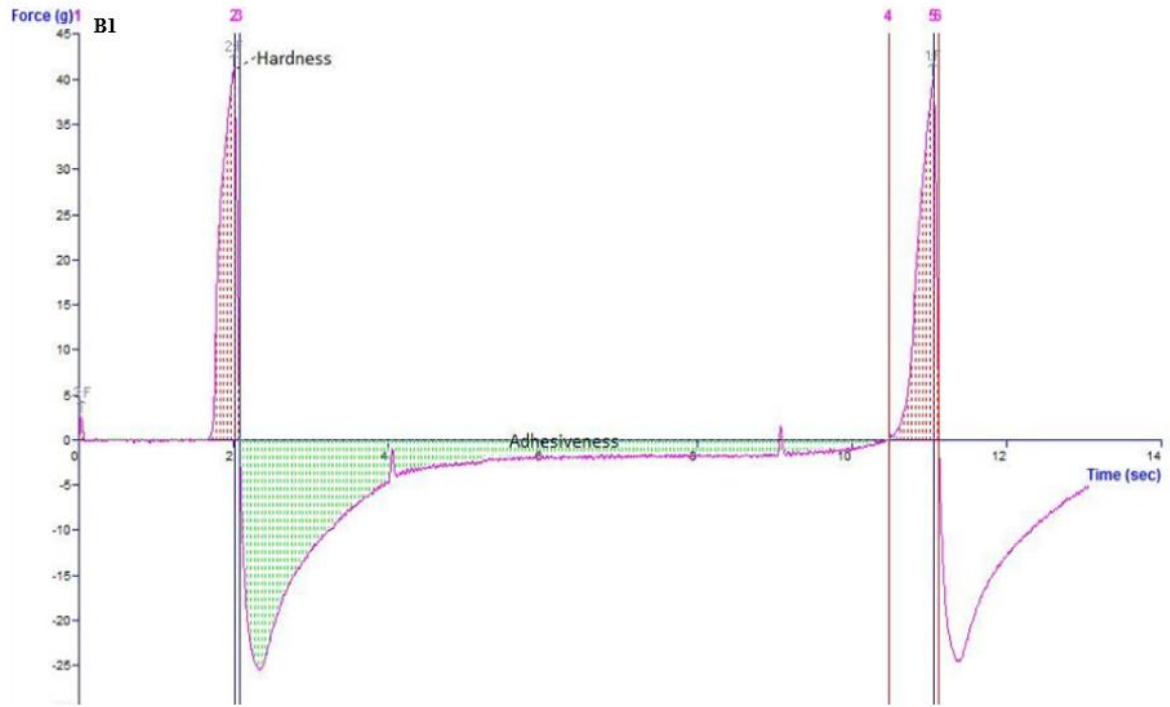
	K (mPa.s)	n	r ²
B1	21764	0,64	0,991
B5	2032342	1,3	0,989
B8	502810	0,78	0,985

Yapı analizi ve mekanik özelliklerin belirlenmesi

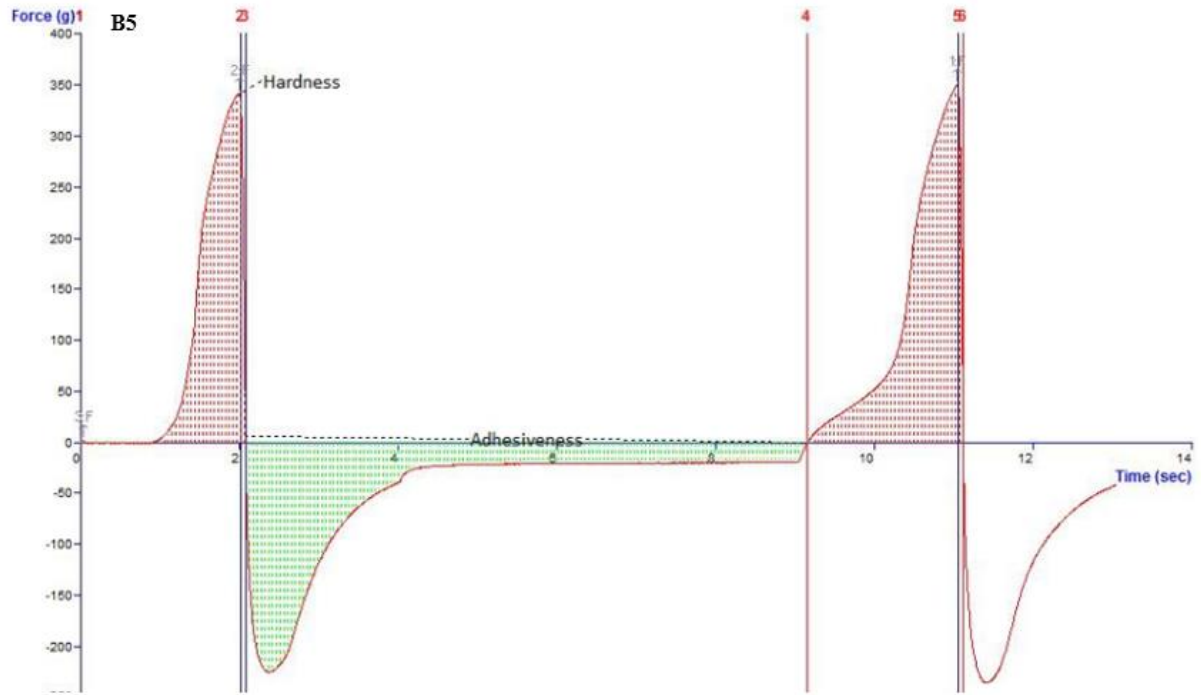
Optimum bijel formülasyonlarına ait yapı analizi ve mekanik özelliklerine ait veriler Çizelge 4.22’de, grafikleri Şekil 4.55-4.57’de verildi.

Çizelge 4.22. Optimum bijel formülasyonlarının yapı analizi sonuçları

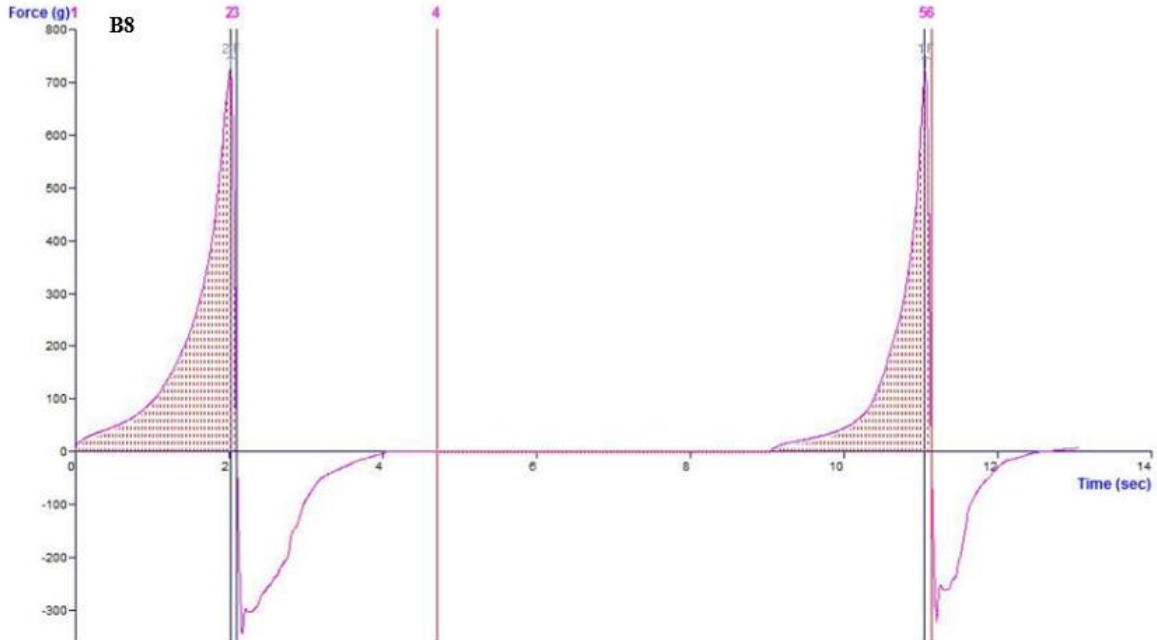
Formülasyon	Sertlik $\pm$ SS	Sıkışabilirlik $\pm$ SS	Adeziflik $\pm$ SS	Koheziflik $\pm$ SS	Elastikiyet $\pm$ SS	K
B1	38,71 $\pm$ 2,35	7,696 $\pm$ 1,6	38,340 $\pm$ 0,74	1,291 $\pm$ 0,197	0,322 $\pm$ 0,030	21764
B5	953,16 $\pm$ 15,0	120,5 $\pm$ 10,3	402,4 $\pm$ 120,56	1,423 $\pm$ 0,05	1,103 $\pm$ 0,1	2032342
B8	619,3 $\pm$ 43,57	98,1 $\pm$ 7,9	184,7 $\pm$ 162,9	1,108 $\pm$ 0,3653	0,840 $\pm$ 0,028	502810



Şekil 4.55. B1 formülasyonuna ait TPA grafiği



Şekil 4.56. B5 formülasyonuna ait TPA grafiği



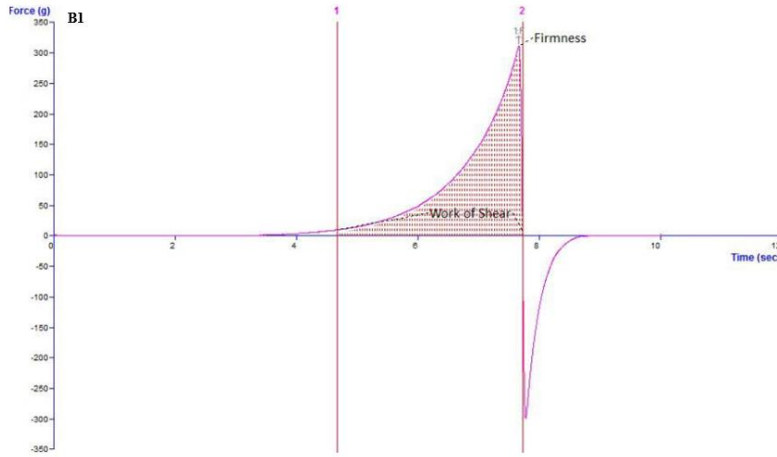
Şekil 4.57. B8 formülasyonuna ait TPA grafiği

Yayılabilirlik tayini

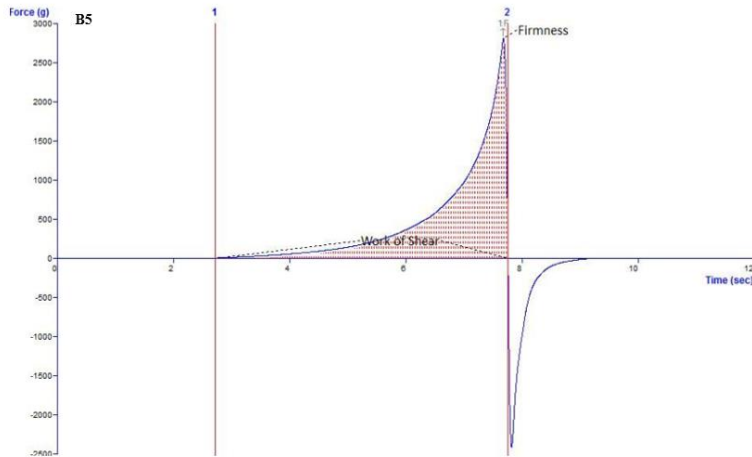
Optimum bijellere ait yayılabilirlik verileri Çizelge 4.23'te, grafikleri de Şekil 4.58-4.60'da verildi.

Çizelge 4.23. Optimum bijel formülasyonlarının yayılabilirlik kuvveti/dayanıklılık ve yayılabilirliğe karşı yaptığı iş

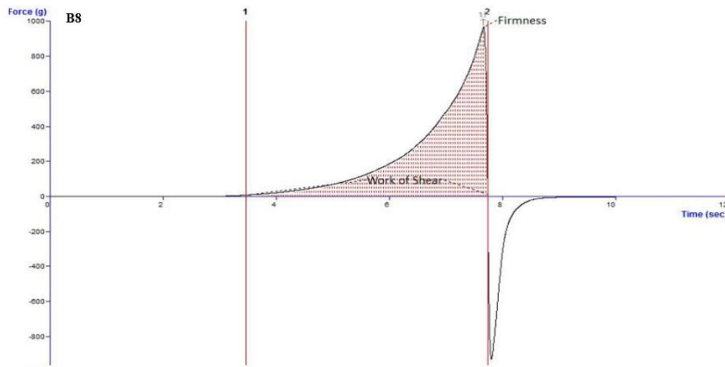
Formülasyon	Dayanıklılık (g $\pm$ SS)	Yayılabilirlik işi (g.sec $\pm$ SS)
B1	302,84 $\pm$ 1,32	257,18 $\pm$ 12,03
B5	2905,05 $\pm$ 80,9	2523,32 $\pm$ 59,6
B8	1067,9 $\pm$ 36,09	1021,02 $\pm$ 24,48



Şekil 4.58. B1 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği



Şekil 4.59. B5 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği



Şekil 4.60. B8 formülasyonuna ait yayılabilirlik grafiği

4.4. Hidrojel, Organojel ve Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Salım çalışması optimum bijellerde, optimum bijelleri oluşturan organojel ve hidrojellerde, ticari krem ve cilada salım çalışması sonucu elde edilen veriler ve salım profilleri aşağıda şekil ve çizelgelerde verildi.

Salım grafiklerinin karşılaştırılabilmesi için, salım verileri 0. derece, 1. derece ve Higuchi kinetik modellerine göre incelendi. Y eksenine yerleştirilecek verilerin olası birimleri aşağıda verildi.

0 derece kinetik modeli

x = saat

y = mg veya % salım veya mg/cm^2

1 derece modeli

x = saat

y = $\ln$ mg veya $\ln$ % salım veya $\ln \text{mg}/\text{cm}^2$

Matris kinetik modeli

x = $\sqrt{\text{saat}}$

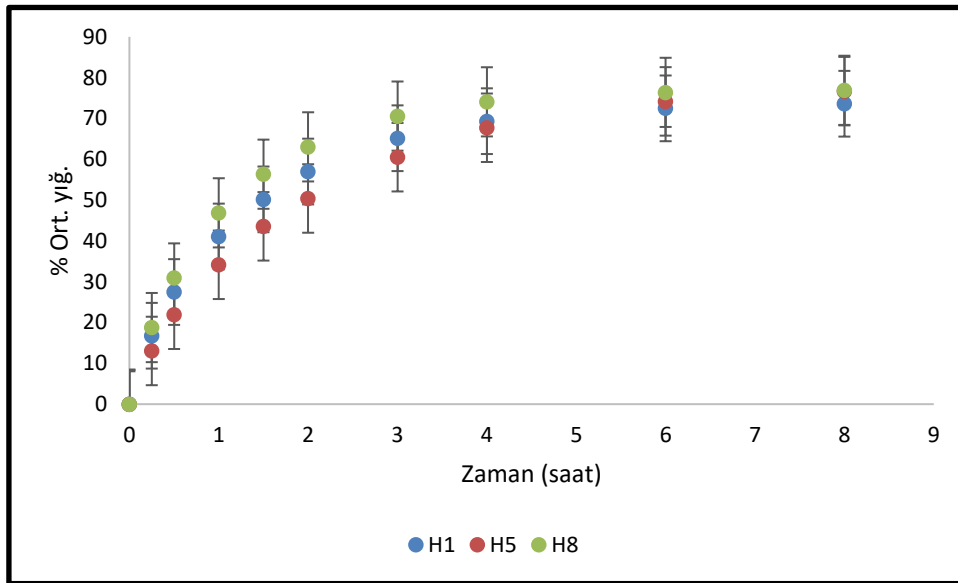
y = mg veya % salım veya mg/cm^2

Hidrojellerden ürenin salımı (diyaliz membran)

Optimum bijelleri oluşturan hidrojellerden (Çizelge 4.24) ürenin salımına ait veriler grafik Şekil 4.61’de verildi.

Çizelge 4.24. Optimum bijelleri oluşturan hidrojel­lerin içerikleri

	B1'in hidrojeli: H1	B5'in hidrojeli: H5	B8'in hidrojeli: H8
Karbopol 974P	0,15 (% 0,26)	0,15 (% 0,4)	0,05 (%0,134)
Üre	20 (% 34,8)	20 (% 53,3)	20 (%53,3)
Propilen glikol	5 (% 8,7)	5 (% 13,3)	5 (%13,3)
Tween 80	2,5 (% 4,34)	2,5 (% 6,66)	2,5 (%6,66)
D.su	29,85 (% 52)	29,85 (% 26,3)	29,85 (% 26,5)



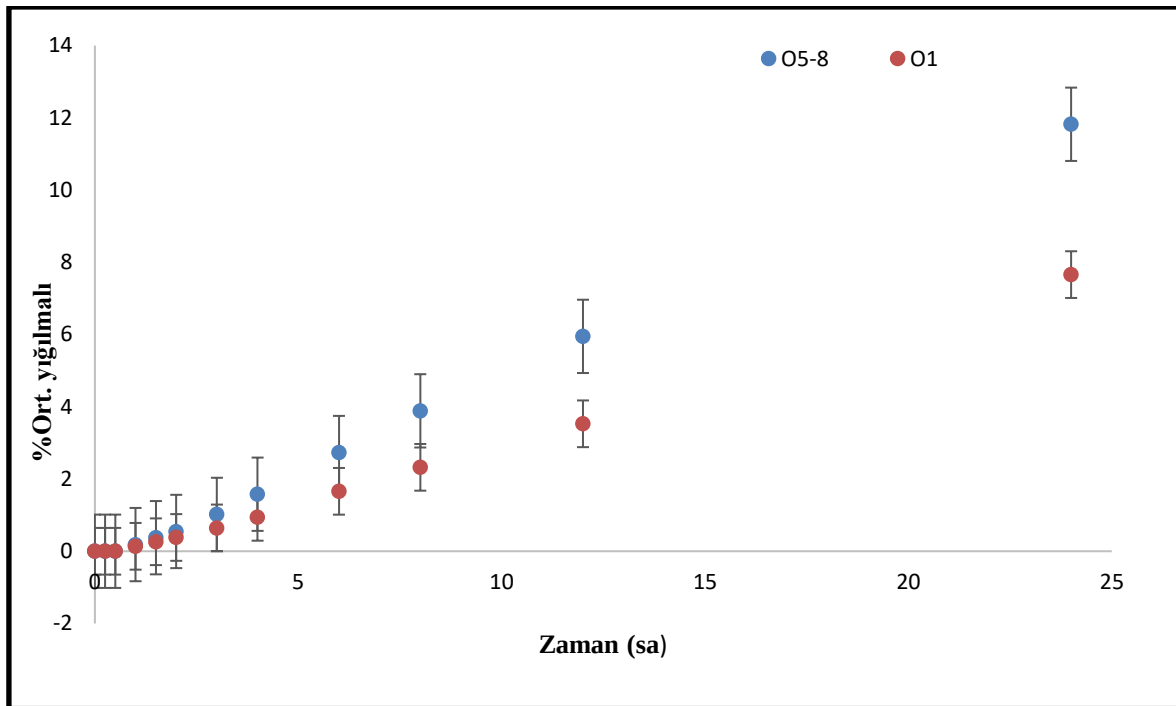
Şekil 4.61. Hidrojellerden ürenin salım grafiği

Organojellerden siklopiroksun salımı (diyaliz membran)

Optimum bijelleri oluşturan organojellerden (Çizelge 4.26) siklopiroksun salımına ait grafik Şekil 4.62’de verildi.

Çizelge 4.25. Optimum bijelleri oluşturan organojellerin içerikleri

	B1'in organojeli : O1	B5'in organojeli : O5	B8'in organojeli : O8
Siklopiroks	1 (%2,35)	1 (%1,6)	1 (%1,6)
GMS	6 (%14,1)	6 (%9,6)	6 (%9,6)
Span 80	2,5 (%5,89)	2,5 (%4)	2,5 (%4)
Migliyol 812	33 (%77,6)	33 (%84,8)	33 (%84,8)



Şekil 4.62. Organojellerden siklopiroksun salım grafiği

Bu çalışmalar sırasında etkin maddelerin alıcı odacıkta saptanma durumları aşağıda gösterildi. Siklopiroks görüldüğü gibi bazı çalışmalarda hiç saptanamadı. Bu çalışmalar ‘-’ olarak Çizelge 4.26’da gösterildi ve çalışmalara ait grafik bulunmamaktadır.

Çizelge 4.26. İn-vitro ve ex-vivo çalışmalarda siklopiroks ve ürenin saptanma durumu

	İn-vitro çalışmalar				Ex-vivo çalışmalar			
	Diyaliz membran		Strat-M membran		Toynak membranı		Deri	
	Siklopiroks	Üre	Siklopiroks	Üre	Siklopiroks	Üre	Siklopiroks	Üre
B1	+	+	-	-	+	+	-	-
B5	+	+	-	-	+	+	-	-
B8	+	+	-	-	+	+	-	-

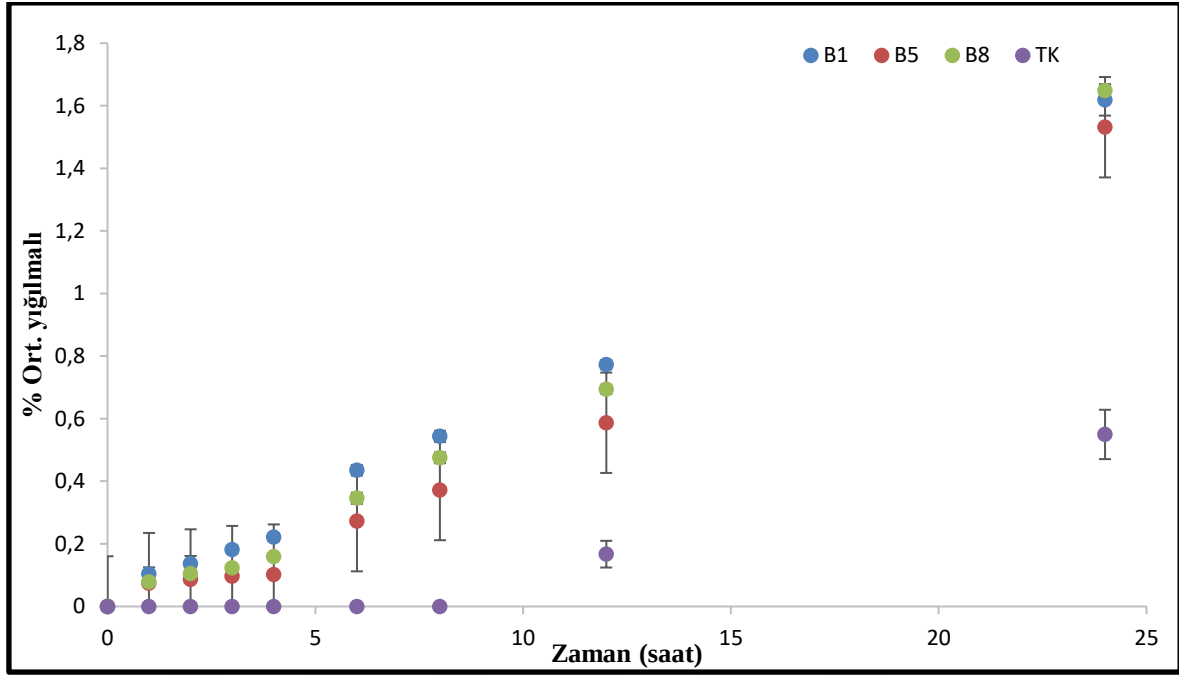
Bijellerden siklopiroks ve ürenin salımı

Optimum bijeller ve ticari kremden siklopiroksun salımı Çizelge 4.27 ve Şekil 4.63'te ve salım kinetikleri de Çizelge 4.29'da verildi.

Optimum bijellerden ürenin salımı Çizelge 4.28 ve Şekil 4.64'te ve salım kinetikleri de Çizelge 4.30'da verildi.

Çizelge 4.27. Optimum bijel formülasyonları ve ticari kremden siklopiroksun salım sonuçları (diyaliz membran) (ort. $\pm$ SS) (Formülasyon içerikleri Çizelge 3.10'da verildi.)

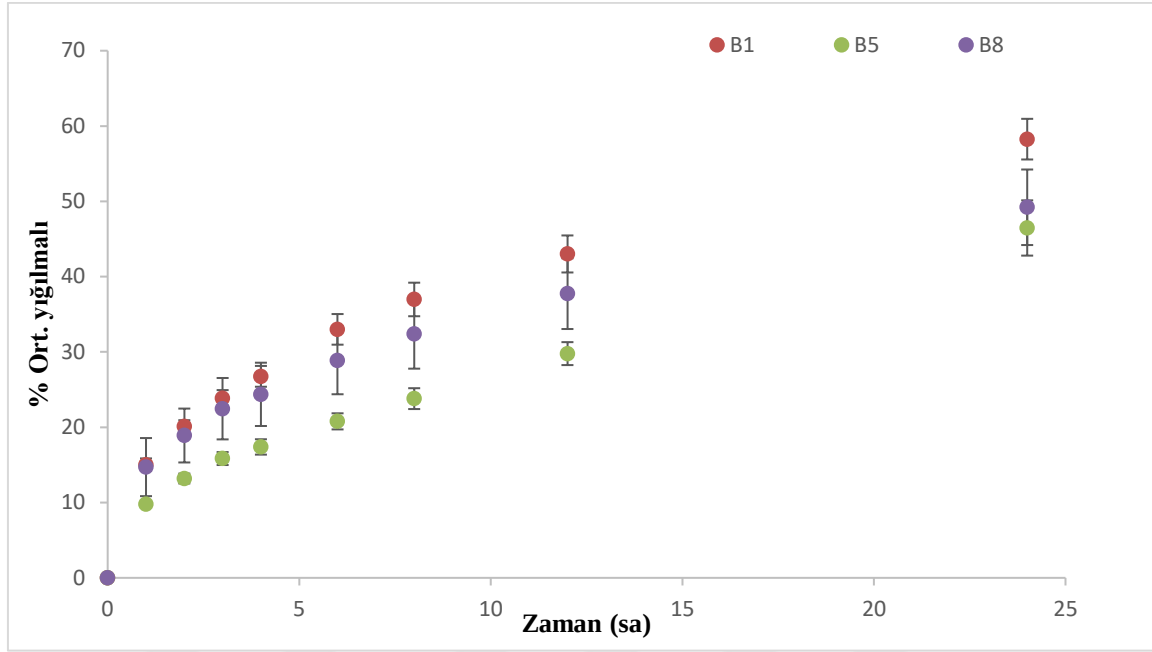
Zaman (sa)	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$			
	B1	B5	B8	Ticari krem
0	0	0	0	0
1	10,36 $\pm$ 3,7	7,46 $\pm$ 4,7	7,86 $\pm$ 1,62	0
2	13,65 $\pm$ 4,3	8,62 $\pm$ 5,16	10,49 $\pm$ 2,06	0
3	18,17 $\pm$ 2,19	9,69 $\pm$ 5,19	12,33 $\pm$ 1,92	0
4	22,13 $\pm$ 2,28	10,18 $\pm$ 4,78	15,95 $\pm$ 1,74	0
6	43,52 $\pm$ 2,92	27,26 $\pm$ 9,05	34,58 $\pm$ 3,08	0
8	54,35 $\pm$ 3,10	37,21 $\pm$ 8,8	47,51 $\pm$ 2,99	0
12	77,28 $\pm$ 2,52	58,7 $\pm$ 8,76	69,42 $\pm$ 2,53	19,7 $\pm$ 4,27
24	161,83 $\pm$ 8,60	153,15 $\pm$ 11,41	164,86 $\pm$ 3,39	54,96 $\pm$ 7,89



Şekil 4.63. Optimum bijel formülasyonları ve ticari kremden siklopiroksun salım grafiği (diyaliz membran)

Çizelge 4.28. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin salım sonuçları (diyaliz membran) (ort.±SS) (Formülasyon içerikleri Çizelge 3.10'da verildi.)

Zaman (sa)	mg/cm ²		
	B1	B5	B8
0	0	0	0
1	30,04 ± 2,9	19,5 ± 1,2	29,4 ± 13,4
2	40,2 ± 0,29	26,4 ± 2,3	37,8 ± 12,4
3	47,7 ± 3,8	31,7 ± 2,9	44,9 ± 14,1
4	53,5 ± 4,8	34,8 ± 3,5	48,7 ± 14,6
6	65,9 ± 7,0	41,6 ± 3,7	57,7 ± 15,6
8	73,9 ± 7,7	47,6 ± 4,8	64,78 ± 15,9
12	86,0 ± 8,5	59,6 ± 5,3	75,5 ± 16,3
24	116,5 ± 9,3	92,9 ± 12,7	98,4 ± 17,4



Şekil 4.64. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin salım grafiği (dializ membran)

Çizelge 4.29. Optimum bijel formülasyonların siklopiroksa ait kinetik değerlendirme sonuçları

		B1	B5	B8	Ticari krem
0°	Eğim (mg/saat)	0,0067	0,0063	0,0069	0,0023
	Eğimin SH'sı	0,00014	0,00037	0,00026	0,00052
	Kesişim (mg)	-4,3*10 ⁻⁵	-7,6*10 ⁻³	-5,4*10 ⁻³	-3,6*10 ⁻³
	Kesişimin SH'sı	0,0014	0,0036	0,0025	0,008
	r²	0,998	0,989	0,995	0,975
	Regresyonun S.H.	0,003	0,0078	0,0055	0,0088
	Akı (mg/cm²/saat)	0,0067	0,0063	0,0069	0,0023
1°	Eğim (ln mg/saat)	0,00016	0,00017	0,00017	-0,121
	Eğimin SH'sı	4,5*10 ⁻⁵	3,7*10 ⁻⁵	4,06*10 ⁻⁵	0,127
	Kesişim (ln mg)	0,0021	0,0016	0,0018	-0,88
	Kesişimin SH'sı	0,00044	0,00036	0,00039	1,97
	r²	0,793	0,867	0,839	0,689
	Regresyonun S.H.	0,00096	0,00077	0,00086	2,16
Q√t	Eğim(mg/√saat)	0,033	0,03	0,033	0,01
	Eğimin SH'sı	0,0045	0,0056	0,0054	0,005
	Kesişim (mg)	- 0,028	- 0,031	- 0,032	-0,0041
	Kesişimin SH'sı	0,012	0,014	0,014	0,017
	r²	0,942	0,897	0,918	0,897
	Regresyonun S.H.	0,018	0,023	0,022	0,018

Çizelge 4.30. Optimum bijel formülasyonların üreye ait kinetik değerlendirme sonuçları

		B1	B5	B8
0°	Eğim (mg/saat)	4128,1	3380,731	3374,558
	Eğimin SH'sı	676,345	355,025	627,739
	Kesişim (mg)	29578,45	16796,18	28313,81
	Kesişimin SH'sı	6572,891	3460,222	6100,535
	r²	0,918	0,964	0,897
	Regresyonun SH'sı	14347,44	7531,215	13316,37
	Akı (mg/cm²/saat)	4128,1	3380,731	3374,558
1°	Eğim (ln mg/saat)	0,209	0,211	0,202
	Eğimin SH'sı	0,168	0,161	0,167
	Kesişim (ln mg)	8,376	8,009	8,329
	Kesişimin SH'sı	1,634	1,562	1,624
	r²	0,425	0,444	0,416
	Regresyonun SH'sı	3,567	3,409	3,546
Q√t	Eğim(mg /√saat)	23413,27	18241,49	19460,97
	Eğimin SH'sı	759,869	665,56	1011,715
	Kesişim (mg/cm²)	5623,052	-771,081	8024,287
	Kesişimin SH'sı	1961,972	1718,469	2612,237
	r²	0,996	0,995	0,991
	Regresyonun SH'sı	3086,229	2703,192	4109,111

4.5. Bijel Formülasyonlarında Ex-vivo Permeasyon Çalışmaları ve Dokularda Miktar Tayinine Ait Bulgular

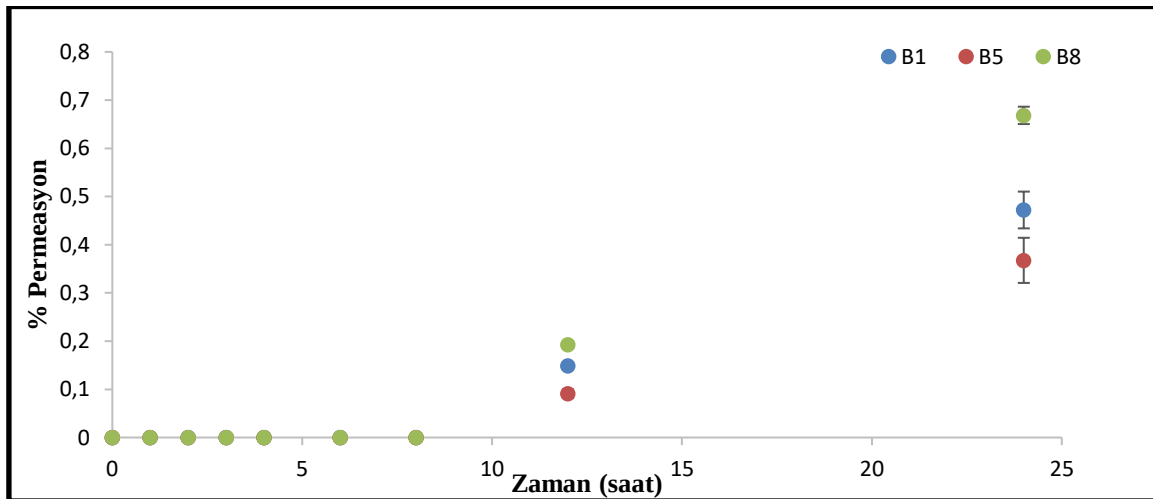
Sıçan sırt derisi kullanılarak yapılan ex-vivo permeasyon çalışmasında alıcı fazda siklopiroks ve üre tayin edilemedi. Bu bize ilgili maddelerin doku ve/veya verici odacıkta kaldığını gösterdi.

Sığır toynak membranı kullanılarak yapılan çalışmada alıcı fazda siklopiroks 12. saatten sonra tayin edilebildi.

Ex-vivo permeasyon çalışmaları sadece bijellerde yapıldı.

Çizelge 4.31. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun ex-vivo permeasyon çalışması sonuçları (ort.±SS) (toynak membranı)

Zaman (sa)	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$			Ticari krem/cila
	B1	B5	B8	
0-0,5-1-1,5-2-3-4-6-8	Permeasyon yok.	Permeasyon yok.	Permeasyon yok.	Permeasyon yok.
12	14,861 $\pm$ 1,13	9,085 $\pm$ 1,58	19,241 $\pm$ 0,66	Permeasyon yok.
24	47,20 $\pm$ 0,066	36,75 $\pm$ 8,11	66,83 $\pm$ 1,80	Permeasyon yok.



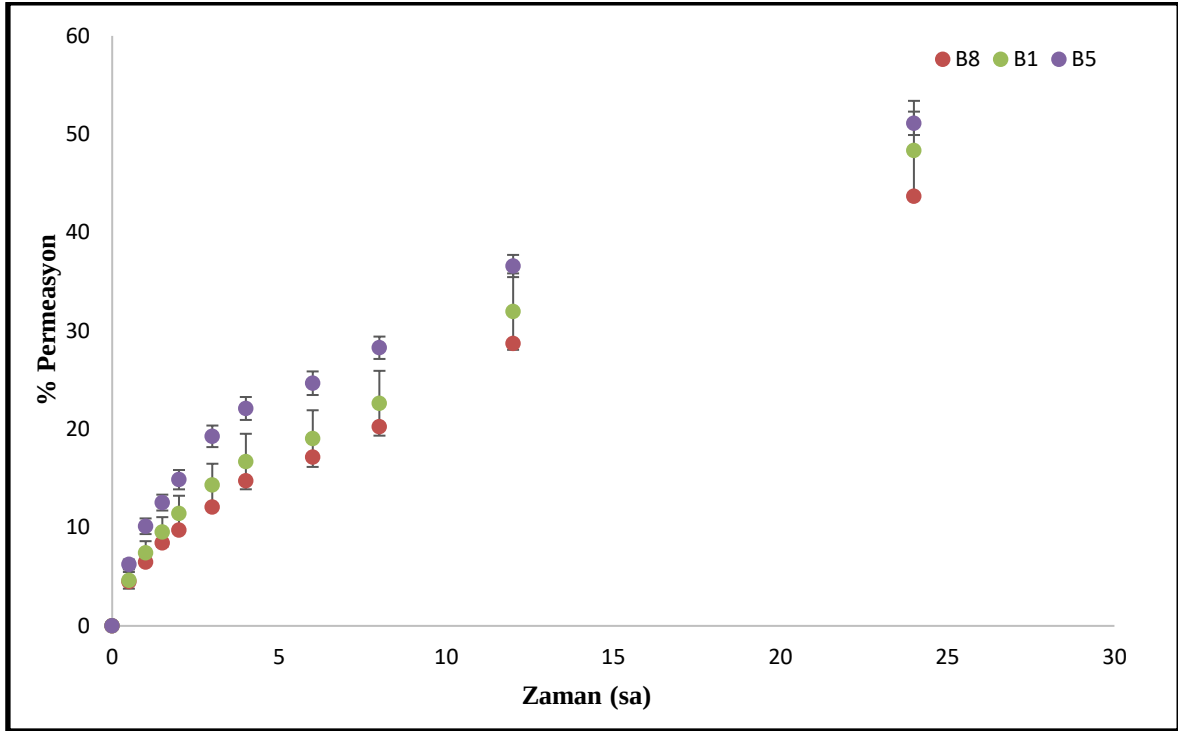
Şekil 4.65. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun ex-vivo permeasyon grafiği (toynak membranı)

Çizelge 4.32. Optimum bijel formülasyonlarından siklopiroksun toynak membranından geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı değerleri (n=3) (ort $\pm$ SH)

Formülasyon	Akı ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{saat}$)	r^2	Permeabilite (cm/sa)
B1	1,35 $\pm$ 0,063	0,999	0,135
B5	1,15 $\pm$ 0,23	0,981	0,115
B8	1,98 $\pm$ 0,22	0,994	0,198

Çizelge 4.33. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin ex-vivo permeasyon çalışması sonuçları (ort. $\pm$ SS) (toynak membranı)

Zaman (sa)	mg/cm ²		
	B1	B5	B8
0	0,00	0,00	0,00
0,5	9,02 $\pm$ 3,8	9,3 $\pm$ 2,9	7,2 $\pm$ 0,87
1	12,99 $\pm$ 5,1	14,84 $\pm$ 4,1	11,13 $\pm$ 1,4
1,5	16,87 $\pm$ 6,9	19,09 $\pm$ 5,3	14,5 $\pm$ 1,4
2	19,5 $\pm$ 8,02	22,88 $\pm$ 6,2	16,9 $\pm$ 1,7
3	24,14 $\pm$ 9,7	28,64 $\pm$ 7,5	19,3 $\pm$ 1,9
4	29,5 $\pm$ 12,3	33,4 $\pm$ 9,7	25,1 $\pm$ 2,0
6	34,3 $\pm$ 13,0	38,09 $\pm$ 9,9	38,68 $\pm$ 2,1
8	40,5 $\pm$ 14,4	45,3 $\pm$ 11,4	42,3 $\pm$ 1,9
12	57,45 $\pm$ 18,4	63,9 $\pm$ 13,4	56,6 $\pm$ 1,9
24	87,39 $\pm$ 22,8	96,69 $\pm$ 17,4	78,1 $\pm$ 2,1



Şekil 4.66. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin ex-vivo permeasyon grafiği (toynak membranı)

Çizelge 4.34. Optimum bijel formülasyonlarından ürenin toynak membranından geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı değerleri (n=3) (ort±SH)

Formülasyon	Akı (mg/cm ² /saat)	r ²	Permeabilite (cm/sa)
B1	3418,47 ± 232,88	0,979	17,09
B5	3766,26 ± 275,81	0,976	18,83
B8	3193,19 ± 299,49	0,963	15,97

Ex-vivo çalışma sonrasında membranda kalan etkin madde miktarı

Sıçan sırt derisinde ex-vivo penetrasyon çalışması Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada verici faza konan bijeller, ticari krem ve ticari cila formülasyonunda 10 mg siklopiroks içermektedir. Bijeller ayrıca 200 mg üre de bulunduruyordu.

Çizelge 4.35. Optimum bijel, ticari krem ve cılanın sığır toynak membranında kalan siklopiroks ve üre miktarı (ort+SS)

Formülasyon	Siklopiroks		Üre	
	µg	Dozun %'si	mg	Dozun %'si
B1	140,72+6,14	1,4	22,25+2,95	11,13
B5	9,21+0,90	0,09	1,58+0,11	0,79
B8	26,54+0,61	0,27	2,44+0,22	1,22
Ticari krem	1,63+0,14	0,016	Üre bulunmamaktadır.	Üre bulunmamaktadır.
Ticari cila	149,55+8,59	1,49	Üre bulunmamaktadır.	Üre bulunmamaktadır.

Çizelge 4.36. Optimum bijel, ticari krem ve cılanın sıçan sırt derisinde kalan siklopiroks ve üre miktarı (ort+SS)

Formülasyon	Siklopiroks		Üre	
	µg	Dozun %'si	mg	Dozun %'si
B1	653,55+105,27	6,54	67,70+2,5	33,85
B5	334,83+22,19	3,35	53,99+2,5	26,99
B8	447,96+35,94	4,48	35,74+2,62	17,87
Ticari krem	189,59+23,86	1,89	Üre bulunmamaktadır.	Üre bulunmamaktadır.
Ticari cila	1990,91+1026,79	19,90	Üre bulunmamaktadır.	Üre bulunmamaktadır.

4.6. Bijel Formülasyonlarının Toynağı Şişirme Derecesinin Tespitine Ait Bulgular

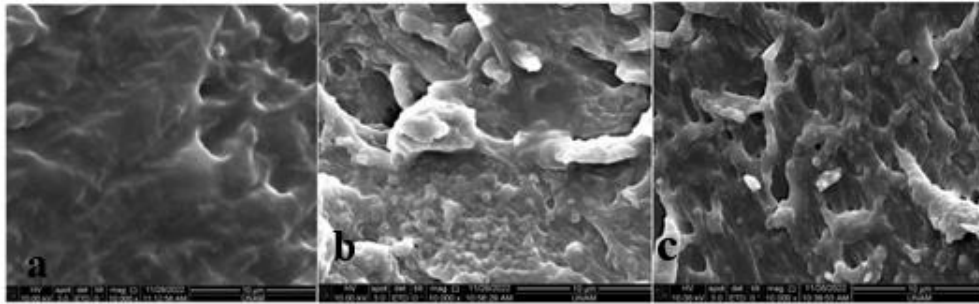
Optimum formülasyonların toynağı şişirme derecesi verileri Çizelge 4.37’de verildi.

Çizelge 4.37. Optimum formülasyonların toynaktaki ağırlık artışı

	$T_{0ort.} (g) \pm SS$	$T_{24ort.} (g) \pm SS$	Artış
B1	0,0604 $\pm$ 0,000327	0,1484 $\pm$ 0,003199	2,456
B5	0,0661 $\pm$ 0,00299	0,0846 $\pm$ 0,0055	1,28
B8	0,1039 $\pm$ 0,000557	0,1339 $\pm$ 0,00435	1,2887

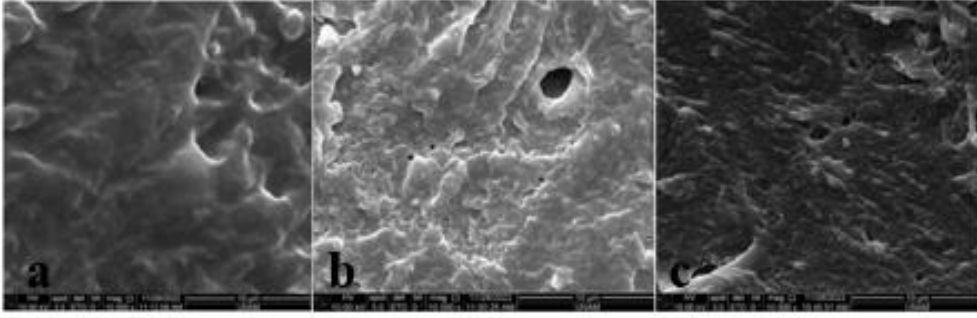
4.7. Bijel Formülasyonlarında Bekletilen Toynakların SEM Görüntüsüne Ait Bulgular

Formülasyon uygulanmayan toynakta membranın pürüzsüz olduğu, formülasyon uygulanan toynak membranlarında zamanla por sayılarının artarak, genişlediği görüntülendi ve Resim 4.4-4.6’da verildi.

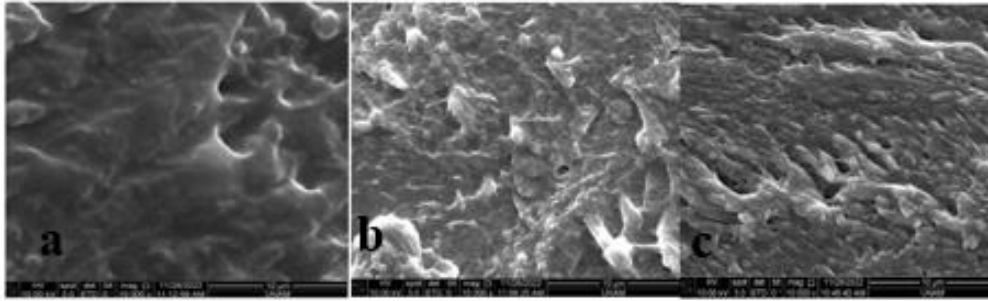


Resim 4.4. B1formülasyonu ile temas eden toynak membranı (*10000)

a) Bijelle temas etmeyen kuru toynak membranı b) B1 ile 12 saat temas eden toynak membranı c) B1 ile 24 saat temas eden toynak membranı



Resim 4.5. B5 formülasyonu ile temas eden toynak membranı (*10000) a) Bijelle temas etmeyen kuru toynak membranı b) B5 ile 12 saat temas eden toynak membranı c) B5 ile 24 saat temas eden toynak membranı



Resim 4.6. B8 formülasyonu ile temas eden toynak membranı (*10000) a) Bijelle temas etmeyen kuru toynak membranı b) B8 ile 12 saat temas eden toynak membranı c) B8 ile 24 saat temas eden toynak membranı

4.8. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Antifungal Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Sterilite çalışması: Formülasyonları hazırlarken herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü.

Antifungal aktivite çalışması: Çalışma sonunda saptanan inhibisyon zonları Çizelge 4.38'de verildi.

Çizelge 4.38. Agar dilüsyon yöntemi formülasyonların inhibisyon zonları (mm)

Formülasyonlar		R _{ort} (mm)	
		Candida albicans ATCC 10231	Trichophyton rubrum RSKK 486
1	B1*	12± 0,00	12± 0,00
2	B5*	12± 0,00	12± 0,00
3	B8*	12± 0,00	12± 0,00
4	B1	-	-
5	B5	-	-
6	B8	-	-
7	Üre çözeltisi	-	-
8	Siklopiroks çözeltisi	12± 0,00	12± 0,00
9	Üre+Siklopiroks çözeltisi	12± 0,00	12± 0,00
10	Ticari ürün cila	15± 0,00	15± 0,00
11	Ticari ürün krem	12± 0,00	12± 0,00

*etkin maddeleri içeren formülasyonlar

4.9. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular

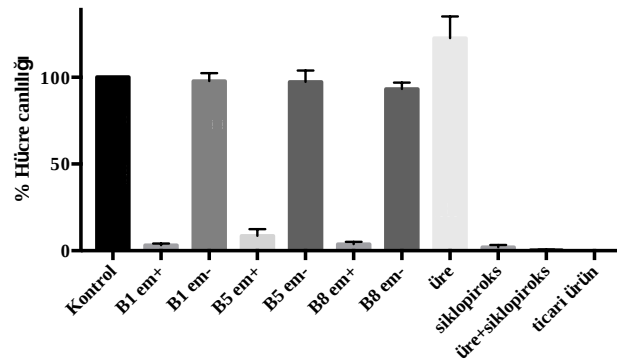
Sitotoksosite değerlendirmesine ait sonuçlar Çizelge 4.39 ve Şekil 4.67’de verildi.

Çizelge 4.39. HaCaT hücrelerinin geliştirilen formülasyon ve etkin maddeler ile uygulanması sonrası in-vitro sitotoksosite sonuçları

Test maddesi	% Hücre canlılığı (ort ± SS)	p
Negatif kontrol	100 ± 0,00	
B1*	3,21 ± 0,94	<0,0001**
B1	97,8 ± 4,54	0,172
B5*	8,53 ± 3,95	<0,0001**
B5	97,3 ± 6,55	0,235
B8*	3,75 ± 1,29	<0,0001**
B8	93,2 ± 3,64	<0,0001**
Üre çözeltisi	123,0 ± 12,4	<0,0001**
Siklopiroks çözeltisi	2,06 ± 1,21	<0,0001**
Üre + siklopiroks çözeltisi	0,32 ± 0,35	<0,0001**
Ticari krem	0,0 ± 0,00	<0,0001**
Doksorubisin çözeltisi	IC ₅₀ =0,3 ± 0,01 µM	<0,0001**

*etkin madde içeren formülasyon

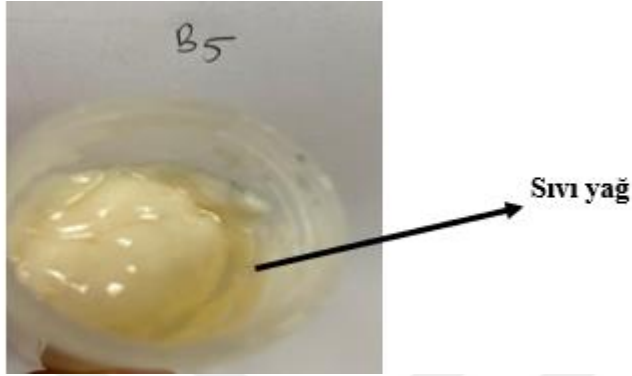
**Kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişim (student t test)



Şekil 4.67. Formülasyon ve etkin maddelerin HaCat hücrelerine 48 saat maruz bırakılması sonucu hücre canlılığı üzerine etkisi

4.10. Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

Stabilité çalışmasına ait veriler Çizelge 4.40-4.42’de verildi. B5 formülasyonunda 3 ay sonra faz ayrışması görüldüğü için çalışma planından çıkarıldı. Stabilité çalışması devam etmektedir.



Resim 4.7. B5 no’lu bijelin 3. aydaki görüntüsü

Çizelge 4.40. Başlangıçta ve 3. ayda optimum formülasyonların 25 °C ve 40 °C’ deki K ve n değerleri

Zaman (ay)	Başlangıç	3.ay	
Formülasyonlar	25 °C	25 °C	40 °C
B1	K=21764,05 n=0,44	K=2058,9 n=0,73	K=5318,8 n=0,55
B5	K=2032342 n=1,3	Faz ayrışması	Faz ayrışması
B8	K=502810,4 n=0,68	K=102547,9 n=0,76	K=114327,6 n=0,46

Çizelge 4.41. Başlangıç ve 3. ayda optimum formülasyonların pH değerleri (ort.±SS)

Zaman (ay)	Başlangıç	3. ay	
Formülasyonlar	25 °C	25 °C	40 °C
B1	5,28 ± 0,015	5,90 ± 0,08	6,05 ± 0,25
B5	5,60 ± 0,005	Faz ayrışması	Faz ayrışması
B8	6 ± 0,015	6,52 ± 0,05	6,95 ± 0,03

Çizelge 4.42. Başlangıç ve 3. ayda optimum formülasyonların etkin madde içerik değerleri (% $\pm$ SS)

Formülasyonlar	Etkin madde/Zaman(ay)	Başlangıç	3. ay	
		25 °C	25 °C	40 °C
B1	Siklopiroks	%98 $\pm$ 0,096	%98,8 $\pm$ 0,001	%98 $\pm$ 0,0006
	Üre	%99,9 $\pm$ 0,00048	%100,04 $\pm$ 0,034	%99,12 $\pm$ 0,02
B5	Siklopiroks	99,5 $\pm$ 0,0251	Faz ayrışması	Faz ayrışması
	Üre	98 $\pm$ 0,0006		
B8	Siklopiroks	%99,5 $\pm$ 0,0251	%100,7 $\pm$ 0,01	%98,8 $\pm$ 0,01
	Üre	%98 $\pm$ 0,0006	%98,5 $\pm$ 0,008	%99,5 $\pm$ 0,03

5. TARTIŞMA

5.1. Siklopiroks ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Siklopiroksun erime derecesi tayini

Siklopiroksun Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) analizi ile erime derecesi 143 °C’de tek keskin bir endotermik pik verdi ve literatür ile uyumlu bulundu [159]. Bu da etkin maddenin saf olduğunu gösterdi [195]. Yapılan literatür taramalarında siklopiroksun tuzu olan siklopiroks olamin ile yapılan çalışmalara da ulaşıldı ve yapılan bir çalışmada erime derecesinin 140-145 °C arasında olduğu görüldü [196].

Çalışmamızda siklopiroks ile diğer etkin maddemiz olan üre ve yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşim/geçimsizliğin olmadığı saptandı.

5.1.2. Siklopiroksun FTIR analizi

Siklopiroksun IR spektrumu Şekil 4.3’de verildi. FTIR analizinde siklopiroks için karakteristik piklerin 2922,16 cm⁻¹ ve 2852,72 cm⁻¹’de C-H bandı, 1637,56 cm⁻¹’de C=O (asetil karbonil) bandı, 1535,34 cm⁻¹’de C=C bandı, 1444,68 cm⁻¹’de C-C bandı literatür ile uyumlu bulundu [170].

5.1.3. Siklopiroksun çözünürlük çalışmaları

Topikal olarak kullanılacak formülasyonun geliştirilmesinde etkin maddenin bulunduğu ortamda çözünmesi emilme ve tedavi sağlayabilme açısından önem taşımaktadır.

Siklopiroks lipofilik bir etkin maddedir. Sudaki çözünürlüğü literatürde 0,22 mg/mL olarak verildi. Bizim yaptığımız çalışmada 0,198 mg/mL bulundu [158, 197]. Bu değerin daha önce bulunmuş çözünürlük değerine çok yakın olduğu saptandı.

Siklopiroks ile yapılan çalışmalara bakıldığında genellikle olamin tuzunun kullanıldığı görülmektedir. Siklopiroks olaminin oda sıcaklığındaki çözünürlüğü 12,4 mg/mL olarak bildirildi [29]. Bu tuzun sudaki çözünürlüğü aynı koşullarda siklopiroksdan daha yüksektir.

Çalışmamızda in-vitro salım ve ex-vivo permeasyon çalışmalarda alıcı fazımız pH 7,4 fosfat tamponu olduğundan, bu ortamda da çözünürlük tayin edildi ve 0,35 mg/mL bulundu. Literatürde bu pH'daki bir tamponda herhangi bir çözünürlük çalışması bulunamadı.

5.1.4. Siklopiroksun partisyen katsayısının belirlenmesi

Oktanol/su partisyen katsayısının belirlenmesi, etkin maddenin çözücü ve su arasındaki dağılımını verdiği için formülasyon geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Çalışmamızda siklopiroksun partisyen katsayısı 2,2 olarak hesaplandı. Literatürde de siklopiroksun oktanol/su partisyen katsayısının 2,59 ve 2,2 olarak verildiği görüldü [7, 198]. Değerlerin bizim sonuçlarımızla benzer olduğu saptandı.

5.1.5. Siklopiroksun HPLC analiz yöntemine ait yapılan çalışmalar

Çalışmamızda HPLC analizinde literatürde belirtildiği gibi dalga boyu 305 nm olarak alındı [199, 200].

Analitik validasyon çalışmalarında, doğruluk/geri elde, kesinlik/tekrar edilebilirlik ve stabilite için tüm sonuçların % bağıl sapması %2'in altında ve ICH kılavuzlarına uygun olduğu bulundu. Duyarlılık ve saptama sınırı parametreleri hesaplandı. Özgünlüğün belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ise siklopiroksun pik oluşturduğu yerde herhangi bir pik oluşmadı ve analiz yönteminin siklopirokse özgü olduğu saptandı.

5.2. Üre ile Yapılan Çalışmalar

5.2.1. Ürenin erime derecesi tayini

Ürenin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) analizi ile erime derecesi 138 °C’de, tek keskin bir endotermik pik verdi. Bu da etkin maddenin saf olduğunu gösterdi. Yapılan literatür taramalarında ürenin erime derecesinin 135-140 °C arasında olduğu ve bu nedenle sonuçların literatür ile uyumlu olduğu bulundu [201, 202].

5.2.2. Ürenin FTIR analizi

Ürenin IR spektrumu Şekil 4.4’te verildi. FTIR analizinde üre için karakteristik piklerin 1673 cm^{-1} ’de C-O bandı, 1629 cm^{-1} ’de C=O ve N-H bantları, 1467 cm^{-1} ’de C-N bandı, 3450 cm^{-1} , 1153 cm^{-1} ve 1055 cm^{-1} ’de NH₂ bandı, 1000 cm^{-1} C-N bandında olduğu görüldü. Bu sonuçların da literatür bilgisi ile benzer olduğu saptandı [201].

5.2.3. Ürenin çözünürlük çalışmaları

Üre, literatürde suda çok çözünen bir madde olarak geçmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25 °C’de 1,9 g/mL olarak bulunmuştur. Literatürde ürenin çözünürlüğü 20 °C’de 1,36 g/mL olarak verildi [203, 204]. Sonuçların sıcaklığa bağlı olarak farklılık gösterebileceği düşünülmektedir.

5.2.4. Ürenin HPLC analiz yöntemine ait yapılan çalışmalar

Yapılan literatür taramalarında ürenin tayininde UV alanda pik vermediği ve spektrofotometrede çalışmadan önce renklendirme yapıldığı görüldü [205]. Ürenin analizinde bu yöntem tercih edilmedi; miktar tayini için sadece HPLC analizi kullanıldı. Üre için HILIC kolon kullanılması gerektiği yapılan çalışmalarda görüldüğü için, bizim çalışmamızda da bu kolon kullanıldı [206].

Çalışmamızda HPLC analizinde dalga boyunun 203 nm olarak kullanılmasına ve mobil faza karar verilmesinde daha önce yapılan bir çalışmadan yararlanıldı. Bu çalışmadan yola çıkılarak mobil fazda kullanılacak asetonitril oranına karar verildi [206-208].

Analiz için, validasyon çalışmalarında, doğruluk/geri elde, kesinlik/tekrar edilebilirlik ve stabilite için tüm sonuçların % bağıl sapması %2'in altında bulundu. Duyarlılık ve saptama sınırı parametreleri hesaplandı. Özgünlüğün belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ise ürenin pik verdiği yerde başka maddelere ait herhangi bir pik saptanmadı; yani analiz yöntemi üreye özgü bulundu.

5.3. Bijel Formülasyonların Geliştirilmesi için Yapılan Çalışmalar

Bijel yapısında bulunan hidrojel ve organojelin hazırlanmasında birçok polimer ve yağın kullanıldığı ve bu konuda yapılmış çok sayıda çalışmanın olduğu görüldü [134, 137].

Bizim çalışmamızda hidrojel ve organojel ayrı ayrı hazırlandı, 24 saat oda sıcaklığında bekletildi ve sonra sıcakta her 2 jelin karıştırılmasıyla bijeller hazırlandı. Literatürde bu yöntemin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir [116, 117, 121, 122, 137].

5.3.1. Hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesine için yapılan çalışmalar

Hidrojel formülasyonlarında polimer olarak Karbopol 974P kullanıldı ve formülasyonda alkali özelliği olan üre bulunduğundan jelleştirme amaçlı ayrıca bir baz kullanılmadı. Karbopol'ün polimer olarak kullanıldığı hidrojellerde pH'yı ayarlamak için trietanolamin ya da NaOH'in kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [123, 209, 210]. Karbopol 974P hidrofilik, poliakrilik asit polimeridir. Jel oluşturma kabiliyeti, tahriş edici veya toksik olmaması, suya olan ilgisinin, biyouyumluluğunun ve moleküler ağırlığının yüksek olması gibi avantajlarından dolayı topikal formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır [211]. Literatürde Karbopol 974P %'sinin farklı kullanıldığı jel formülasyonları bulunmaktadır [212-215]. Hidrojel formülasyonundaki üre konsantrasyonu, dünya ilaç piyasasındaki ticari ürün örnekleri ile aynı olması için %40 olarak belirlendi. Yapılan bir çalışmada Karbopol 974P oranı %1 olarak kullanılarak hidrojel formülasyonu hazırlandı [215]. Fakat bizim hazırladığımız hidrojel formülasyonunda üre %'si yüksek olduğundan (%40), %0,25'ten

daha fazla oranda Karbopol 974P kullanıldığında formülasyondaki su, polimerin jelleşmesi için yeterli olmamaktadır. Karbopol 974P, %0,125 ve % 0,25 oranında kullanıldığında jelin viskozitesinin bijel hazırlamaya uygun olduğu deneysel olarak saptandı.

Yarı katı ilaç şekillerinden olan jel sistemlerin viskozitesi hasta uyuncunu ve dolayısıyla da tedaviyi etkilediği için önem taşımaktadır. Bu sebeple hidrojel formülasyonlarının akış özellikleri ve viskozitesi gibi özellikleri incelenmelidir. Çalışmamızda viskoziteye karşı kayma hızı grafiğe geçirildiğinde hazırlanan hidrojel formülasyonlarının Non-newtonian akış gösterdiği ve psödoplastik akış özelliğine sahip olduğu görüldü. Bu durum literatür bilgisi ile benzerdi [215-217]. Psödoplastik akış özelliği, tırnak ve deriye uygulanan hidrojin sürülme esnasında akışkan duruma geçip ince jel tabakasının oluşmasını ve etkin maddelerin deri veya tırnak ile birebir temasını kolaylaştırır. Yapılan bir çalışmada düşük kayma hızında yüksek viskoziteye sahip olmaları, saklama sırasında bu sistemlerin yüksek stabilite göstermelerini sağladığı bildirildi [218].

5.3.2. Organojel formülasyonlarının geliştirilmesi için yapılan çalışmalar

Organojel formülasyonlarında jelleştirici ajan olarak GMS kullanıldı. GMS farmasötik ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır [219]. GMS'in organojel formülasyonlarında farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı birçok çalışma vardır [150, 219, 220]. Organojel Span80 içerecek şekilde ve sıcakta hazırlama tekniği ile jelleştirici ajanın sıvı yağ içinde eritilmesiyle hazırlandı [147, 220]. GMS konsantrasyonu %5 ve %10 olan organojel formülasyonlarının viskozitesi bijel hazırlamaya uygun bulundu. Yapılan bir çalışmada GMS (%5 ve %10) ve sürfaktan olarak da Span 80 kullanıldığında jelleşmede bir sorun yaşanmadığı ve organojelin rahatlıkla hazırlanabildiği bildirildi [219]. Yapılan başka bir çalışmada organojel formülasyonunda GMS kullanılmasının bijelin stabilitesini iyileştirdiği bildirildi [221].

Çalışmamızda organojel formülasyonlarının akış özellikleri ve viskozitesi de incelendi. Viskoziteye karşı kayma hızı grafiğe geçirildiğinde hazırlanan organojel formülasyonlarının Non-newtonian akış özelliğinde olduğu ve psödoplastik akış özelliğine sahip olduğu görüldü. Bu durum yapılan çalışmalarla da uyumlu bulundu [222, 223].

5.3.3. Bijel formülasyonlarında yapılan çalışmalar

Optimum olarak seçilen bijel formülasyonlarında (B1, B5 ve B8) aşağıda verilen karakterizasyon çalışmaları yapıldı ve literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldı.

Hazırlanan 3 bijelin (B1, B5 ve B8) beyazımsı renkli, kremi yapıda olduğu gözlemlendi. Bu bulgunun literatür ile uyumlu olduğu saptandı [118, 123, 126, 146].

pH

Bijellerin pH'sının 5-6 arasında olduğu tespit edildi. Sonuçlar sağlıklı cildin fizyolojik pH aralığı içindeydi. Topikal uygulamalarda cildin tahriş olmaması açısından formülasyonun pH'sı çok önemlidir. Hazırlanan bijellerin deride güvenle kullanılabileceği ve sonucun literatürler ile de uyumlu olduğu görüldü [110, 146].

Jel oluşup oluşmadığının tespiti

Bijel oluşup oluşmadığının tüp çevirme tekniği ile kontrol edildiği çok sayıda makale olduğu saptandı [117, 118, 129, 136]. Çalışmamızda bu teknik kullanıldı. Esasında bu teknik kullanılmadan da jellerin olduğu görsel olarak saptandı.

Dış faz tespiti

Dış faz tespiti için Sudan III boyası kullanıldı. Bu teknik literatürlerde sıklıkla kullanılan klasik bir tekniktir [113, 132].

Bizim çalışmamızdan farklı olarak, yapılan bazı çalışmalarda dış faz tespiti için, bijel hazırlanırken su fazına Rodamin B, yağ fazına ise Florol sarısı 088 eklenmiş ve sistem mikroskopta incelendi. Görüntülemeye renk farklılığından dolayı dış fazın hidrojel den oluştuğu bildirildi [116, 129, 136, 194].

Etkin madde içerik tayini

Çalışmamızda optimum bijellerde siklopiroks içeriği %98-99,5 arasında iken, üre %98-100 arasında bulundu. ICH Q3 kılavuzuna göre formülasyondaki etkin madde %95-105 arasında bulunmalıdır. Bijel formülasyonlardaki etkin madde içerikleri olması gereken aralıkta bulundu. Yapılan farklı çalışmalarda da etkin madde içeriklerinin benzer oranlarda bulunduğu ve çalışmamızdaki değerlerin kılavuz ile uyumlu olduğu saptandı [154]. Ayrıca USP'ye göre etkin madde içerik tayini %90-110 arasında olmasını referans gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [113, 115, 117].

Damla boyutu tayini

Damla boyutu tespiti için bijel su içinde diperse edildi. Dispersiyonlar için damla büyüklüğü ve dağılımı çok önemlidir. Küçük damlalardan oluşan dispersiyonların, daha büyük damlalardan oluşan dispersiyonlara göre daha stabil olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [224].

Çalışmamızda hazırlanan bijellerin damla boyut dağılımlarının multimodal dağılım modelinde olduğu görüldü. Bu durum damlaların formülasyon içinde aynı boyutta olmadığını ve iç fazın dış fazda büyüklü küçüklü dağıldığını gösterdi.

Behera ve diğerleri, floresan mikroskop kullanarak bijel içinde oluşan damla boyutunu incelendi. Bijelleri floresan özellikli boya olan Rodamin B ve Florol sarı 088'i sırasıyla su ve yağ fazında çözerek hazırlamışlar ve damla boyutunu da ImageJ yazılımı v 1.43 kullanarak analiz etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bizim çalışmalarımızla benzer şekilde damla boyutu dağılımının yüksek olduğunu, damlaların %50'sinin 8-13 μm arasında ve multimodal bir dağılım olduğunu belirtmişlerdir [136]. Bizim çalışmamızda damlaların %90'dan fazlası yaklaşık 300-500 nm arasında bulunmuştur. Damla boyutundaki bu farklılığın sebebi, farklı yardımcı maddelerin kullanılmasından ve farklı karıştırma hızından dolayı oluşmuş olabilir. Karıştırma hızıyla damlaların küçüldüğü çalışmamızda ispatlandı.

Hazırladığımız formülasyonlardan damla boyutu diğerlerine göre büyük olan (B2, B3, B4, B6, B7- Çizelge 3.10) formülasyonlarda santrifüj ile faz ayrımı gözlemlendi. Bu durum

hidrojel içinde dağılmış olan büyük yağ damlalarının birleşme eğiliminde olduğunu gösterdi. Optimum olarak seçilen B1, B5 ve B8 formülasyonlarının damla boyutu dağılımlarının daha homojen oldukları ve bu sayede de stabilitelerinin de daha iyi olduğu sonucuna varıldı. Bununla beraber B5 formülasyonunun 3. ayda faz ayrışmasına uğradığı görüldü. Bu durumun sebebinin de iç faz oranının diğerlerine göre fazla olması ve sürfaktanın yağ/su arayüzeyini tamamen kaplayamaması ve damlaların birleşme eğilimlerine bağlandı.

Bijelleri santrifüjleme zorlayıcı bir koşuldur ve fiziksel stabilite hakkında önemli bilgi verir.

Yapılan bir çalışmada 4000 rpm'de 10 dk santrifüjleme ile stabilite test edildi. Sodyum alginat hidrojeli + Aerosil organojelinden oluşan bijelin santrifüjden sonra homojen görünümde olduğu ve faz ayrımı olmadığı bildirildi [225]. Santrifüj ile stabilite kontrolünün yapıldığı başka bir çalışmada da 1000 rpm, 10 dk santrifüj uygulanmış ve hazırlanan tüm formülasyonların stabil olduğu bildirildi [144].

Mazurkeviciute ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada 40 °C / % 75BN'de hızlandırılmış stabilite çalışması yapmışlar ve büyük damla boyutuna sahip bijel formülasyonlarında kendiliğinden faz ayrışması olduğunu bildirmişlerdir [134]. Bizim çalışmamızda ise büyük damla boyutuna sahip bijelerde santrifüj uygulandığında faz ayrışması meydana geldi. B5 bijelinde santrifüj ile bir faz ayrışması meydana gelmedi, fakat süspande bir sistem olması nedeniyle, bekleme ile faz ayrışması saptandı.

Bijelerde damla boyutu ve dağılımını hidrojel/organojel oranı da etkilemektedir.

Andonova ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada hidrojel/organojel oranı farklı (80:20, 70:30 ve 60:40) 3 bijel hazırlanmış; bijeller pH 5,5 fosfat tamponunda dağıtılarak, Nanotra Wave apparatus ile damla boyut dağılımları saptandı. Hidrojel %'si 70 ve 80 olan bijel formülasyonlarında organojelin hidrojel içinde düzenli ve homojen bir şekilde dağıldığı, hidrojel %'si 60 olan bijel formülasyonunda ise tam bir organojel ve hidrojel ayrımı olmadığı, bildirildi. Yaptığımız çalışmada da damla boyutunun hidrojel oranından etkilendiği tespit edildi. Formülasyondaki tüm bileşenlerin oranları, karıştırma hızı, sıcaklık gibi bileşenlerin de çok etkili olduğu bulundu. Yapılan çalışmalarda hidrojelin organojel içinde homojen dağılmasının stabilite için önemli olduğu homojen olmayan dağılım nedeniyle bijel formülasyonunun 1 ay içinde faz ayrımına uğradığı söylendi.

Bimodal bir dağılım gösteren bijellerde, damlaların %90'ı 0,257 μm 'den büyük iken sadece %5'i 3,29 μm 'den büyük olduğu bulunmuştur [123].

Başka bir çalışmada da aljinat hidrojel ve badem yağı organojeli ile hazırlanan bijel formülasyonunun (50:50) damla boyutu ve sayı açısından düzenli küçük tekdüze damlacıklar oluşturduğu bildirildi [116] .

Bijel yapısında kristallanma olup olmadığının tespiti

Hazırlanan optimum bijellerde yapının görüntülenmesi için çok çeşitli mikroskoplar kullanılmaktadır [110, 149, 150]

Bijellerimizde yapıda kristal olmadığı görüldü. Organojel oranı yüksek olan B5 ve B8'de bile yoktur. Bunun sebebi organojel hazırlarken etkin maddenin sıvı yağda çözülmüş olmasına bağlandı.

Chen ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada dış fazları ve organojel oranları farklı bijeller (80 (H/O), 60 (H/O), 50 (O/H), 40 (O/H), ve 20 (O/H)) hazırlamış ve polariza ataçmanlı mikroskop ile görüntülemişlerdir. Organojel tek başına görüntülendiğinde yapısındaki balmumunun iğne benzeri kristaller oluşturduğu, bijel içindeki organojel oranı %60 ve %80 olduğunda sürekli fazda balmumu kristal oluşumunun devam ettiği görülmüştür. Oran %40 ve %50 olduğunda damlaların etrafında kristal oluşumu görüntülenirken, oran %20'ye düştüğünde ise kristaller neredeyse yok olmuştur. Organojel oranının azalmasıyla dış faz değişmiş ve organojel bu fazda dağıldığı için kristal oluşmadığı ileri sürülmüştür [226].

Vergara ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada farklı organojel/hidrojel oranlarında hazırladıkları bijellerin yapılarını polarize ataçmanlı mikroskop ile incelemişlerdir. Organojel oranı %60'tan %40'a düşürüldüğünde oluşan damlaların daha küçük olduğu ve daha homojen dağıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca mumdan kaynaklanan kristal oluşumu da azaldı [149].

Viskozite ölçümü ve reolojik özelliklerin belirlenmesi

Yarıkatı formülasyonların akış özelliklerinin tespiti önemli kalite kontrol çalışmalarından birisidir. Reolojik özellikler iç yapıdaki gözle görülemeyen değişikliklerin anlaşılmasını sağladığı için kontrol edilmesi gereken özelliklerdendir.

Khelifi ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, bizim sonuçlarımızla benzer şekilde, hazırladıkları bijel formülasyonlarının viskozitelerini ölçtüklerinde kayma hızındaki artışla viskozitenin azaldığı ve psödoplastik akış davranış sergilediği bildirildi [116].

Bijel formülasyonlarında tek bir viskozite değerinin olmadığından önceki bölümlerde bahsedilmişti. Pseudoplastik akışta viskozite, Ostwald de Waele eşitliğinden hesaplanan akış yoğunluğu indeksi (K) ile ifade edilmektedir.

Hazırlanan formülasyonlarda damla boyutu küçüldükçe akış yoğunluğu indeksinin arttığı da görülmüştür. Damlalar iç fazda ve hareketli olduğu için, daha küçük damla boyutuna sahip bijellerde viskozite arttı.

Andonova ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, H/O oranı 80:20 ve 70:30 olan 2 formülasyonun kayma hızına karşı viskoziteleri ölçüldüğünde, kayma hızı arttıkça viskozitelerinin azaldığı ve sistemin psödoplastik akışa uyduğu görülmüştür [123]. Ölçülen her bir rpm’de organojel oranı yüksek olan bijelin daha yüksek viskoziteye sahip olduğu saptandı. Bu sonucu destekleyen yapılmış başka çalışmalar da vardır [141]. Bizim çalışmamızda organojel oranı arttığında yapısındaki GMS’nin de oranı artacağından sistemin viskozitesi arttı. Buna ilaveten hidrojel yapısındaki Karbopol 974P oranı da sistemin viskozitesini etkilemektedir.

Çalışmamızda hidrojel, organojel ve bijel formülasyonlarının neredeyse hepsinin (B5 hariç) psödoplastik akış davranışına uyduğu görüldü. Rehman ve Zulfakar’ın yaptıkları çalışmada da hazırlanan bijellerin de aynı şekilde kayma hızıyla viskozitelerin azaldığı görülmüştür. Bu durum yarı katı sistemlerde istenen bir durumdur. Ayrıca bu çalışmada bijel yapısındaki hidrojin azalmasıyla sistemin viskozitesi azalmaktadır [132]. Bizim çalışmamızda da bijel yapısındaki iç faz oranının azalmasıyla viskozitenin azalması, literatür ile uyumlu bulundu.

Viskoelastisite çalışmalarında G' , depolama modülü (elastik modül-elastik katılara özgü davranış), G'' ise kayıp modül (kompleks modül-viskoz sıvılara özgü akış özelliği) olarak adlandırılır [227].

Viskoelastisite ve bu özelliğin sıcaklıkla değişimi, bijellerde incelenen diğer önemli bir husustur. Bijellerin soğutulma sırasında sistem, viskoz sıvı davranıştan, katı davranışa net bir geçiş yapmaktadır. Tüm kayma hızı değerlerinde G' değerleri G'' değerleri olduğunda, katı benzeri davranış baskın olmaktadır [228]. Sol-jel geçiş sıcaklığı tespitinde (karakteristik jelleşme sıcaklığı) soğutma işlemi sırasında G' değerlerinin hızla arttığı, $G' \gg G''$ durumunun gerçekleştiği ve G'' ile G' arasında önemli bir farkın olduğu saptandı [229]. Bizim çalışmamızda da sistemimiz aynı davranışı gösterdi.

Bollom ve diğerleri farklı sıcaklıklarda bijellerin reolojik davranışını incelemişlerdir [119]. Başlangıç sıcaklığı 98 °C, bitiş sıcaklığı 8 °C olarak seçildi. Sıcaklık arttıkça bijellerin G' değerinin azalması ile elastik benzeri davranışta bir düşüş olduğu sonucuna varıldı. Bizim çalışmamızda da sıcaklık arttıkça G' düştü. Tüm bijeller için çalışma boyunca $G' > G''$ olması, tüm sıcaklıklarda elastik davranışın baskın olduğunu göstermektedir.

Fasolin ve diğerleri 4 farklı organojel/hidrojel oranında (20:80, 35:65, 50:50, 65:35, 80:20) bijeller hazırlamış ve viskoelastik özelliklerini tayin etmişlerdir [120, 230]. Tüm formülasyonlar jel benzeri davranış gösterdi. Bijel yapısındaki hidrojel ve organojellerin tek başlarına G'' (akış özelliği) değerleri bijellerden daha düşük bulunmuştur. Bu da bijellerin iki farklı yapıdaki jelin birleşiminden oluşması nedeniyle mekanik özellikleri bakımından daha sağlam bir yapı oluşturduğunu gösterdi. Bizim çalışmamızda da tüm formülasyonlarımızda bijeller daha yüksek G'' değerleri gösterdi. Bijeller, özellikle organojel içeriği hidrojelden yüksek olduğunda, daha yüksek G'' değerleri göstermektedir. Bizim hazırladığımız bijellerde de B1, B5 ve B8'in O/H oranı 0,8, 1,67, 1,67'dir ve B5 ve B8'in G'' değerleri B1'den yüksek bulunmuştur. Bu sonuç önceki çalışmaları destekler niteliktedir.

Zheng ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada önceki çalışmaları destekler nitelikte bir sonuca varmışlardır. Bijellerin, kendisini oluşturan jellere göre daha iyi mekanik özelliklerinin olmasını, organojel yapısına bağlanmışlardır [231]. Disperse fazın dolgu maddesi olarak görev yaptığını ve sürekli fazın mekanik özelliklerini iyileştirdiğini gösteren birçok çalışma vardır [112, 120]. Ancak yapılan bir başka çalışmada ise sodyum aljinat hidrojel-balmumu organojellerinin oluşturduğu bijeller için tam tersi bir durum geçerli olmuştur,

organojel oranının artması aljinat ağını bozmuş ve sonuç olarak bijellerin mekanik yapısı zayıfladı [111].

Soni ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada farklı oranlarda H/O oranlarına (60:40, 70:30, 80:20) sahip bijeller hazırlandı [128]. Bijellerin akış davranışını belirlemek için, Power law (Ostwald de Waele eşitliğini) modelini uygulamışlardır. Bijelin viskozitesi kayma hızıyla ters orantılı bulunmuştur. Psödoplastik davranış gösteren bu sistemlerin az miktarı ile geniş alana yayılmalarının kolaylaşacağı ve bu nedenle kolay uygulanacağı bildirildi.

Yapı analizi ve mekanik özelliklerin belirlenmesi

Hazırlanan bijel formülasyonlarının tırnak ve bitişindeki dokuya kolaylıkla uygulanabilmesi ve dokunun her noktasına temas edebilmesi tedaviyi etkileyen bir parametredir. Bu açıdan ve nihai formülasyonu seçebilmek için sistemin yapı ve mekanik özellikleri (sertlik, adezivlik, kohezivlik, elastikiyet ve esneklik) texture aleti ile tespit edildi.

Çalışmamızda optimum formülasyonların akış yoğunluğu indeksi (K) ile sertlik değeri arasında ilişki olduğu görülmüştür. Viskozitesi (K) en büyük, pat kıvamında olan B5 formülasyonunun sertlik değeri de en yüksek olmuştur. Sertlik, jellerin deformasyonuna karşı oluşan bir kuvvet olduğuna göre bu sonuç mantıklıdır. Sertlik formülasyonun uygulanabilirliğini etkiler. Bu değer yüksek olması, uygulama zorluğunu işaret eder ve hasta uyuncunun azalacağını gösterir.

Golodnizky ve Davidovich-Pinhas, TPA cihazını kullanarak hazırladıkları bijellerin mekanik özelliklerini tayin etmişlerdir. Hazırlanan tüm bijellerde organojel oranı aynıdır, sadece farklı HLB değerlerine sahip sükroz esterleri kullanıldı. Bijellerden düşük HLB'li SE içeren bijelin sertlik değerinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu, yüksek HLB'li SE içeren bijelin ise en düşük sertliğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Organojelin sertliği ile bijel sertliği arasında ters orantı olduğu görülmüştür. Buna göre organojele ait damla boyutunun küçülmesiyle bijel sertliğinin arttığı bildirildi. Damla boyutu küçüldükçe artan yüzey alanıyla sürekli faz ile daha fazla etkileşim söz konusu olacak ve daha viskoz/sert yapı oluşturacaktır. Bu sonucu destekleyen yapılan başka çalışmalar da bulunmaktadır [122, 232, 233]. Bizim yaptığımız çalışmada da bijelin iç fazını oluşturan organojelin damla boyutunun, bijel sertliği üzerinde birebir etkili olduğu görüldü.

Yapılan diğer çalışmalarda organojelin sertliği arttıkça bijelin sertliğinin de aynı şekilde arttığı bildirildi [234, 235]. Bu çalışmalarda koheziflik parametresinin kullanılan sürfaktanın HLB değerinden çok, kullanılan yüzey aktif maddenin konsantrasyonuna bağlı olduğu saptandı. Bizim yaptığımız çalışmada da bijelleri hazırlarken sürfaktan konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Bu nedenle koheziflik değerleri de birbirine oldukça yakın olmuştur.

Elastikiyet, kuvvet uygulandıktan sonra deforme olmuş sistemin eski haline dönebilme yeteneğidir. Bu değer yüksek olması, sistemin elastik olduğunu gösterir ve bu istenen bir durumdur. Optimum olarak seçilen bijel formülasyonlarında B1'in hem en küçük sertliğe hem de en küçük elastikiyet değerine sahip olduğu görüldü.

Jel oluşumunun en basit haliyle tespiti, yerçekiminin etkisi altında akmadığının gösterilmesiyle mümkündür. Bu husus bilimsel olarak, bir jel ($G' > G''$) ile viskoz bir sol ($G'' > G'$) arasındaki ayrımı yapmaya yarayan reolojik ölçümler (genlik taramaları) ile aydınlatılabilir. Bu ölçümler, viskoelastik numunelerin akış ve deformasyon özelliklerini ölçmeyi sağlamanın yanında, frekans taramalarına göre sistemin güçlü jeller, zayıf jeller ve viskoz sollar olarak sınıflandırılmasını da kolaylaştırır [236]. Bu sınıflandırmayı yapan çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Shakeel ve diğerleri bu kapsamda kayıp modülünden (G'') daha yüksek depolama modülüne (G') sahip bijelleri güçlü jeller olarak sınıflandırmışlardır [109]. Bizim bijellerimizin tamamında da $G' > G''$ olduğundan sistemlerimizi güçlü jeller olarak ifade edebiliriz.

Fasolin ve diğerleri sertlik, yayılabilirlik, adeziflik gibi mekanik özelliklerin bijel bileşenlerine ve proses parametrelerine bağlı olduğunu söylemişlerdir [237]. Bu konu ile ilgili birçok çalışmada fikir birliği sağlandı [132, 238]. Yüksek G'' 'ye sahip sistemler aynı zamanda yüksek sertlik, yüksek dayanıklılık ve yüksek kayma işi değerlerine de sahiptir. Aslında bijeller, aynı miktarda (%) jelleştirici ajan ile üretilen basit bir jelle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek streslere dayanabilmektedir. Çalışmada hidrojel ve organojellerin tek başına sertlik değerleri 1,2-1,3 N iken, bijellerin sertlik değerleri 2 N'den yüksek olup, bu değerlerin 10 N'a bile ulaştığı kaydedildi. Bizim çalışmamızda da B8'in en yüksek G'' değerine ve bununla bağlantılı olarak en yüksek sertlik, dayanıklılık ve kayma işi değerlerine sahip olduğu görüldü. Ayrıca söylendiği gibi kendilerini oluşturan hidrojel ve organojellere göre bijeller daha yüksek viskozite (K)

değerlerine de sahipti. Bu konuda da yapılmış çalışmalar bu bulguları destekler niteliktedir [127, 231].

Yayılabilirlik tayini

Yayılabilirlik, yarı katı dozaj formlarının önemli bir özelliğidir; ürünün ambalajdan çıkabilmesini, uygulama kolaylığını, doğru dozajlama yapmayı ve hasta uyuncunu doğrudan etkilemektedir. Yayılabilirlik formülasyondaki etkin maddenin uygulanan tırnak/deriye penetrasyonunu da etkilemektedir.

Çalışmamızda yayılabilirlik tayini için TPA cihazı kullanıldı. Optimum formülasyon olan B1, B5 ve B8'in yayılabilirliği ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında B5 formülasyonunun yayılabilirlik işinin diğerlerine göre yüksek olduğu; bununla paralel olarak akış yoğunluğu indeksi değerinin de yüksek olduğu saptandı. Viskozitesi (K) yüksek olan sistemin yayılabilirliği az bulundu. Yani sistemi yaymak için daha fazla iş yapılması gerekmektedir.

Golodnizky ve Davidovich-Pinhas, TPA cihazı kullanarak bijel formülasyonlarının yayılabilirliğini tayin etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız ile paralel olarak, viskoelastisitesi yüksek formülasyonunun yayılabilirliğinin de yüksek olduğunu bulmuşlardır [122].

Literatür taramasında sistemin yayılabilirliğin tayininde bijel 2 yatay plaka arasına konulmuştur. Daha sonra plakaların üzerine ağırlık konuldu ve belli bir süre sonra yayılma çapı ($\emptyset$) ölçüldü.

Andonova ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada $\emptyset > 70$ mm ise, sistem sıvı jel, $70 \geq \emptyset > 55$ mm ise sistem yarı akışkan jel, $55 \geq \emptyset > 47$ mm ise sistem yarı katı jel, $47 \geq \emptyset > 40$ mm ise sistem katı jel, $\emptyset \leq 40$ mm ise çok katı jel olarak tanımlandı [239]. Bu yöntem ile yapılan bir çalışmada H/O oranı 80:20 ve 70:30 olan 2 formülasyon hazırlandı ve yayılabilirlik tayini yapıldı. $\emptyset$ değerleri sırasıyla $38,0 \pm 1,0$ mm ve $37,3 \pm 0,6$ mm olarak bulundu. Hidrojel ve organojel oranındaki değişimin formülasyonun yayılabilirliğini etkilediği sonucuna varıldı. Sonuçların birbirine yakın olması, çap ölçümünün cetvel kullanılarak ampirik yöntemlerle yapıldığından durumu tam olarak açıklayamadığını düşündürmüştür. Ancak bizim yaptığımız yayılabilirlik çalışmasındaki gibi viskozitesi düşük olan bijelin daha yüksek yayılma çapına sahip olmasını beklenirdi [123].

5.4. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Salım Çalışmasına Ait Değerlendirmeler

Bu çalışmada amacımız ürenin dış faz olan hidrojelden hızlıca salınması ve tırnağın keratin yapısını yumuşatması, tırnakta por oluşturmaması, bu sayede damla halindeki organojeldeki siklopiroksun veya organojel damlalarının daha kolay ve fazla miktarda enfekte alana penetre olmasıdır. Siklopiroks iç fazda olduğundan ve lipofilik olduğundan, bijelden çok yüksek bir in-vitro salım beklenmemektedir. Sonuçlara baktığımızda siklopiroks salımı 24. saatte B1, B5 ve B8’de sırasıyla $161,83 \pm 8,60 \mu\text{g/mL}$, $153,15 \pm 11,41 \mu\text{g/mL}$ ve $164,86 \pm 3,39 \mu\text{g/mL}$ olarak bulundu ($p>0,05$). Bu sonuçlar ticari kremden ~3 kat daha fazlaydı. Bu değerlerin siklopiroksun MIC değerinin ($0,9-3,9 \mu\text{g/mL}$) çok üstünde olduğu görüldü [245]. İn-vitro çalışmalar temelde kalite kontrol çalışmalarıdır ve formülasyonlar arasında kıyaslamayı sağlar. Alıcı odacığa geçen konsantrasyon > MIC olduğundan bijellerin bu açıdan başarılı olduğunu söyleyebiliriz.

Ürenin diyaliz membrandan salım sonuçlarına baktığımızda, B1, B5 ve B8 arasında anlamlı bir fark olmasa da 24. saatte sırasıyla $116,5 \pm 9,3 \text{ mg/mL}$, $92,9 \pm 12,7 \text{ mg/mL}$ ve $98,4 \pm 17,4 \text{ mg/mL}$ olarak bulundu ($p>0,05$). Üre hidrojelde yani bijelin dış fazında bulunmaktadır. B1’in viskozitesinin diğerlerine göre daha düşük olması B1’den daha fazla üre salımını sağladı. B5 ve B8 arasındaki az da olsa farkın, B5’te bulunan ürenin hidrojel içinde süspande halde ve viskozitesinin de yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hazırladığımız bijellerden siklopiroks ve ürenin salım kinetikleri için 0. derece, 1. derece ve Higuchi kinetiği kullanıldı. Bijellerin hangi kinetiğe uyduğu r^2 sonuçlarına göre değerlendirildi. Siklopiroks için ilk 4 noktada etkin madde salımı çok düşük olmasına rağmen, yine de az miktarda bir çıkış olduğu için tüm noktalar hesaba katıldı. Bijellerden siklopiroksun salımında salım kinetiği 0. derece kinetiğe uyduğu görüldü. Bijellerin yapı olarak matris sistemlere benzediği için Higuchi salım kinetiğine uyması beklenmekteydi. Bu durumun sebebi salımın az olduğu ilk 4 noktanın hesaba katılması olduğu düşünüldü.

Mazurkeviciute ve diğerleri 2 farklı lipofilik etkin madde içeren bijel formülasyonları ile diyaliz membrandan 6 saat 32°C ’de in-vitro salımı incelemişlerdir. Etkin maddeleri hidrojel ve organojele değişen oranlarda (önce tamamı hidrojele, sonra %90, %50 ve en sonda da tamamı organojelde olacak şekilde) koymuşlardır. Bijel yapısındaki organojel oranı arttığında ve etkin maddenin tamamı organojelde olduğunda etkin maddelerin

salımının azaldığını bildirilmişlerdir. Hazırladıkları bijel O/H yapısında olup etkin maddeler organojelde bulunmaktadır. Etkin maddeler yağlı sistem olan organojeli bırakıp sulu faza geçmek istemedikleri için salımın azaldığı düşünülmüştür [134]. Bizim hazırladığımız bijellerde de organojel oranı arttığında ($B5 > B1$, $B8 > B1$) siklopiroksun salımı aynı şekilde azaldı.

Behera ve diğerleri etkin madde olarak metronidazol, Ayçiçek yağı + Span 40 ve farklı jelleştirici ajanlar (sodyum aljinat, CMC, maltodekstrin, nişasta) kullanarak bijel (O/H) hazırlamış ve in-vitro salım çalışması yapmışlardır. Ticari jelden salım 12 saatte %90,33 olurken, bijellerden salım sodyum aljinat, CMC, nişasta ve maltodekstrin sırası ile azaldı ve max. %71,68 oldu. Sonuçlar, dallanmış polisakkaritlerin etkin maddenin salımını, lineer polisakkaritlere göre büyük ölçüde yavaşlattığını gösterdi. Dallanmış yapılar matris tip bir sistemi oluşturdu. Etkin maddenin salımı da matrisden difüzyon ile gerçekleşti. Etkin maddenin bijelden salınmasının Higuchi kinetiğine göre gerçekleştiği gösterildi [129].

5.5. Bijel Formülasyonlarında Ex-vivo Permeasyon Çalışmaları ve Dokularda Miktar Tayinine Ait Değerlendirmeler

Tırnak mantarı tedavisinde geliştirilen formülasyonların etkinliğinin değerlendirilmesi için ex-vivo çalışmalar sıklıkla kullanılır. Elde edilen verilerle, olası in-vivo etki hakkında bir yorumda bulunulabilir. Bu konuda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılabilecek yeterli boyutta insan tırnak plağına ulaşmak zor olduğundan genellikle sığır toynağından elde edilen membran kullanılmaktadır [29, 49, 160, 169]. Bununla beraber, insan tırnak plağı ile sığır toynak membranı arasında farklılık olduğu da unutulmamalıdır. İnsan tırnağıyla (%25) karşılaştırıldığında sığır toynak membranları (%38) daha yüksek şişme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle sığır toynak membranları ilaç permeasyonuna karşı daha az direnç gösterir. Mertin ve Lippold yaptıkları bir çalışmada insan tırnak plağı ile sığır toynak membranının benzer özelliklere sahip olduğunu ve her ikisinin de hidrofilik membran gibi davrandığını bildirmişlerdir [69]. İnsan tırnağı ve toynak aynı keratin tipinden (α -keratin) oluşur. Ancak sığır toynağının keratin yoğunluğu daha azdır ve bu nedenle insan tırnak plağına göre daha geçirgen olduğu bildirildi [240]. Ayrıca toynaktaki proteinler, insan tırnak plağında bulunanlara göre daha az sistin ve

disülfid bağına sahiptir [241]. Bu nedenle toynak membranı, disülfür bağlantılarını kıran penetrasyon artırıcılardan daha az etkilenebilmektedir [30, 160, 242].

Bazı çalışmalarda, insan tırnak plağı yerine sığır toynak membranının kullanılabilceğı, 2 yapının da önemli ölçüde benzer olduğunu bildirildi [169, 56].

Yapılan çalışmalarda benzer tekniğın kullanıldığı görülmektedir. Sığır toynağı mezbahadan alındıktan sonra kesilmeyi kolaylaştırmak ve ex-vivo çalışmada kullanılacak hale getirmek için distile suda bekletilmektedir [160]. Kesilmeye uygun yumuşaklığa geldiğinde ağaç rendesi kullanılarak kesilip, kalınlığı dijital kumpas ile ölçülmektedir (~ 150 µm). Yapılan çalışmalarda toynak membran kalınlığının standart olmadığı; farklı kalınlıklarda kullanıldığı görülmüştür [29, 32, 166, 243, 244]. Ex-vivo permeasyon çalışmasında amacımız, etkin maddenin alıcı odacığa geçmesinden ziyade dokuda birikmesi ve zaman içinde üst katmandan başlayarak alt katmanlara doğru difüzlenmesidir. Tırnak mantarı enfeksiyonu tırnak plağından tırnak yatağına ilerleyip yatağın tamamına yerleşme eğilimindedir.

Çalışmamızda ex-vivo permeasyon çalışmasında siklopiroks alıcı odacıkta ancak 12. saatten sonra tayin edilebildi. 12. saatte saptanan siklopiroks konsantrasyonu (B1, B5 ve B8 için sırasıyla 14,9, 9,1 ve 19,2 µg/ml) siklopiroksun minimum inhibisyon konsantrasyonundan (0,9-3,9 µg/ml) daha fazla olduğu görüldü [245]. Bu durumda formülasyonlarımızın 12 saatte bir uygulandığını düşündüğümüzde, 1 kez uygulama ile bile tedavinin başlayacağı kanıtlandı. Bu durumun formülasyonumuzda kullandığımız ürenin keratin dokuyu yumuşatma, porları genişletme ve siklopiroksun geçişinin kolaylaşması sonucu olduğu düşünülmektedir.

Siklopiroksun toynak membranından permeasyon sonuçlarına göre optimum bijel formülasyonlarından B1 ve B5 arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Ancak B1 ile B8 ve B5 ile B8 arasında anlamlı fark olduğu ($p<0,05$) bulundu. Bu durumun nedeni şöyle yorumlandı: B8'in B5'e göre viskozitesi daha düşüktür ve sonuç olarak siklopiroksun içinde bulunduğu yağ damlacıklarının etrafında daha az viskoz hidrojel olması, siklopiroks moleküllerinin daha hızlı difüzlenmesine neden olmuştur. B1'de ise organojel oranının düşük olması, siklopiroksun alıcı odacığa geçmesi için difüzyon mesafesinin uzun olmasına ve bu nedenle de B8 ile de aralarında anlamlı bir fark olmasına neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda ürenin toynaktan permeasyon sonuçları arasında anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmadı. Bunun sebebi, ürenin dış faz olan hidrojelde olması ve membranla birebir temas halinde bulunmasıdır. Ürenin bu çalışmada alıcı odacıkta tayin edilmesi, toynaktan alıcı odacığa geçerken toynakta yumuşamaya, porların sayı ve büyüklüklerinin artmasına neden olmuş olabilir. Nitekim üre içermedikleri için, ticari krem ve cila alıcı odacıkta siklopiroks tayin edilemezken, bijel formülasyonlarında alıcı odacıkta 12. saatten itibaren siklopiroks tayin edilebildi. Bu durum ürenin olumlu etkisini ispatladı.

Çalışmamızda üre, penetrasyonu artırıcı özelliği nedeniyle kullanıldı. Topikal üre kremi kimyasal tırnak avulsiyonu (tırnak plağının tırnak yatağından ayrılması) için kullanılmaktadır. Ayrıca ürenin, topikal ajanların penetrasyonunu ve biyoyararlanımını artırarak topikal antifungal tedavilerin etkinliğini artırdığı yönünde etkili olduğu birçok çalışma vardır [4, 7, 178, 250, 251]. Yaklaşık %30'un üzerindeki konsantrasyonlarda üre, tırnak keratinini denatüre ederek tırnak plağını yumuşatan ve nemlendiren ve böylece etkin maddenin permeasyonunu artıran ve etkilenen tırnakların avulsiyonunu sağlayan bir keratolitik ajan olarak bilinmektedir [174]. Üre, onikomikoz tedavisinde dermatolojide ve ayak bakımında çok uzun bir süredir kullanılmaktadır [41, 252].

Üre kreminin tırnak mantarında tek başına antifungal ajanlarla yapılan tedaviden önce bir yardımcı madde olarak ya da diğer oral veya topikal antifungal ajanlarla kombine olarak kullanıldığı gösteren çalışmalar vardır [179].

Çalışmamızda bijellerde bulunan %20'lik ürenin toynak üzerindeki etkisi, bijellerin etkinliği hakkında bilgi vereceğinden incelendi.

Formülasyonlarımıza maruz bırakılan toynak membranlarının SEM görüntülerinde 12. saatten itibaren toynaktaki porların genişlediği, toynağın düzgünlüğünü kaybettiği görüldü.

Quintanar-Guerrero ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, ürenin de (%40) içinde bulunduğu çeşitli penetrasyon artırıcıların 48. saatteki insan tırnak plağındaki etkisi SEM ile incelendi. Tırnaktaki keratin dokunun aralandığı bildirildi [247]. Bu durum çalışmamızı destekler niteliktedir.

Yang ve diğerlerinin yaptıkları başka çalışmada terbinafin HCl, üre ile tırnak cilası şeklinde formüle edilmiş ve 72. saat formülasyona maruz bırakılan sıgır toynak membranlarının SEM görüntüleri alındı. 72. saatte üre içeren cilanın toynağı nerdeyse dağıttığı ve çok sayıda por oluşturduğu görüldü [32].

Fritscha ve diğerleri ürenin insan tırnak plağı üzerinde morfolojik değişiklikler yaptığını; yeni porların oluşumunu sağladığı bildirildi [253].

Çalışmamızda siklopiroks ve ürenin sığır toynak membranında birikimi de değerlendirildi. Toynakta biriken siklopiroks ve üre miktarı için tüm formülasyonlarımız arasında anlamlı fark olduğu ($p<0,05$) bulundu. Siklopiroks ve ürenin dokuda birikim sırası $B1>B8>B5$ olarak bulundu. Üre bijelin dış fazında bulunmaktaydı. Viskozitesi en düşük olan bijel (B1) ile etkin maddenin hızla ve kolayca difüzlendiği; dokuya geçip biriktiği düşünülmektedir. Ayrıca en düşük birikimin olduğu B5'te (hidrojeldeki su miktarı en az olan) üre yapıda süspande halde bulunmaktaydı. Dokuya geçmesi ve birikmesi için önce çözünmesi gerekmektedir. Bu nedenle B5 ile dokuda birikim en düşük düzeyde oldu. Ticari kremde penetrasyonu artıracak ve etkin madde geçişini kolaylaştıracak bir madde bulunmadığından dokuda birikim diğerinden daha az oldu. Ticari cila ile toynakta, bijellere ve ticari ürüne kıyasla, en yüksek birikimin olmasının sebebi, yapısında organik solvanın olmasıdır. Bu durumu açıklayacak olursak, organik solvan buharlaştıktan sonra doku üzerinde ince bir film tabakası bırakmaktadır. Etkin madde oluşun konsantrasyon farkından dolayı yüksek difüzyon hızı ile dokuya penetre olmakta ve burayı depo olarak kullanmaktadır. Ayrıca organik solvanın penetrasyon artırıcı bir etki oluşturma olasılığı da vardır.

Üre uzun yıllardan beri kullanılan keratolitik, nemlendirici ve yumuşatıcı bir maddedir. Ürenin tırnak plağında etkin maddenin geçirgenliğini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [246-248].

Baran ve Coquard yaptıkları klinik çalışmada üre (%20) ve antifungal etkinlikteki etkin maddeyi tırnak cilasısı şeklinde formüle etmişler ve hastaların %90'ın tedavi edildiği bildirildi [41].

Yang ve diğerleri üre içeren tırnak cilasısı ile sığır toynak membranında ex-vivo permeasyon çalışması yapmış ve dokuda kalan terbinafil HCl'yi tayin etmişlerdir. Üre içeren cila formülasyonunda etkin maddenin alıcı odacığa daha fazla geçtiği ve dokuda da tutulumunun daha iyi olduğunu bildirmişlerdir [32]. Bu durumun ürenin toynak membranındaki keratin ile etkileşiminden kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Pal ve diğerleri üre içeren jel hazırlamış ve insan tırnağı kullanılarak 32 °C'de ex-vivo permeasyon çalışması yapmışlardır. Üre içeren formülasyonda tırnakta birikimin itrakonazolün en yüksek olduğu bildirildi [249].

Yapılan bu çalışmalar ışığında, kendi çalışmamızda da gördüğümüz gibi üre penetrasyon artırıcı olarak kullanıldığında dokuda birikim artmaktadır.

Tırnak mantarı hastalığında patojen, tırnak bitişiğindeki deriyi de enfekte edebilmektedir. Bu nedenle hazırladığımız bijel formülasyonları için sıçan sırt derisi kullanılarak ex-vivo çalışmalar yapıldı. Bu konuda yapılan çalışmalarda farklı canlılara ait deriler kullanılmaktadır [106, 124, 140]. Çalışmamızda sıçan sırt derisinde yapılan ex-vivo çalışmalarda siklopiroks ve üre alıcı odacıkta tayin edilemedi. Deri ile yapısal olarak uyumlu olduğu kanıtlanan Strat-M membrandan da herhangi bir geçiş saptanamadı. Bu koşullarda siklopiroks ve ürenin deride biriktiği ve bir kısmının da deri yüzeyine uygulanan üründe kalmış olabileceği düşünüldü.

Deride biriken siklopiroks ve üre tayin edildi. Ticari ürünlerde üre olmadığı için sadece siklopiroks tayin edildi. Deride biriken siklopiroks için, ticari cila ile hem optimum bijellerimiz hemde ticari krem arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$) bulundu. Deride en yüksek siklopiroks birikimini sağlayan ürünün ticari cila olduğu bulundu. Bunun nedeni şöyle açıklandı: ciladaki organik solvan ile deride lipitler çözüldü ve sonra solvan buharlaştığında yüksek konsantrasyon farkından kaynaklı difüzyon arttı. Ticari kremin en düşük siklopiroks birikimine neden olması, kremin yapısında bir penetrasyon artırıcının bulunmamasına ve siklopiroksun lipofilik bir madde olması nedeniyle yağlı fazdan ayrılmak istememesine bağlandı. Bizim amacımız dokuda biriken siklopiroksun minimum inhibe edici konsantrasyondan yüksek olmasıydı. Sonuçlara baktığımızda B1, B5 ve B8 için sırasıyla biriken konsantrasyonlar $653,55 \pm 105,27$, $334,83 \pm 22,19$ ve $447,96 \pm 35,94$ $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Siklopiroksun MIC değerinin 0,9-3,9 $\mu\text{g/mL}$ olduğu biliniyordu [245]. Geliştirdiğimiz tüm bijeller için derideki siklopiroks birikiminin MIC değerinden yüksek olması, bijellerin tedavide başarılı olacağını göstermektedir.

Rehman ve diğerleri, hazırladıkları bijel ve ticari krem ile fare derisinde ex-vivo permeasyon çalışması yapmışlardır. 48. saatin sonunda alıcı odacıktaki imikimod miktarı ticari krem için $0,87 \pm 0,12$ mg/cm^2 , bijel için ise $0,30 \pm 0,01$ mg/cm^2 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada etkin maddenin uzatılmış salım profiline uygun bir profil oluşturduğu ve tedavide bu durumun önemli olduğu belirtildi. Bizim çalışmamızda ise alıcı odacığa etkin madde geçişi 24. saatin sonunda bile gerçekleşmedi. Deney süremiz 48 saat olmadığı için, 48. saatte geçişin olup olmayacağı hakkında bir yorum yapılamadı. Permeasyon çalışmasının sonunda deride kalan formülasyon arındırılmış ve bant soyma metoduyla SC dermis ve epidermisten ayrıldı. Ticari krem derinin tüm kısımlarında bijele göre daha fazla

deride kaldı. Etkin maddenin enflamasyon oluşturabileceği için bijelin daha güvenli olarak kullanılabileceği bildirildi [140].

5.6. Bijel Formülasyonlarının Toynagi Şişirme Derecesinin Tespitine Ait Değerlendirmeler

Tırnağın keratin dokusu etkin maddelerin geçişine engel olacak kadar sıkıdır. Bu sıkı yapı, su moleküllerinin girişi ile yumuşar/aralanır. Üre de tırnak dokusunda benzer bir etki oluşturur.

Bu çalışmayı yapma amacımız hazırladığımız formülasyonların toynak membranını ne ölçüde şişirdiği ve bu sayede de siklopiroksun enfekte alana giriş kolaylığının anlaşılmasıdır. Yapıda bulunan su ve üre beraberce dokunun içine giriş yaparak dokunun şişmesini sağlayacaktır. Bu açıdan B1 ve B5, B1 ve B8 arasında anlamlı bir fark bulunmuş; B5 ve B8 arasında ise anlamlı fark olmadığı saptandı. B1'in daha yüksek oranda su içeriyor olmasının bu durumun ana nedeni olduğu düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmaların teknik olarak bizim yaptığımız çalışma ile mantıken aynı olduğu görüldü.

Kumar ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, farklı penetrasyon artırıcıların (üre, tiyoglikolik asit ve salisilik asit) insan tırnak kırpıntılarında hidrasyon artırma dereceleri hesaplandı. Tırnak kırpıntılarının ağırlıkları, 24 saat oda sıcaklığında penetrasyon artırıcılara maruz bırakıldıktan sonra ölçüldü. Penetrasyon artırıcının kullanılmadığı çalışma ile sonuçlar kıyaslandı. Ürenin tırnağı şişirme gücünün yüksek olduğu gösterildi [254].

5.7. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Antifungal Aktivite Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

Silindir agar difüzyon yöntemi, antifungal aktivitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki amaç, etkin maddenin formülasyondan agara difüzenerek ilgili patojenin üremesini engellemesi ve bu bölgenin, patojenin üreyemediği bir daire şeklini almasıdır.

Bijel formülasyonlarının antifungal etkin maddeler için iyi bir taşıyıcı sistem olduğu yapılan birçok çalışmayla gösterildi [134, 142, 255].

Çalışmamızda önce antifungal aktivite çalışmalarını yapmadan, formülasyon hazırlama aşamasında mantar kaynaklı herhangi bir kontaminasyon olmadığı gösterildi. Antifungal aktivite çalışmasında üre çözeltisi ve siklopiroks içermeyen optimum bijel formülasyonları *Candida albicans* ve *Trichophyton rubrum*'a karşı inhibisyon bölgesi oluşturmamışlardır. Formülasyonda antifungal aktiviteye sahip tek maddenin siklopiroks olduğu düşünüldüğünde, bu durum normaldir. Siklopiroks çözeltisi ve etkin madde içeren bijel formülasyonları 12 mm inhibisyon çapında bir zon oluşturmuşlardır ($p>0,05$). Optimum bijellerin ticari krem ile eşit inhibisyon çapı oluşturduğu saptandı. Bu aynı etkinlikte olduklarının bir ispatıdır. Bijel formülasyonları ve ticari krem eşit miktarda siklopiroks içerdiklerinden benzer inhibisyon çapı oluşturmuşlardır. Ancak ticari cila, sıvı olduğundan, siklopiroks agar içinde hızla difüzlenererek daha geniş bir zon oluşturmuştur.

Antifungal aktivite çalışması ve dokuda biriken siklopiroks miktarı birlikte değerlendirildiğinde geliştirdiğimiz bijel formülasyonların her iki patojene karşı antifungal etkinlikte olduğu görülmüştür.

Mazurkeviçütè ve diğerleri siklopiroks olamin içeren emüljel ve bijel formülasyonu hazırlamışlardır. *T. rubrum*'a karşı antifungal aktivite silindir agar difüzyon yöntemi ile karşılaştırıldı. Etkin madde içermeyen formülasyonlar inhibisyon bölgesi oluşturmadığı görülmüştür. Bijelin emüljelden daha büyük inhibisyon bölgesi oluşturduğu ($p>0,05$), bu durumun sebebinin etkin maddenin difüzyon hızındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür [144]. Aynı çalışma grubu siklopiroks olamin ve terbinafin HCl içeren bijel formülasyonları hazırlamışlar ve *Microsporum canis*'e karşı antifungal aktiviteyi değerlendirmişlerdir. Bizim çalışmamızla da benzer şekilde yine etkin madde içermeyen formülasyonların antifungal aktivitesinin olmadığı bulunmuştur. İnhibisyon bölgesi siklopiroks içeren bijel için 69-71 mm iken, terbinafin içeren bijel için 80 mm'den büyük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, patojenleri öldürmek için daha düşük bir terbinafin hidroklorür konsantrasyonunun gerekli olduğunu gösterdi [256]. Bijellerin antifungal aktivite gösteren etkin maddeler için etkili olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5.8. Bijel Formülasyonlarında İn-vitro Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

Topikal formülasyonlar için in-vitro sitotoksikite çalışmaları yani biyoyumluluk çalışmaları topikal formülasyonlarda farklı hücreler ile yapılmaktadır [124, 126, 132, 257]. Fakat genellikle bijel formülasyonlarının biyoyumluluk çalışmasında HaCaT hücreleri (insan keratinosit hücre dizisi) kullanılmaktadır [127, 136, 139]. HaCaT hücreleri yani keratinositler epidermin temel hücreleridir ve topikal formülasyonlara maruz kaldıkları için bu çalışmalarda sıklıkla kullanılırlar. Formülasyona maruz bırakılan hücrelerin çoğalması kontrol edilerek, istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok ise formülasyon biyoyumludur denmektedir.

Singh ve diğerleri bijellerin HaCaT hücreleri için sitotoksik olup olmadığını değerlendirmek için MTT analizini kullanmışlardır. Bijel formülasyonları diyaliz torbaya konulmuş ve torba dışındaki çözeltiler kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Formülasyona maruz bırakılan hücrelerin çoğalması formülasyonların toksik olmadığını gösterdi [127, 137]. Biyoyumluluk çalışmalarının bu şekilde yapıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır [147].

Bizim çalışmamızda bijellerin (1:10) çözeltileri doğrudan hücre dizisi ile muamele edildi. Çünkü deri yüzeyine formülasyon uygulandığında keratinosit hücreleriyle birebir temas halinde olacaktı. Yapılan literatür taramalarında bu şekilde yapılmış çalışma sayısı çok azdır, bunlarında genellikle kanser çalışmaları için olduğu görüldü [126].

Çalışmamızda kontrolle karşılaştırıldığında, etkin madde içermeyen B1 ve B5 nolu bijel sistemlerinin HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). B8 nolu formülasyonunun % hücre canlılığını yaklaşık %7 düzeyinde düşürdüğü; bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,0001$) bulunsada biyolojik açıdan kayda değer olmadığı düşünüldü. Üre çözeltilisinin HaCaT hücrelerine sitotoksik etkisi bulunmazken, siklopiroksun güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, formülasyon içerisinde yer aldığı da hücrelerde sitotoksik aktiviteye neden olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$). Bununla birlikte, ticari kremin HaCaT hücrelerini neredeyse tamamen öldürdüğü belirlendi. MTT test sisteminin doğruluğunu belirlemek için deney tasarımına eklenen doksorubisinin IC_{50} değeri $0,3 \pm 0,01 \mu M$ olarak bulunarak deney sisteminin sağlıklı sonuçlar verdiği onaylandı. Üre çözeltilisinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi $\%123 \pm 12,4$ olmasının deneysel bir hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü ürenin hücre canlılığını

azalttığı yönünde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır [258, 259]. Bu sebeple üre çözeltisi için bu çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir.

5.9. Stabilité Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

Yapılan çalışmalarda bijel sistemlerin fiziksel olarak stabil oldukları belirtilmektedir [116, 126, 128]. Bunun nedeni, yüksek viskozite ile iç faz damlalarının hareketlerinin kısıtlanmasıdır. Doğal olarak dış fazın viskozitesinin yüksek veya düşük olması durumu etkiler. Yapılan çalışmalarda iç faz damla boyutunun büyük olması fiziksel stabiliteyi olumsuz etkiledi.

Andonova ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada hazırlanan bijellerin stabiliteleri, ICH kılavuzlarına göre hızlandırılmış stabilite çalışmalarıyla değerlendirildi. Bijeller sıkıca kapatılmış plastik kaplarda, 6 ay boyunca $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65 \pm \%5$ bağıl nemde saklanmış ve fiziksel stabiliteleri, renk, faz ayrımı açısından değerlendirildi. Damla boyutu büyük bijel formülasyonunda zamanla faz ayrımı gerçekleştiği bildirildi [123].

Bizim çalışmamızda bijeller $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%60$ bağıl nem ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\%75$ bağıl nem şartlarını sağlayan iklim dolaplarında ağızları kapatılarak takibe alındı. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki çalışma teknik bir sıkıntı nedeniyle ilerleyemedi ve tekrar başlatıldı. B5 bijelinde her iki bekleme koşulunda da faz ayrışması meydana geldi. Damla boyutu en küçük olan bu bijel (B5) muhtemelen sürfaktan miktarının su/yağ arayüzeyini kaplamaya yetmediğinden bu durumun oluştuğu düşünüldü. Bu stabilite probleminin diğer bir nedeni de bu formülasyonda ürenin hidrojel içinde süspande durumunda olması olarak düşünüldü. Pat yapısında olan bu sistemde yağ fazı sistemin dışına itildi. Stabilité çalışmamız devam etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tırnak mantarı enfeksiyonunun topikal tedavisi için siklopiroks ve üre içeren bijel formülasyonlarının geliştirilmesi, karakterizasyonlarının yapılması ve in-vitro ve ex-vivo çalışmalarla değerlendirilmesini kapsayan tez çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda verildi.

DSC çalışmalarıyla siklopiroks, üre ve yardımcı maddeler arasında geçimsizlik olmadığı görüldü.

Siklopiroks ve üre farklı kolonlar kullanılarak HPLC’de analiz edildi. Yöntemlerin validasyonu analiz işlem ve koşullarının doğru yapıldığı gösterildi.

Bijel hazırlarken stabil bir sistem elde edilebilmesi için her iki faza da (hidrojel ve organojele) sürfaktan eklenmesi gerektiği anlaşıldı.

Optimum bijel formülasyonlarının psödoplastik akışa uydukları saptandı.

Organojelin hidrojel içinde damla halinde dağıldığı tespit edildi.

İn-vitro salım çalışmalarında optimum bijel formülasyonlarının ticari kremden daha yüksek siklopiroks salımı sağladığı görüldü.

Sıçan sırt derisinde gerçekleştirilen ex-vivo permeasyon çalışmalarında alıcı odacıkta siklopiroks tayin edilememesi, sistemik dolaşıma geçmediğinin bir göstergesi olacağından, avantaj olarak görüldü. Deride ve toynakta biriken siklopiroks optimum formülasyonlar için, ticari kremden ve MIC değerinden daha fazla olduğu bulundu. Bu durum geliştirilen bijel formülasyonların tedavide başarılı şekilde kullanılabileceği gösterildi.

Ürenin deri ve toynakta biriktiği saptandı. Bu durumun klinik açıdan tedaviye fayda sağlayacağı sonucuna varıldı.

İn-vitro antifungal aktivite çalışmasında ticari krem ile eş bir inhibisyon bölgesi oluşturması, antifungal etkin madde olan siklopiroksun başarılı şekilde formülasyondan ayrıldığını ve patojenleri etkili şekilde öldürdüğünü gösterdi.

Bijellerin in-vitro sitotoksite çalışmasında siklopiroks içeren optimum bijel formülasyonunun HaCaT hücrelerini öldürmesinin olağan olduğu; ticari ürünün de aynı sonucu verdiği, patojeni öldürürken hücrelere zarar vermesinin beklenen bir durum olduğu sonucuna varıldı.

Tüm çalışmalar düşünüldüğünde, siklopiroks ve üre içeren bijel formülasyonlarının başarılı bir şekilde geliştirildiği; tedavide etkin olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Konu ile ilgili olarak aşağıdaki öneriler sunuldu:

- a. Bijel içindeki organojeli oluşturan sıvı yağ olarak antifungal aktivitesi olduğu kanıtlanan yağlar kullanılabilir. Böylece siklopiroks ile sinerjik etki oluşturulabilir.
- b. Bijelin ticari ürün haline getirilmesi sırasında yüksek rpm’de kullanılabilen bir karıştırıcının kullanılması gereklidir. Bu, iç faz damlacıklarının boyutunun daha da küçülmesini sağlayabilir.
- c. Stabilite çalışmalarının devamı getirilecektir.
- d. Çalışmalarla en iyi permeasyon ve dokuda birikim sağladığı görülen B1 bijeli için uygun bir hayvan deney modeli ile in-vivo antifungal aktivite çalışmasının yapılması ürünün klinik etkinliğini ispatlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Bhattacharjee, B., Dey, N., Barman, D., Karmakar, A., Ahmed, N. (2021). Understanding the drug delivery through nails: a comprehensive review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(4), 116-131.
2. Bhairy, S., Momin, A., Pednekar, M., Madan, D., Shaikh, A., Bankar, R. and Pitchika, S. (2023). A Note on the Current Status of the Trans-ungual Delivery of Poorly Soluble Drugs at a Glance: Formulation Perspective. *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*, 12(3), 1-21.
3. Lipner, S. R., and Scher, R. K. (2019). Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(4), 835–851.
4. Saner, M.V., Kulkarni, A.D. and Pardeshi, C.V. (2014). Insights into drug delivery across the nail plate barrier. *Journal of Drug Targeting*, 22(9), 769-789.
5. Baswan, S., Kasting, G.B., Li, S.K., Wickett, R., Adams, B., Eurich, S. and Schamper, R. (2017). Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. *Mycoses*, 60(5), 284-295.
6. Gupta, A.K., Polla Ravi, S., Choi, S.Y., Konda, A. and Cooper, E.A. (2023). Strategies for the enhancement of nail plate permeation of drugs to treat onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 3(2), 243-255.
7. Monti, D., Mazzantini, D., Tampucci, S., Vecchione, A., Celandroni, F., Burgalassi, S. and Ghelardi, E. (2019). Ciclopirox and Efinaconazole Transungual Permeation, Antifungal Activity, and Proficiency To Induce Resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(10), e00442-19.
8. Singh, B., Narwal, S., Sangeeta, Jain, S., Chaudhri, S.K., Bhagwat D.P., Preeti, Patel, V. (2023). An Overview of Recent Advances on Transungual Drug Delivery System: An Optimistic Way to Treat Nail Disease, Assorted Hindrance and Assorted Progresses. *European Chemical Bulletin*, 12(1), 3087-3104.
9. Costa, P.S., Mendes, V., Veiga, F.F., Negri, M. and Svidzinski, T.I.E. (2022). Relevant insights into onychomycosis' pathogenesis related to the effectiveness topical treatment. *Microbial Pathogenesis*, 169, 105640.
10. Leung, A.K.C., Lam, J.M., Leong, K.F., Hon, K.L., Barankin, B., Leung, A.A.M. and Wong, A.H.C. (2020). Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 14(1), 32-45.
11. Gregoriou, S., Kyriazopoulou, M., Tsiogka, A. and Rigopoulos, D. (2022). Novel and Investigational Treatments for Onychomycosis. *Journal of Fungi (Basel)*, 8(10).

12. Cañete-Gibas, C. and Wiederhold, N.P. (2023). Mycology of Onychomycosis. *Clinical Microbiology Newsletter*, 45(2), 11-17.
13. Aggarwal, R., Targhotra, M., Sahoo, P.K. and Chauhan, M.K. (2020). Onychomycosis: Novel strategies for treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101774.
14. Gupta, A.K., Stec, N., Summerbell, R.C., Shear, N.H., Piguet, V., Tosti, A. and Piraccini, B.M. (2020). Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1972-1990.
15. Gupta, A.K., Foley, K.A., Mays, R.R., Shear, N.H. and Piguet, V. (2020). Monotherapy for toenail onychomycosis: a systematic review and network meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 182(2), 287-299.
16. Ma, W., Si, C., Kasyanjan Carrero, L.M., Liu, H.F., Yin, X.F., Liu, J., Xu, Y. and Zhou, B. (2019). Laser treatment for onychomycosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 98(48), e17948.
17. Dembskey, N. and Abrahamse, H. (2016). Laser Therapy for the Treatment of Onychomycosis: Best Evidence Based Practice or Not?. *Clinical Research on Foot & Ankle*, 04 (04).
18. Bhatta, A.K., Huang, X., Keyal, U. and Zhao, J.J. (2014). Laser treatment for onychomycosis: a review. *Mycoses*, 57(12), 734-740.
19. Kalinowska, K. and Hryniewicz-Gwóźdź, A. (2017). Photodynamic therapy in the treatment of onychomycosis – a review. *Dermatology Review*, 3, 290-299.
20. Aggarwal, R., Targhotra, M., Kumar, B., Sahoo, P.K. and Chauhan, M.K. (2020). Treatment and management strategies of onychomycosis. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(2), 100949.
21. Helou, J., Maatouk, I., Hajjar, M.A. and Moutran, R. (2016). Evaluation of Nd:YAG laser device efficacy on onychomycosis: a case series of 30 patients. *Mycoses*, 59(1), 7-11.
22. Bonhert, K., Dorizas, A. and Sadick, N.S. (2019). Efficacy of combination therapy with efinaconazole 10% solution and 1064 nm Nd:YAG laser for treatment of toenail onychomycosis. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 21(3), 179-183.
23. Faergemann, J. and Baran, R. (2003). Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 149(65), 1-4.
24. Dai, T., Tegos, G.P., Rolz-Cruz, G., Cumbie, W.E. and Hamblin, M.R. (2008). Ultraviolet C inactivation of dermatophytes: implications for treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 158(6), 1239-1246.

25. Dai, T., Tegos, G. P., Rolz-Cruz, G., Cumbie, W. E. and Hamblin, M. R. (2008). Ultraviolet C inactivation of dermatophytes: implications for treatment of onychomycosis. *The British Journal of Dermatology*, 158(6), 1239–1246.
26. Cronin, L.J., Mildren, R.P., Moffitt, M., Lauto, A., Morton, C.O. and Stack, C.M. (2014). An investigation into the inhibitory effect of ultraviolet radiation on *Trichophyton rubrum*. *Lasers in Medical Science*, 29(1), 157-163.
27. Baran, R. and Tosti, A. (2002). Chemical avulsion with urea nail lacquer. *Journal of Dermatological Treatment*, 13(4), 161-164.
28. Lipner, S.R. and Scher, R.K. (2019). Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(4), 853-867.
29. Nogueiras-Nieto, L., Begoña Delgado-Charro, M. and Otero-Espinar, F. J. (2013). Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxanes as aqueous-based nail lacquers: application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3), 370-377.
30. Monti, D., Saccomani, L., Chetoni, P., Burgalassi, S., Senesi, S., Ghelardi, E. and Mailland, F. (2010). Hydrosoluble medicated nail lacquers: in vitro drug permeation and corresponding antimycotic activity. *British Journal of Dermatology*, 162(2), 311-317.
31. Rizi, K., Mohammed, I.K., Xu, K., Kinloch, A.J., Charalambides, M.N. and Murdan, S. (2018). A systematic approach to the formulation of anti-onychomycotic nail patches. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 355-365.
32. Yang, F., Yu, X., Shao, W., Guo, P., Cao, S., Wang, M., Wang, Y., Wu, C., and Xu, Y. (2020). Co-delivery of terbinafine hydrochloride and urea with an in situ film-forming system for nail targeting treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 585, 119497.
33. Tanriverdi, S.T. and Özer, Ö. (2013). Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48 (4-5), 628-636.
34. Boker, A., Ciocon, D., Kimball, A. (2007). A randomized, double-blind placebo-controlled, pilot study of 1% terbinafine cream applied twice daily and delivered via nail plate microporation for the treatment of subungual toenail onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(2), AB114.
35. AbdelSamie, S.M., Kamel, A.O., Sasmour, O.A. and Ibrahim, S.M. (2016). Terbinafine hydrochloride nanovesicular gel: In vitro characterization, ex vivo permeation and clinical investigation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 91-100.

36. Baran, R., Feuilhade, M., Combernale, P., Datry, A., Goettmann, S., Pietrini, P., Viguie, C., Badillet, G., Larnier, C. and Czernielewski, J. (2000). A randomized trial of amorolfine 5% solution nail lacquer combined with oral terbinafine compared with terbinafine alone in the treatment of dermatophytic toenail onychomycoses affecting the matrix region. *The British Journal of Dermatology*, 142(6), 1177–1183.
37. Syed, T.A., Ahmadpour, O.A., Ahmad, S.A., and Shamsi, S. (1998). Management of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 20% urea cream: a placebo-controlled, double-blind study. *The Journal of Dermatology*, 25(10), 648–652.
38. Flores, F.C., Chiu, W.S., Beck, R.C.R., da Silva, C.B. and Delgado-Charro, M.B. (2018). Enhancement of tioconazole ungual delivery: Combining nanocapsule formulation and nail poration approaches, *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 237-244.
39. Flores, F.C., Rosso, R.S., Cruz, L., Beck, R.C. and Silva, C.B. (2017). An innovative polysaccharide nanobased nail formulation for improvement of onychomycosis treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 56-63.
40. Singal, A., Pandhi, D., Agrawal, S. and Das, S. (2005). Comparative efficacy of topical 1% butenafine and 1% clotrimazole in tinea cruris and tinea corporis: a randomized, double-blind trial. *Journal of Dermatological Treatment*, 16(5-6), 331-335.
41. Baran, R. and Coquard, F. (2005). Combination of fluconazole and urea in a nail lacquer for treating onychomycosis. *Journal of Dermatological Treatment*, 16(1), 52-55.
42. Bassiri-Jahromi, S., Ehsani, A.H., Mirshams-Shahshahani, M. and Jamshidi, B. (2012). A comparative evaluation of combination therapy of fluconazole 1% and urea 40% compared with fluconazole 1% alone in a nail lacquer for treatment of onychomycosis: therapeutic trial. *Journal of Dermatological Treatment*, 23(6), 453-456.
43. Amra, K. and Momin, M. (2019). Formulation evaluation of ketoconazole microemulsion-loaded hydrogel with nigella oil as a penetration enhancer. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(6), 1742-1750.
44. Susilo, R., Korting, H.C., Greb, W. and Strauss, U.P. (2006). Nail penetration of sertaconazole with a sertaconazole-containing nail patch formulation. *American Journal of Clinical Dermatology*, 7(4), 259-262.
45. Kracht, T. and Muller-Goymann, C.C. (2020). Antifungal efficacy of liquid poloxamer 407-based emulsions loaded with sertaconazole nitrate. *International Journal of Pharmaceutics*, 585, 119400.

46. Bseiso, E.A., Nasr, M., Sammour, O.A. and Abd El Gawad, N.A. (2016). Novel nail penetration enhancer containing vesicles "nPEVs" for treatment of onychomycosis. *Drug Delivery*, 23(8), 2813-2819.
47. Roberts, D.T., Hay, R.J., Doherty, V.R., Richardson, M.D. and Clayton, Y.M. (1988). Topical treatment of onychomycosis using bifonazole 1% urea/40% paste. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 544, 586-587.
48. Hoogdalem, E.J., Hoven, W.E, Terpstra, I.J., Zijtveld, J., Verschoor, J.S.C. and Visser, J.N. (1997). Nail penetration of the antifungal agent oxiconazole after repeated topical. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(3) 119–127.
49. Aggarwal, R., Targhotra, M., Sahoo, P.K. and Chauhan, M.K. (2020). Efinaconazole nail lacquer for the transungual drug delivery: Formulation, optimization, characterization and in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101998.
50. Agrawal, V., Patel, R., Patel, M., Thanki, K. and Mishra, S. (2021). Design and evaluation of microemulsion-based efinaconazole formulations for targeted treatment of onychomycosis through transungual route: Ex vivo and nail clipping studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 201, 111652.
51. Barot, B.S., Parejiya, P.B., Patel, H.K., Mehta, D.M. and Shelat, P.K. (2012). Microemulsion-based antifungal gel delivery to nail for the treatment of onychomycosis: formulation, optimization, and efficacy studies. *Drug Delivery and Translational Research*, 2(6), 463-476.
52. El-Sheridy, N.A., Ramadan, A.A., Eid, A.A. and El-Khordagui, L.K. (2019). Itraconazole lipid nanocapsules gel for dermatological applications: In vitro characteristics and treatment of induced cutaneous candidiasis. *Colloids*, 181, 623-631.
53. Kesharwani, P., Fatima, M., Singh, V., Sheikh, A., Almalki, W.H., Gajbhiye, V. and Sahebkar, A. (2022). Itraconazole and Difluorinated-Curcumin Containing Chitosan Nanoparticle Loaded Hydrogel for Amelioration of Onychomycosis. *Biomimetics (Basel)*, 7(4), 206.
54. Bouchand, C., Nguyen, D., Secretan, P.H., Vidal, F., Guery, R., Auvity, S., Cohen, J.F., Lanternier, F., Lortholary, O., Cisternino, S. and Schlatter, J. (2020). Voriconazole topical cream formulation: evidence for stability and antifungal activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(3), 106083.
55. Krawczyk-Santos, A.P., da Rocha, P.B.R., Kloppel, L.L., Souza, B.D.S., Anjos, J.L.V., Alonso, A., de Faria, D.L.A., Gil, O.M., Gratieri, T., Marreto, R.N. and Taveira, S.F. (2021). Enhanced nail delivery of voriconazole-loaded nanomicelles by thioglycolic acid pretreatment: A study of protein dynamics and disulfide bond rupture. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120597.

56. Christensen, L., Turner, R., Weaver, S., Caserta, F., Long, L., Ghannoum, M. and Brown, M. (2017). Evaluation of the Ability of a Novel Miconazole Formulation To Penetrate Nail by Using Three In Vitro Nail Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), e02554-16.
57. Fatima, S.H. and Ansari, H.Q.F. (2021). Epidemiological study of dermatophytic infections with evaluation of efficacy of luliconazole cream 1% versus miconazole 2% cream. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 39, S99.
58. Šveikauskaitė-Radučienė, I. and Briedis, V. (2016, April). Preformulation and in vitro characterization of 1 % naftifine hydrochloride medical nail lacquers. 10th World Meeting on Pharmaceutics, *Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology* At: Glasgow, United Kingdom.
59. Šveikauskaitė, I. and V. Briedis. (2017). Effect of Film-Forming Polymers on Release of Naftifine Hydrochloride from Nail Lacquers. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 1-7.
60. Elewski, B.E., Aly, R., Baldwin, S.L., Gonzalez Soto R.F., Rich, P., Weisfeld, M., Wiltz, H., Zane, L.T. and Pollak, R. (2015). Efficacy and safety of tavaborole topical solution, 5%, a novel boron-based antifungal agent, for the treatment of toenail onychomycosis: Results from 2 randomized phase-III studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(1), 62-69.
61. Agrawal, V., Patel, R. and Patel, M. (2022). Tavaborole microemulsion: New strategy for the targeted treatment of onychomycosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103494.
62. Dehari, D., Mehata, A.K., Priya, V., Parbat, D., Kumar, D., Srivastava, A.K., Singh, S. and Agrawal, A.K. (2022). Luliconazole Nail Lacquer for the Treatment of Onychomycosis: Formulation, Characterization and In Vitro and Ex Vivo Evaluation. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 23(6), 175.
63. Verma, A., Singh S., Kaur, R., Jain, U.K. (2013). Topical Gels as Drug Delivery Systems: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23(2), 374-382.
64. Cook, M. T. and Brown, M. B. (2018). Polymeric gels for intravaginal drug delivery. *Journal of controlled release:official journal of the Controlled Release Society*, 270, 145–157.
65. Mahtab, A., Anwar, M., Mallick, N., Naz, Z., Jain, G.K. and Ahmad, F.J. (2016). Transungual Delivery of Ketoconazole Nanoemulgel for the Effective Management of Onychomycosis. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 17(6), 1477-1490.
66. Wróblewska, M., Szekalska, M., Hafner, A. and Winnicka, K. (2018) .Oleogels And Bigels As Topical Drug Carriers For Ketoconazole-Development And In Vitro Characterization. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 75(3), 777-786.

67. Shah, V.H. and Jobanputra, A. (2018). Enhanced Ungual Permeation of Terbinafine HCl Delivered Through Liposome-Loaded Nail Lacquer Formulation Optimized by QbD Approach. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 19(1), 213-224.
68. Rocha, K.A.D., Krawczyk-Santos, A.P., Andrade, L.M., Souza, L.C., Marreto, R.N., Gratieri, T. and Taveira, S.F. (2017). Voriconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for drug delivery in deeper regions of the nail plate. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(1), 292-298.
69. Mertin, D., Lippold, B.C. (1997). In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(9), 866-72.
70. Kobayashi, Y., Komatsu, T., Sumi, M., Numajiri, S., Miyamoto, M., Kobayashi, D., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y. (2004). In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 471-477.
71. Kumar, S. and Kimball, A.B. (2009). New antifungal therapies for the treatment of onychomycosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(6), 727-734.
72. Palekar Shanbhag, P. and Jani, U. (2017). Drug delivery through nails: Present and future. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 3(5).
73. Di Chiacchio, N., Kadunc, B.V., de Almeida, A.R. and Madeira, C.L. (2003). Nail abrasion. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2(3-4), 150-152.
74. Sumikawa, M., Egawa, T., Honda, I., Yamamoto, Y., Sumikawa, Y. and Kubota, M. (2007). Effects of foot care intervention including nail drilling combined with topical antifungal application in diabetic patients with onychomycosis. *Journal of Dermatology*, 34(7), 456-464.
75. Kobayashi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y. (1999). Drug permeation through the three layers of the human nail plate. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(3), 271-278.
76. Ciocon, D., Gowrishankar, T.R., Herndon, T. and Kimball, A.B. (2006). How low should you go: novel device for nail trephination, *Dermatologic Surgery*, 32(6), 828-833.
77. Cordoba Diaz, D., Losa Iglesias, M.E., Becerro de Bengoa Vallejo, R. and Cordoba Diaz, M. (2019). Transungual Delivery of Ciclopirox Is Increased 3(-)4-Fold by Mechanical Fenestration of Human Nail Plate in an In Vitro Model. *Pharmaceutics*, 11(1).

78. Gunt, H.B. and Kasting, G.B. (2007). Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(4-5), 254-260.
79. Sveikauskaite, I., Pockevicius, A. and Briedis, V. (2019). Potential of Chemical and Physical Enhancers for Transungual Delivery of Amorolfine Hydrochloride. *Materials (Basel)*, 12(7).
80. Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaj, I. and Jerala, R. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3420-3426.
81. Nair, A.B., Sammeta, S.M., Vaka, S.R. and Narasimha Murthy, S. (2009). A study on the effect of inorganic salts in transungual drug delivery of terbinafine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(4), 431-437.
82. Repka, M.A., Mididoddi, P.K. and Stodghill, S.P. (2004). Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), 95-106.
83. Nair, A.B., Chakraborty, B., and Murthy, S.N. (2010). Effect of polyethylene glycols on the trans-ungual delivery of terbinafine. *Current Drug Delivery*, 7(5), 407-414.
84. Kushwaha, A., Shivakumar, H.N. and Murthy, S.N. (2016). Iontophoresis for drug delivery into the nail apparatus: exploring hyponychium as the site of delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(10), 1678-1682.
85. Manda P, S.S., Repka, M.A., Murthy, S.N. (2012). Iontophoresis across the proximal nail fold to target drugs to the nail matrix. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(7), 2392-2397.
86. Nair, A.B., Kim, H.D., Chakraborty, B., Singh, J., Zaman, M., Gupta, A., Friden, P.M. and Murthy, S.N. (2009). Ungual and trans-ungual iontophoretic delivery of terbinafine for the treatment of onychomycosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(11), 4130-4140.
87. Patil, P.B., Datir, S.K. and Saudagar, R.B. (2019). A Review on Topical Gels as Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 9(3), 989-994.
88. Buerkle, L.E. and Rowan, S.J. (2012). Supramolecular gels formed from multi-component low molecular weight species. *Chemical Society Reviews*, 41(18), 6089-6102.
89. Almoshari, Y. (2022). Novel Hydrogels for Topical Applications: An Updated Comprehensive Review Based on Source. *Gels*, 8(3), 174.

90. Karamkar, P.G., Agrawal, A., Chatap, V.K. (2023). A Review Article: Formulation of Topical Gel by QbD Approach. *Advances in Pharmacology and Pharmacy*, 11(2) 90-101.
91. Sharma, U., Arjariya, S., Chouksey, R., Sharma, N. (2022). A Review: Formulation and Evaluation of Pharmaceutical Gel. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 13(1), 1344-1362.
92. Martin-Illana, A., Notario-Perez, F., Cazorla-Luna, R., Ruiz-Caro, R., Bonferoni, M.C., Tamayo, A. and Veiga, M.D. (2022). Bigels as drug delivery systems: From their components to their applications. *Drug Discovery Today*, 27(4), 1008-1026.
93. Barbosa, A.I., Torres, T., Lima, S.A.C. and Reis, S. (2021). Hydrogels: A Promising Vehicle for the Topical Management of Atopic Dermatitis. *Advanced Therapeutics*, 4(7), 2100028.
94. Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J. and Zhang, K. (2021). Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 426.
95. Ahmed, E.M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105-121.
96. Veloso, S.R.S., Andrade, R.G.D. and Castanheira, E.M.S. (2021). Review on the advancements of magnetic gels: towards multifunctional magnetic liposome-hydrogel composites for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102351.
97. Larraneta, E., Stewart, S., Ervine, M., Al-Kasasbeh, R. and Donnelly, R.F. (2018). Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification. Synthesis and Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1), 13.
98. Raythatha, N., Vyas, J., Shah, I., and Upadhyay, U. (2022). Bigels: A newer system - An opportunity for topical application. *Hamdan Medical Journal*, 15(3), 113-121.
99. Zeng, L., Lin, X., Li, P., Liu, F.-Q., Guo, H. and Li, W.-H. (2021). Recent advances of organogels: from fabrications and functions to applications. *Progress in Organic Coatings*, 159, 106417.
100. Budhawant, R.S. and Tushar, G. (2022). Review on Organogel. *International Journal of Research Publication and Reviews*, 3(6), 1097-1100.
101. Sagiri, S.S., Behera, B., Rafanan, R.R., Bhattacharya, C., Pal, K., Banerjee, I. and Rousseau, D. (2013). Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State. *Soft Materials*, 12(1), 47-72.
102. Esposito, C.L., Kirilov, P. and Roullin, V.G. (2018). Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications. *Journal of Controlled Release*, 271, 1-20.

103. Vintiloiu, A. and Leroux, J.C. (2008). Organogels and their use in drug delivery--a review. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 179-192.
104. Francavilla, A., Corradini, M.G. and Joye, I.J. (2023). Bigels as Delivery Systems: Potential Uses and Applicability in Food. *Gels*, 9(8), 648.
105. Agarwal, P. and Rupenthal, I.D. (2023). Non-aqueous formulations in topical ocular drug delivery - A paradigm shift? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 198, 114867.
106. Loza-Rodriguez, N., Millan-Sanchez, A. and Lopez, O. (2023). A biocompatible lipid-based bigel for topical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 190, 24-34.
107. Gronnow, M.J., White, R.J., Clark, J.H. and Macquarrie D.J. (2005). Energy efficiency in chemical reactions a comparative study of different reaction techniques. *Organic Process Research & Development*, 9(4), 516–518.
108. Singh, B. and Kumar, R. (2019). Designing biocompatible sterile organogel–bigel formulations for drug delivery applications using green protocol. *New Journal of Chemistry*, 43(7), 3059-3070.
109. Shakeel, A., Farooq, U., Iqbal, T., Yasin, S., Lupi, F.R. and Gabriele, D. (2019). Key characteristics and modelling of bigels systems: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 932-953.
110. Martinez, R.M., Magalhaes, W.V., Sufi, B.D.S., Padovani, G., Nazato, L.I.S., Velasco, M.V.R., Lannes, S. and Baby, A.R. (2021). Vitamin E-loaded bigels and emulsions: Physicochemical characterization and potential biological application. *Colloids*, 201, 111651.
111. Martins, A.J., Silva, P., Maciel, F., Pastrana, L.M., Cunha, R.L., Cerqueira, M.A. and Vicente, A.A. (2019). Hybrid gels: Influence of oleogel/hydrogel ratio on rheological and textural properties. *Food Research International*, 116, 1298-1305.
112. Lupi, F.R., De Santo, M.P., Ciuchi, F., Baldino, N. and Gabriele, D. (2017). A rheological modelling and microscopic analysis of bigels. *Rheologica Acta*, 56(9), 753-763.
113. Rehman, K., Mohd Amin, M.C. and Zulfakar, M.H. (2014). Development and physical characterization of polymer-fish oil bigel (hydrogel/oleogel) system as a transdermal drug delivery vehicle. *Journal of Oleo Science*, 63(10), 961-970.
114. Zulfakar, M.H., Chan, L.M., Rehman, K., Wai, L.K. and Heard, C.M. (2018). Coenzyme Q10-Loaded Fish Oil-Based Bigel System: Probing the Delivery Across Porcine Skin and Possible Interaction with Fish Oil Fatty Acids. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 19(3), 1116-1123.

115. Mukherjee, S., Majee, S.B. and Biswas, G.R. (2019). Formulation and in Vitro Characterisation of Soybean Oil-Hpmck4m Based Bigel Matrix for Topical Drug Delivery. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(5), 33-38.
116. Khelifi, I., Saada, M., Hayouni, E.A., Tourette, A., Bouajila, J. and Ksouri, R. (2019). Development and Characterization of Novel Bigel-Based 1,4-Naphthoquinones for Topical Application with Antioxidant Potential. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(1), 53-61.
117. Kanoujia, J., Nikita, Parashar, P., Singh N. and Saraf, S.A. (2021). Tea tree and jojoba oils enriched bigel loaded with isotretinoin for effective management of acne. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 12(1), 158-163.
118. Andonova, V., Peneva, P., Georgiev, G.S., Toncheva, V.T., Apostolova, E., Peychev, Z., Dimitrova, S., Katsarova, M., Petrova, N. and Kassarova, M. (2017). Ketoprofen-loaded polymer carriers in bigel formulation: an approach to enhancing drug photostability in topical application forms. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6221-6238.
119. Bollom, M.A., Clark, S. and Acevedo, N.C. (2020). Development and characterization of a novel soy lecithin-stearic acid and whey protein concentrate bigel system for potential edible applications. *Food Hydrocolloids*, 101, 105570.
120. Lupi, F.R., Shakeel, A., Greco, V., Oliviero Rossi, C., Baldino, N. and Gabriele, D. (2016). A rheological and microstructural characterisation of bigels for cosmetic and pharmaceutical uses. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 358-365.
121. Hamed, R., Mahmoud, N.N., Alnadi, S.H., Alkilani, A.Z. and Hussein, G. (2020). Diclofenac diethylamine nanosystems-loaded bigels for topical delivery: development, rheological characterization, and release studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(10), 1705-1715.
122. Golodnizky, D. and Davidovich-Pinhas, M. (2020). The Effect of the HLB Value of Sucrose Ester on Physiochemical Properties of Bigel Systems. *Foods*, 9(12), 1857.
123. Andonova, V.Y., Peneva, P.T., Apostolova, E.G., Dimcheva, T.D., Peychev, Z.L. and Kassarova, M.I. (2017). Carbopol hydrogel/sorbitan monostearate-almond oil based organogel biphasic formulations: Preparation and characterization of the bigels. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(7), 1455-1463.
124. Maji, R., Omolo, C.A., Jaglal, Y., Singh, S., Devnarain, N., Mocktar, C. and Govender, T. (2021). A transferosome-loaded bigel for enhanced transdermal delivery and antibacterial activity of vancomycin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 607, 120990.
125. Raythatha, N., Vyas, J. and Shah, I. (2022). Formulation of antifungal Bigels containing Terbinafine for topical application. *International Journal of PharmaO2*, 4(3), 54-60.

126. Ilomuanya, M., Hameedat, A., Akang, E., Ekama, S., Silva, B. and Akanmu, A. (2020). Development and evaluation of mucoadhesive bigel containing tenofovir and maraviroc for HIV prophylaxis. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 81.
127. Singh, V.K., Banerjee, I., Agarwal, T., Pramanik, K., Bhattacharya, M.K. and Pal, K. (2014). Guar gum and sesame oil based novel bigels for controlled drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 582-592.
128. Soni, K., Gour, V., Agrawal, P., Haider, T., Kanwar, I.L., Bakshi, A. and Soni, V. (2021). Carbopol-olive oil-based bigel drug delivery system of doxycycline hyclate for the treatment of acne, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(6), 954-962.
129. Behera, B., Sagiri, S.S., Singh, V.K., Pal, K. and Anis, A. (2014). Mechanical properties and delivery of drug/probiotics from starch and non-starch based novel bigels: A comparative study. *Starch - Stärke*, 66(9-10), 865-879.
130. Paul, S.R., Qureshi, D., Yogalakshmi, Y., Nayak, S.K., Singh, V.K., Syed, I., Sarkar, P. and Pal, K. (2018). Development of Bigels Based on Stearic Acid-Rice Bran Oil Oleogels and Tamarind Gum Hydrogels for Controlled Delivery Applications. *Journal of Surfactants and Detergents*, 21(1), 17-29.
131. Wakhet, S., Singh, V.K., Sahoo, S., Sagiri, S.S., Kulanthaivel, S., Bhattacharya, M.K., Kumar, N., Banerjee, I. and Pal, K. (2015). Characterization of gelatin-agar based phase separated hydrogel, emulgel and bigel: a comparative study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(2), 118.
132. Rehman, K. and Zulfakar, M.H. (2017). Novel Fish Oil-based Bigel System for Controlled Drug Delivery and its Influence on Immunomodulatory Activity of Imiquimod Against Skin Cancer. *Pharmaceutical Research*, 34(1), 36-48.
133. Mao, L., Lu, Y., Cui, M., Miao, S. and Gao, Y. (2020). Design of gel structures in water and oil phases for improved delivery of bioactive food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1651-1666.
134. Mazurkeviciute, A., Ramanauskiene, K., Ivaskiene, M., Grigonis, A. and Briedis, V. (2018). Topical antifungal bigels: Formulation, characterization and evaluation. *Acta Pharm*, 68(2), 223-233.
135. Koski, A., Yim, K. and Shivkumar, S. (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58(3-4), 493-497.
136. Behera, B., Singh, V.K., Kulanthaivel, S., Bhattacharya, M.K., Paramanik, K., Banerjee, I. and Pal, K. (2015). Physical and mechanical properties of sunflower oil and synthetic polymers based bigels for the delivery of nitroimidazole antibiotic—A therapeutic approach for controlled drug delivery. *European Polymer Journal*, 64, 253-264.

137. Singh, V.K., Anis, A., Banerjee, I., Pramanik, K., Bhattacharya, M.K. and Pal, K. (2014). Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Materials Science and Engineering C Materials for Biological Applications*, 44, 151-158.
138. Algin Yapar, E., Tuncay Tanriverdi, S., Aybar Tural, G., Gumus, Z.P., Turunc, E. and Gokce, E.H. (2020). An examination of carbopol hydrogel/organogel bigels of thymoquinone prepared by microwave irradiation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(10), 1639-1646.
139. Satapathy, S., Singh, V.K., Sagiri, S.S., Agarwal, T., Banerjee, I., Bhattacharya, M.K., Kumar, N. and Pal, K. (2015). Development and characterization of gelatin-based hydrogels, emulsion hydrogels, and bigels: A comparative study. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(8), 41502.
140. Rehman, K., Aluwi, M.F., Rullah, K., Wai, L.K., Mohd Amin, M.C., and Zulfakar, M.H. (2015). Probing the effects of fish oil on the delivery and inflammation-inducing potential of imiquimod. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1-2), 131-141.
141. Ibrahim, M.M., S.A. Hafez, and M.M. Mahdy. (2013). Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 48-57.
142. Raythatha, N. and J. Vyas. (2022). Development of Bigels Containing Antifungal Agent for Vaginal Infection. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14(10), 38-42.
143. Hamed, R., A. AbuRezeq, and O. Tarawneh. (2018). Development of hydrogels, oleogels, and bigels as local drug delivery systems for periodontitis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(9), 1488-1497.
144. Mazurkevičiūtė, A., Matulytė, I., Ivaškienė, M. and Žilius, M. (2022). Assessment of Physical, Mechanical, Biopharmaceutical Properties of Emulgels and Bigel Containing Ciclopirox Olamine. *Polymers (Basel)*, 14(14), 2783.
145. Mousavi, S. N., Hosseini, E., Seyed Dorraji, M. S., Sheikh Mohammadi, S., Pourmansouri, Z., Rasoulifard, M. H., Doosti, M. and Chiti, H. (2021). Synthesis of a green bigel using cottonseed oil/cannabis oil/alginate/ferula gum for quercetin release: Synergistic effects for treating infertility in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 157-165.
146. Charyulu, R.N., Muaralidharan, A. and Sandeep, D.S. (2018). Design and Evaluation of Bigels Containing Flurbiprofen. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11 (1), 143-152.

147. Sagiri, S. S., Singh, V. K., Kulanthaivel, S., Banerjee, I., Basak, P., Battachrya, M. K. and Pal, K. (2015). Stearate organogel-gelatin hydrogel based bigels: physicochemical, thermal, mechanical characterizations and in vitro drug delivery applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 43, 1–17.
148. Wróblewska, M., Szymańska, E., Szekalska, M., & Winnicka, K. (2020). Different Types of Gel Carriers as Metronidazole Delivery Systems to the Oral Mucosa. *Polymers*, 12(3), 680.
149. Vergara, D., Loza-Rodríguez, N., Acevedo, F., Bustamante, M. and López, O. (2022). Povidone-iodine loaded bigels: Characterization and effect as a hand antiseptic agent. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 72, 103427.
150. Corredor-Chaparro, M.Y., Vargas-Riveros, D. and Mora-Huertas, C.E. (2022). Hypromellose – Collagen hydrogels/sesame oil organogel based bigels as controlled drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 75, 103637.
151. Shukla, R., Rohit, P., Jain, H., Asit Sahu, D. B. Meshram Formulation and Evaluation of Topical Bigel Containing Mometasone Furoate. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 7(1), 1086-1091.
152. Shaikh, H.M., Anis, A., Poulouse, A.M., Madhar, N.A. and Al-Zahrani, S.M. (2022). Development of Bigels Based on Date Palm-Derived Cellulose Nanocrystal-Reinforced Guar Gum Hydrogel and Sesame Oil/Candelilla Wax Oleogel as Delivery Vehicles for Moxifloxacin. *Gels*, 8 (6), 330.
153. Sreekumar, M., Mathan S., Mathew, S.S. and Dharan, S.S. (2020). Development and Evaluation of Innovative Two- Phase Systems (Bigels) Containing Propionic Acid Derivative for Topical Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 12(12), 1532-1543.
154. Hamed, R., Abu Alata, W., Abu-Sini, M., Abulebdah, D. H., Hammad, A. M. and Aburayya, R. (2023). Development and Comparative Evaluation of Ciprofloxacin Nanoemulsion-Loaded Bigels Prepared Using Different Ratios of Oleogel to Hydrogels. *Gels (Basel, Switzerland)*, 9(7), 592.
155. Kanoujia, J., Nikita, Parashar, P., Singh N. and Saraf, S.A. (2021). Tea tree and jojoba oils enriched bigel loaded with isotretinoin for effective management of acne. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 12(1), 158-163.
156. Myoung, Y. and H.K. Choi. (2003). Permeation of ciclopirox across porcine hoof membrane: effect of pressure sensitive adhesives and vehicles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(3), 319-325.
157. Bohn, M. and K.T. Kraemer. (2000). Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(4), S57-69.

158. Cutrín-Gómez, E., Conde-Penedo, A., Anguiano-Igea, S., Gómez-Amoza, J. L. and Otero-Espinar, F. J. (2020). Optimization of Drug Permeation from 8% Ciclopirox Cyclodextrin/Poloxamer-Soluble Polypseudorotaxane-Based Nail Lacquers. *Pharmaceutics*, 12(3), 231.
159. Al-Zubaydi, F., Gao, D., Kakkar, D., Li, S., Adler, D., Holloway, J., Szekely, Z., Gu, Z., Chan, N., Kumar, S., Love, S. and Sinko, P.J. (2020). Breast intraductal nanoformulations for treating ductal carcinoma in situ I: Exploring metal-ion complexation to slow ciclopirox release, enhance mammary persistence and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 323, 71-82.
160. Tauber, A. and Muller-Goymann, C.C. (2015). In vitro permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407-based formulations--comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films. *International Journal of Pharmaceutics*, 489(1-2), 73-82.
161. Tauber, A. and Muller-Goymann, C.C. (2015). In vitro model of infected stratum corneum for the efficacy evaluation of poloxamer 407-based formulations of ciclopirox olamine against *Trichophyton rubrum* as well as differential scanning calorimetry and stability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 304-311.
162. Tauber, A. and Muller-Goymann, C.C. (2016). In vitro evaluation of the antifungal efficacy of poloxamer 407-based formulations in an infected nail plate model. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1-2), 20-23.
163. Mazurkeviciute A, Ramanauskiene K, Askiene MI, Grigonis A, Briedis V. (2017). Modelling And Biopharmaceutical Evaluation Of Ciclopirox Olamine Gels. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 74(2), 543-549.
164. Chouhan, P. and Saini, T.R. (2012). Hydration of nail plate: a novel screening model for transungual drug permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 179-182.
165. Cutrín Gómez, E., Anguiano Igea, S., Delgado-Charro, M. B., Gómez Amoza, J. L., & Otero Espinar, F. J. (2018). Microstructural alterations in the onychomycotic and psoriatic nail: Relevance in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 128, 48-56.
166. Gomez, E.C., Anguiano Igea, S., Gomez Amoza, J.L. and Otero Espinar, F.J. (2018). Evaluation of the promoting effect of soluble cyclodextrins in drug nail penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117, 270-278.
167. Puri, V., Savla, R., Chen, K., Robinson, K., Virani, A., Michniak-Kohn, B. (2022). Antifungal Nail Lacquer for Enhanced Transungual Delivery of Econazole Nitrate. *Pharmaceutics*, 14(10), 2204.

168. Cutrín-Gómez, E., Anguiano-Igea, S., Delgado-Charro, M. B., Gómez-Amoza, J. L., and Otero-Espinar, F. J. (2018). Effect on Nail Structure and Transungual Permeability of the Ethanol and Poloxamer Ratio from Cyclodextrin-Soluble Polypseudorotaxanes Based Nail Lacquer. *Pharmaceutics*, 10(3), 156.
169. Monti, D., Saccomani, L., Chetoni, P., Burgalassi, S., Tampucci, S., & Mailland, F. (2011). Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. *The British Journal Of Dermatology*, 165(1), 99–105.
170. Mahajan, S.S., Chaudhari, R.Y. and Patil, V.R. (2021). Formulation and Evaluation of Topical Proniosomal Gel of Ciclopirox for Antifungal Therapy. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 11(1), 56-62.
171. Ackermann, C., Flynn, G. L. and Wyk, C. J. (1985). Percutaneous absorption of urea. *International Journal of Cosmetic Science*, 7(6), 251–264.
172. Beastall, J., Guy, R. H., Hadgraft, J. and Wilding, I. (1986). The influence of urea on percutaneous absorption. *Pharmaceutical Research*, 3(5), 294–297.
173. Celleno, L. (2018). Topical urea in skincare: A review. *Dermatologic Therapy*, 31(6), e12690.
174. Pan, M., Heinecke, G., Bernardo, S., Tsui, C. and Levitt, J. (2013). Urea: a comprehensive review of the clinical literature. *Dermatology Online Journal*, 19(11), 20392.
175. Wahlberg, J.E. and Swanbeck, G. (1973). The Effect Of Urea And Lactic Acid On The Percutaneous. *Acta Dermatovener (Stockholm)*, 53, 207-210.
176. Gloor, M., Fluhr, J., Lehmann, L., Gehring, W., Thieroff-Ekerdt, R. (2002). Do urea/ammonium lactate combinations achieve better skin protection and hydration than either component alone? *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15(1), 35-43.
177. Arievidh, A.M., Vikhreva, O.G., Lebedev, B.M. and Stepanischeva, Z.G. (1960). *Vestnik Dermatologi Venerologi*, 34, 30–35.
178. Akhtar, N., Sharma, H. and Pathak, K. (2016). Onychomycosis: Potential of Nail Lacquers in Transungual Delivery of Antifungals. *Scientifica (Cairo)*, 2016, 1387936.
179. Dars, S., Banwell, H.A. and Matricciani, L. (2019). The use of urea for the treatment of onychomycosis: a systematic review. *Journal of Foot and Ankle Research*, 12, 22.
180. Samui, T., Goldenisky, D., Rosen-Kligvasser, J. and Davidovich-Pinhas, M. (2021). The development and characterization of novel in-situ bigel formulation. *Food Hydrocolloids*, 113, 106416.

181. Zhu, Q., Gao, J., Han, L., Han, K., Wei, W., Wu, T., Li, J. and Zhang, M. (2021). Development and characterization of novel bigels based on monoglyceride-beeswax oleogel and high acyl gellan gum hydrogel for lycopene delivery. *Food Chemistry*, 365, 130419.
182. Martín-Illana, A., Notario-Pérez, F., Cazorla-Luna, R., Ruiz-Caro, R. and Veiga, M. D. (2019). Smart Freeze-Dried Bigels for the Prevention of the Sexual Transmission of HIV by Accelerating the Vaginal Release of Tenofovir during Intercourse. *Pharmaceutics*, 11(5), 232.
183. Ekama, S. O., Ilomuanya, M. O., Azubuike, C. P., Ayorinde, J. B., Ezechi, O. C., Igwilo, C. I., & Salako, B. L. (2021). Enzyme Responsive Vaginal Microbicide Gels Containing Maraviroc and Tenofovir Microspheres Designed for Acid Phosphatase-Triggered Release for Pre-Exposure Prophylaxis of HIV-1: A Comparative Analysis of a Bigel and Thermosensitive Gel. *Gels (Basel, Switzerland)*, 8(1), 15.
184. Rençber, S., Özcan Bülbül, E., Üstündağ Okur N., and Ay Şenyiğit, Z. (2021). Preparation and detailed characterization of fusidic acid loaded in situ gel formulations for ophthalmic application. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(1), 1-12.
185. Temporiti, M. E. E., Guerini, M., Baiguera, R. M., Buratti, S., Desiderio, A., Goppa, L., Perugini, P. and Savino, E. (2022). Efficacy of Bovine Nail Membranes as In Vitro Model for Onychomycosis Infected by Trichophyton Species. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(11), 1133.
186. Kappes, S., Faber, T., Nelleßen, L., Yesilkaya, T., Bock, U. and Lamprecht, A. (2021). Improving Transungual Permeation Study Design by Increased Bovine Hoof Membrane Thickness and Subsequent Infection. *Pharmaceutics*, 13(12), 2098.
187. Flaten, G.E., Palac, Z., Engesland, A., Filipović-Grčić J., Vanić Ž., Škalko-Basnet N. (2015). In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 10-24.
188. Naumann, S., Meyer, J.P., Kiesow, A., Mrestani, Y., Wohlrab, J. and Neubert, R.H. (2014). Controlled nail delivery of a novel lipophilic antifungal agent using various modern drug carrier systems as well as in vitro and ex vivo model systems. *Journal of Controlled Release*, 180, 60-70.
189. Khattab, A. and Shalaby, S. (2018). Optimized Ciclopirox-Based Eudragit RLPO Nail Lacquer: Effect of Endopeptidase Enzyme as Permeation Enhancer on Transungual Drug Delivery and Efficiency Against Onychomycosis. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 19(3), 1048-1060.
190. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing for yeasts: Approved guideline (2nd Ed.). CLSI Document, M44-A2, Pennsylvania, USA, 1-13.

191. Berkow, E. L., Lockhart, S. R. and Ostrosky-Zeichner, L. (2020). Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00069-19.
192. Plein EM, Plein JB. (1957). A cylinderplate method for the quantitative determination of diffusion of antibacterial drugs from ointments. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, 46(12), 716-20.
193. Cazedey, E.C. and Salgado, H.R. (2011). Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. *Pharmaceutics*, 3(3), 572-581.
194. Martin-Illana, A., Cazorla-Luna, R., Notario-Perez, F., Bedoya, L.M., Ruiz-Caro, R. and Veiga, M.D. (2019). Freeze-dried bioadhesive vaginal bigels for controlled release of Tenofovir. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 38-51.
195. Patil, A. and Kontamwar, P. (2021). Formulation And Evaluation Of Antifungal Nanogel For Topical Drug Delivery System. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 14(10), 127-134.
196. Tarawneh, R.T., Hamdan, I.I., Bani-Jaber, A., and Darwish, R.M. (2005). Physicochemical studies on Ciclopirox olamine complexes with divalent metal ions. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1-2), 179–187.
197. Nogueiras-Nieto, L., Sobarzo-Sanchez, E., Gomez-Amoza, J.L. and Otero-Espinar, F.J. (2012). Competitive displacement of drugs from cyclodextrin inclusion complex by polypseudorotaxane formation with poloxamer: implications in drug solubilization and delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(3), 585-595.
198. Lin, J., Zangi, M., Kumar, T., Shakar Reddy, M., Reddy, L.V.R., Sadhukhan, S.K., Bradley, D.P., Moreira-Walsh, B., Edwards, T.C., O'Dea, A.T., Tavis, J.E., Meyers, M.J. and Donlin, M.J. (2021). Synthetic Derivatives of Ciclopirox are Effective Inhibitors of *Cryptococcus neoformans*. *American Chemical Society Omega*, 6(12), 8477-8487.
199. Pinheiro, V.A., Serikaku, D., Baby, A.R., Velasco, M.V., Kaneko, T.M. and Consiglieri, V.O. (2015). Development of ciclopirox olamine topical formulations: evaluation of drug release, penetration and cutaneous retention. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(2), 197-203.
200. Chouhan, P., Saini, T.R. (2016). Development and validation of a HPLC method for direct estimation of ciclopirox olamine in ex vivo transungual. *Indian Drugs*, 53(3), 32-39.
201. Onija, O., Borodi, G., Kacso, I., Pop, M.N., Dadarlat, D., Bratu, I., Jumate, N. and Lazar, M.D. (2012). Preparation and characterization of urea-oxalic acid solid form. *American Institute of Physics*, 1425, 35-38.

202. Tischer, S., Bornhorst, M., Amsler, J., Schoch, G. and Deutschmann, O. (2019). Thermodynamics and reaction mechanism of urea decomposition. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(30), 16785-16797.
203. de J. dos Santos, J., Rocha, J.A.A.B., Costa, G.M.N., Cabral-Albuquerque, E.C.M., Alves, T.L.M., Pinto, J.C. and Fialho, R.L. (2016). Measurement and modelling of urea solubility in aqueous propane-1,2,3-triol and prop-2-enoic acid solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 103, 142-151.
204. Pinck L.A., Kelly, M.A. (1925). The solubility of urea in water. *Journal of the American Chemical Society*, 47 (8), 2170-2172.
205. Shamshad, U.H., Aghajamali, M. and Hassanzadeh, H. (2023). Design and development of a simple and highly sensitive anthocyanin-based sensing device for colorimetric urea determination. *The Canadian Journal Of Chemical Engineering*, 101(3), 1310-1320.
206. Hellgren, L. and Larsson, K. (1974). On the effect of urea on human epidermis. *Dermatologica*, 149(5), 289–293.
207. Wynckel, A., Randoux, C., Millart, H., Desroches, C., Gillery, P., Canivet, E., Chanard, J. (2000). Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(8), 1183-8.
208. Waswa, GA., Michira, I., Abong, O., Mbugua JK., Andala D. and Aluoch AO. (2018). Dissipation and Sorption of Urea on Eburru Soils in Kenya. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 8(3), 1000271.
209. Sheikh, U., Dhote, V., Dhote, K. and Jain, S. (2023). Formulation and Evaluation of Topical Hydrogel of Terbinafine HCL for Effective Management of Dermatophyte. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 10(1), 390-423.
210. Grip, J., Engstad, R.E., Skjæveland I., Škalko-Basnet N., Holsæter A.M. (2017). Sprayable Carbopol hydrogel with soluble beta-1,3/1,6-glucan as an active ingredient for wound healing-Development and in-vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107, 24-31.
211. Bouttier-Figueroa, D.C., García-Valenzuela, J.A., Cota-Leal, M., Robles-Zepeda, R.E. and Sotelo-Lerma, M. (2022). Preparation and characterization of antibacterial gels of galactomannan/ZnO nanocomposite in carbopol-based matrix using mesquite seeds as the biopolymer source. *Polymers from Renewable Resources*, 14(1), 3-15.
212. Gadhawe, D., Rasal, N., Sonawane, R., Sekar, M. and Kokare, C. (2021). Nose-to-brain delivery of teriflunomide-loaded lipid-based carbopol-gellan gum nanogel for glioma: Pharmacological and in vitro cytotoxicity studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 906-920.

213. Lefrançois, P., Ibarboure, E., Payré, B., Gontier, E., Le Meins, J.-F. and Schatz, C. (2015). Insights into Carbopol gel formulations: Microscopy analysis of the microstructure and the influence of polyol additives. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(46), 42761.
214. Sarfraz, M., Iqbal, R., Khan, K.U. and Minhas, M.U. (2022). Carbopol Based Hydrogels for ITOPRIDE Hydrochloride Delivery; Synthesis, Characterization and Comparative Assessment with Various Monomers. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(4), 295.
215. Celebi, N., Ermis, S. and Ozkan, S. (2015). Development of topical hydrogels of terbinafine hydrochloride and evaluation of their antifungal activity. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(4), 631-639.
216. Giuliano, E., Paolino, D., Cristiano, M.C., Fresta, M. and Cosco, D. (2020). Rutin-Loaded Poloxamer 407-Based Hydrogels for In Situ Administration: Stability Profiles and Rheological Properties. *Nanomaterials (Basel)*, 10(6), 1069.
217. Tang, B., Shan, J., Yuan, T., Xiao, Y., Liang, J., Fan, Y. and Zhang, X. (2019). Hydroxypropylcellulose enhanced high viscosity endoscopic mucosal dissection intraoperative chitosan thermosensitive hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 209, 198-206.
218. Martinez, R.M., Rosado, C., Velasco, M.V.R., Lannes, S.C.S. and Baby, A.R. (2019). Main features and applications of organogels in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(2), 109-117.
219. Keskin Uslu, E. and Yılmaz, E. (2021). Preparation and characterization of glycerol monostearate and polyglycerol stearate oleogels with selected amphiphiles. *Food Structure*, 28, 100192.
220. Franco, J.M., Sánchez, R., Delgado, M.A., Valencia, C. and Gallegos, C. (2011). Rheology of oleogels based on sorbitan and glyceryl monostearates and vegetable oils for lubricating applications. *Grasas Y Aceites*, 62(3), 328-336.
221. Davidovich-Pinhas, M., Barbut, S. and Marangoni, A.G. (2015). The role of surfactants on ethylcellulose oleogel structure and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 127, 355-362.
222. Sharma, G., Devi, N., Thakur, K., Jain, A. and Katare, O.P. (2018). Lanolin-based organogel of salicylic acid: evidences of better dermatokinetic profile in imiquimod-induced keratolytic therapy in BALB/c mice model. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(2), 398-413.
223. Mady, F.M., Essa, H., El-Ammawi, T., Abdelkader, H. and Hussein, A.K. (2016). Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatitis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1101-1110.

224. Campanholi, K. D. S. S., da Silva, J. B., Batistela, V. R., Gonçalves, R. S., Said Dos Santos, R., Balbinot, R. B., Lazarin-Bidóia, D., Bruschi, M. L., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V. and Caetano, W. (2022). Design and Optimization of Stimuli-responsive Emulsion-filled Gel for Topical Delivery of Copaiba Oil-resin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(2), 287–292.
225. Ciurba, A., Gabriela Popescu A., VLAD, R.-A., Rédei E., Todoran, N., Cotoi C.-T., Bîrsan M., Antonoaea P. (2023). Development and Evaluation Of Bigels Containing Naproxen Sodium For Topical Administration. *Farmacia*, 71(4), 771-780.
226. Chen, Z., Bian, F., Cao, X., Shi, Z. and Meng, Z. (2023). Novel bigels constructed from oleogels and hydrogels with contrary thermal characteristics: Phase inversion and 3D printing applications. *Food Hydrocolloids*, 134, 108063.
227. Zhang, D., Mu, T. and Sun, H. (2017). Calorimetric, rheological, and structural properties of potato protein and potato starch composites and gels. *Starch - Stärke*, 69, 1600329.
228. Kavanagh, G.M., Ross-Murphy, S.B. (1998). Rheological characterization of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, 23(3), 533-562.
229. Sun, X.D.A., Susan, D.A. (2011). Gelation properties of salt extracted pea protein isolate induced by heat treatment: Effect of heating and cooling rate. *Food Research International*, 43, 509–515.
230. Patel, A.R., Mankoč, B., Bin Sintang, M.D., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2015). Fumed silica-based organogels and ‘aqueous-organic’ bigels. *RSC Advances*, 5(13), 9703-9708.
231. Zheng, H., Mao, L., Cui, M., Liu, J. and Gao, Y. (2020). Development of food-grade bigels based on κ -carrageenan hydrogel and monoglyceride oleogels as carriers for β -carotene: Roles of oleogel fraction. *Food Hydrocolloids*, 105, 105855.
232. KIM, K.H.G., Shoichi and YOSHIMASA, Y. (2007). Effect of oil droplets on physical and sensory properties of o/w emulsion agar gel. *Journal of Texture Studies*, 27, 655-670.
233. McClements, D.J., Monahan, F.J. and Kinsella, J.E. (1993). Effect of Emulsion Droplets on the Rheology of Whey Protein Isolate Gels. *Journal of Texture Studies*, 24, 411-422.
234. Oliver, L., Scholten, E. and van Aken, G.A. (2015). Effect of fat hardness on large deformation rheology of emulsion-filled gels. *Food Hydrocolloids*, 43, 299-310.
235. Sala, G., Van Aken, G.A., Stuart, M.A.C. and Van De Velde, F. (2007), Effect Of Droplet–Matrix Interactions On Large Deformation Properties Of Emulsion-Filled Gels. *Journal of Texture Studies*, 38, 511-535.

236. Patel, A.R., Babaahmadi, M., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2015). Rheological profiling of organogels prepared at critical gelling concentrations of natural waxes in a triacylglycerol solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(19), 4862-4869.
237. Fasolin, L.H., Martins, A.J., Cerqueira, M.A. and Vicente, A.A. (2021). Modulating process parameters to change physical properties of bigels for food applications. *Food Structure*, 28, 100173.
238. Almeida, I.F., Fernandes, A.R., Fernandes, L., Pena Ferreira, M.R., Costa, P.C. and Bahia, M.F. (2008). Moisturizing effect of oleogel/hydrogel mixtures. *Pharmaceutical Development and Technology*, 13(6), 487-494.
239. Lardy, F., Vennat, B., Pouget, M.P. and Pourrat, A. (2000). Functionalization of hydrocolloids: principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(7), 715-721.
240. Khengar, R.H., Jones, S.A., Turner, R.B., Forbes, B. and Brown, M.B. (2007). Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of ungual penetration enhancers. *Pharmaceutical Research*, 24(12), 2207-2212.
241. Nogueiras-Nieto, L., Gomez-Amoza, J.L., Delgado-Charro, M.B. and Otero-Espinar, F.J. (2011). Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of human nail and bovine hoof: implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 156(3), 337-344.
242. Joshi, M., Sharma, V. and Pathak, K. (2015). Matrix based system of isotretinoin as nail lacquer to enhance transungual delivery across human nail plate. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 268-277.
243. Lusiana, Reichl, S. and Müller-Goymann, C.C. (2013). Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(3), 599-605.
244. Dobler, D., Gerber, M., Schmidts, T.M., Runkel, F. and Schlupp, P. (2022). Comparative Ungual Drug Uptake Studies: Equine Hoof Membrane vs. Human Nail Plate. *Pharmaceutics*, 14(12), 2552.
245. Piraccini, B.M., Iorizzo, M., Lencastre, A., Nenoff, P. and Rigopoulos, D. (2020). Ciclopirox Hydroxypropyl Chitosan (HPCH) Nail Lacquer: A Review of Its Use in Onychomycosis. *Dermatologic Therapy (Heidelb)*, 10(5), 917-929.
246. Malhotra, G.G. and Zatz, J.L. (2002). Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 312-323.

247. Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Tapia-Olguin, P., Kalia, Y.N. and Buri, P. (1998). The effect of keratolytic agents on the permeability of three imidazole antimycotic drugs through the human nail. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(7), 685-690.
248. Elkeeb, R., AliKhan, A., Elkeeb, L., Hui, X. and Maibach, H.I. (2010). Transungual drug delivery: current status. *International Journal of Pharmaceutics*, 384(1-2), 1-8.
249. Pal, P., Thakur, R.S., Ray, S. and Mazumder, B. (2015). Design and development of a safer non-invasive transungual drug delivery system for topical treatment of onychomycosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(7), 1095-1099.
250. Gupta, A.K., Versteeg, S.G. and Shear, N.H. (2017). Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 21(6), 525-539.
251. Crawford, F. and Hollis, S. (2007). Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2007(3), CD001434.
252. Bonifaz, A. and Ibarra, G. (2000). Onychomycosis in children: treatment with bifonazole-urea. *Pediatric Dermatology*, 17(4), 310-314.
253. Fritsch H., Stettendorf S., Hegemann L. (1992). Ultrastructural Changes in Onychomycosis during the Treatment with Bifonazole Urea Ointment. *Dermatology*, 185(1), 32-36.
254. Kumar B.S., Kumar, T.P., Himabindu V. and Eswaraiah M.C. Formulation And Evaluation Of Bi Layer Nail Lacquer Containing Antifungal Drug For The Treatment Of Onychomycosis. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 9(7), 2191-2203.
255. Das, B., Nayak, A.K. and Mallick, S. (2023). Thyme Oil-Containing Fluconazole-Loaded Transfersosomal Bigel for Transdermal Delivery. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 24(8), 240.
256. Leyden, J. (1998). Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(5), S42-S47.
257. Mishra, R.K., Datt, M., Pal, K. and Banthia, A.K. (2008). Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(6), 2275-2280.
258. Elewski, B. E., Haley, H. R. and Robbins, C. M. (2004). The use of 40% urea cream in the treatment of moccasin tinea pedis. *Cutis*, 73(5), 355–357.
259. Valkov, A., Zinigrad, M. and Nisnevitch, M. (2021). Photodynamic Eradication of *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(3), 263.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Esra KODAN
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :
 Medeni Hali :
 Telefon :
 e-posta :

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmasötik Teknoloji A.B.D	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	Bursa Ahmet Hamdi Gökbayrak AÖL	2008
İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2021- Devam ediyor	Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihazı Kurumu	Eczacı
2015-2021	Adıyaman Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce (İleri)

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- İNCEÇAYIR TUBA, Olgac Seval, Yıldız Aysegul, SAAR SİNEM, KODAN ESRA (2019). pH-Dependent Dissolution Behavior of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY, 38(10), 1921-1928. (Yayın No: 5557418)
- Tort, Serdar & Kodan, Esra & Olğaç, Seval & Saar, Sinem & Yıldız, Ayşegül & Unal, İlay & Özdal, Zeliha & Tugcu-Demiröz, Fatma Nur. (2022). Venlafaksin Hidroklorürün Uzatılmış Salım Yapan Tablet Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimlerinde Değer. 12. 28-35. 10.33631/sabd.105522

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1. SAAR SİNEM, YILDIZ Ayşegül, ÜNAL İlay Sema, ÖZDAL ZELİHA DUYGU, OLĞAÇ Seval, KODAN ESRA, DURAN CENNET, TORT SERDAR, TUĞCU DEMİRÖZ FATMA NUR (2018). DEVELOPMENT AND EVALUATION OF EXTENDED RELEASE TABLET FORMULATIONS OF VENLAFAXINE HYDROCHLORIDE. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:6361894)
2. Olğaç Seval, Yıldız Ayşegül, SAAR SİNEM, KODAN ESRA, İNCEÇAYIR TUBA (2018). pH-Dependent Dissolution Behavior Of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences(121) (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:5864120)
3. OLGAC SEVAL, YILDIZ AYŞEGÜL, Saar Sinem, KODAN ESRA, İNCEÇAYIR TUBA (2018). pHDependent Dissolution Behavior of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), p: 323 Ankara, Turkey, June 26-29, 2018 (Tam Metin Bildiri/Poster) (Yayın No:4895982)
4. KODAN ESRA, TIRNAKSIZ FAHRİYE FİGEN (2021). PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIGEL SYSTEMS CONTAINING CICLOPIROX AND UREA. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-13), p: 34 Ankara, Turkey, June 22-25, 2021 (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:129)
5. KODAN ESRA, TIRNAKSIZ FAHRİYE FİGEN (2021). IN VITRO RELEASE AND EX VIVO PENETRATION STUDIES OF BIGEL SYSTEMS CONTAINING CICLOPIROX. 3rd International Gazi Symposium Series (GPSS-3) (Tam metin bildiri/Poster)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. ONGUN MELİKE, TUNÇEL EMRE, KODAN ESRA, TUĞCU DEMİRÖZ FATMA NUR, TIRNAKSIZ FAHRİYE FİGEN (2020). DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MUCOADHESIVE-THERMOSENSITIVE BUCCAL GEL CONTAINING METRONIDAZOLE FOR THE TREATMENT OF ORAL MUCOSITIS. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 44(3), 517-539., Doi: 10.33483/jfpau.742957 (Kontrol No: 6656473)

Diğer Yayınlar

1. KODAN ESRA, GÜL ÜLKER, TIRNAKSIZ FAHRIYE FİGEN (2020). Tırnak Mantarı Enfeksiyonu (Onikomikoz) ve Topikal Tedavide Yararlanımı Artırma Yöntemleri. Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi, Journal of Literature Pharmacy Sciences, 9(2), 171-183., Doi: 10.5336/pharmsci.2019- 70802 (Ulusal) (Hakemli) (MAKALE Derleme Makale) (Yayın No: 6455768)





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



GAZİ İSMAYİL HƏRİSİ CUKYUR.

