

**VİTİLİGO TEDAVİSİNE YÖNELİK PİMEKROLİMUS
YÜKLÜ LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF PIMECROLIMUS-LOADED
LIPOSOME FORMULATIONS FOR TREATMENT OF
VITILIGO**

MELİKE AKMAN

PROF. DR. İPEK EROĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

VİTİLİGO TEDAVİSİNE YÖNELİK PİMEKROLİMUS YÜKLÜ LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Melike AKMAN

Yüksek Lisans, BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İpek EROĞLU

Ocak 2023, 73 sayfa

Pigment hastalıkları, deriye rengini veren melanosit hücrelerinin genetik, otoimmün veya çevresel nedenlerle hasar görmesiyle meydana gelen hastalıklardır. Melanositlerde oluşan bu hasarlar sonucunda cilt rengi normal renginden daha koyu (hiperpigmentasyon) ya da daha açık (hipopigmentasyon) bir renk alabilir.

Vitiligo, edinsel hipopigmentasyon hastalıklar arasında en sık görülen olup, dünya çapında prevalansı yaklaşık % 8.8 civarındadır. Vitiligo için güncel tedavi seçenekleri arasında medikal, cerrahi, bitkisel ve bazı tıbbi tedaviler bulunmaktadır. Bu tedaviler ile hastalığın semptomları azaltılabilir, ancak bu konvansiyonel yaklaşımlar etkin bir tedavi sağlanmasında yetersiz kalmakta ve yan etkiler oluşturabilmektedir.

Günümüzde, immünsüpresif ajan olan pimekrolimus içeren topikal formülasyonlar tedavi amacıyla sıklıkla tercih edilmektedirler. Ancak konvansiyonel formülasyonlar (krem, jel, merhem, losyon, toz) ile yapılan bu tedaviler, düşük penetrasyon özelliklerine sahip olması ve hedef dokulara ulaşamaması nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle topikal tedavi,

fototerapi veya sistemik tedavi ile kombine şekilde kullanılabilmekte, fakat kombine tedavilerin yan etkileri fazla ve tedavi süresi uzun olabilmektedir.

Son yıllarda, yeni nesil formülasyonlar ve ileri teknolojik tedaviler ile vitiligo oluşumunun önlenmesi ve böylece hastanın yaşam kalitesinin artırılması hedeflenmektedir. Bu açıdan lipozomlar, biyoparçalanabilen, biyoyumlu, biyolojik membranlara benzer yapıda olan, toksik olmayan, penetrasyon artırma ve hedefleme özelliklerine sahip, etkili ilaç taşıyıcı sistemler olarak dikkat çekmektedirler. Bu avantajlar sayesinde lipozom formülasyonları ile, daha düşük dozlarla hem etkin tedavi sağlanabilmekte hem de ilaca bağlı yan etkiler azaltılabilmektedir.

Bu tez kapsamında; lipozom formülasyonları farklı lipitler kullanılarak (Soya-fosfotidilkolin, DPPC, Lipoid S100) ince film tabaka oluşturma yöntemi ile hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri, morfolojik özellikler, enkapsülasyon etkinliği ve stabilite testleri) yapılmıştır. Optimize edilen lipozom formülasyonlarının, *in-vitro* salım/difüzyon özellikleri ve sitotoksiteleri araştırılmıştır.

Sonuç olarak; şu an tedavide kullanılmakta olan konvansiyonel preparatlara alternatif olarak yenilikçi bir formülasyon geliştirilmiştir. Böylece hastalar için daha düşük dozda, daha kısa sürede ve daha etkin bir tedavi seçeneği sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pigment Hastalıkları, Vitiligo, Pimekrolimus, Lipozom, Topikal Tedavi

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PIMECROLIMUS-LOADED LIPOSOME FORMULATIONS FOR TREATMENT OF VITILIGO

Melike AKMAN

Master of Science, DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Ipek EROGLU

June 2023, 73 pages

Pigment diseases are diseases that occur when melanocyte cells that give color to the skin are damaged by genetic, autoimmune or environmental reasons. As a result of these damage to the melanocytes, the skin color may become darker (hyperpigmentation) or lighter (hypopigmentation) than its normal color.

Vitiligo is the most common among acquired hypopigmentation diseases, with a worldwide prevalence of approximately 8.8%. Current treatment options for vitiligo include medical, surgical, herbal and some medical treatments. With these treatments, the symptoms of the disease can be reduced, but these conventional approaches are insufficient to provide an effective treatment and may cause side effects.

Today, topical formulations containing the immunosuppressive agent pimecrolimus are frequently preferred for treatment. However, these treatments with conventional formulations (cream, gel, ointment, lotion, powder) cannot provide adequate treatment because they have low penetration properties and cannot reach target tissues. For this reason, it can be used in combination with topical treatment, phototherapy or systemic treatment, but the side effects of combined treatments can be high and long treatment duration.

In recent years, it is aimed to prevent the formation of vitiligo and thus to increase the quality of life of the patient with new generation formulations and advanced technological treatments. In this respect, liposomes draw attention as effective drug delivery systems that are biodegradable, biocompatible, have a structure similar to biological membranes, are non-toxic, have penetration enhancing and targeting properties. Thanks to these advantages, with liposome formulations, both effective treatment can be provided with lower doses and drug-related side effects can be reduced.

Within the scope of this thesis; Liposome formulations were prepared by thin film-forming method using different lipids (Soya-phosphatidylcholine, DPPC, Lipoid S100) and characterization studies (particle size, polydispersity index and zeta potential measurements, morphological properties, encapsulation efficiency and stability tests) were performed. The in-vitro release/diffusion properties and cytotoxicity of the optimized liposome formulations were investigated.

In conclusion; An innovative formulation has been developed as an alternative to conventional preparations currently used in treatment. Thus, a lower dose, shorter time and more effective treatment option was provided for patients.

Keywords: Pigment Diseases, Vitiligo, Pimecrolimus, Liposome, Topical Treatment

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Genel Özellikleri	3
2.1.1. Hipodermis	4
2.1.2. Dermis	4
2.1.3. Epidermis	5
2.2. Deri Pigmentasyonu	8
2.2.1. Melanin Sentez (Melanogenez) Mekanizması	10
2.3. Deri Pigmentasyon Hastalıkları	12
2.3.1. Hiperpigmentasyon	12
2.3.2. Hipopigmentasyon	14
2.4. Vitiligo Hastalığının Tanımı ve Tarihçesi.....	18
2.4.1. Vitiligonun Sınıflandırılması.....	19
2.4.2. Vitiligonun Epidemiyolojisi.....	21
2.4.3. Vitiligonun Etiyolojisi.....	21
2.4.4. Vitiligonun Patogenezi.....	22
2.4.5. Vitiligoda Kullanılan Tedavi Yaklaşımları	25
2.5. Pimekrolimus (SDZ ASM 981).....	29
2.5.1. Kalsinörin İnhibitörlerinin Etki Mekanizması.....	30
2.6. Lipozomlar ve İlaç Taşıma Sistemleri	30
2.6.1. Lipozomların Özellikleri ve Etki Mekanizması	31

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemler	36
3.2. Kullanılan Araç-Gereçler	37
3.3. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi.....	38
3.3.1. UV Spektroskopisi Çalışmaları.....	39
3.3.2. Termal Analiz Çalışmaları	39
3.3.3. Erime Derecesi ve Çözünürlük Çalışmaları	39
3.4. Analitik Yöntem Validasyonu	39
3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik	40
3.4.2. Doğrusallık.....	41
3.4.3. Kesinlik ve Doğruluk.....	41
3.4.4. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	41
3.4.5. Duyarlılık	41
3.4.5. Sağlamlılık	42
3.4.6. Tutarlılık	42
3.4.7. Kararlılık	42
3.4.8. Sistem Uygunluk Testi.....	43
3.5. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	43
3.5.1. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	43
3.5.2. Lipozom Formülasyonlarını Karakterizasyonu	44
3.6. Stabilite Çalışmaları.....	46
3.7. İn-vitro Salım Çalışmaları.....	46
3.8. Difüzyon Çalışmaları	47
3.9. Lipozomların Biyouyumluluklarının Değerlendirilmesi	48
3.10. Araştırma Sonuçlarının İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	50
4.1.1. UV Spektrum Çalışmaları.....	50
4.1.2. Termal Analiz Sonuçları	50
4.1.3. Erime Derecesi ve Çözünürlük Çalışmaları Sonuçları.....	51

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu.....	51
4.2.1. Özgünlük ve Seçicilik	52
4.2.2. Doğrusallık	54
4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk	54
4.2.4. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	55
4.2.5. Duyarlılık	56
4.2.6. Sağlamlılık	56
4.2.7. Tutarlılık.....	57
4.2.8. Kararlılık	58
4.2.9. Sistem Uygunluk Testi	59
4.3. Lipozom Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları	59
4.3.1. Fosfolipit Yapısının, Sonikasyon Süresinin ve Kolestrol Miktarının	59
Lipozom Formülasyonları Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	59
4.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Sonuçları	60
4.5. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	61
4.6. Stabilite Çalışması Sonuçları	61
4.7. İn-vitro Salım Çalışması Sonuçları	62
4.8. Difüzyon Salım Çalışmaları	63
4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	64
5. YORUM.....	67
6. KAYNAKLAR	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Derinin katmanları [14]	4
Şekil 2.2. Epidermis Tabakaları [20]	7
Şekil 2.3. Melanosit Yapısı [21]	7
Şekil 2.4. Feomelanin ve Ömelanin Oluşumu [22].....	9
Şekil 2.5. Derideki bir melanosit ve onu çevreleyen keratinositlerin diyagramı [25] ...	10
Şekil 2.6. Melanin Biyosentezi [26].....	12
Şekil 2.7. Hipopigmente vitiligo makülleri ve histopatolojisi [32, 33].....	19
Şekil 2.7. Vitiligo oluşumunda genetik ve genetik olmayan faktörler [43]	21
Şekil 2.8. Vitiligo ile ilişkili aday genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyonel etkileşim ağı [44]	23
Şekil 2.9. Oksidatif stres sonucunda melanositlerde ROS birikimi [51]	25
Şekil 2.10. Pimekrolimus'un iki boyutlu ve üç boyutlu kimyasal yapısı [63, 64]	29
Şekil 2.11. Vitiligo için nanotaşıyıcı bazlı dermofarmasötik formülasyonlar olarak kullanılan en ilgili veziküler sistemler: lipozomlar , etozomlar ve transferzomlar [66]	31
Şekil 2.12. (A) Polimerik nanotaşıyıcının cilde nüfuz etmesi ve sağlıklı ciltte ilaç salınımı (B) hasarlı ciltte nanotaşıyıcı tabanlı sistem davranışı hipotezi [66]	32
Şekil 2.13. Lipozomların sınıflandırılması, (A) MVV, (B) MLV, (C) ULV, (C1) GUV, (C2) LUV, (C3) SUV [68].....	34
Şekil 3.1. Pimekrolimus'un kimyasal yapısı (Formülü:C ₄₃ H ₆₈ CINO ₁₁ ve Molekül Ağırlığı: 810.45 g/mol) [63].....	38
Şekil 3.2. Formülasyon optimizasyon çalışmaları için kullanılan parametreler ve optimum koşullar.....	43
Şekil 3.3. (A) ince film tabaka oluşturma yöntemi (B) İnce Film Tabaka Oluşumu	44
Şekil 3.4. Malvern Zetasizer Cihazı ve Zeta Potansiyeli Ölçümünde Kullanılan Küvetler	45
Şekil 3.1. Diyaliz Membrandan <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	47
Şekil 3.2. Franz Difüzyon Salım Çalışması	48
Şekil 4.1. Pimekrolimus'un UV spektrumu	50
Şekil 4.2. Pimekrolimus'un DSC Spektrumu	51

Şekil 4.3. Pimekrolimus etkin maddesine ait HPLC piki.....	52
Şekil 4.4. Optimum koşullar altında elde edilen kromatogramlar; a) Blank b) LOQ derişiminde PMC eklenmiş matriks (1 µg/mL) c) Standart PMC çözeltisi (50 µg/mL)	53
Şekil 4.5. Pimekrolimus'un HPLC yöntemine ait standart doğrusu (n=7)	54
Şekil 4.6. Lipo-PMC ve Boş-Lipo numunelerine ait SEM görüntüleri a) Lipo-PMC b) Boş-Lipo.....	61
Şekil 4.7. Lipo-PMC ve kontrol grubuna ait PMC'nin <i>in-vitro</i> salım profilleri (n = 6) .	62
Şekil 4.8. PMC, Lipo-PMC ve ticari ürünün difüzyon salım profilleri (n = 3).....	63
Şekil 4.9. Serbest ilaç çözeltisi (10-1000 µM)'ne ait hücre canlılığı grafiğı	65
Şekil 4.10. İlaç Yüklenmemiş Lipozom (1000-0.625 nM) formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiğı. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak one-way ANOVA yapıldı. p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı	65
Şekil 4.11. İlaç Yüklü Lipozom (1000-0 nM) formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiğı. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak one-way ANOVA yapıldı. p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Pimekrolimus'un gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği	54
Çizelge 4.2. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	55
Çizelge 4.3. Sağlık çalışması için deneysel tasarım planı ve sonuçları	57
Çizelge 4.4. Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri	57
Çizelge 4.5. Pimekrolimus stok çözeltisi için kararlılık sonuçları.....	58
Çizelge 4.6. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları (n: 6).....	59
Çizelge 4.7. fosfolipit yapısının, sonikasyon süresinin ve kolesterol miktarının PB, ZP ve PDI üzerindeki etkisi (n=3).....	60
Çizelge 4.8. Optimum Formülasyona Ait Stabilite Sonuçları (+4°C).....	61
Çizelge 4.9. Lipozom formülasyonunun in-vitro salım hızı kinetik verileri.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

T_c	Camsı Geçiş Sıcaklığı
T_m	Faz Değişim Tepe Sıcaklığı
T_0	Faz Değişimi Başlangıç Sıcaklığı
v/v	Hacimce Yüzde
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
nm	Nanomolar
m^2	Metrekare
cm	Santimetre
mm	Milimetre
dk	Dakika
R^2	Determinasyon Katsayısı
rpm	1 Dakikadaki Devir Sayısı
rcf	Göreceli Santrifüj Kuvveti
k'	Kapasite Faktörü
kV	Kilovolt

Kısaltmalar

BH	Bağlı Hata
BSS	Bağlı Standart Sapma
Ch	Kolestrol
DC	Dendritik Hücre

DHI	5,6-Dihidroksiindol
DHICA	5,6-Dihidroksiindol-2-Karboksilik Asit
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOPA	3,4-Dihidroksifenilalanin
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EAA	Eğri Altı Alan
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EP	Avrupa Farmakopesi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FK506	Takrolimus
FKBP	FK506-Bağlayıcı Protein
GUV	Dev Tek Tabakalı Lipozomlar
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ICAM-1	İntrasellüler Adezyon Molekülü
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IL	İnterlökin
KBr	Potasyum Bromür
Lipo-PMC	Pimekrolimus Yüklü Lipozom
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
LUV	Büyük Tek Tabakalı Lipozomlar
M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra

MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MLV	Çok Tabakalı Lipozomlar
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid
MW	Molekül Ağırlığı
NK	Doğal Öldürücü
PB	Partikül Büyüklüğü
PDI	Polidispersite İndeksi
PMC	Pimekrolimus
PUVA	Psoralen Ultraviole A
RES	Retikülo Endotelyal Sistem
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SC	Stratum Corneum
SE	Standart Hata
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SLN	Katı Lipid Nanopartikül
SNS	Sempatik Sinir Sistemi
Soy-PC	Soya Fosfatidilkolin
SS	Standart Sapma
SUV	Küçük Tek Tabakalı Lipozomlar
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TKS	Topikal Kortikosteroidler
TNF	Tümör Nekrosiz Faktör
TRP	Tirozinazla İlgili Protein-1
TYR	Tirozinaz
UFLC	Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi
UPR	Katlanmamış Protein Tepkisi

USP	Birleşik Devletler Farmakopesi
UV	Ultraviole
ULV	Tek Tabakalı Lipozomlar
VCAM-1	Vasküler Adezyon Molekülü
VGICC	Vitiligo Küresel Sorunlar Konsensüs Konferansı
VK	Varyasyon Katsayısı
ZP	Zeta Potansiyel

1. GİRİŞ

Vitiligo, derinin epidermis tabakasında bulunan ve melanosit olarak adlandırılan, melanin pigmentinin üretiminden sorumlu olan hücrelerin otoimmün yıkımının neden olduğu hipopigmentasyon deri hastalığıdır. Vitiligo hastalığının ortaya çıkmasında, UV ışınları, genetik kalıtım, oksidatif stres, çevresel ve otoimmün toleransın bozulması dahil olmak üzere birçok faktör vardır. Vitiligo hastalığının, tedavi sürecinin uzun olması ve uzun süreli ilaç kullanımına bağlı olarak ilaca karşı direncin gelişmesi ve istemeyen yan etkilerin ortaya çıkması nedeniyle kişinin yaşam kalitesini bir hayli düşürmektedir.

Pimekrolimus, *Streptomyces hygroscopicus* toprak bakterisi tarafından üretilen, askomisin makrolaktam bileşiğinden sentetik yollarla türetilmiş anti-inflamatuar bir bileşiktir. Organ nakli yapılan hastalarda doku reddini önlemek için kullanılmaktadır, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, topikal ve sistemik uygulanan pimekrolimusun, inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle vitiligo dahil olmak üzere immün-inflamatuar durumlar için bir immünoşüpresan ajan olarak kullanılmıştır[1].

Pimekrolimusun immünoşüpresif etkisini nasıl gösterdiği kesin olarak bilinmemekle birlikte, kalsinörin inhibisyonu yaparak, antijen spesifik T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Kalsinörin, hedef proteinlerden fosfat gruplarını ayıran, kalsiyum aktivasyonu yapan bir enzimdir. Sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunda temel rol oynamaktadır. Pimekrolimus, sitoplazmik reseptör FKBP-immünofilinle bağlanır ve kalsinörin ile birleşerek fosfataz aktivitesini inhibe ederek T-lenfosit aktivasyonunun inhibisyonuna yani immünoşüpresyona neden olur ve böylece inflamasyonu baskılar [2].

Şu anda piyasada pimekrolimusun ticari ürün olarak, vitiligo ve diğer inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde topikal uygulamada kullanılmak üzere bir merhem formülasyonu (ELİDEL®-Novartis Pharmaceutical Corp., East Hanover, NJ, ABD) mevcuttur. Pimekrolimus, deri hastalıklarının tedavisinde oldukça etkili olmasına rağmen topikal merhem ile yapılan çalışmalarda, düşük ve değişken biyoyararlanım, ilacın hedef bölgeye iletilmemesi, deri penetrasyonunun zayıf olması ve uygulama bölgesinde kızarıklık, kaşıntı, deri döküntüleri gibi dezavantajları mevcuttur[3-8]

Piyasada yer alan topikal tedavilerin yan etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla ilaç taşıyıcı sistemlere ilgi her geçen gün artmaktadır. Özellikle lipozomlar, lipidik yapılarından dolayı deriye hızlıca penetre olarak etkin tedavi sağlamada dikkat çeken preparatlar arasına girmiştir.

Ayrıca lipozomların, çok düşük toksisite, fiziksel stabilite, biyolojik olarak parçalanabilirlik, geliştirilmiş biyoyararlanım, biyouyumluluk, güçlü doku afinitesi ve kontrollü salım gibi avantajları sayesinde günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir[9-11].

Bu nedenle tez kapsamında, günümüzde sıkça rastlanan vitiligo hastalığının tedavisi için melanosit hücrelerinde immünsüpresif etkili bir ajan olan ve pimekrolimus etkin maddesini içeren lipozom formülasyonları hazırlanmış ve *in-vitro* koşullarda değerlendirilmesi yapılmıştır. İnce film tabaka oluşturma yöntemi ile elde edilen lipozomlar, yapılarında bulunan lipitlerin deri lipitleri ile etkileşimi sonucunda, etkin maddelerin deriden penetrasyonunu arttırmaktadırlar. Böylece topikal tedavi için kullanılan etkin maddenin dozunun düşürülmesi mümkün olabilmekte ve mevcut tedavilerin dezavantajları ortadan kaldırılarak, etkin ve güvenilir bir tedavi yaklaşımı sağlanabilmektedir.

Karakterizasyon, salım ve hücre kültürü çalışmalarının sonucunda, etkin madde lipozom formülasyonları ile vitiligo tedavisi için, etkin ve güvenilir bir sistem geliştirilmesi planlanmıştır. Sistemik tedaviye bağlı yan etkileri azaltması, topikal tedavide hasta uyuncunu arttırması ve etkin tedavi sağlaması nedeniyle, lipozom formülasyonlarının konvansiyonel formülasyonlardan daha etkin bir seçenek olacağı ve bu şekilde tedaviye yenilikçi bir formülasyon sunulabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

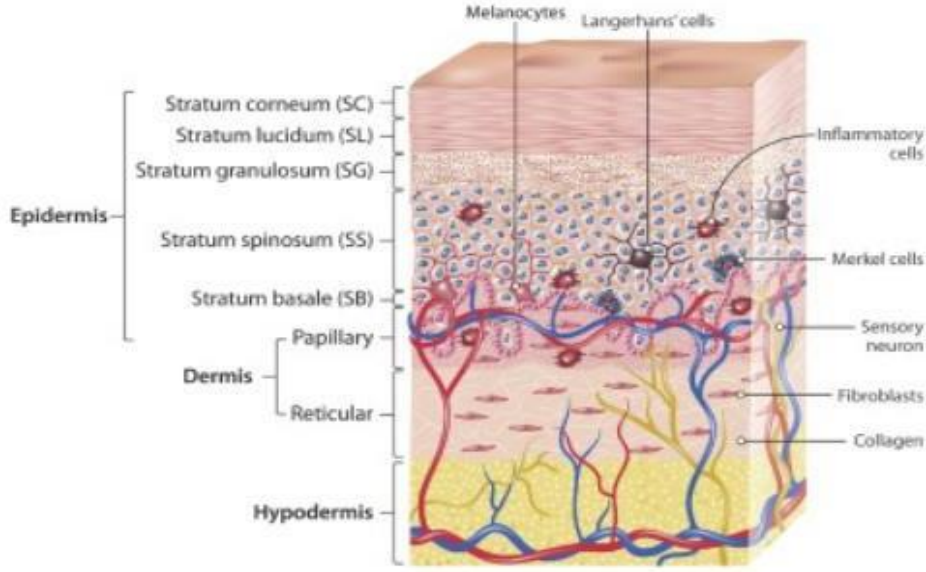
2.1. Derinin Genel Özellikleri

Deri, vücudumuzun iskelet sisteminden sonraki en geniş organıdır. Erişkin bir insanda yüzey alanı yaklaşık 2m² dir. Vücudu ultraviyole ışınlarla ve enfeksiyonlara karşı korur ve vücut ısısını düzenler. Epidermis ve dermis olmak üzere iki ana katmanı vardır. Epidermis, cildin en üst yüzeyidir. Cilt renginden sorumlu melanin adlı bir pigment üreten melanosit adı verilen hücreleri barındırır. Dermis tabakası daha kalındır ve kıl folikülleri , yağ ve ter bezleri , sinir uçları ve lenf damarlarından oluşur. Bu iki tabakanın altında, yağ ve bağ dokularından oluşan daha derin bir deri altı dokusu (hipodermis) bulunur. Hipodermis, vücudu dış etmenlerden korur ve enerjinin depolanmasını sağlar [12].

Ayrıca deri, suya, mikroorganizmalara, mekanik ve kimyasal travmaya ve UV ışığından kaynaklanan hasara karşı bir bariyer görevi görür. Dendritik epidermal T lenfositleri ve adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olan epidermisteki langerhans hücrelerinin etkisiyle ilk immünolojik savunma bölgesidir. Deri, hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonları sağlarken sıcaklık ve su kaybını düzenleyerek vücudun homeostazını korur.

Endokrin İşlevleri arasında, güneşten gelen UV ışığının yardımıyla epidermisteki 7-dehidrokolesterolü D vitaminine dönüştürmekten sorumlu olan keratinositlerde D vitamini üretimi yer alır. Derinin ekzokrin fonksiyonları ise ter ve yağ bezleri yoluylaadır.

Derinin bir diğer önemli rolü de dokunma, sıcak, soğuk ve acı duyularının sinir uçları yardımıyla ayırt edilmesinin sağlanmasıdır [13].



Şekil 2.1. Derinin katmanları [14]

2.1.1. Hipodermis

Derinin en alt tabakasıdır. Liposit adı verilen yağ hücrelerince zengin gevşek, fibröz bağ dokusudur. Hipodermis tabakası damar ve sinir yönünden çok zengindir. Yapısındaki kolajen ve elastin fibriller dermis içerisine kadar devam eder. Isı kaybını engelleme, travmalara karşı koruma ve yedek besin deposu olma işlevleri vardır. Bunların yanı sıra endokrin görevleri, androjenleri östrojene çevirmek ve leptin hormonu salgılayarak tokluk hissini sağlamaktadır.

Karın bölgesinde kalınlığı 3cm'ye kadar çıkabilir. Bu kısımda bulunan fibrillerin az ya da çok oluşu, dermisin bu tabakaya sıkı ya da gevşek bağlanmasına neden olacağından derinin hareketliliği hipodermis fibrillerinin sayısına bağlıdır [15, 16].

2.1.2. Dermis

Dermis, deriye elastikiyet ve mekanik bütünlük sağlayan, lenf damarları, yağ ve ter bezleri, tırnak ve kıl folliküllerini içeren tabakadır. Fibroblastlar dermisin başlıca hücre tipidir ve dermisin hücre dışı destek matriks dokusunun üretiminden sorumludur. Bu matriks yapısı vücudun yapısal proteini olan kolajen, elastin ve retiküler fiberlerden

oluşmaktadır. Yaşlanma ile sayıları azalır. Yara iyileşmesinde en önemli rolü oynarlar ve mekanik güçlere karşı direnç sağlarlar [15].

Dermis tabakası iki katmana ayrılır:

- Papiller katman : Gevşek bağ dokusu, elastik lifler, kolajen, kan damarları ve sinirlerden oluşur. Kollajen ve elastin cilde esneklik, gerginliğini veren protein yapısındaki liflerdir. Herhangi bir şekil değişikliğinde, cildin tekrar eski şekline dönmesini sağlarlar. Ayrıca alt katmanlardaki hücre ve damarların gelişmesi için uygun ortam oluştururlar.
- Retiküler katman : Bu katman, dermisen daha derin ve önemli kısmıdır. Fibroblastlara, mast hücrelerine, sinir uçlarına, lenfatiklere ve deriye giren kaslara ek olarak kalın kollajen demetleri ve daha büyük kan damarları içerir. Ayrıca kıl foliküllerinin ve bu kılların hareketini sağlayan errector pilli kasların da bulunduğu katmandır [17].

2.1.3. Epidermis

Derinin en üst tabakası olan epidermis, devamlı kendini yenileyen, çok katlı ve su geçirmez özelliği olan bir tabakadır. Epidermis, derinin en ince katmanıdır ve kalınlığı 0,04- 1,6mm arasında değişir. Epidermis tabakasının %95' ini keratinosit hücreleri oluşturur. Keratinositler sürekli bölünüp, biçim ve yapıları değişerek bazal tabaka adı verilen en alt kısımdan yüzeye doğru göç ederler. Böylece üst deri, tabakalaşmış bir yapı gösterir. Yara iyileşmesindeki epidermal cevaptan primer olarak bu keratinositler sorumludur.

Melanositler ve Langerhans hücreleri epidermiste bulunan diğer hücrelerdir. Dermisten farklı olarak epidermiste damar yapısı bulunmaz. Beslenme, dermis tabakasından difüzyon yoluyla olur.

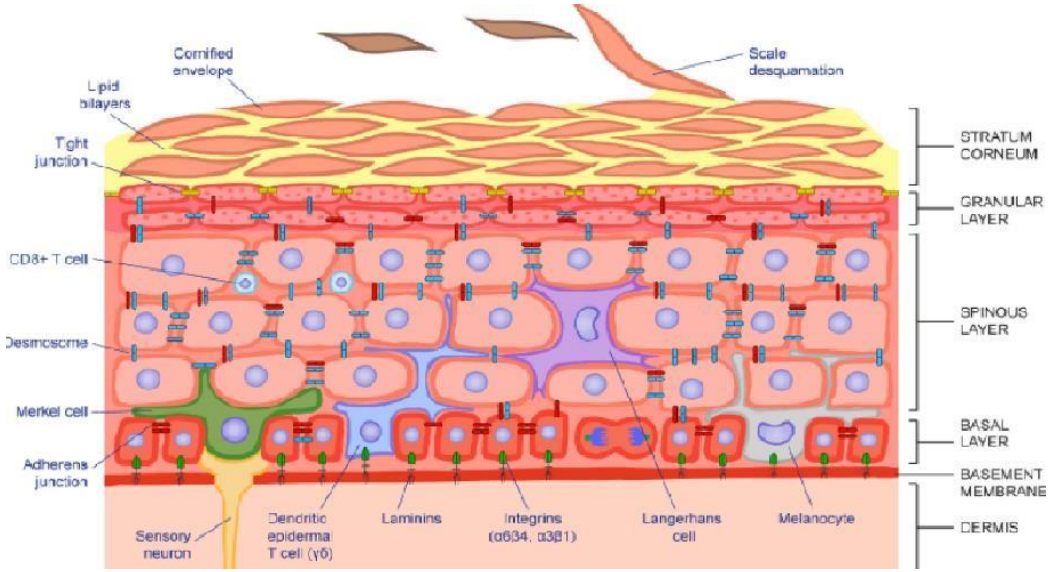
Epidermis, 4 tabakadan oluşur. Bunlar;

- **Temel Tabaka (Stratum Bazale):** En alt tabaka olan stratum basale Dermisen tam üzerinde yer almaktadır. Bu tabakanın hücreleri olan keratinositler bölünerek deri yüzeyindeki hasarı onarırlar. Bu katman devamlı olarak yeni hücreler yapar

ve üst katmanlara yollar. Nöral cresten kaynaklanan Merkel hücreleri (nöroendokrin hücreler olup derinin dokunma hissinin sınırlara taşımaktadır) Bu katmanda yer alan önemli hücre tipi melanositlerdir. Bu hücreler melanin adı verilen pigmentleri yaparlar. Melanin, dış ortamdan cilde gelen zararlı ışınlarının daha alt katmanlardaki hassas hücrelere ulaşmasını engeller.

- **Dikenli Tabaka (Stratum Spinozum):** Temel tabakadan daha kalın bir hücre tabakasıdır. Keratinosit Hücrelerinin bazılarında ufak çıkıntılar vardır. Hücresel bölünme kapasiteleri sınırlıdır. Dikenli hücre tabakası ve temel tabaka derinin canlı kısmını oluşturur ve kemik iliği kökenli immün sistem hücreleri olan Langerhans hücreleri bulunmaktadır. Bunlar derinin ve vücudun savunma sisemleridir.
- **Tanecikli Tabaka (stratum Granulozum):** artık bölünme yeteneği taşımayan düzleşmiş keratinositlerdir. Hücrelerde önemli değişikliklerin olduğu bir tabakadır. Burada hücre çekirdeği bozulur ve hücrenin ölmesine sebep olur. Ufak çıkıntılar daha az belirgindir. Zamanla bu hücreler daha da düzleşmekte ve alttaki hücrelerin çoğalma süreçleri ile derinin üst tabakalarına atılmaktadır.
- **Boynuzsu Tabaka (Stratum Corneum):** Üst derinin yüzeyini oluşturur. Stratum corneum hücreleri ölü ancak biokimyasal olarak aktif hücrelerdir ve korneosit olarak tanımlanmıştır. Deriyi ve vücudumuzu dış ortamda korurken deriden su kaybını kontrol etmektedir [15, 18, 19].

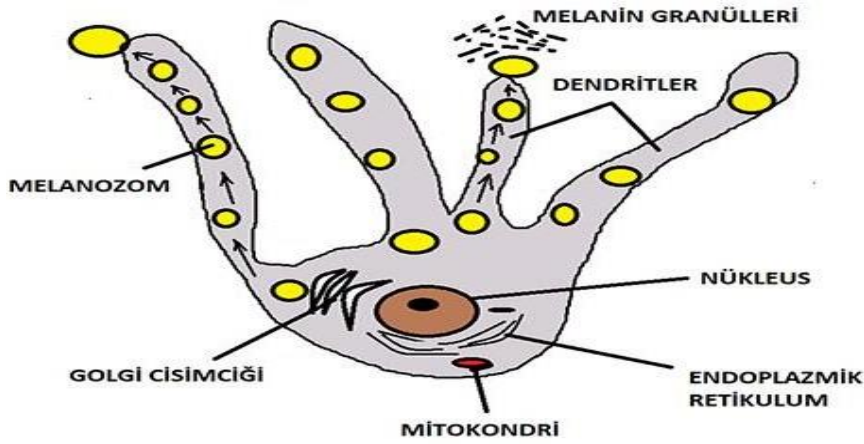
Diğer keratinosit olmayan hücreler de epidermiste bulunur. Bunlar arasında melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri bulunur .



Şekil 2.2. Epidermis Tabakaları [20]

2.1.3.1. Melanositler

Melanositler , epidermiste bulunan ikinci bir dendritik hücre popülasyonudur. Cilt pigmentasyonundan sorumlu olan ve tirozinaza bağımlı bir yol ile melanozomlarda melanini sentezleyebilen tek dendritik hücrelerdir.



Şekil 2.3. Melanosit Yapısı [21]

Embriyolojik olarak nöral krestten türetilirler. Epiderminin bazal tabakasında, kıl foliküllerinde ve mukozada bulunurlar.

Cilt rengi, herhangi bir bireyde melanosit sayısına göre değil, üretilen melanin miktarına göre belirlenir. Melanositler, epidermiste melanozomlar aracılığıyla melanini keratinositlere aktarırlar. UV ışığa daha fazla maruz kalma, melanogenezin ve keratinositlere melanin transferinin (bronzlaşma) artmasıyla sonuçlanır, cildin fotokoruma potansiyelini artırır ve genetik bilgiyi radyasyon hasarından korur. UV radyasyon ve kimyasal maruziyetlerin genetik özelliklerle kombinasyonu, melanom gelişimi dahil olmak üzere melanosit bozuklukları ile ilişkili ana faktörleri oluşturur [17].

2.1.3.2. Langerhans Hücreleri

Langerhans hücreleri , ağırlıklı olarak epidermisen stratum spinosum katmanında bulunan özelleşmiş dendritik hücrelerdir ve derinin patojenlere karşı bağışıklık yanıtında anahtar rol oynar. Çapı 1 mikrondan daha küçük olan partikülleri fagosite edebilirler.

Langerhans hücreleri golgi aygıtı , endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organelleri içerir.

Langerhans hücreleri desmozom içermez ve bu nedenle stratum spinosum'daki keratinositler gibi komşu hücrelere tutunmazlar. Makrofajlara çok benzeyen bu hücreler, kemik iliğinin CD34 pozitif kök hücrelerinden türetilen mezenkimal kökenlidir ve mononükleer fagositik sistemin bir parçasıdır ve antijen sunma yeteneğine sahiptir [13].

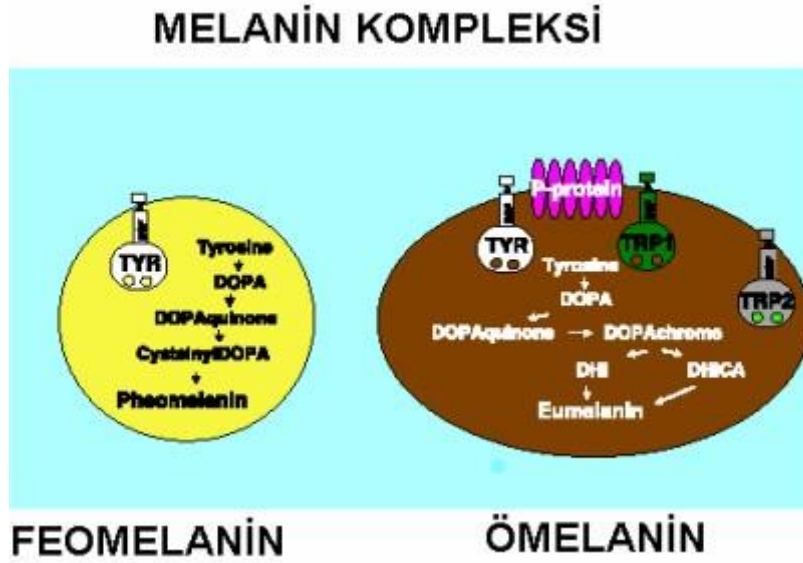
2.1.3.3. Merkel Hücreleri

Merkel hücreleri, bazal membranın hemen üzerinde, stratum bazal katmanında bulunan oval şekilli epidermal hücrelerdir. Merkel hücrelerinin duyu sinir uçlarıyla sinaptik bağlantıları vardır ve duyu ayırt etmede rol oynarlar. Bu hücreler, mekanoreseptörler olarak işlev görürler ve avuç içlerinde, ayak tabanlarında, oral ve genital mukozada bulunurlar [13].

2.2. Deri Pigmentasyonu

İnsanlarda en görünür fenotipik özelliklerden biri deri pigmentasyonudur. saç, deri ve gözlerin pigmentasyonu esas olarak melanin varlığının bir sonucudur. Melanin, melanositlerdeki özelleşmiş organellerde (melanozomlar) sentezlenen ve komşu

keratinositlere aktarılan pigmentasyon ana maddesidir. Memelilerde ve kuşlarda bulunan melanositler, kimyasal olarak farklı iki tip melanin üretir, siyah-kahverengi ve büyük-elipsoidal melanine ömelanin, sarı-kırmızımsı kahverengi küçük-küresel melanine ise fömelanin adı verilir.



Şekil 2.4. Feomelanin ve Ömelanin Oluşumu [22]

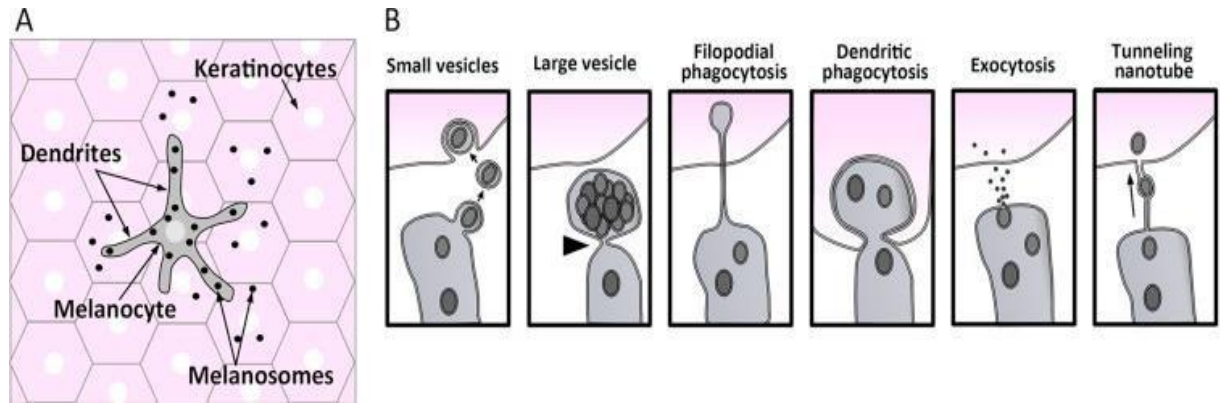
Pigmentasyon, melanosit sayısından ziyade epidermisteki melanozomların sayısına, boyutuna, hücresel dağılımına ve tipine bağlıdır. Açık tene zayıf pigmentli fömelanin, keratinositlerdeki çekirdeklerin üzerinde kümelenme eğilimindeyken, koyu tene yoğun pigmentli ömelanin hücreler içinde eşit olarak dağılır. Aynı vücut bölgesi için melanositlerin siyah ve beyaz tenli bireyler arasındaki dağılımı benzerdir. Ancak yaşam boyu melanosit sayısı azalır. 30 yaşından başlayarak her on yılda bir melanositlerde %10-20'lik bir azalma meydana gelir. Yaşlanmaya bağlı melanosit kaybı, özellikle beyazlayan saçlar şeklinde görülür [23].

Melanositlerin bir diğer önemli rolü, deriyi çevresel UV radyasyonunun zararlı etkilerinden korur ve oluşan DNA hasarını onarır. Aynı zamanda UV'ye maruz kalma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırır. Özellikle melanositlerde üretilen ömelaninin koruyucu etkisi, UV'yi dağıtan fiziksel bir bariyer ve epidermis yoluyla UV'nin penetrasyonunu azaltan emici bir filtre olarak görev alır. Açık tenden daha fazla

ömelanin içeren koyu ten, UV kaynaklı hasara karşı deriyi daha iyi korur ve bu da cilt kanserine yakalanma olasılığının beyaz tenlilere göre yaklaşık 70 kat daha az olduğunu destekler [24].

2.2.1. Melanin Sentez (Melanogenez) Mekanizması

Melanositlerin temel görevi, epidermiste bulunan melanozomlar içindeki özelleşmiş organellerde melanin sentezlemek ve UV ışınlarına karşı koruma sağlamak için melanozomları komşu keratinositlere aktarmaktır.



Şekil 2.5. Derideki bir melanosit ve onu çevreleyen keratinositlerin diyagramı [25]

- (A) Bir melanosit hücrede melanozom adı verilen özelleşmiş organellerde melanin sentezi.
- (B) Melanozomların keratinositlere transfer şekilleri.

Melanin sentezi(melanogenez) temel olarak 4 adımda gerçekleşir:

- melanogenez için gerekli proteinlerin transkripsiyonu,
- melanozom biyogenezi,
- melanojenik proteinlerin melanozomlara ayrılması,
- melanozomların melanosit dendritlerinin uçlarına taşınması ve melanozomların keratinositlere transferi.

Bu olaylardan herhangi birinin bozulması hipopigmentasyona neden olur [26].

Melanogenez, bir dizi enzimatik ve kimyasal katalizli reaksiyonları içeren karmaşık bir yoldur. Melanin sentezi için gerekli olan üç enzim, tirozinaz (TYR), tirozinazla ilişkili protein-1 (TRP-1) ve dopakrom tautomeraz (TRP-2)'dir; özellikle tirozinaz, melanogenezin ilk basamağı için önemlidir.

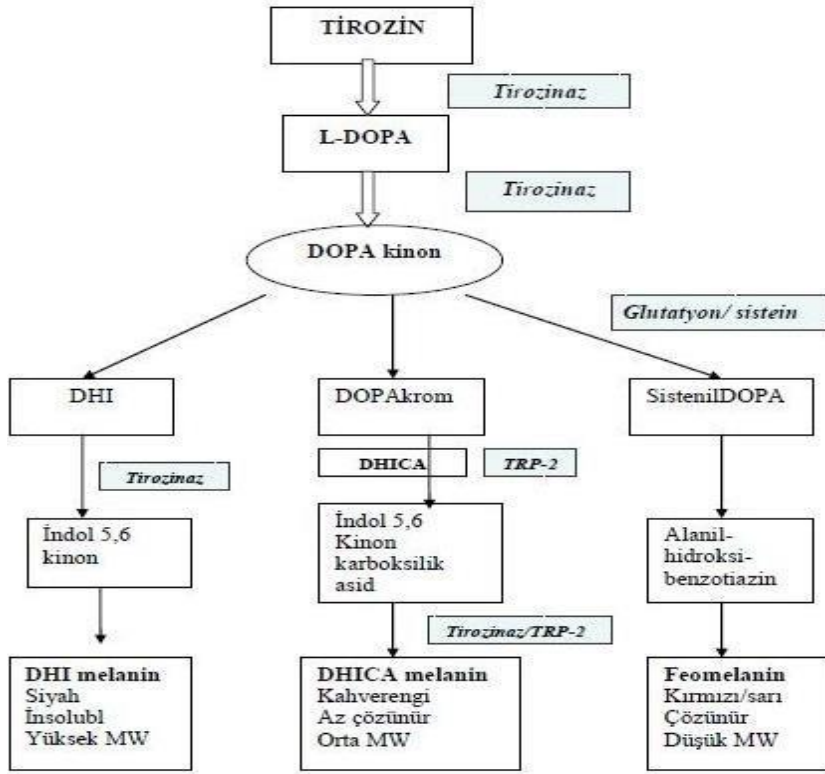
Biyosentez, tirozinaz enziminin tirozini, DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin)'ya oksidasyonu ile başlar ve dopakrom üretilir. Bu basamak melanin sentezi için hız sınırlayıcı basamaktır. Bu basamağın inhibisyonu melanin sentezini engeller.

Dopakrom'un dopakrom tautomeraz (TRP-2) enzimi ile dekarboksilasyonu, DHI-melanin olarak bilinen koyu kahverengi/siyah, yüksek moleküler ağırlıklı çözünmeyen ve hızla oksitlenen 5,6-dihidroksiindol (DHI) meydana getirir, bu dihidroksiindoller ömelanini oluşturur.

Tirozinaz ile ilişkili proteinin (TRP-1), DHICA'nın ömelanine oksidasyonunu katalize eder.

Öte yandan eğer ortamda sistein varsa, dopakinon sisteinle reaksiyona girerek 3,5-sisteinil DOPA meydana getirir. Sisteinildopalar daha sonra benzotiyazın ara ürünleri vermek ve son olarak fömelanin üretmek için oksitlenir.

TRP-1 ve TRP-2'nin TYR'yi stabilize ettiği ve aktivitesini arttırdığı bilinmektedir. Melanojenik enzimlerin ve substratların varlığı, üretilen melanin tiplerine karar verir[27].



Şekil 2.6. Melanin Biyosentezi [26]

DHI (3,4-dihidroksiindol), DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin), DHICA (5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit)

2.3. Deri Pigmentasyon Hastalıkları

Pigmentasyon hastalıkları pigmentasyonda artış (hiperpigmentasyon) ve pigmentasyon kaybı (hipopigmentasyon) olarak ikiye ayrılır[28].

2.3.1. Hiperpigmentasyon

Hiperpigmentasyon, deride bulunan melanin pigmentinin çeşitli nedenlerle artışından kaynaklanır. Hiperpigmentasyonun en yaygın nedeni, derinin UV ışınlarına maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan tepkisidir yani bronzlaşmadır. Diğer nedenler arasında hormonal bozukluklar, sistemik bozukluklar ve ilaca bağlı hiperpigmentasyon yer alır.

2.3.1.1. Hiperpigmentasyonun Hormonal Nedenleri

- **Melazma (Gebelik Maskesi, Kloazma):**

Melazma, derinin pigmentasyon bozukluğundan kaynaklanan, yüz bölgesinde sıkça görülen bir hiperpigmentasyon hastalığıdır. %90 oranında kadınlarda görülmekle birlikte az da olsa erkeklerde de görülebilir. Genellikle hamilelik döneminde hormonların etkisiyle ve güneşe maruz kalma ile ortaya çıkar. Melazma oluşumunda irksal faktörler ve genetik yatkınlık söz konusudur. Koyu tenlilerde görülme oranı açık tenlilere göre daha yüksektir. Çeşitli tedavi yöntemleriyle hastalığı tamamen ortadan kaldırmak mümkündür.

- **Addison Hastalığı (Adrenal Yetmezlik):**

Her 100.000 kişiden birinde görülen addison hastalığında, böbreklerin hemen üstünde bulunan adrenal bezlerin çeşitli sebeplerle kortizol ve aldosteron hormonlarını yeterli seviyelerde salgılamaması sonucu ortaya çıkar. Hastalığın ortaya çıkmasındaki etkenler arasında; stres, adrenal bezlerin hasar görmesi, tüberküloz, HIV, AIDS, mantar enfeksiyonları, böbrek üstü bezlerin herhangi bir nedenden dolayı cerrahi olarak alınması, dokularda biriken bazı proteinler, genetik kusurlar gösterilebilir. Genellikle dişeti ve genital deri gibi mukozal yüzeyler de görülür.

- **Cushing Sendromu:**

Nadir görülen hastalıklar arasında yer alan cushing sendromu, böbrek üstü bezlerden salgılanan kortizol hormonunun fazlalığı ile ortaya çıkar. Cushing sendromunun tipik belirtileri arasında deride hiperpigmentasyon, incelme ve sivilce artışı, kemiklerde kolay kırılma, karın bölgesinde kilo artışı olurken kol ve bacaklarda kilo artışı olmaması bulunur. Bu tablo santral obezite olarak da tanımlanır.

- **Hipertiroidizm:**

Tiroid bezinin aşırı çalışması sonucu gelişen ve kanda tiroid hormonunun fazlalığıyla tespit edilen bir hastalıktır. Her iki cinsiyette de görülür fakat kadınlarda görülme sıklığı erkeklere oranla daha fazladır. Belirtileri arasında, hiperpigmentasyon, hızlı kilo kaybı, aşırı terleme ve kalpte ritim bozukluğu gösterilebilir. Hormon baskılayıcı ilaçlar, radyoaktif iyot tedavisi ve cerrahi uygulamalar ile tedavisi mümkündür.

2.3.1.2. Sistemik Hastalıklar

Hiperpigmentasyonu etkileyen bir diğer faktör ise sistemik bozukluklardır. Solid malign tümörler, otoimmün tiroid hastalığı (Hashimoto tiroidi), romatoid artrit, pernisiyöz anemi, Addison hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, siroz, obezite ve diyabet, lenfoma, sistemik skleroz, sistemik lupus eritematozus, dermatomyozit, morfea gibi hastalıklar hiperpigmentasyonun gelişmesinde rol oynar. Ayrıca B12, B3 ve A vitaminlerinin eksikliğinde de hiperpigmentasyon gelişebilir.

2.3.1.3. İlaça Bağlı Hiperpigmentasyon

- **Kemoterapi İlaçları:**

Dokсорubisin, Siklofosamid, 5-Fluorourasil, Hidroksiüre, Bleomisin gibi kemoterapik ajanlar deri, tırnak ve özellikle güneşe maruz kalan bölgelerde hiperpigmentasyona sebep olabilirler.

- **Sıtma Önleyici İlaçlar:**

Hidroksiklorokin ve Klorokinler, hastaların %25'lik kısmında yüz bölgesi, damak ve tırnaklarda hiperpigmentasyona sebebiyet verebilirler.

- **Tetrasiklinler:**

Özellikle Minosiklin, tırnaklarda hiperpigmentasyona sebep olabilir. Bunun dışında tiroid bezinde ve hatta kemiklerde yapısal bozukluklara neden olabilir.

- **Psikotrop İlaçlar:**

Amitriptilin, Klorpromazin Desipramin, İmipramin gibi merkezi sinir sistemini etkileyen ilaçlar, grimsi renkte hiperpigmentasyona neden olabilirler[28, 29].

2.3.2. Hipopigmentasyon

Hipopigmentasyon, çeşitli nedenlerle derideki melanin pigmentinin kaybından kaybı ile ortaya çıkar. Hipopigmentasyonda, deri normal cilt rengine kıyasla daha açıktır. Hipopigmentasyon, genelleştirilmiş (yaygın) hipopigmentasyon ve lokalize hipopigmentasyon olarak iki gruba ayrılır.

2.3.2.1. Genelleştirilmiş (Yaygın) Hipopigmentasyon

Genelleştirilmiş (yaygın) hipopigmentasyonda, vücudun büyük bir kısmında veya tamamında pigment kaybı gözlenir.

- **Albino (Albinizm):**

Nadir görülen bir hastalık olan albinizm, Latince beyaz anlamına gelen "Albus" kelimesinden türemiştir. Bu hastalarda melanin pigmenti üretimi ya çok azdır ya da hiç yoktur. Genetik bir bozukluktur ve hastalığın tedavisi bulunmamaktadır. Albinizm belirtileri arasında cilt, saç ve kirpiklerde beyazlama, pembe renkte çil ve benler, gözün iris bölümünde saydamlık, ışığa karşı aşırı hassaslık, gözlerin istem dışı hareket etmesi ve ciddi görme bozuklukları gösterilebilir.

Albinizmi olan bireyler UV ışınlarından korunmalıdır çünkü bu hastalarda cilt kanseri riski normal insanlara göre çok daha yüksektir.

- **Fenilketonüri:**

Otozomal çekinik bir fenilalanin metabolizması bozukluğudur. Bu hastalıkta fenilalanini tirozine dönüştüren fenilalanin hidroksilaz enzimi ya eksiktir ya da hiç bulunmaz. Albinizme benzer şekilde deri, saç ve gözlerde pigmentasyon eksikliği görülür. Genetik bir hastalık olduğu için tedavisi ve önlenmesi mümkün değildir fakat fenilalaninden kısıtlı diyetler ile hastanın daha konforlu bir yaşam sürdürebilmesi sağlanabilir.

- **Chediak-Higashi Sendromu:**

Chediak-higashi sendromu otozomal çekinik kalıtmı, lenfomaya benzer ölümcül bir hastalıktır. Lökositlerin lizozomal granüllerinin işlev bozukluğundan kaynaklanır. Kısmi albinizm, nötropeni ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar görülür.

- **Hermansky-Pudlak Sendromu:**

Çeşitli organlarda seroid lipofüksin birikimi ile karakterize otozomal çekinik bir hastalıktır. Bu hastalarda kısmi albinizm ve kanama diyatezi görülür.

- **Griscelli Sendromu:**

İmmun yetmezlik ve kısmi albinizmle karakterize otozomal çekinik bir bozukluktur. Bu hastalarda gümüş grisi saçlar, tekrarlayan enfeksiyonlar nörolojik bozukluklar ve ileri derece immün yetmezlik görülür.

- **Yarık Dudak (Ektrodaktili-Ektodermal Displazi) Sendromu:**

Embriyolojik dönemde çeşitli nedenlerle ortaya çıkan yüz bölgesindeki yapıların birleşme kusuru ile ortaya çıkar. Bu hastalarda diffüz hipopigmentasyon ile saç ve deride kuruluk görülür.

- **Menkes Sendromu:**

Menkes hastalığı X'e bağlı çekinik, nadir görülen nörodejeneratif bir hastalıktır. Özellikle beyni etkileyen bu hastalık bakır metabolizmasının bozulmasından kaynaklanır. Bu hastalarda genellikle beyaz veya gri renkte kırılğan ve seyrek saçlar, hipotermi, zeka geriliği osteoporoz görülür.

- **Elejalde Sendromu (Nöroektodermal Melanozomal Sendrom):**

Elejalde sendromunda, sebebi henüz bilinmeyen gen mutasyonları meydana gelmiştir. Gümüşümsü gri saç, bronz renkte deri, ağır disfonksiyon görülür.

- **Nutrisyonel Bozukluklar:**

Özellikle çocuklarda selenyum eksikliğine bağlı saç ve deride pigment kaybı oluşabilir. Bu hastalarda selenyum tedavisi ile repigmentasyon sağlanabilir.

2.3.2.2. Lokalize Hipopigmentasyon

Lokalize hipopigmentasyonda, pigment kaybı vücutta dağınık halde ya da simetrik olarak görülür.

- **Vitiligo (Ala) hastalığı:**

Vitiligo, en sık görülen hipopigmentasyon hastalığıdır. Farklı şekil ve boyutlarda beyaz lekelerle karakterizedir ve cilt, saçlarda ve mukozal bölgelerde rastlanır. Hastaların yaşam kalitelerini ciddi şekilde etkileyen, önemli bir kozmetik sorun haline gelebilir. Uygun tedavi uygulandığında vitiligo tamamen geri döndürülebilir.

- **Pitriazis Alba (PA):**

Nedeni tam olarak bilinmeyen, çoğunlukla 12 yaş altı çocuklarda görülen bir hastalıktır. Özellikle yüz bölgesinde açık pembe renkte ortaya çıkar ve ilerleyen zamanlarda deri rengi daha da açılır. Kortizonlu ilaçlar ile tedavisi mümkün olabilir.

- **Tuberoz Skleroz (TS):**

Cilt, beyin ve böbreklerde beyaz lekelerle karakterize otozomal baskın bir hastalıktır. Bunun yanında zeka geriliği, otizm ve epilepsi semptomları sıklıkla görülür. Tam olarak tedavisi mümkün olmasa da düzenli doktor kontrolü ile hasta yaşamını sürdürebilir.

- **Waardenburg Sendromu (WS):**

Otozomal baskın bir hastalıktır. Bu hastalığı taşıyan kişilerde hem işitsel hemde pigmenter eksiklik görülür. Hastaların deri, saç ve gözlerindeki melanositlerin fiziksel yokluğundan kaynaklanır. Saçta beyaz perçem, işitme kaybı, deride beyaz lekeler ve çok açık mavi göz rengi hastalığın belirtileri arasındadır.

- **İto'nun Hipomelanozu (IH):**

"Incontinentia Pigmenti Achromians" adıyla bilinen ve nadir olarak görülen nörokutanöz bir hastalıktır. Özellikle doğum sırasında ve çocukluk döneminde rastlanan bu hastalık, blaschko çizgilerini izleyen hipopigmente lezyonlar ile karakterizedir. Hipopigmente lezyonlar helezonik, yama ve lineer gibi farklı morfolojilerde görülebilir.

- **Piebaldizm:**

Otozomal baskın, vitiligo benzeri maküller ve saçta beyaz perçemle seyreden nadir görülen kongenital bir hastalıktır. Piebaldizm doğumda ortaya çıkar ve sabit boyutlarda kalırken, vitiligo doğumdan sonra ortaya çıkar ve oluştuktan sonra genişleyerek yayılır. Piebaldizm'de işitme kaybıda görülebilir.

- **Nevus depigmentosus:**

Kalıtsal olmayan daha çok çocukluk döneminde ortaya çıkan vitiligo benzeri bir hastalıktır. Vitiligonun aksine yaşla birlikte yayılım göstermez. Nevus depigmentosus'un tedavisi yoktur ancak uygun kozmetiklerle lekeler gizlenebilir.

- **Hipopigmente Mikozis Fungoides:**

Primer kutanöz T hücreli lenfomaların en sık görülen tipidir. Nadir görülen, kalıtsal olmayan ve asemptomatik hipopigmente yamalarla karakterize bir hastalıktır. Koyu tenlilerde görülme sıklığı açık tenlilere göre daha fazladır. Kortizonlu ilaçlar ve fototerapi yardımıyla hastalığın tedavisi mümkündür.

- **Tinea Versikolor:**

Tinea versikolor, deride normal şartlarda da bulunan *Malassezia* adındaki mantar türünün çeşitli nedenlerle sayısının artmasıyla gövde, sırt ve kollarda hipopigmentasyon meydana gelmesidir. Sıcak ortam hastalığı olarak da bilinir. İlaçlı şampuanlar, losyon ve kremlerle tedavisi mümkündür.

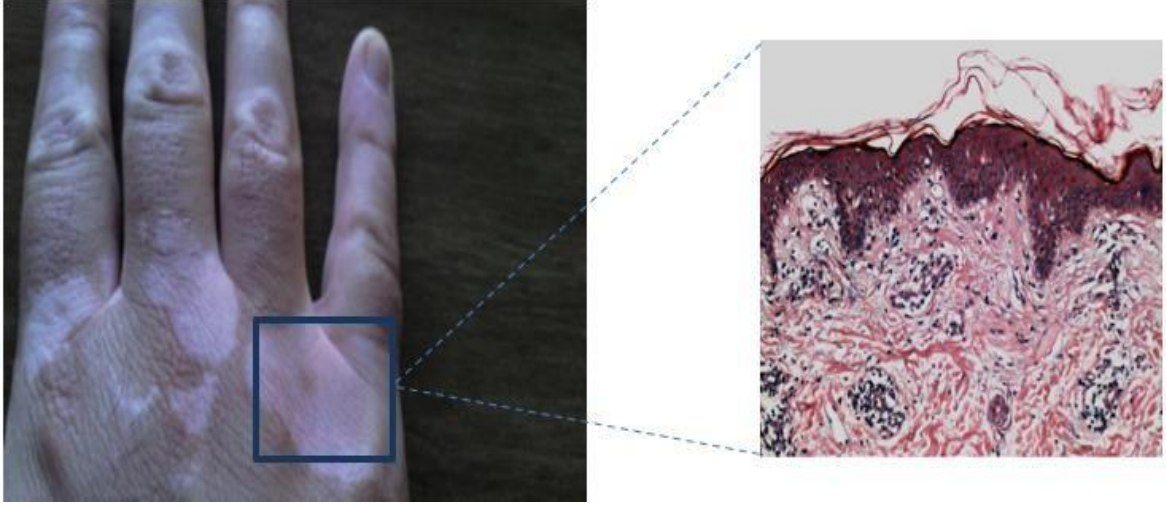
- **İnkontinentia Pigmenti:**

İnkontinentia pigmenti, X kromozomuna bağlı dominant geçişli, ektodermal ve mezodermal kökenli organ tutulumlu bir hastalıktır. Cilt yüzeyinde genellikle lineer hipopigmentasyon gösterir. Bu hastalık erkek çocukları için genellikle ölümcüldür. Spesifik bir tedavisi yoktur fakat çeşitli yöntemlerle hastaların konforu artırılabilir[28-30].

2.4. Vitiligo Hastalığının Tanımı ve Tarihçesi

Vitiligo, epidermal melanositlerin eksikliğinden veya hasarından kaynaklanan en yaygın cilt depigmentasyon bozukluğudur ve dünya nüfusunun yaklaşık %1-2' sini etkiler. Her iki cinsiyet de eşit derecede etkilenir ve görülme oranlarında fototip ve ırka göre belirgin bir fark yoktur. Açık tenli kişilerde vitiligo, genellikle ilk kez güneş ışığına maruz kalmadan sonra ortaya çıkar.

Hastaların %25'i 10 yaş altı çocuklardır. 2-3 aylık bebeklerde görülmesi doğuştan vitiligonun varlığı konusunu gündeme getirmektedir. Etnik köken ne olursa olsun segmental vitiligo yüzdesi çocuklarda yetişkinlere göre çok daha yüksektir. Yayımlanan raporlarda çocukluk çağında segmental vitiligo prevalansı %4.6 ile %32.5 arasında değişmektedir[31].



Şekil 2.7. Hipopigmente vitiligo makülleri ve histopatolojisi [32, 33]

Vitiligo, antik çağlardan beri bilinen ve tarihçesi M.Ö. 1.500’lü yıllarda Mısır’da bulunan Ebers Papirüsleri’ne dayanan bir hastalıktır. Bazı kültürlerde lepra (cüzzam) hastalığı ile karıştırılan vitiligo, ilk kez bu belgelerde lepradan ayrı bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Vitiligo kelimesinin nereden geldiğine dair birden çok hipotez vardır. Tarih boyunca bu hastalığa “shwetakustha”, “sutra”, “kilas”, “baras” gibi isimler verilmiştir.

Vitiligonun Latince iz, kusur, eksiklik anlamındaki “vitium” veya M.S. 2. Yüzyılda Romalı Doktor Aulus Cornelius Celsus’un kullandığı vitelius (dana) kelimelerinden türetildiği düşünülmektedir. Buradaki vitelius kelimesi, benekli danalardaki beyaz yamalara benzetilerek türetilmiştir. Vitiligo kelimesinin kullanımına ilişkin ilk doküman Celsus’un M.S. yazdığı “De Medicina” isimli kitaptır.

Kutsal kitaplarda beyaz cilt anlamına gelen “baras” kelimesi, Hz. İsa’nın tedavi ettiği bir hastalığı açıklamak için kullanılmıştır[34].

2.4.1. Vitiligonun Sınıflandırılması

Vitiligo, 2012 yılında yayınlanan "Vitiligo Küresel Sorunlar Konsensüs Konferansı (VGICC)" nda belirtilen, lezyonların dağılımına ve tutulan alanların yaygınlığına göre 3 grupta incelenir.

- i) Segmental olmayan vitiligo,
- ii) Segmental vitiligo,

iii) Sınıflandırılmamış vitiligo.

Bu kategorilerin her biri, aşağıda açıklandığı gibi başka alt sınıflandırmalara sahiptir[35].

2.4.1.1. Segmental Olmayan Vitiligo

Vitiligonun segmental olmayan formu genelleştirilmiş, akrofasiyal, universalis ve mukozal olarak çeşitli alt başlıklarda incelenir.

Daha önce vitiligo vulgaris olarak adlandırılan genelleştirilmiş vitiligo, en sık görülen form olup vücudun birden fazla bölgesini tutan, çoğunlukla simetrik olan süt beyazı maküllerle karakterizedir. Deri hipopigmentasyonu genellikle asemptomatiktir ancak hastaların küçük bir kısmı öncesinde ortaya çıkan hafif bir kızarıklık ve kaşıntıdan söz eder. Hastalık vücudun herhangi bir yerinde başlayabilir ancak parmaklar, eller ve yüz çoğunlukla başlangıç bölgeleridir.

Akrofasiyal vitiligo, genellikle dudak çevresi, dudaklar ve parmak uçlarında görülür.

Universalis vitiligo, vücut yüzeyinin %80-90'ını etkileyen, multiple endokrinopati sendromu ile ilişkili olduğu düşünülen formdur.

Mukozal vitiligo, oral ve genital mukozanın depigmentasyonudur[36].

2.4.1.2. Segmental Vitiligo

Segmental vitiligo, çoğunlukla çocukluk döneminde ortaya çıkan, vücudun bir tarafında görülen bir ya da birden fazla beyaz depigmente maküllerin varlığıdır. Genellikle vücudun orta hattında asimetrik bir dağılım görülür. Segmental olmayan vitiligoya göre görülme sıklığı daha azdır. Segmental vitiligoya aynı zamanda fokal veya lokalize vitiligo da denilmektedir. Genellikle kombine tedavilerle iyileşme söz konusudur[31].

2.4.1.3. Sınıflandırılmamış Vitiligo

Sınıflandırılmamış vitiligo, hastalık ortaya çıktıktan sonra segmental veya non-segmental vitiligoya dönüşmeyen lezyonlar için kullanılır. Odak vitiligo ve mukozal vitiligo olmak üzere iki şekilde görülebilir.

Odak vitiligo, tek bir bölgede görülen ve seneler sonra bile yayılım göstermeyen vitiligodur. Mukozal vitiligo ise segmental olmayan vitiligodan farklı olarak sadece bir mukozal bölgede (oral veya genital) görülür[32].

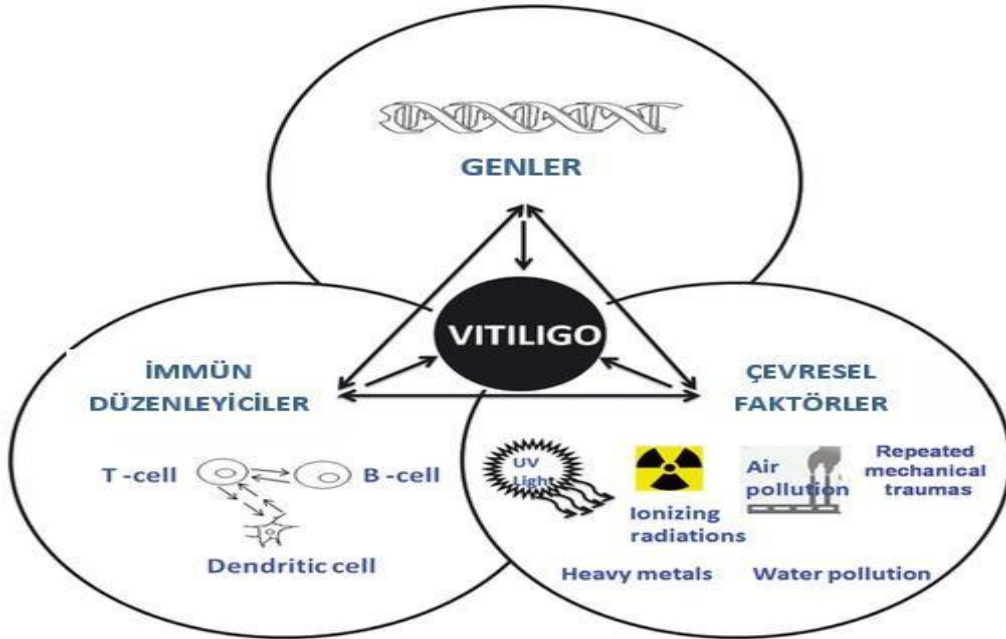
2.4.2. Vitiligonun Epidemiyolojisi

Vitiligo, 1964 ve 2017 yılları arasında yayınlanan verilere göre küresel prevalansı %0.06-8.8 olan en yaygın depigmentasyon bozukluğudur. Vitiligonun görülme sıklığı cinsiyetler arası farklılık göstermez ancak coğrafi bölgelere göre vitiligo prevalansında farklılıklar vardır. Bildirilen en yüksek prevalansa sahip ülkeler Hindistan (%8,8), Meksika (%2,6-4) ve Japonya'dır (%1,68) [37-41]. Ülkemizde ise yayınlanan dermatoloji kliniğine başvuran hastaların sayısına göre vitiligonun yaklaşık prevalansı %0.15'tir. En yüksek vitiligo insidansı yaygın olarak çocuklukta veya genç erişkinlikte gözlemlenmiştir ve 10-30 yaşları arasındaki bireylerde görülme sıklığı açısından zirveye ulaşır. Ancak, unutulmaması gereken nokta vitiligonun her yaşta da gelişebilen bir hastalık olduğudur[34, 42].

2.4.3. Vitiligonun Etiyolojisi

Vitiligonun etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber, genetik, otoimmün, çevresel, biyokimyasal faktörlere ve nöral mekanizmalara bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Vitiligonun ruhsal ve fiziksel bir travmadan sonra ya da sıcaklık, ultraviyole ışınları, basınç, kimyasal maddelerle temas, kesi, abrazyon gibi fiziksel incinmeler, cerrahi operasyon, radyoterapi, şiddetli güneş yanığı ve kontakt dermatit sonucu ortaya çıkışına sıkça rastlanmaktadır. Ayrıca çeşitli ilaçların kullanımı sonucu da ortaya çıkabilmektedir.

Şekil 2.7. Vitiligo oluşumunda genetik ve genetik olmayan faktörler [43]



Vitiligo oluşumunda, genetik ve genetik olmayan etkenlerin rol aldığı artık bilim otoritelerince kabul edilmektedir. Bu genetik faktörlerin yol açtığı hastalıklara tiroid, diyabet, Addison hastalığı, alopesi areata, Crohn hastalığı, skleroderma, myastenia gravis, biliyer siroz, pernisiyoz anemi, sistemik lupus eritematozus ve inflamatuvar bağırsak hastalığı örnek verilebilmekte; bu hastalıklar vitiligo hastalığını tetikleyebilmekte ya da birlikte seyredilmektedir. Tüm bu nedenlerin dışında, vitiligonun gebelikte veya tifo, hepatit gibi bazı hastalıklar sonucunda da ortaya çıktığı belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, ruhsal ya da fiziksel kronik stresin kutan melanogenezini baskılamasıyla, vitiligonun başlamasında çok etkili olduğu bulunmuştur[34].

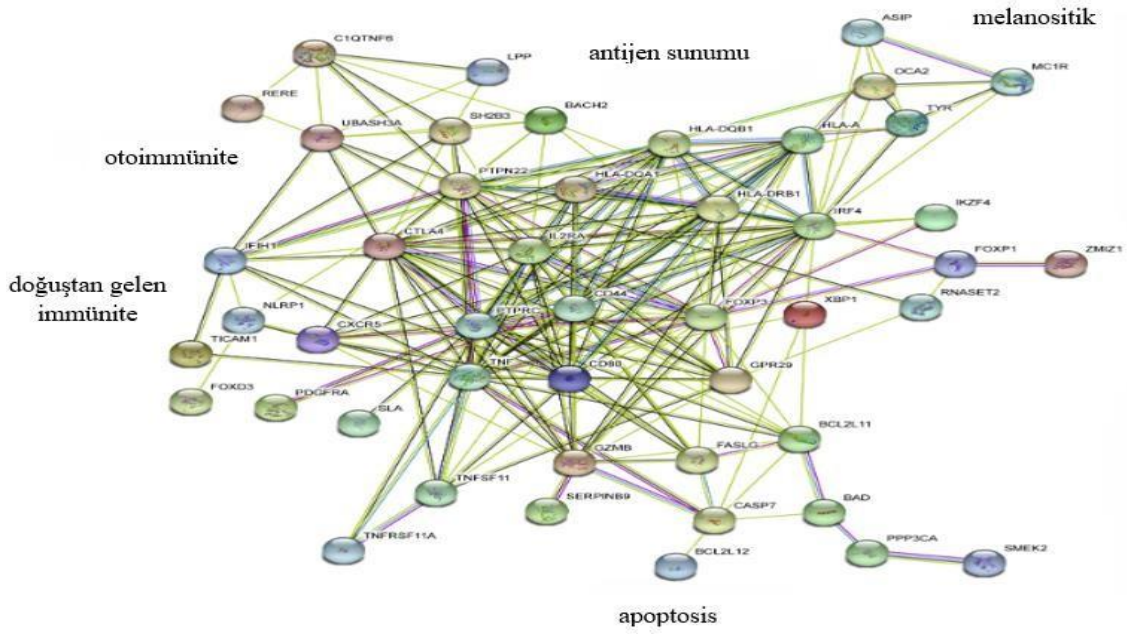
2.4.4. Vitiligonun Patogenezi

Vitiligo, hem genetik hem de genetik olmayan faktörlerle bağlantılı, karmaşık bir patogenezi olan multifaktöriyel poligenik bir hastalıktır. Yapılan son çalışmalar, vitiligonun genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkma oranının %75 -80 olarak tahmin edildiği, geri kalan yaklaşık %20-25 'inin ise çevresel faktörlere bağlı olduğu görülmüştür[33].

2.4.4.1. Genetik Faktörler

Vitiligo genetiğinin ilk çalışmaları, 1950'de Stüttgen ve Teindel'in aynı anda vitiligodan etkilenen çok sayıda akrabaya sahip multipleks aileleri tanımlamasıyla başlamıştır. Aslında, Stüttgen'in ailesinde vitiligo ve otoimmün tiroid hastalığının birlikte ortaya çıkmasının hem baskın hem de resesif faktörlerin eşzamanlı ayrışmasını yansıtabileceği yönündeki önerisi, karmaşık kalıtımın en eski spesifik hipotezlerinden birini oluşturur. Vitiligo, aynı ailenin birkaç üyesini etkileyebilir, bu da genetik bir risk olduğunu gösterir. [44].

Genetik faktörlerin yaklaşık %70'i yaygın genetik varyantlardan ve geri kalan %30'luk kısmı nadir genetik varyantlardan kaynaklanır. Aday gen, genom çapında bağlantı ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları yoluyla 50'den fazla vitiligo duyarlılık lokusu keşfedilmiştir[45].



Şekil 2.8. Vitiligo ile ilişkili aday genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyonel etkileşim ağı [44].

2.4.4.2. Genetik Olmayan Faktörler

Vitiligo'nun patogenezi günümüzde hala belirsizliğini korusa da, çeşitli teoriler geliştirilmiştir. Bunlar otoimmün, nöral ve biyokimyasal teorilerdir. Bu teorilerin bir veya birkaç tanesinin vitiligo gelişiminde aynı anda etkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte güncel çalışmalar otoimmün teorisinin vitiligoda daha etkili olduğunu göstermektedir. Bunların dışında aile öyküsü de göz önünde bulundurulmalıdır[32].

- **Otoimmün Teori**

Vitiligo hastalığının, çeşitli immün sistem hastalıkları ile birlikte görülmesinden dolayı patogenezi otoimmünite bozukluklarının da rol oynayabileceği düşünülmüştür. Vitiligo ile sıklıkla ilişkili olan Tiroid hastalıklarının yanı sıra, Juvenil diabetes mellitus, Pernisiyöz anemi, Addison hastalığı, Alopesi Areata ve Halo Nevi dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalıkla ilişkili olabileceği yaygın olarak bilinmektedir. Ayrıca, otoimmün tiroid hastalıklarının, özellikle Hashimoto tiroiditinin, vitiligo ile ilişkili en yaygın otoimmün hastalık olduğu gösterilmiştir [32, 46].

Asıl görevi canlıyı ultraviyole ışınlarından korumak olan melanositlerin, immün sistem ile bağlantısı olduğu bilinmektedir. Melanositler major histokompatibilite kompleksi (MHC) class 1 ve 2 moleküllerini, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve vasküler

adezyon molekülü (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerini ve ayrıca interlökin IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinleri ve transforming growth faktör (TGF- β 1)'i de salgılamaktadır. Ayrıca melanositlerin fagositoz yeteneklerinin yanısıra T hücrelerine antijen ve antijenik peptidlerin sunulmasında da görev alıyor olabilecekleri düşünülmektedir. Bu bulgular vitiligonun immün sistemle bağlantısına daha çok ağırlık verilmesi gerektiğini göstermektedir[47].

- **Nöral Teori**

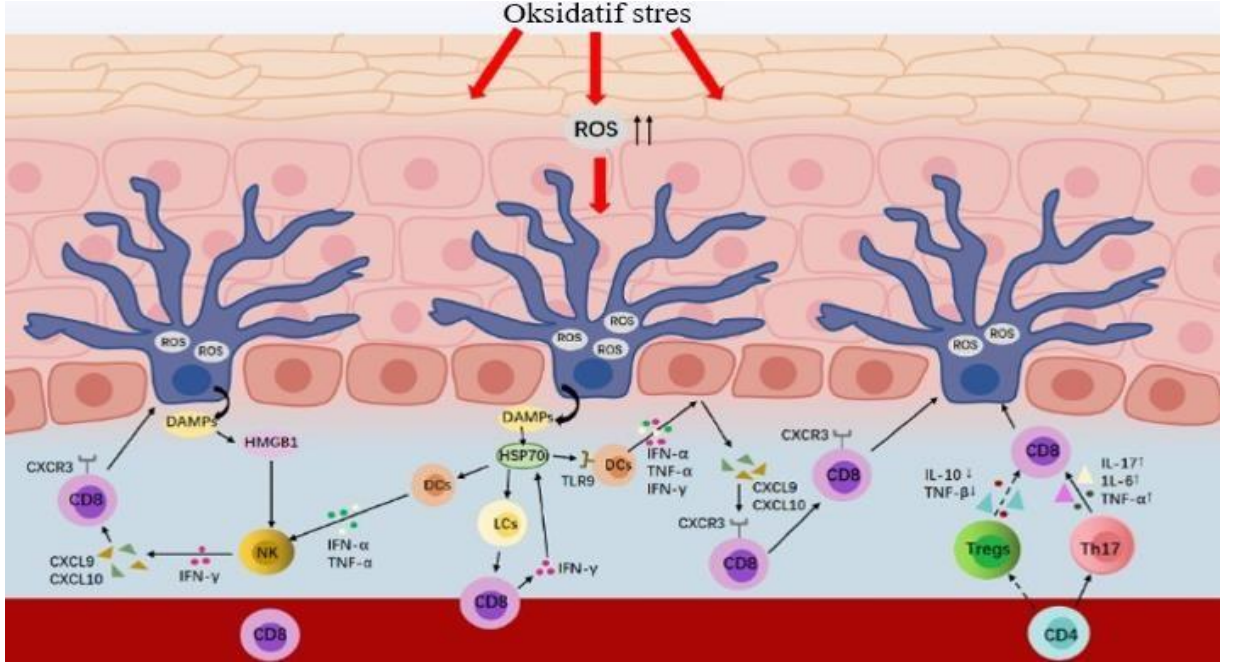
Lerner'in (1959) öne sürdüğü "Nöral Teori"ye göre, sinir uçlarından salgılanan nörokimyasal mediatörler, melanositler üzerinde toksik etki gösterir ve bunun sonucunda vitiligo ortaya çıkar. Melanositler, nöral krest hücrelerinden türetilir. Nöronlar, glial hücreler, kalp hücreleri, kraniyofasiyal doku ve adrenal medulla da bu pluripotent hücrelerden köken alır. Melanoblastlar olarak bilinen melanosit öncüleri, bazal epidermis ve saç foliküllerinde hedeflerine doğru *giderken göç eder, çoğalır ve farklılaşır*.

Sempatik sinir sisteminin (SNS) aktivitesinin işlev bozukluğu melanin üretimini etkiler ve depigmentasyona yol açar. Ayrıca viral ensefalit, multipl 9 skleroz, nörofibromatozis, Horner sendromu gibi sinir sistemini ilgilendiren bazı hastalıklara da vitiligonun eşlik ettiği görülmüştür[48].

- **Biyokimyasal Teori**

Oksidatif stres, melanosit kaybında olası patojenik olaylardan biri olarak kabul edilir. Melanositlerde üretilen melanin pigmentinin ana görevi, hücre çekirdeğini zararlı ultraviyole ışınlarından korumaktır. Hem dolaşım yoluyla gelen hem de solunum yoluyla alınan oksijen, UV ışınlarının etkisiyle aktive olur. Bu durum serbest elektron içeren ve bu nedenle de hücrede kuvvetli yıkım gücüne sahip olan serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açar. Antioksidan sistem bu radikalleri kontrol altına alabilmek için katalaz ve peroksidaz enzimlerini kullanır. Serbest radikallerin bir kısmı ise melanin tarafından inaktifleştirilir. Oksidatif stres hem antioksidanların hem de reaktif oksijen türlerinin artması sonucu gelişebilir. Melanin molekülünün yükünün artışı ile prostaglandin sentezi sırasında oluşan peroksitler inaktive edilemeyecek ve lipid peroksit oluşumu ile membranları zarara uğratması önlenemeyecektir. Böylece melanozom transferi bozulacaktır. Bir yandan da otositotoksik etki ile birlikte melanin molekülleri melanositlerin yıkımına neden olacaktır[43, 49, 50].

Oksidatif stres, melanosit endoplazmik retikulumdaki değişiklikleri tetikleyebilir, bu da "katlanmamış protein tepkisi (UPR) " adı verilen bir hücre stres fenomenini uyararak kusurlu proteinlerin üst üste birikmesiyle sonuçlanır. Ayrıca, melanin üretimi için gereken enerji tek başına mitokondriyal metabolizma yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Bu iki yolun vitiligolu hastaların melanositlerinde aşırı aktif olduğu görülmektedir ve bu da bu hücrelerin melanin üretiminin sağlıklı bireylere göre daha az tolere ettiğini kanıtlamaktadır[33].



Şekil 2.9. Oksidatif stres sonucunda melanositlerde ROS birikimi [51].

DC, dendritik hücre; NK, doğal öldürücü; ROS, reaktif oksijen türleri.

2.4.5. Vitiligoda Kullanılan Tedavi Yaklaşımları

Vitiligo hastalığının kesin bir tedavisi olmamakla birlikte bir çok tedavi yaklaşımları mevcuttur. Bu tedaviler tek başına uygulandığı gibi kombine olarak da kullanılabilir. Vitiligo tedavisi, lezyonların yaygınlığına, lokalizasyonuna, yaşa ve önceki tedavilere verilen yanıtı göre değişmektedir. Tedavide amaç repigmentasyonu sağlamak ve depigmentasyon sürecini yavaşlatmaktır.

2.4.5.1. Topikal Kalsinörin İnhibitörleri

Topikal kalsinörin inhibitörleri (pimekrolimus ve takrolimus) son yıllarda vitiligo tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Uzun süreli topikal kortikosteroid kullanımının getirdiği yan etkilerden korunmak için iyi bir alternatif oluşturmaktadırlar. Takrolimus ve

pimekrolimus gen ekspresyonu düzeyinde etki ederler ve proinflamatuvar sitokinleri (interlökinler, tümör nekrozis faktör (TNF), interferonlar) baskılayarak melanosit büyümesini ve melanosit göçünü indüklerler[52]. Kalsinörin inhibitörleri immunofilin bağlayıcı proteine bağlanarak kalsinörin defosforilaz aktivitesini bloke ederek T hücre proliferasyonunu ve IL-2, IL4, IL-12, TNF-alfa ve IFN-gama salımını baskırlar. Topikal kortikosteroidlerle karşılaştırıldıkları çalışmalarda kalsinörin inhibitörlerinin etkinlik açısından çok daha iyi olduğu ve üstelik yan etkilerinin de daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Ayrıca kalsinörin inhibitörlerinin göz kapağı gibi hassas bölgelerde de kullanımında sakınca olmadığı bulunmuştur[53].

Kalsinörin inhibitörlerinin topikal kullanımlarında sistemik immünsüpresyon görülmemiştir ancak uzun süre kullanılmaları durumunda yan etkiler oluşabilmektedir.

2.4.5.2. Topikal Kortikosteroidler

Sınırlı olgularda ucuz ve kolay uygulanabilir olmaları nedeni ile topikal kortikosteroidler (TKS) tedavide ilk seçenektir ve özellikle lokalize ve yüz yerleşimli lezyonlarda, çocuk hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Etkinliği immunomodülatör etkilerine bağlıdır. Kortikosteroidler melanositlere karşı kompleman aracılı sitotoksosite ile oluşan otoantikörleri ve melanosit yüzey antijenine karşı oluşan antikörleri azaltırlar. Hedef alınan melanositlerin proliferasyonunu epidermiste göç etmeleri en az 3 aylık bir süreyi alır. Bu nedenle hangi tedavi uygulanırsa uygulansın tedavi süresi en az 3 ay olmalıdır. Kısa süreli tedavide ilacın etkinliği saptanamaz. Fakat kortikosteroidlerin 2-4 aydan daha uzun süre kullanılması atrofi, telenjektazi ve stria oluşumu gibi yan etkilere neden olabilir. Ayrıca deri absorpsiyonunun fazla olduğu yüz, boyun gibi bölgelere uygulanması sonucunda ciddi sistemik yan etkilerde görülebilir[54].

2.4.5.3. Kalsipotriol

Kalsipotriol gibi vitamin D3 analogları, T hücre aktivasyonunu inhibe ederek, keratinosit ve melanositlerin diferansiasyonunu uyararak etki gösterirler. Melanositlere bozulmuş kalsiyum (Ca⁺⁺) girişini düzelterek Ca⁺⁺ homeostazını sağlarlar. Tek başına topikal kalsipotriol kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda etkinliği konusunda çelişkili sonuçlar vardır. 18 vitiligolu çocuk hastada yapılan çalışmada hastaların %21.4'ünde tam düzelmeye izlenmiş olup çocuklarda etkili bir tedavi seçeneği olabileceği vurgulanmıştır[55].

2.4.5.4. Fototerapi

Fototerapide, dar bant ultraviyole B (UVB) (311-313nm) ve geniş bant UVB (290-320nm) tedavileri uygulanmaktadır. Dar bant UVB, sitokinlerin sekresyonunu ve indüksiyonunu inhibe ederek inaktif durumdaki melanositlerin proliferasyonunu ve vitiligo lezyonlarına göçünü sağlar. Ultraviyole tedavisi hem UVA hem de UVB spektrumunda vitiligo tedavisinde kullanılır. Etki mekanizması halen anlaşılamamıştır, ancak immunsupresyonu artırarak melanosit yıkımını inhibe ettiği veya melanositlerin sayısını ve göç etme kapasitesini artırdığı düşünülmektedir. Halen UVB tedavisine ait güvenlik aralıkları, tedavi etkinliğinin ne zaman değerlendirilmesi gerektiği ve tedavinin ne zaman kesilmesi veya tedaviye ne kadar devam edilmesi gerektiğine ait bilgiler netlik kazanmamıştır[56].

2.4.5.5. PUVA Tedavisi

320-400 nm arasındaki dalga boyunda çalışır. Etki mekanizması dar bant UVB'ye benzerdir. UVA ışığı ile kombine edilir. Psoralenler yaygın olarak 8 metoksipsoralen, 5 metoksipsoralen ve trimetilpsoralen formlarında topikal ve oral olarak kullanılırlar. Vitiligo hastalarda oral PUVA tedavisi ilk olarak 1948 yılında kullanılmıştır. Oral PUVA tedavisi çocuklarda 12 yaş altında kontrendikedir. 12 yaş üzeri ve %20'nin üzerinde vücut yüzey alanı tutulumunda tercih edilir. Topikal PUVA tedavisi ise 2 yaşın üzerinde güvenilir olarak kabul edilmektedir. Dar bant UVB tedavisinin daha güvenilir olması ve daha iyi yanıt alınması nedeni ile PUVA tedavisi günümüzde vitiligo tedavisinde daha az tercih edilmektedir[57].

2.4.5.6. Depigmentasyon

Repigmentasyon tedavilerine cevap alınamayan ve çok yaygın lezyonu olan vitiligo olgularında, özellikle yüz bölgesinde tutulumun olduğu bölgelerde bazen depigmentasyon tedavi seçeneği olarak görülebilir. Tedavide monobenzileterhidrokinon kullanılır. Bu bileşik Amerikan Gıda ve ilaç Dairesi (FDA) tarafından onaylıdır ve oksijen radikallerini arttırarak melanositlerin sayısını azalttığı düşünülmektedir. Oluşan depigmentasyon kalıcıdır. Eritem ve yanık gelişimi, kaşıntı, dermatit, uygulama alanına uzak alanlarda da depigmentasyon gelişimi, erken deri yaşlanması ve deri kanseri riskinde artış olabilmesi kullanımını sınırlandıran yan etkileridir. Depigmentasyon kalıcıdır bu nedenle tedavi uygulanacak hasta depigmentasyon tedavisinin sonuçlarını ve güneşten korunmanın önemini iyi bilmelidir[58].

2.4.5.7. Cerrahi Tedaviler

Stabil ve diğer tedavilere yanıt alınamayan lokalize vitiligo lezyonlarında tercih edilirler. Cerrahi tedavide sağlıklı deriden alınan melanosit içeren örnekler kullanılır. Cerrahi tedavi segmental veya fokal vitiligosu olan genç hastalarda daha başarılıdır. Segmental veya fokal lezyonların vücudun gelişmesi ile orantılı olarak yayılması çok küçük çocuklarda cerrahi prosedürlerin kullanımını kısıtlar. Tedavilerin etkinliği uygulama alanının postoperatif immobilizasyonuna bağlıdır, bu durumu sağlamak küçük yaş grubunda zordur bu nedenle adölesanlarda ve uyum sağlayabilecek hastalarda uygulanabilir. Cerrahi prosedürlerin geniş alanlara uygulanmaması ve donör alanında köbnerizasyon riski de olması kısıtlayıcı yönleridir. Cerrahi yöntemler doku greftleri (punch greftler, emme bülü epidermal grefti, split-thickness greftler) ve hücresele greftler olarak sınıflandırılabilir[59].

2.4.5.8. Diğer Tedaviler

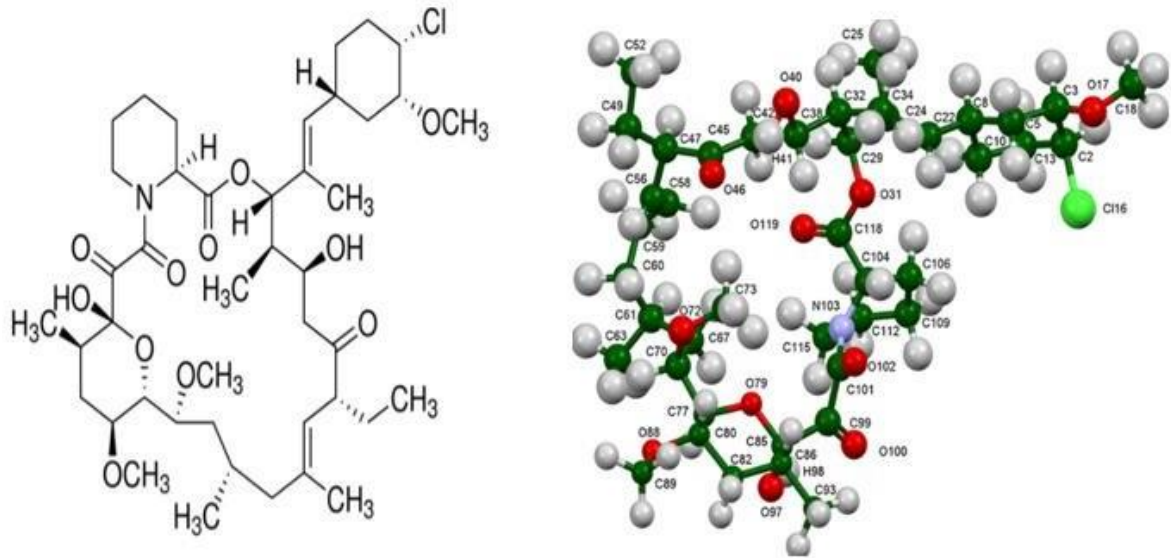
- **Kozmetik Yöntemler** : Vitiligo hayatı tehdit eden bir hastalık olmamasına karşın kişinin psikolojik ve sosyal durumu üzerinde olumsuz etkiler yapabilir. Özellikle yüz, boyun ve el gibi görünen alanlardaki lezyonları kapatmak için kozmetikler kullanılabilir. Bunların yan etkileri bulunmamaktadır ve sosyal yaşamda hastalara rahatlık sağlar. kozmetik kamuflaj, hem tedavilerle birlikte hem de tedavilerden fayda görülmeyen durumlarda uygulanabilecek bir yöntemdir. İdeal kamuflaj uygun renkte, etkilenen alanı kapatacak derecede opak, ter ve suya dayanıklı, kolay uygulanabilir olmalı ve uzun süre yapışkan kalabilmeli, alerjik olmamalı, kolay çıkarılabilen, etkili ve uygun maliyetli olmalıdır[60].
- **Güneş Koruyucular:** Vitiligolu deri, melanositlerin DNA üzerindeki koruyucu etkilerinden yoksun olduğu için erken dönemde güneş yanıklarına, geç dönemde ise karsinogeneze daha yatkındır. Bundan dolayı hastaların güneş gören bölgedeki lezyonlarına yüksek faktörlü güneş koruyucu kullanmaları zorunludur. Ayrıca güneş koruyucular bronzlaşmayı azaltarak normal deri ve depigmente deri arasındaki kontrast farkının artmasına engel olarak kozmetik yarar sağlarlar. Güneş yanıkları, lezyonların yayılmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle hastaların güneş gören bölgelerdeki lezyonlarına güneşten koruyucu kullanmaları,

özellikle çocuklarda fiziksel yapıdaki güneşten koruyucuların kullanılması tavsiye edilmektedir[61].

Bu tedavilerin yanında bazı bitkisel tedavilerde sıklıkla kullanılır. Vitiligo hastalığının tedavi sürecinde hastaların stres seviyelerinin azaltılması konusunda psikolojik tedavilerde almaları da mutlaka önerilmektedir.

2.5. Pimekrolimus (SDZ ASM 981)

Bir askomisin türevi olan Pimekrolimus (SDZ ASM 981), immünomodülatör makrolaktamların yeni sınıflarından biridir ve özellikle inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisi için geliştirilmiştir. Pimekrolimusa olan ilgi, önemli anti-inflamatuvar aktivitesi ve immünomodülatör yetenekleri ve düşük sistemik immünoşüpresif potansiyeli nedeniyle önemli olmuştur. Pimekrolimusun etki mekanizması, T hücresi aktivasyonunun bloke edilmesidir. Pimekrolimus (tüm askomisinler gibi), spesifik olarak sitozolik reseptör, immünofilin makrofilin-12'ye bağlanan bir immünofilin ligandıdır. Bu pimekrolimus-makrofilin kompleksi, kalsinörinin bir transkripsiyon faktörü olan aktifleştirilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünü (NF-AT) fosforilasyonunu önleyerek protein fosfataz kalsinörünü etkili bir şekilde inhibe eder. Bu, T hücrelerinde sinyal iletim yollarının tıkanmasına ve inflamatuvar sitokinlerin, özellikle Th1- ve Th2-tipi sitokinlerin sentezinin inhibisyonuna neden olur. Pimekrolimusun ayrıca mast hücrelerinden sitokinlerin ve proinflamatuvar mediatörlerin salınmasını önlediği de bilinmektedir[62].



Şekil 2.10. Pimekrolimus'un iki boyutlu ve üç boyutlu kimyasal yapısı [63, 64]

2.5.1. Kalsinörin İnhibitörlerinin Etki Mekanizması

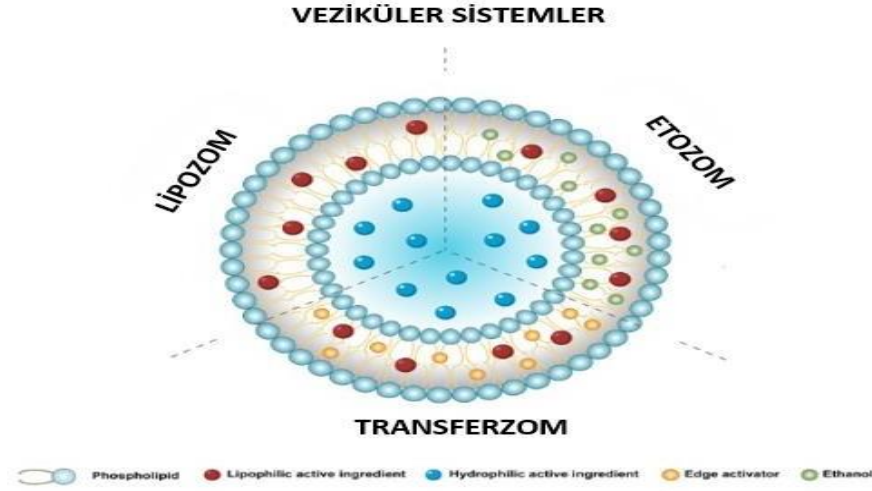
Normal immün yanıtta, majör histokompatibilite kompleksi tarafından T hücre reseptörüne sunulan antijenler, kalmodulin'e bağlanan intrasitoplazmik kalsiyumun yükselmesine neden olarak kalsinörin aktivasyonuna yol açar. Serbest kalsiyum ayrıca aktif T hücrelerinin nükleer faktörünün sentezine yol açar. Kalsinörin (bir protein fosfataz), sonunda nükleer alt birime bağlanan aktive T hücrelerinin nükleer faktörünün sitoplazmik alt birimini fosforile eder. Aktive edilmiş T hücreleri kompleksinin nükleer faktörünün bu sitoplazmik-nükleer alt birimi, interlökin (IL)-2, IL-3, IL-4, tümör nekroz faktörü- α , interferon- γ , dönüştürücü büyüme faktörü- β dahil birçok sitokinin transkripsiyonunu kolaylaştırır. ve granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör. Kalsinörin inhibitörleri, sitozolik kalsinörin fonksiyonunu inhibe ederek bu yola müdahale eder ve dolayısıyla proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunun baskılanmasına neden olur. Pimekrolimus ve takrolimus hücre içi FK506 bağlayıcı proteine bağlanırken siklosporin sitozolik siklofiline bağlanır. Bu hücre içi kompleksler sonunda kalsinörine bağlanarak fosfataz aktivitesini inhibe eder. Takrolimus ayrıca histamin salınımını ve IgE tarafından aktive edilen mast hücrelerinden prostaglandin D2'nin de novo sentezini inhibe eder, oysa pimekrolimus mast hücre sitokini, serotonin ve beta-heksosaminidaz salınımını inhibe edebilir[65].

2.6. Lipozomlar ve İlaç Taşıma Sistemleri

Lipozom formülasyonlarındaki nanotaşıyıcı terimi, 1 ila 1000 nm arasında değişen yapıları/cihazları ifade eder; bununla birlikte, istenen terapötik faydalar, yan etkilerden kaçınma ve ilaçların optimal lokalize teslimi, boyutu <200 nm olan nanotaşıyıcıların kullanılmasıyla elde edilir. Geleneksel yaklaşımlara göre çok sayıda avantaj sunarlar, bunlar arasında; suda az çözünen ilaçların artan çözünme hızı ve geçirgenliği, onları birçok biyoaktif molekül için başarılı bir dağıtım aracı yapan gelişmiş hücresel alım ve terapötik yükün hedefe özgü iletimini sağlayarak hedef dışı etkileri azaltmıştır.

Son yıllarda, ilaçların yan etkilerini en aza indirerek hedefe özel dağıtımını sağlamak amacıyla nanotaşıyıcı tabanlı tedavilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu nano taşıyıcılar arasında lipozomlar , etozomlar, katı lipid nanopartüküller (SLN) , nanoemülsiyonlar ve polimerik lipozomlar bulunur. Konvansiyonel tedavilerin aksine, ileri hedefe yönelik tedavilerin terapötik sonucu iyileştirmede ve yan etkilerini azaltmada çok daha etkilidirler. Nanotaşıyıcı-aracılı tekniklerin terapötik üstünlüğü, alışıl gelmiş

tedavilerle karşılaştırıldığında, bölgeye özgü iletimi başarma potansiyellerinin yanı sıra hastalığın şiddeti ve ilerlemesi üzerindeki dikkate değer kontrolleri açısından da başarılıdır[66].

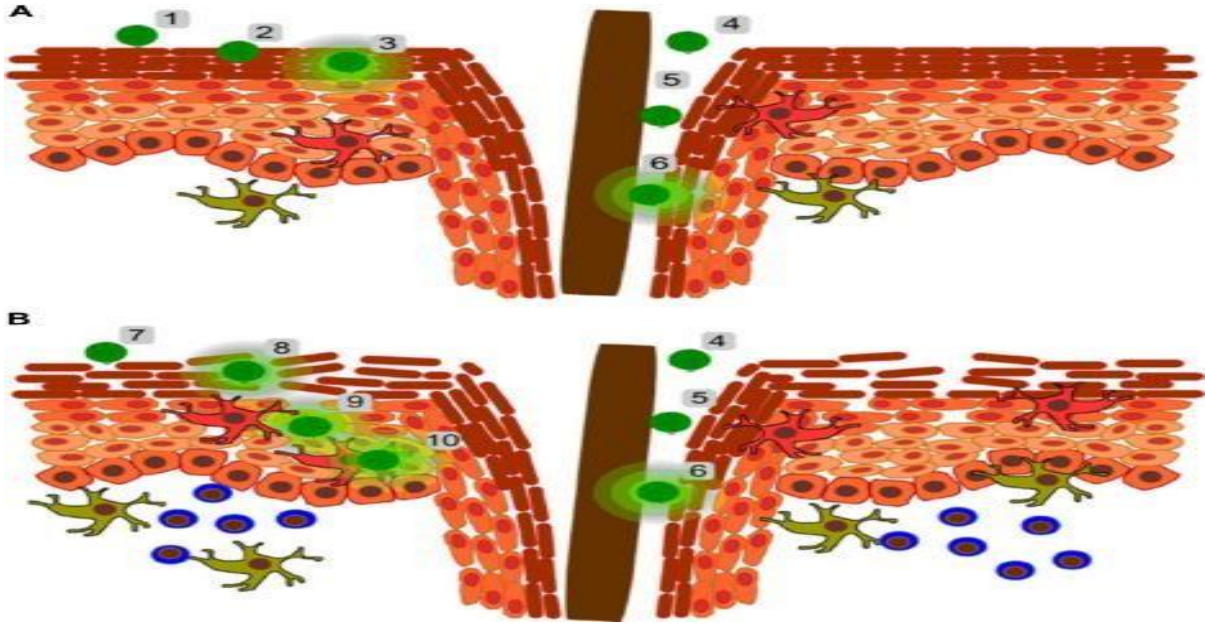


Şekil 2.11. Vitiligo için nanotaşıyıcı bazlı dermofarmasötik formülasyonlar olarak kullanılan en ilgili veziküler sistemler: lipozomlar , etozomlar ve transferzomlar [66].

2.6.1. Lipozomların Özellikleri ve Etki Mekanizması

Deride koruyucu tabaka görevi gören ve ilaçların büyük çoğunluğuna karşı geçirimsiz olan ve fizikokimyasal bariyer tabakası stratum corneum (SC) varlığı nedeniyle, fizikokimyasal bariyeri aşabilen yeni ilaç verme sistemlerinin geliştirilmesine yönelik birçok çalışma vardır. Bu çalışmalar, nanotaşıyıcı aracılı dağıtım sistemlerinin, etkin maddeleri hedef organlara iletmede ve çeşitli dermatolojik bozuklukları tedavi etmedeki etkinliğinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Dermatolojik bozukluklar (Vitiligo, deri iltihabı, atopik dermatit, sedef hastalığı veya cilt kanserleri) için ilaç dağıtım sistemleri geliştirilirken, risk altındaki derinin farklı özellikleri dikkate alınmalıdır. Nanotaşıyıcı dağıtım sistemleri, sağlıklı cilde uygulandığında, stratum corneum tabakasına ve kıl folikülü kanallarına nüfuz eder ve içeriklerini serbest bırakır. Bununla birlikte, SC'nin bütünlüğünün tehlikeye girdiği enfekte, kırık veya hasarlı ciltte, nanotaşıyıcı tabanlı sistemler en alt katmanlarına kadar ilerleyebilir. Lipozomlar hücreye adsorbsiyon, lipit değişimi, endositoz veya füzyon ile alınabilirler[66].



Şekil 2.12. (A) Polimerik nanotaşıyıcının cilde nüfuz etmesi ve sağlıklı ciltte ilaç salınımı (B) hasarlı ciltte nanotaşıyıcı tabanlı sistem davranışı hipotezi [66].

(A) Cilt bariyeri sağlam olduğunda, topikal olarak uygulanan taşıyıcılar cilt yüzeyi (1,4) ile etkileşime girer ve SC'de (2) veya kıl folikülü kanalında (5) birikir. Orada yüklenen maddeleri (3,6) bozundurur ve/veya serbest bırakırlar. (B) İnflamatuar veya hasarlı ciltte, topikal olarak uygulanan dağıtım sistemleri, hasarlı cilt yüzeyiyle etkileşime girebilir (7), hasarlı SC'ye nüfuz edebilir (8), cildin canlı katmanlarına girebilir (9) veya bağışıklık hücreleri tarafından alınabilir (10)

2.6.1.1. Lipozomların Avantajları ve Dezavantajları

Lipozomların avantajları arasında;

- Biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerine sahip olmaları,
- Toksik ve immünojenik olmamaları,
- Lipozomların kanser, otoimmün hastalıklar ve alerji gibi çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılabilmesi,
- *İlaçların* retiküloendotelial sistem (RES) tarafından alınmasını önleyerek, ilaç yüklü lipozomların uzun süreli sistemsel dolaşımına izin verebilmeleri,
- Aktif hedefleme yoluyla etki bölgesine spesifik olarak iletimi sağlayabilmeleri ve yan etkileri azaltabilmeleri,
- Enkapsüle ettikleri etkin maddenin stabilitesinin arttırmaları,

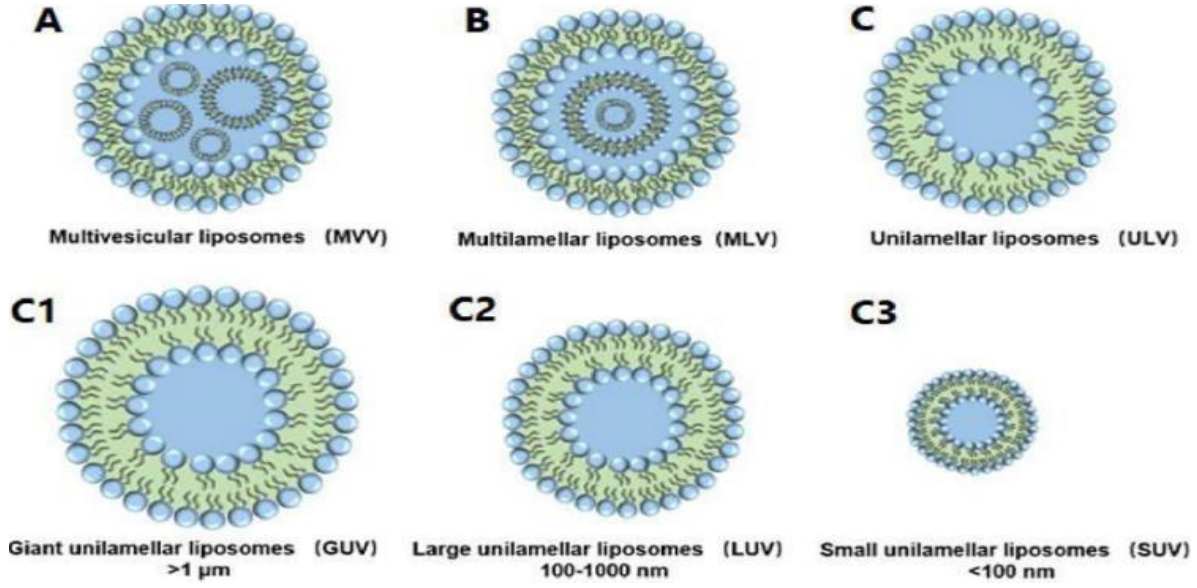
- Lipozom adjuvanları, hücresel alım, antijen işleme ve antijen sunan hücreler tarafından antijene özgü immün yanıtların (hem humoral hem de hücresel) tanınmasını geliştirmeleri bulunmaktadır.

Lipozomların dezavantajları ise;

- Boyutlarından dolayı yarılanma ömürlerinin kısa olması,
- Üretim maliyetlerinin yüksek olması,
- Çözünürlüklerinin düşük olması,
- Kapsülleme etkinliğini etkileyebilecek kimyasal kararsızlık,
- Mikrobiyal kontaminasyona karşı sterilizasyon ve kapsüllenmiş ilaçların sızması gibi bazı zorluklarla karşılaşılmasıdır[67].

2.6.1.2. Lipozomların Sınıflandırılması

İçerdiği lipit çift tabakalarının sayısına göre, lipozomlar unilamellar veziküller (ULV), multilamellar veziküller (MLV) ve multivesiküler veziküller (MVV) olarak sınıflandırılır. ULV, küçük ULV (SUV), büyük ULV (LUV) ve dev ULV (GUV) olarak alt başlıklara ayrılmıştır. ULV'ler sadece tek bir fosfolipid çift katmanlı yapıya sahipken, MLV'ler soğana benzer katmanlı bir yapıya sahiptir. Lipozom, fosfolipidlerin yüküne göre anyonik lipozomlar, katyonik lipozomlar ve nötr lipozomlar olarak kategorize edilebilir. Tipik olarak, pozitif yüklü lipozomlar, gen ilaçları vermek için daha önemli bir kapasiteye sahipken, negatif yüklü lipozomlar daha düşük sitotoksositeye sahiptir. Lipozom boyutunu, ilaç yüklemesini, stabilitesini ve ilaç salınımını etkileyen faktörlerin anlaşılması, istenen farmakokinetiği olan lipozomların rasyonel tasarımı için kritik öneme sahiptir. Lipit zincir uzunluğu, lipid doymamışlığı, lipid faz geçiş sıcaklığı (T_c) ve kolesterol içeriği gibi formülasyon parametreleri lipozom özelliklerini etkileyebilir. Örneğin, lipitlerin uzun asil zincirleriyle birleştirilmesi, lipozomların ilaç yükleme kapasitesini ve kapsülleme etkinliğini artırabilir. Yüksek doymamışlığa ve düşük T_c'ye sahip lipidlerin formüle edilmesi, lipozomlardan daha hızlı ilaç salınımını gösterir. Ek olarak, kolesterolün arttırılması polidispersite indeksini (PDI) arttırabilir ve lipozom zarının akışkanlığını modüle edebilir, sistemde dolaşım süresinin ve hedef dağılımının uzamasına katkıda bulunur[68].



Şekil 2.13. Lipozomların sınıflandırılması, (A) MVV, (B) MLV, (C) ULV, (C1) GUV, (C2) LUV, (C3) SUV [68].

2.6.1.3. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozom hazırlama yöntemleri dört ana aşama içerir: kuru lipitlerin organik fazda elde edilmesi, lipitlerin sulu bir ortamda yeniden dağıtılması, elde edilen lipozomların saflaştırılması ve nihai lipozomun saptanması.

İnce film tabaka oluşturma yöntemi laboratuvarında en sık kullanılan hazırlama yöntemidir ve diğer yöntemler etanol enjeksiyonu, ters fazlı buharlaştırma ve yüksek basınçlı homojenleştirmeyi içerir. Endüstrilerde sadece birkaç yöntem uygulanıyor olsa da, ölçekli üretimde yaygın olarak kullanılan teknik etanol enjeksiyon yöntemi ve ardından ekstrüzyondur. Lipozomların endüstriyel üretimi, tampon çözelti hazırlama, fosfolipid çözelti hazırlama, lipid membran hidrasyonu, lipozom ekstrüzyonu, diafiltrasyon, nihai ürün seyreltme, sterilizasyon ve her adım arasında filtrasyon dahil olmak üzere karmaşık ve zahmetli bir süreçtir[68].

- **İnce Film Tabaka Oluşturma Yöntemi**

Lipozomların hazırlanması için en popüler yöntemlerden biri ince film tabaka oluşturma yöntemidir. Özel ekipman ve beceri gerektirmeyen, gerçekleştirilmesi kolay bir yöntemdir ve hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin lipozomlara dahil edilmesine uyarlanan ilk yöntemdir. İlk adım olarak, yuvarlak dipli bir balon jode kloroform ve/veya etanol içindeki bir lipit solüsyonu, şişenin iç duvarına yapışan

ince bir lipidik film elde etmek için evaporatör ile kurutulur. Bu lipit filmi, herhangi bir organik çözücü izini ortadan kaldırmak için yarım saat vakum altında kurutulmalıdır. Daha sonra film, lipit şişmesiyle lipozomlar oluşturmak üzere şiddetli çalkalama altında sulu bir çözelti veya tamponla hidratlanır T_m (faz değişim tepe sıcaklığı)'si oda sıcaklığından yüksek olan lipidler için hidrasyon aşamasından önce T_m 'nin üzerinde önceden ısıtılmalıdır[69].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemler

Çizelge 3.1. Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasal malzemelerin listesi

KİMYASAL MADDE	MARKA VE ÜLKE	KULLANIM AMACI
Pimekrolimus (\geq %98.0) (PMC)	Sigma Aldrich (ABD)	Lipozomformülasyonunda kullanılan etken madde
Soya fosfotidilkolin	Sigma Aldrich (ABD)	Formülasyonda kullanılan temel lipit
Fibroblast hücreleri (ATCC L929)	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ABD)	<i>İn-vitro</i> hücre çalışmalarında kullanılan hücre hattı
Dimetilsülfoksit	Merck (Almanya)	Toksisite deneyleri
Dipalmitoilfosfatidil kolin (DPPC)	Lipoid (İsviçre)	Formülasyonda kullanılan lipit
Diyaliz membran	Sigma Aldrich (ABD)	<i>İn-vitro</i> salım çalışmalarında kullanılan membran
Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı	Lonza (İsviçre)	<i>İn-vitro</i> hücre çalışmalarında kullanılan besi ortamı
Etanol	Merck (Almanya)	Çözücü madde
Kolesterol	Sigma Aldrich (ABD)	Formülasyon stabilitesi için kullanılan bileşen

Lipoid S100	Lipoid (Almanya)	GmbH	Formülasyonda kullanılan lipit
--------------------	---------------------	------	--------------------------------

3.2. Kullanılan Araç-Gereçler

Çizelge 3.2. Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan cihazların listesi

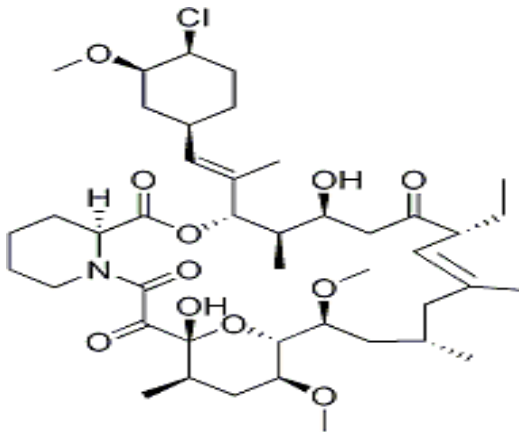
KULLANILAN CİHAZ	MARKA
Rotary Evaporatör	Buchi R-114
Sonikatör	Bandelin Sonoplus HD 2070
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3003
Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayini cihazı	Malvern ZetaSizer NanoS
Hassas Terazî	Shimadzu Ax200
Hassas Terazî	Mettler Toledo PB 303-S
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu SPD-M20A
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5430 R

Viskozimetre	Brookfield
Su Banyosu	Buchi
Çalkalayıcı Su Banyosu	Memmert
pH-Metre	İnolab WTW
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex Digital
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Perkin Elmer DSC-8000
Ultra Saf Su Cihazı	MP MiniPure

3.3. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Etkin madde olarak pimekrolimus ile çalışılmış, standardizasyon ve saflık kontrolleri, fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, etkin maddenin UV ve DSC spektrumları tayinleri yapılmıştır.

Pimekrolimus kimyasal yapısı **Şekil 3.1.**'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Pimekrolimus'un kimyasal yapısı (Formülü: $C_{43}H_{68}ClNO_{11}$ ve Molekül Ağırlığı: 810.45 g/mol) [63]

3.3.1. UV Spektroskopisi Çalışmaları

1 mg/mL olacak şekilde tartılan pimekrolimusun, etanol (pH 7.4) içinde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 100 µl çekilmiş ve yine pH 7.4 etanol ile 1mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltinin maksimum absorbansı, *Shimadzu UV-2600-Vis spektrofotometresi (Japonya)* kullanılmış ve dalga boyu taraması yapılarak saptanmıştır.

3.3.2. Termal Analiz Çalışmaları

Termal analiz çalışmaları için, pimekrolimus alüminyum örnek kabında yaklaşık 5 mg kadar tartılmış ve kapak basınç yardımıyla kapatılmıştır. Referans olarak alüminyum boş plaklar kullanılarak, 10°C/dk sıcaklık artışı, 50 mL/dk azot akış hızı ve 10-250°C sıcaklık aralığında DSC spektrumu çekilmiştir (*PerkinElmer DSC-8000- ABD*).

3.3.3. Erime Derecesi ve Çözünürlük Çalışmaları

50 mg etkin madde (pimekrolimus), bir ucu kapatılmış kılcal boruya doldurulup, erime derecesi cihazına yerleştirilmiştir. Sıcaklık, kontrollü bir silikon banyosuyla sağlanmış ve maddenin erime derecesi termometreden okunarak tayin edilmiştir.

Tez kapsamında difüzyon ortamı olarak Etanol:Su (pH= 7.4) (70:30, v/v) kullanılması planlandığı için, pimekrolimusun bu ortamdaki çözünürlük çalışması yapılmıştır. Saf etkin maddenin çözünürlüğü difüzyon ortamında incelenmiştir. Bu amaçla kapaklı bir erlen içinde bulunan çözünme ortamına çözünebileceğinden fazla miktarda etkin madde konularak 37°C de bir manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılarak bekletilmiş, sıvı fazdan 0.45 µm'lik filtre ile süzülerek alınan numunelerde etkin madde miktarı tayin edilmiştir.

3.4. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon çalışmaları, Avrupa Farmakopesi (EP), Birleşik Devletler Farmakopesi (USP), Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) talimatlarına uygun olacak şekilde yapılmıştır[70], etkin maddenin miktarının tayininde kullanılan yöntemin güvenilir olup olmadığını göstermek için yapılmaktadır. Bu amaçla, çalışmamızda kullanılan validasyon parametreleri aşağıda gösterilmiştir;

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk ve geri elde edilebilirlik (Accuracy and Recovery)
- Kesinlik (Precision)
- ✓ Tekrar edilebilirlik (Repeatability)

- ✓ Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)
- Özgünlük, Seçicilik (Specificity)
- Stabilite (Stability)
- Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ)

Tez kapsamında, etkin madde olan pimekrolimus'un miktar tayini çalışmaları için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (*Shimadzu SPD-M20A*) yöntemi kullanılmış ve validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Kromatografik şartlar Tablo 3.3'te verilmiştir.

1mg pimekrolimus, 1mL etanol (pH:7.4) içerisinde, 5 dk ultrasonik su banyosunda çözdürülmüş ve farklı konsantrasyonlarda seyreltmeler yapılarak (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 ppm) viallere aktarılmıştır. Hazırlanan stok çözeltiliden, belirlenen kromatografik şartlarda (**Çizelge 3.3.**) ölçümler alınmıştır.

Çizelge 3.3. Pimekrolimus Miktar Tayini İçin Kullanılan Kromatografik Şartlar

Cihaz	HPLC (<i>Shimadzu, SPD-M20A</i>)
Kolon	Exsil Mono 100 (C18), 4.6 x 150 mm
Dedeksiyon	UV, 215 nm
Akış Hızı	0.75 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Analiz Süresi	5 dk
Hareketli Faz	Etanol:Su (80:20)
Kolon Basıncı	~190 bar
Alıkonma Zamanı (RT)	~3.5 dk
Fırın Sıcaklığı	50°C

3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik

DeneySEL çalışmalardaki analiz yönteminin, ortamda etkin madde dışındaki maddeler varlığında sadece çalışılan bileşiği saptayabilmesidir. Bunun için seyreltme çözeltisi, standart çözelti, lipid çözeltisi, *in-vitro* salım ortamı olan pH 7.4 Etanol:Su (70:30, v/v) karışımı hazırlanarak viallere aktarılmış ve analiz yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.4.2. Doğrusallık

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki konsantrasyonu ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Bunun için 1 mg/mL olacak şekilde pimekrolimusun etanolde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden seyreltmeler (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/ mL) yapılarak, HPLC (Shimadzu SPD-M20A) yöntemi ile etkin madde miktarları belirlenmiştir. Elde edilen eğri altı alan değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu ve denklemi elde edilmiştir. Her bir konsantrasyon için 6 deneme yapılmıştır.

3.4.3. Kesinlik ve Doğruluk

Doğruluk, valide edilen analitik yöntem ile yapılan deneyden elde edilen verilerin gerçek sonuçlarla olan benzerlik derecesidir. Kesinlik, kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür.

Geliştirilen yöntemin kesinliğini ve doğruluğunu belirlemek için gün içi ve günler arası analizler yapılmıştır. gün içi analizler ve günler arası analizler, sırasıyla aynı gün ve ardışık üç günde pimekrolimusun doğrusallık aralığında dört derişim seviyesinde (1, 5, 50 ve 300 µg/mL), 215 nm'de üç tekrarlı analizle değerlendirilmiştir.

3.4.4. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

50 ppm'lik standart pimekrolimus çözeltisi hazırlanmış ve aynı vialden ard arda analizler yapılmıştır. PMC'ye ait alıkonma zamanları ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği %BSS değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. BSS değerlerinin %2'den küçük olması yöntemin cihaz tekrarlanabilirliğini dolayısıyla kesinliğini göstermektedir.

3.4.5. Duyarlılık

Geliştirilen yöntemin duyarlılığı, gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri ile değerlendirilmiştir.

3.4.5.1. Saptama Sınırı (LOD)

En düşük değere karşılık gelen alan değerleri, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmüş ve standart sapma hesaplanmıştır. Bu değer 3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD) belirlenmiştir.

3.4.5.2. Miktar Tayin Sınırı

Miktar tayin sınırı, valide edilen analitik yöntem koşullarında, miktar tayini yapılan maddenin kesinliğinin ve doğruluğunun kabul edilebilir seviyede olduğu konsantrasyondur. Bu konsantrasyonda elde edilen sinyal/gürültü oranı 10/1'dir. Bu sebeple, LOQ çözeltilisinden bir adet hazırlanmış, vialle aktarıldıktan sonra ardışık altı enjeksiyon yapılmıştır, ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen pimekrolimus'un pik alanları %VK değeri ≤ 10 olması gerekmektedir.

3.4.5. Sağlamlılık

Sağlamlık çalışmasında deneysel koşullardaki küçük bir sapmanın elde edilen sinyallerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yaratıp yaratmadığını belirlemek için optimize edilmiş koşullar altında üç deney içeren dokuz aşamalı bir kesirli faktör tasarımı uygulanmıştır (Çizelge 3.4.). Analiz sonuçları ANOVA testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve regresyon katsayısı ve regresyon denkleminin p değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 3.4. Sağlamlık çalışması için parametreler ve seviyeleri.

Parametreler	Seviye		
	-1	0	+1
Organik faz %	79	80	81
Akış hızı (mL/dk)	0.745	0.750	0.755
Sıcaklık (°C)	49	50	51

3.4.6. Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığı, pimekrolimus standart çözeltilisinin (50.00 $\mu\text{g/mL}$) iki farklı analist (Analist-1 ve Analist-2) tarafından optimum analiz koşullarında HPLC'de (Shimadzu SPD-M20A) analiz edilmesiyle elde edilmiştir.

3.4.7. Kararlılık

Kararlılık çalışmasında pimekrolimus stok çözeltilisinin +4°C'de kısa dönem ve uzun dönem, oda sıcaklığında ve oto örnekleyicideki kararlılığı incelenmiştir. Farklı sıcaklık koşullarında bekletilen pimekrolimus stok çözeltilisi belirtilen süreler sonunda 50 $\mu\text{g/mL}$

derişimine seyreltilmiş, analiz edilmiş ve taze olarak hazırlanmış standart çözeltinin analiz sonuçları ile karşılaştırılarak kararlılık durumları belirlenmiştir. Bu amaçla geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.4.8. Sistem Uygunluk Testi

Optimum koşullarda alınan kromatogramlara sistem uygunluk testi uygulanarak alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, kolon verimi (teorik plak sayısı, N) ve kapasite faktörü (k') parametrelerinin analitik yöntemin gerekliliklerini karşılayıp karşılayamadığını görebilmek için yapılmıştır.

3.5. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.5.1. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Lipozom formülasyonları hazırlanırken optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda; farklı parametrelerin (sonikasyon süresi, fosfolipitin yapısı, kolesterol miktarı), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bunlar arasından ideal karakterizasyon ve enkapsülasyon etkinliği gösteren lipozomlar ile formülasyonlar hazırlanmıştır.

Fosfolipit Yapısı →	Soya-Fosfotidilkolin	Lipoid S100	DPPC (Dipalmitoilfosfatidil Kolin)
Sonikasyon Süresi →	3 dakika	4 dakika	5 dakika
Kolesterol Miktarı →	5 mg	6 mg	12 mg

Şekil 3.2. Formülasyon optimizasyon çalışmaları için kullanılan parametreler ve optimum koşullar

Lipozom formülasyonları için optimum koşullar;

Fosfolipit yapısı : Soya- Fosfotidilkolin

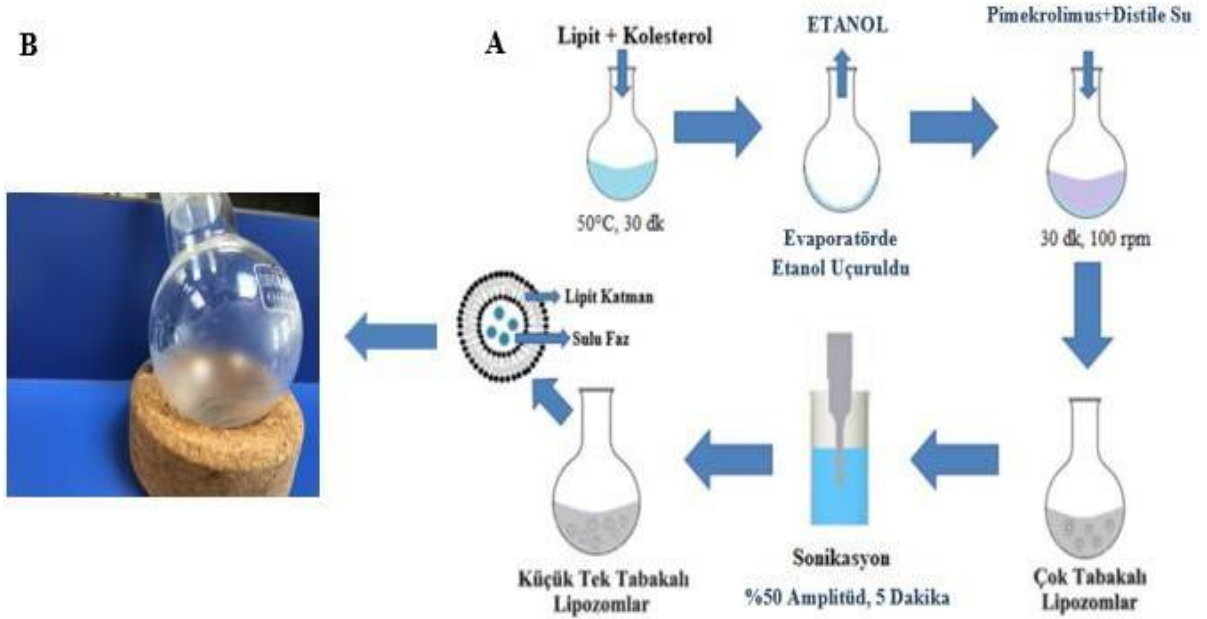
Sonikasyon süresi : 5 dk

Kolesterol miktarı : 6 mg olarak belirlenmiştir.

Optimum olarak belirlediğimiz lipit (Soya-Fosfatidilkolin), kolesterol (stabilite arttırıcı) 50:6 (mg/mg) ve 10 mg etkin madde (pimekrolimus) balon joje içerisine alınmıştır. Üzerine 12,5 mL etanol ekleyip manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır.

Organik çözücü, rotavaporda alçak basınçta (40°C, 100 rpm) 30 dk uçurularak balonun alt kısmında ince bir lipit tabakası oluşması sağlanmıştır (şekil 3.4). Üzerinden nitrojen gazı geçirildikten sonra, lipit film üzerine sulu faz (25 mL ultra saf su) eklenerek, 100 rpm manyetik karıştırıcıda (30 dk) karıştırılmıştır.

Son olarak, sonikatör (*Bandelin Sonopuls HD 2070*) yardımıyla 5dk boyunca rehidrate edilmiş ve lipozomlar hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. (A) ince film tabaka oluşturma yöntemi (B) İnce Film Tabaka Oluşumu

3.5.2. Lipozom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının karakterizasyonları; partikül büyüklüğü (PB), partikül büyüklüğü dağılımı (polidispersite indeksi - PDI), zeta potansiyel (ZP) analizleri ile değerlendirilmiştir. Partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi ölçümleri, lazer ışık saçılımı yöntemi ile yapılmıştır. Polidispersite indeksi ölçümleri

formülasyonun homojenitesi, zeta potansiyel ölçümleri ise formülasyonun stabilitesi hakkında fikir vermiştir.



Şekil 3.4. Malvern Zetasizer Cihazı ve Zeta Potansiyeli Ölçümünde Kullanılan Küvetler

3.5.2.1. Partikül Büyüklüğü Analizi

Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı analizleri, lazer ışık saçılımı yöntemi ile özel küvetler kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, bölümümüzde bulunan *Malvern-Zeta-Sizer NanoS* cihazı kullanılmış, ölçümler 25°C’de yapılarak 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.2.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Zeta potansiyeli ölçümü, partikülü çevreleyen yükün ölçülmesi esasına dayanmaktadır ve stabilite hakkında fikir vermektedir. Bu değer pozitif veya negatif 30 mV değerinde olması ile sistemin stabil olduğu varsayılmaktadır.

Zeta potansiyel ölçümleri, bölümümüzde bulunan *Malvern-ZetaSizer NanoS* cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, koloidal süspansiyonu herhangi bir seyreltme yapılmadan özel küvetler içine konulmuş ve zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir. Ölçümler 25°C’de ve 3 kez tekrarlanarak yapılmıştır.

3.5.2.3. Polidispersite İndeksi Analizi

PDI ölçümü, partikül boyut dağılımı ve homojenitesini belirleyen bir parametre olup, genellikle lipozom formülasyonları için 0.5’ten küçük olması beklenir. Bu amaçla, koloidal süspansiyonu herhangi bir seyreltme yapılmadan özel küvetler içine konulmuş ve PDI değerleri belirlenmiştir. Ölçümler 25°C’de ve 3 kez tekrarlanarak yapılmıştır.

3.5.2.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Lipozomların morfolojilerinin ve dağılımlarının araştırılması için Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy, SEM) çalışmaları, yüksek vakum altında hız gerilimi 5 kV olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar alüminyum plakalara damlatılmıştır, daha sonra kurumaları için 3 saat oda sıcaklığında bekletilip, altın-paladyum alaşımı ile yaklaşık 2nm kalınlıkta püskürtme yöntemiyle kaplanarak analiz yapılmıştır.

3.5.2.5. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Lipozomların enkapsülasyon etkinliği tayinleri için ultrasantrifüj yöntemi kullanılmıştır. Lipozomlar 1 mL hacimde alınarak, santrifüj tüplerinde (40000 x g, 4°C, 1 saat) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen çözelti ve çökelek enkapsülasyon etkinliğini belirlemek amacıyla HPLC ile analiz edilmiştir.

Buna göre enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır[71]:

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği} = \frac{[(\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Çöken etkin madde miktarı}) / \text{Toplam etkin madde miktarı}] \times 100}{}$$

3.6. Stabilite Çalışmaları

Lipozomlar, hazırlanmalarını takiben +4°C’de muhafaza edilmiş ve karakterizasyonlarında tayin edilen parametrelerde (partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, polidispersite indeksi) gözlenen değişiklikler bakımından 1. Hafta, 1. Ay ve 3. Ay ölçümleri *Malvern-Zeta-Sizer NanoS* cihazı ile alınarak değerlendirilmiştir.

3.7. *In-vitro* Salım Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre ideal olarak seçilen formülasyonlardan, etkin madde salım profilinin belirlenmesi amacıyla diyaliz membran yöntemi ile *in-vitro* salım çalışması yapılmıştır (**Şekil 3.5.**).



Şekil 3.1. Diyaliz Membrandan *İn Vitro* Salım Çalışması

İn vitro salım çalışmasında, 12.000-14.000 Da molekül ağırlığındaki selüloz diyaliz membranlar kullanılmıştır. Bu amaçla, reseptör faz olarak 100 mL Etanol:Su (pH= 7.4) (70:30, v/v) karışımı kullanılmıştır. Donör faz olarak ise 1 mL formülasyon kullanılmıştır. Daha önceden 8 cm olacak şekilde kesilerek 30 dakika reseptör faz içinde ısıtılan membranlar, donör ve reseptör fazlar yerleştirildikten sonra 37°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızındaki su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca reseptör fazdan belirli zaman aralıklarında 1 mL örnek alınıp, hemen aynı hacimdeki taze reseptör faz ile değiştirilmiştir. % salınan etkin madde miktarları HPLC cihazında okunarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Tüm deneyler 6 paralel olacak şekilde yapılmıştır (n=6).

3.8. Difüzyon Çalışmaları

Etkin madde (PMC), pimekrolimus içeren lipozom formülasyonu (Lipo-PMC) ve Türkiye ilaç piyasasında bulunan ticari krem formülasyonu, Franz difüzyon hücreleri (0.63 cm² alan ve 5 mL hacim) ve selüloz membran kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, reseptör faz olarak Etanol:Su (pH= 7.4) (70:30, v/v) karışımı kullanılmıştır ve kullanımdan önce 30 dk degaze edilmiştir. Donör faz olarak ise 1 mL formülasyon kullanılmıştır. Daha önceden 2 cm olacak şekilde kesilerek 30 dakika reseptör faz içinde ısıtılan membranlar, donör ve reseptör fazlar yerleştirildikten sonra 37°C sıcaklık ve 130 rpm karıştırma hızındaki su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca reseptör fazdan belirli zaman aralıklarında reseptör fazdan 1 mL örnek alınıp,

yine aynı hacimdeki taze reseptör faz ile değiştirilmiştir. % salınan etkin madde miktarları HPLC cihazında okunarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Tüm deneyler 6 paralel olacak şekilde yapılmıştır (n=6).

Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapılan salım çalışmalarında difüze olan etkin madde miktarı, reseptör fazdan alınan örneklerin HPLC (*Shimadzu SPD-M20A*) cihazında okunması ile tayin edilmiştir.



Şekil 3.2. Franz Difüzyon Salım Çalışması

3.9. Lipozomların Biyouyumluluklarının Değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarının canlı hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisinin olup olmadığını incelemek için ISO10993-5: in vitro sitotoksikite testleri standardının “İndirekt MTT sitotoksikite testi” yönergesine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Pimekrolimus yüklenmiş lipozom formülasyonlarının biyouyumluluklarını test etmek amacıyla 96 kuyucuklu hücre kültürü kabında fare fibroblast (L929) hücreleri (1×10^4 hücre/kuyucuk) 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra azalan konsantrasyonlarda (1000-0.625 nM) lipozom formülasyonlarına maruz bırakılmıştır.

İlaç yüklenmiş lipozom(n=5) ile birlikte pozitif kontrol grubu olarak %10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren DMEM (n=5), negatif kontrol grubu olarak DMEM(n=5), ilaç içermeyen lipozom(n=5) ve serbest ilaç(n=5) olmak üzere 5 grup ile deney kurulmuştur. 24 saat sonra % hücre canlılığını belirlemek için MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) testi uygulanmıştır. 24 saatlik deney sonrasında her bir

kuyucuğa 100 µL %10 MTT içeren DMEM eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini çözmek ve hücre zarlarını parçalamak amacıyla her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. İnkübasyon için hücreler 15 dk boyunca karanlık ortamda ve oda koşullarında karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Deney sonunda hücre absorbansları 570 nm ve 690 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda ölçülmüştür. Deney gruplarının % hücre canlılığı oranları kontrol grubuna(% 100 hücre canlılığı) göre hesaplanmıştır.

3.10. Araştırma Sonuçlarının İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

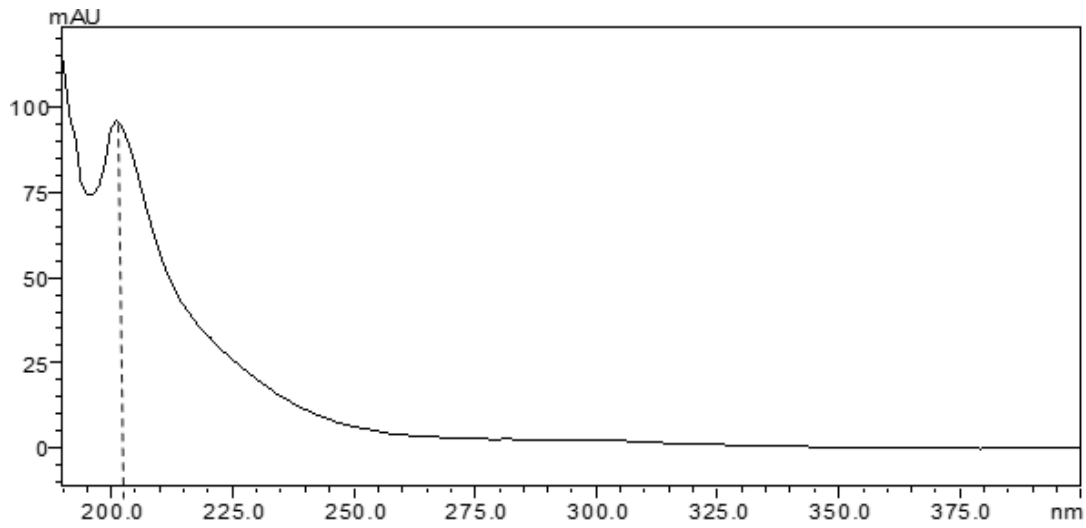
Elde edilen tüm veriler, GraphPad Prism (sürüm 3.0.2) yazılımı kullanılarak varyansın tek yönlü analiziyle değerlendirilmiştir (ANOVA). Gruplar arası karşılaştırmada P değerleri 0.05' ten küçük bulunduğu gruplara Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. 0.05'ten küçük P değerleri, karşılaştırılan gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığına göstergesi olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1. UV Spektrum Çalışmaları

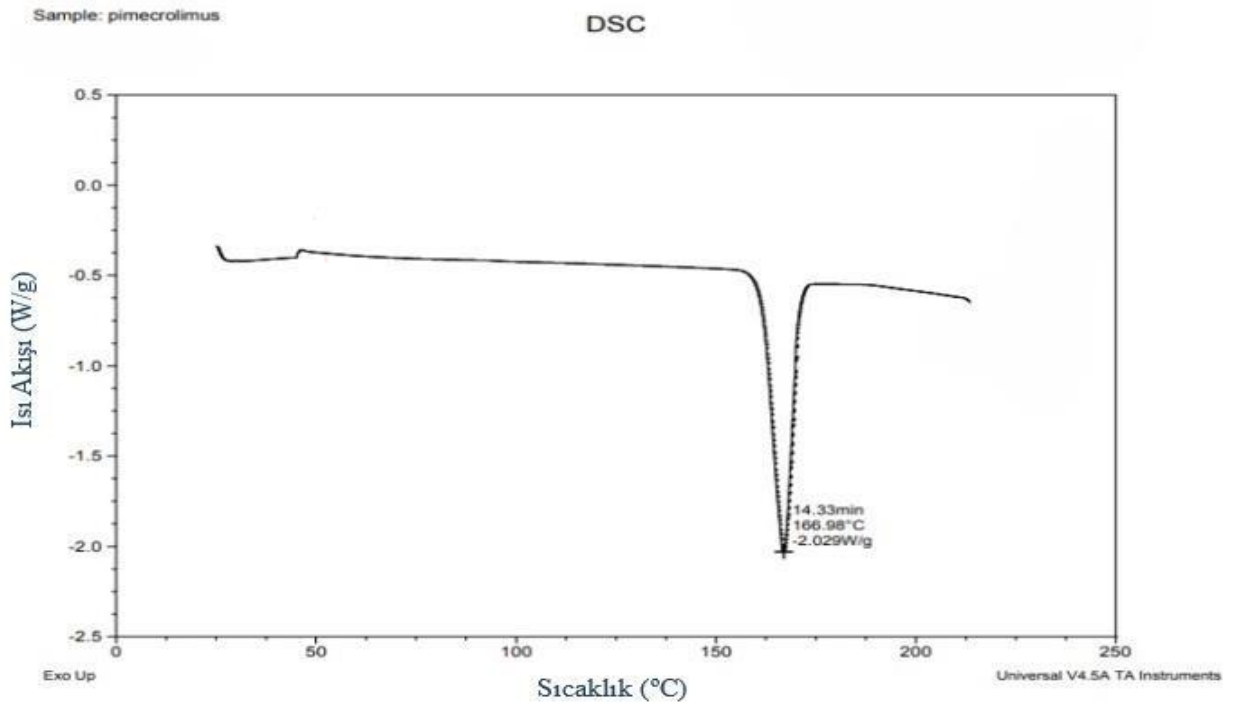
Pimekrolimus, 215 nm dalga boyunda pik göstermiş olup, maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer literatür ile uyumlu bulunmuştur[72].



Şekil 4.1. Pimekrolimus'un UV spektrumu

4.1.2. Termal Analiz Sonuçları

Termal analiz çalışmaları sonucunda, şekil 4.3.'de görüldüğü gibi pimekrolimusun erime derecesi 166.98°C (endotermik) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. Pimecrolimus'un DSC Spektrumu

4.1.3. Erime Derecesi ve Çözünürlük Çalışmaları Sonuçları

Pimecrolimus etkin maddesinin erime derecesi 135 °C olarak bulunmuştur.

Etkin maddenin çözünürlüğü difüzyon ortamında incelenmiş ve denge oluşumunda ölçülen değer kullanılarak etkin maddenin çözünürlüğü 20 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu iki değer, literatür ile uyumludur[73].

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

HPLC-UV yöntemi, ICH biyoanalitik yöntem kılavuzuna göre yapılmıştır. Etkin maddenin miktarının tayininde kullanılan yöntemin güvenilir olup olmadığını göstermek için yapılan validasyonun sonuçları çizelgeler şeklinde verilmektedir.

Analitik yöntem validasyonunda yapılmış olan HPLC analizleri, Shimadzu marka UFLC sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografik sistem, bir çözücü dağıtım sisteminden (*Shimadzu LC-20AB*) ve bir diyot dizisi detektöründen (*Shimadzu SPD-M20A*) oluşmaktadır. Numune enjeksiyonu için otomatik örnekleyici sistem (*Shimadzu SIL-20AC*) kullanılmış olup kolon sıcaklığı bir kolon fırını (*Shimadzu CTO-20AC*) ile sağlanmıştır. Kromatografik ayrımlar, hareketli faz olarak Etanol:Su (80:20, v/v) karışımının izokratik elüsyonu yoluyla bir *Exsil mono 100 C18* Kolonunda (4.6 x 150

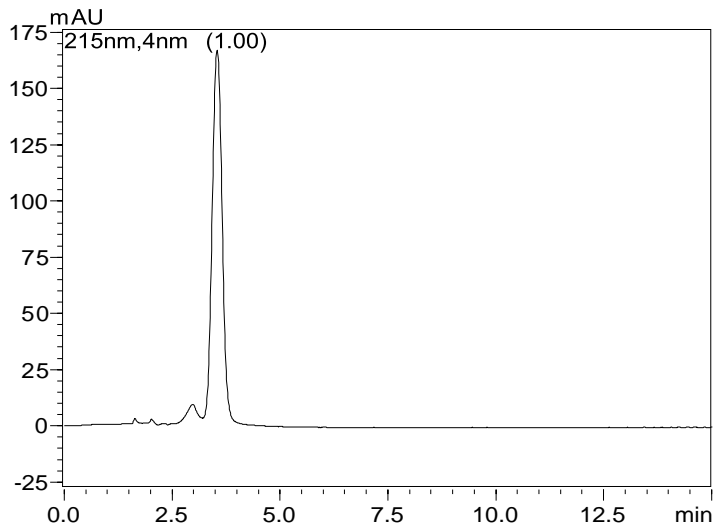
mm) gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 50°C'ye ayarlandı ve akış hızı 0.750 mL/dk olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve diyot dizisi detektörü için algılama dalga boyu olarak 215 nm seçilmiştir. Pik kimliği, alıkonma süresi karşılaştırmasıyla doğrulanmıştır.

Veri analizi

Veri toplama ve işleme, LabSolutions yazılımı (versiyon 1.25, Shimadzu) ile yapılmıştır. Numunelerdeki pimekrolimus miktarının tayini, kalibrasyon eğrileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, pimekrolimus derişimi pimekrolimusun pik alanına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu amaçla en küçük kareler doğrusal regresyon analizi yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar Microsoft Excel yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

4.2.1. Özgünlük ve Seçicilik

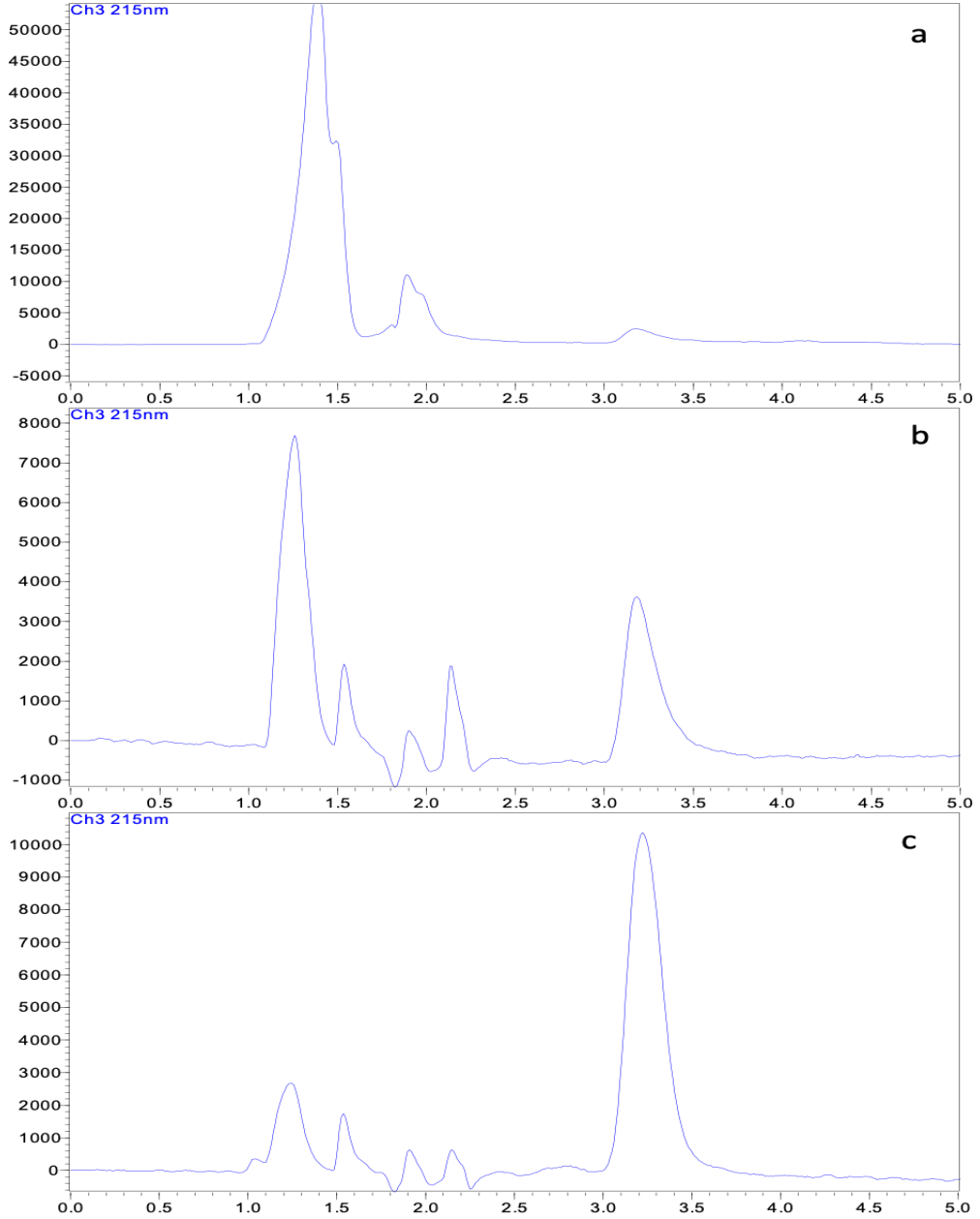
Elde edilen kromatogramda pimekrolimus piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiştir ve kullanılan yöntemin pimekrolimus analizi için belirlenen kromatografik şartlarda özgün olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3.). Elde edilen bu pik, UV spektrofotometrede 215nm'de okunmuş olup yaklaşık olarak 3.5 dakikada çıkmaktadır.



Şekil 4.3. Pimekrolimus etkin maddesine ait HPLC piki

Geliştirilen HPLC-UV yönteminin seçiciliği, blank ve LOQ konsantrasyonunda (1 $\mu\text{g/mL}$) pimekrolimus spike edilen matriks için elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak incelenmiştir (Şekil 4.4.).

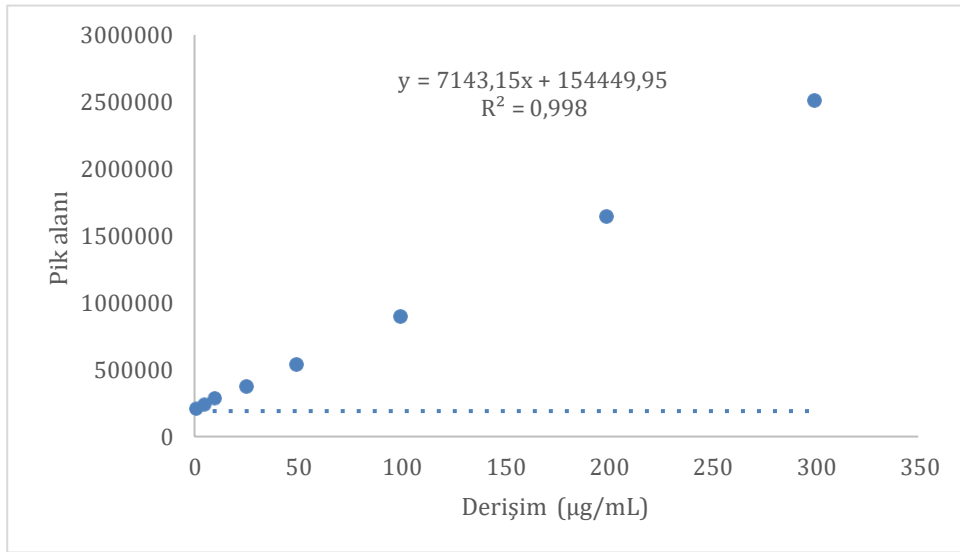
Elde edilen kromatogramlarda LOQ düzeyinde pimekrolimusun pik alanının %20'sinden daha yüksek önemli bir bozucu pik sinyali görülmemiştir. Bu durumda geliştirilen yöntemin ilaç sistemlerinde pimekrolimus analizi için seçici olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.4. Optimum koşullar altında elde edilen kromatogramlar; a) Blank b) LOQ derişiminde PMC eklenmiş matriks (1 $\mu\text{g/mL}$) c) Standart PMC çözeltisi (50 $\mu\text{g/mL}$)

4.2.2. Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları, farklı derişimlerde pimekrolimus (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/ml) içeren kalibrasyon çözeltilerinin geliştirilen HPLC yöntemi kullanılarak analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, en küçük kareler doğrusal regresyon analizi uygulanarak, derişime (x) karşı pik alanı değerleri (y) çizilerek oluşturulmuştur (Şekil 4.5.). Kalibrasyon eğrilerinin 1-300 µg/ml konsantrasyon aralığındaki korelasyon katsayısı değeri 0.998 ± 0.001 olarak belirlenmiştir. Eğim ve kesişim değerleri (ortalama \pm SS; n=7) sırasıyla 7143.15 ± 209.5 ve 154449.95 ± 13365.5 bulunmuştur. Sonuçlara göre geliştirilen yöntem belirtilen derişim aralığında pimekrolimus için kabul edilebilir bir doğrusallık göstermiştir ($R^2=0.998$)[72].



Şekil 4.5. Pimekrolimus'un HPLC yöntemine ait standart doğrusu (n=7)

4.2.3. Kesinlik ve Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini belirlemek için gün içi ve günler arası analizler yapılmıştır. Gün içi analizler ve Günler arası analizler, sırasıyla aynı gün ve ardışık üç günde pimekrolimusun doğrusallık aralığında dört derişim seviyesinde (1, 5, 50 ve 300 µg/ml) üç tekrarlı analizle değerlendirildi (Çizelge 4.1.). Düşük bağıl standart sapma (BSS) ve bağıl hata (BH) değerleri, yöntemin kesin ve doğru olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, yöntemin kesinlik ve doğruluğunun yeterli olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1. Pimekrolimus'un gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği

Derişim (µg/mL)	Gün içi (n = 3)		Günler arası (n = 3)	
	Doğruluk	Kesinlik	Doğruluk	Kesinlik
	(BH ^a , %)	(BSS ^b , %)	(BH, %)	(BSS, %)
1	-0.002	0.771	0.012	1.707
5	-0.006	1.378	-0.025	2.256
50	0.023	1.980	-0.011	1.031
300	-0.001	0.747	0.005	0.300

^aBH, bağıl hata. ^bBSS, bağıl standart sapma

4.2.4. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

50 ppm'lik standart PMC özeltisi hazırlanmış ve aynı vialden ard arda analizler yapılmıştır. PMC'ye ait alıkonma zamanları ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği %BSS değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. BSS değerlerinin %2'den küçük olması yöntemin cihaz tekrarlanabilirliğini dolayısıyla kesinliğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Enjeksiyon	Alıkonma Zamanı	Pik Alanı
Enjeksiyon-1	3.616	583508
Enjeksiyon-2	3.621	574346
Enjeksiyon-3	3.625	571095
Enjeksiyon-4	3.617	577023
Enjeksiyon-5	3.607	575134
Enjeksiyon-6	3.604	580110
Ortalama ± SH	3.615±0.003	576869.3±1801.101
BSS (%)	0.223	0.765

4.2.5. Duyarlılık

Geliştirilen yöntemin duyarlılığı, gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri ile değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla sinyal/gürültü oranınının 3:1 ve 10:1 olduğu pimekrolimus derişimi olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre önerilen yöntemin ilaç sistemlerinde pimekrolimus analizi için yeterli hassasiyete sahip olduğu görülmüştür.

4.2.5.1. Saptama Sınırı (LOD)

En düşük değere karşılık gelen alan değerleri, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmüş ve standart sapma hesaplanmıştır. Bu değer 3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD) belirlenmiştir. Sonuç olarak saptama sınırı (LOD) değeri, 0.1 µg/ mL olarak bulunmuştur. Bu değer literatürle uyumlu bulunmuştur[72].

4.2.5.2. Miktar Tayin Sınırı

Miktar tayin sınırı, valide edilen analitik yöntem koşullarında, miktar tayini yapılan maddenin kesinliğinin ve doğruluğunun kabul edilebilir seviyede olduğu konsantrasyondur. Bu konsantrasyonda elde edilen sinyal/gürültü oranı 10/1'dir. Bu sebeple, LOQ çözeltisinden bir adet hazırlanmış, vialle aktarıldıktan sonra ardışık altı enjeksiyon yapılmıştır, ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen pimekrolimus'un pik alanları %VK değeri ≤ 10 olması gerekmektedir. Sonuç olarak miktar tayin sınırı (LOQ), 1.0 µg/ mL olarak bulunmuştur. Bu değer literatürle uyumlu bulunmuştur[72].

4.2.6. Sağlamlılık

Sağlamlık çalışmasında deneysel koşullardaki küçük bir sapmanın elde edilen sinyallerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yaratıp yaratmadığını belirlemek için optimize edilmiş koşullar altında üç deney içeren dokuz aşamalı bir kesirli faktör tasarımı uygulanmıştır (Çizelge 3.4.). Analiz sonuçları ANOVA testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve regresyon katsayısı ve regresyon denkleminin p değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.). Sonuçlar arasında istatistiksel fark olmadığı görülmüştür ($p \geq 0,05$). Dolayısıyla küçük değişikliklerin pik alanı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığını ve geliştirilen yöntemin sağlam olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 4.3. Sağlamlık çalışması için deneysel tasarım planı ve sonuçları

Deney No	Organik faz %	Akış hızı (mL/dk)	Sıcaklık (°C)	Pik alanı (n=3)
1	-1	-1	-1	605719,3
2	1	-1	-1	592579,3
3	-1	1	-1	592501,3
4	1	1	-1	582908
5	-1	-1	1	588587
6	1	-1	1	594972,7
7	-1	1	1	555334
8	1	1	1	597269,7
9	0	0	0	585508
P değerleri	0.544	0.229	0.380	

4.2.7. Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığı, pimекrolimus standart çözeltisinin (50.00 µg/mL) iki farklı analist (Analist-1 ve Analist-2) tarafından optimum analiz koşullarında analiz edilmesiyle elde edilmiştir. Analiz sonuçları t-testi ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) ve sonuç olarak yöntemin tutarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4.)

Çizelge 4.4. Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri

Analist	Alıkonma zamanı*	Bulunan derişim (Ortalama±SE)
Analist-1	3.750±0.025	48.962±0.257
Analist-2	3.708±0.016	48.005±0.256
P değeri	0.234	0.057

*BSS, bağıl standart sapma, Ortalama ± standard error (n=3).

4.2.8. Kararlılık

Kararlılık çalışmasında pimekrolimus stok çözeltisinin buzdolabında kısa dönem ve uzun dönem, oda sıcaklığında ve oto örnekleyicideki kararlılığı incelenmiştir. Farklı sıcaklık koşullarında bekletilen pimekrolimus stok çözeltisi belirtilen süreler sonunda 50 µg/mL derişimine seyreltilmiş, analiz edilmiş ve taze olarak hazırlanmış standart çözeltinin analiz sonuçları ile karşılaştırılarak kararlılık durumları belirlenmiştir. Bu amaçla geri kazanım değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Pimekrolimus stok çözeltisi için kararlılık sonuçları

Kısa dönem (+4°C)	Geri kazanım (%)
1 saat	102,15
3 saat	102,83
6 saat	101,04
24 saat	99,92
Uzun dönem (+4°C)	Geri kazanım (%)
1 ay	90,46
2 ay	84,29
Oda sıcaklığında (25°C)	Geri kazanım (%)
1 saat	100,06
3 saat	99,90
6 saat	100,24
24 saat	99,70
Oto örnekleyicide	Geri kazanım (%)
1 saat	102,59
3 saat	101,96
6 saat	99,58
24 saat	98,93

4.2.9. Sistem Uygunluk Testi

Optimum koşullarda alınan kromatogramlara sistem uygunluk testi uygulanarak alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, kolon verimi (teorik plak sayısı, N) ve kapasite faktörü (k') parametrelerinin analitik yöntemin gerekliliklerini karşıladığı doğrulanmıştır. Geliştirilen HPLC-UV yönteminin sistem uygunluğu Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları (n: 6)

Alıkonma zamanı (dakika)	3.615 ± 0.003
Kuyruklanma faktörü (% 10)	1.379 ± 0.06
Teorik tabaka sayısı (N)	3628 ± 1.04
Kapasite faktörü (k')	1.008 ± 0.002

4.3. Lipozom Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları

Formülasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında, farklı parametrelerin (fosfolipitin yapısı, sonikasyon süresi, kolestrol miktarı), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bunlar arasından ideal karakterizasyon ve enkapsülasyon etkinliği gösteren lipozomlar ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.3.1. Fosfolipit Yapısının, Sonikasyon Süresinin ve Kolestrol Miktarının

Lipozom Formülasyonları Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarının hazırlanması sırasında, fosfolipit yapısının (soya-fosfotidilkolin, Lipoid S100, DPPC), sonikasyon süresinin (3 dk, 4 dk, 5 dk) ve kolestrol miktarının (5mg, 6mg, 12mg) formülasyon karakterizasyon parametreleri (PB, PDI, ZP) üzerine etkisi değerlendirilmiş ve hazırlanan lipozomlarda bu parametrelere bağlı olarak PB, ZP ve PDI değerlerinde anlamlı değişiklikler olduğu saptanmıştır (p<0.05).

Çizelge 4.7.'de görüldüğü üzere en ideal değerleri soya-fosfotidilkolin ile hazırlanan sonikasyon süresinin 5 dk ve kolestrol miktarının 6mg olduğu lipozomlarda görülmüştür. Homojen ve istenen boyutta olduğu için ve en yüksek enkapsülasyon bu formülasyonla sağlandığı için (EE=%72.85) çalışmalara bu formülasyon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

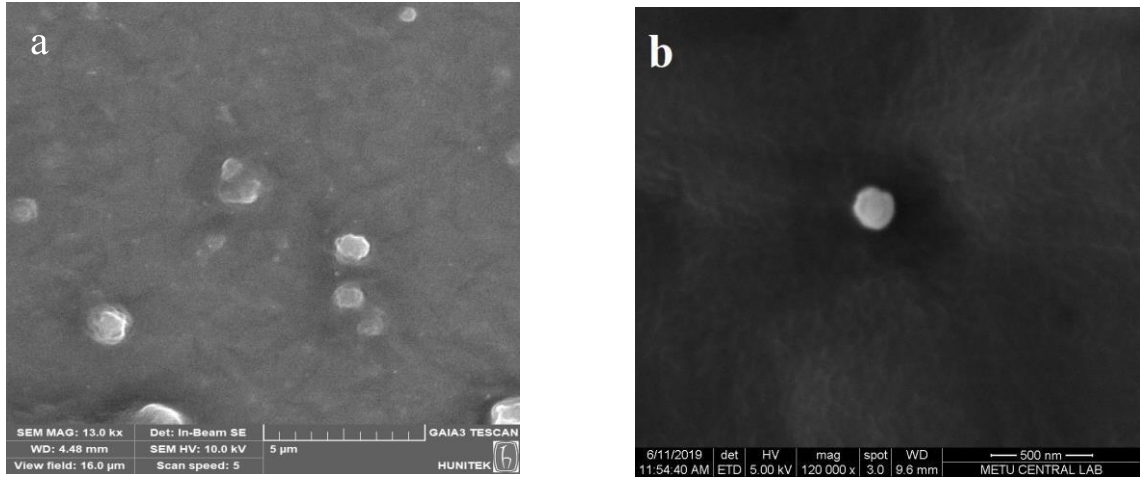
Çizelge 4.7. fosfolipit yapısının, sonikasyon süresinin ve kolestrol miktarının PB, ZP ve PDI üzerindeki etkisi (n=3)

Fosfolipit Yapısı	Sonikasyon Süresi	Kolestrol Miktarı (mg)	PB(Nm) (Ort. ±SS*)	ZP(Mv) (Ort. ±SS*)	PDI (Ort. ±SS*)
Lipoid S100	3dk	5mg	248.3 ± 2.20	-17.9 ± 0.569	0.469 ± 0.016
	4dk	6mg	233.7 ± 2.371	-18 ± 5.910	0.516 ± 0.08
	5dk	12mg	187.6 ± 7.70	-19.3 ± 0.300	0.455 ± 0.007
DPPC	3dk	5mg	481.7 ± 3.107	-6.07 ± 0.512	0.727 ± 0.006
	4dk	6mg	392.1 ± 9.182	-11.3 ± 0.436	0.675 ± 0.058
	5dk	12mg	247.8 ± 3.253	-19.0 ± 0.600	0.505 ± 0.002
Soya-Fosfatidilkolin	3dk	5mg	239.9 ± 2.107	-11.0 ± 0.435	0.731 ± 0.152
	4dk	6mg	163.9 ± 3.214	-13.8 ± 0.481	0.584 ± 0.113
	5dk	12mg	116.1 ± 0.737	-19.5 ± 0.473	0.455 ± 0.011

4.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Sonuçları

Geliştirilen lipozomların partikül boyutunun ve şeklinin incelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

SEM görüntüleri, soya-fosfatidilkolin bazlı lipozomların düzgün yüzeyli ve küresel yapıda olduklarını göstermiştir.



Şekil 4.6. Lipo-PMC ve Boş-Lipo numunelerine ait SEM görüntüleri a) Lipo-PMC b) Boş-Lipo

4.5. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

En optimum partikül boyutu ve PDI değeri soya–fosfotidilkolin (5 dk sonikasyon) formülasyon ile sağlandığı için çalışmalara bu formülasyon ile devam edilmiştir.

Formülasyonun enkapsülasyon etkinliği oranı % 72.85 olarak bulunmuştur ve bu değer literatür ile uyumludur[71].

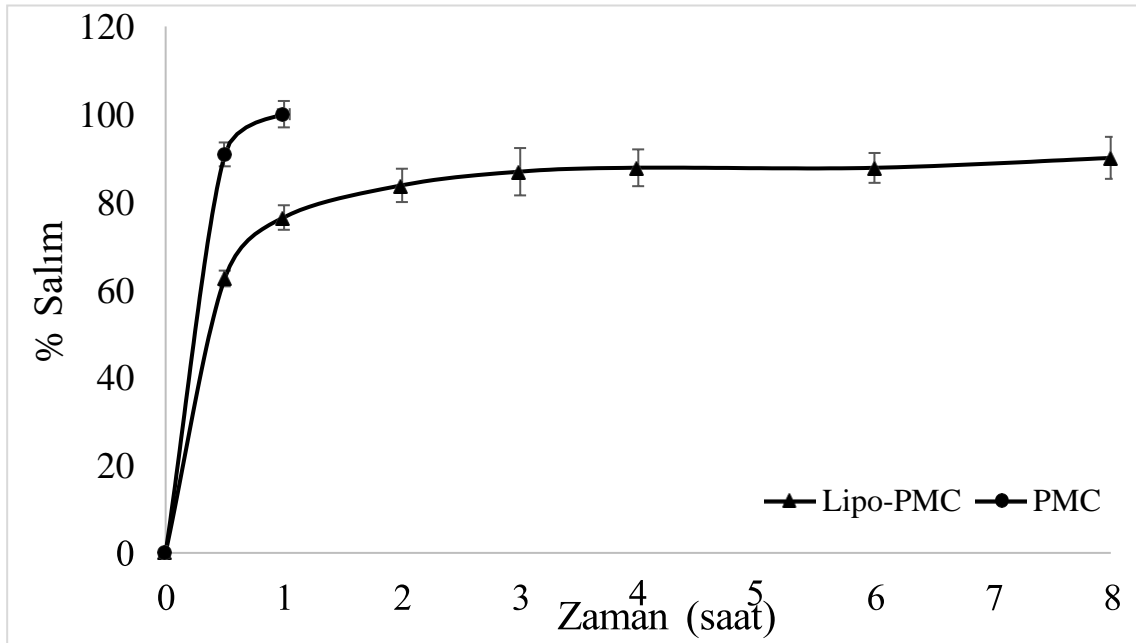
4.6. Stabilite Çalışması Sonuçları

Formülasyonların karakterizasyonlarında tayin edilen parametrelerdeki değişimler göz önüne alınarak, +4°C’de 3 ay süre (0.ay, 1. ay ve 3. ay) ile bekletilen formülasyonların stabiliteleri incelenmiş olup, karakterizasyon parametrelerindeki değişim Çizelge 4.8.’de verilmiştir. 3. aya kadar olan sonuçlar değerlendirildiğinde, formülasyonun stabilitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8.Optimum Formülasyona Ait Stabilite Sonuçları (+4°C)

Formülasyon	Zaman	PB (nm)	ZP (mV)	PDI
Soya-fosfotidilkolin	0. ay	116.1 ± 0.737	-15.3 ±0.473	0.455 ±0.011
6 mg kolesterol	1. ay	118.4 ± 2.452	-21.3 ± 0.586	0.484 ±0.023
5 dk sonikasyon	3.ay	177.6 ± 6.4	-23.2 ± 0.814	0.491 ± 0.05

4.7. *In-vitro* Salım Çalışması Sonuçları



Şekil 4.7. Lipo-PMC ve kontrol grubuna ait PMC'nin *in-vitro* salım profilleri (n = 6)

Diyaliz membran yöntemi ile yapılan ve kümülatif olarak değerlendirilen *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, kontrol grubu olan etkin madde çözeltisi (PMC) ile, 0.5. saatin sonunda ilacın yaklaşık %90.84'ünün ve 1. saatin sonunda ilacın tamamının salıverildiği gözlenmiştir.

Lipozom formülasyonu (Lipo-PMC) ile, başlangıçta ani salım etkisi görülmüş olup, daha sonra sabit bir seviyede sürekli salım profili elde edilmiştir. Bu formülasyon ile 1. saatin sonunda %76.45 oranında salım gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.7.). İlk başta gözlenen ani ilaç salımı, lipozomun çekirdek/çeper yapısında yer alan etkin maddeye dayandırılmıştır. İlacın lipit tabakalardan sızma şeklinde çeperden gerçekleşen salımı sonucu ani salım etkisi gözlenmiştir. Daha sonra salımın yavaşlaması çekirdek kısmında enkapsüle olan ilacın salıverilmesine dayandırılmıştır.

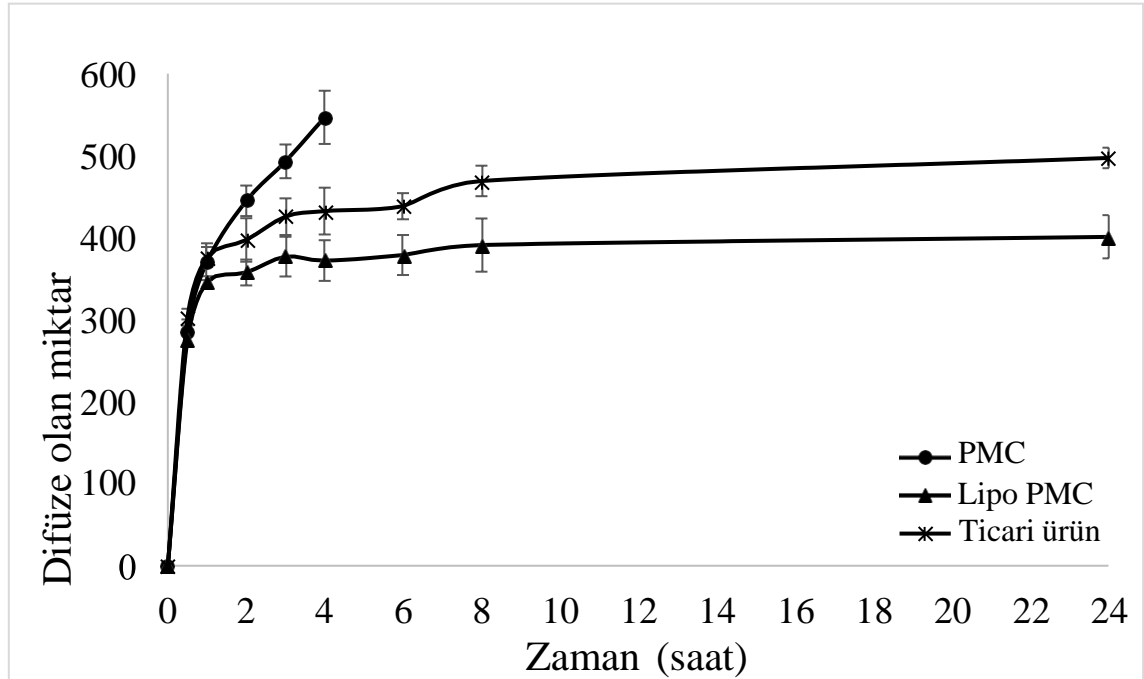
Kinetik değerlendirmeler kapsamında ise, formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına dört farklı kinetik model (Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Langenbucher) uygulanmış ve k/R^2 (salım hız sabiti/determinasyon katsayısı) değerleri, Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Lipozom formülasyonunun in-vitro salım hızı kinetik verileri

Formülasyon		Sıfıncı derece	Birinci derece	Higuchi	Hixson Crowell	Langenbucher
Lipo-PMC	k	0.0451	-0.024	1.4075	0.021	0.0881
	r ²	0.5756	0.7121	0.7292	0.6664	0.9332

Lipozom formülasyonu için, en yüksek determinasyon katsayısı değeri ($r^2=0.9332$) bulunmuş ve salımın ilaç salımında difüzyonun baskın olduğu matematiksel model olan Langenbucher kinetik modele uyduğu gösterilmiştir.

4.8. Difüzyon Çalışmaları



Şekil 4.8. PMC, Lipo-PMC ve ticari ürünün difüzyon salım profilleri (n = 3)

Franz difüzyon hücresi ile yapılan ve kümülatif olarak değerlendirilen difüzyon çalışmaları sonucunda, kontrol grubu olan etkin madde çözeltisi (PMC)'nin grafiğine bakıldığında, 2. saatin sonunda toplam 625 µg etkin maddenin yaklaşık 445µg'nın salındığı görülmüştür. 4. saatin sonunda ise ilacın neredeyse tamamı difüze olmuştur.

Aynı konsantrasyondaki lipozom formülasyonu (Lipo-PMC) ve ticari ürün grafikleri karşılaştırıldığında, 2.saatin sonunda sırasıyla 358 µg ve 397 µg etkin madde salınmıştır. Salım çalışmaları 24 saat boyunca değerlendirilmiş olup, ortalama salım sonuçları lipo-PMC için yaklaşık 327 µg iken ticari ürün için 433 µg çıkmıştır. Bu sonuçlara göre, hazırlanmış olduğumuz lipozom formülasyonu, ticari ürün preparatına göre daha kontrollü ve uzun süreli salım göstermiştir (Şekil 4.8.).

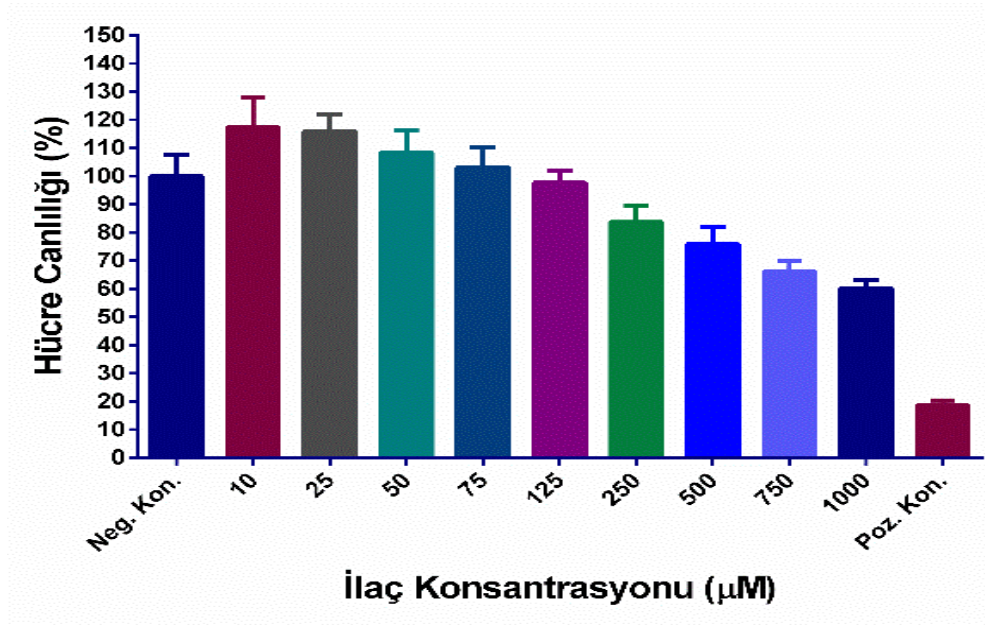
4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarımızda; serbest ilaç, Boş-Lipozom ve ilaç yüklü lipozom (Lipo-PMC) formülasyonlarının, L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkisi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

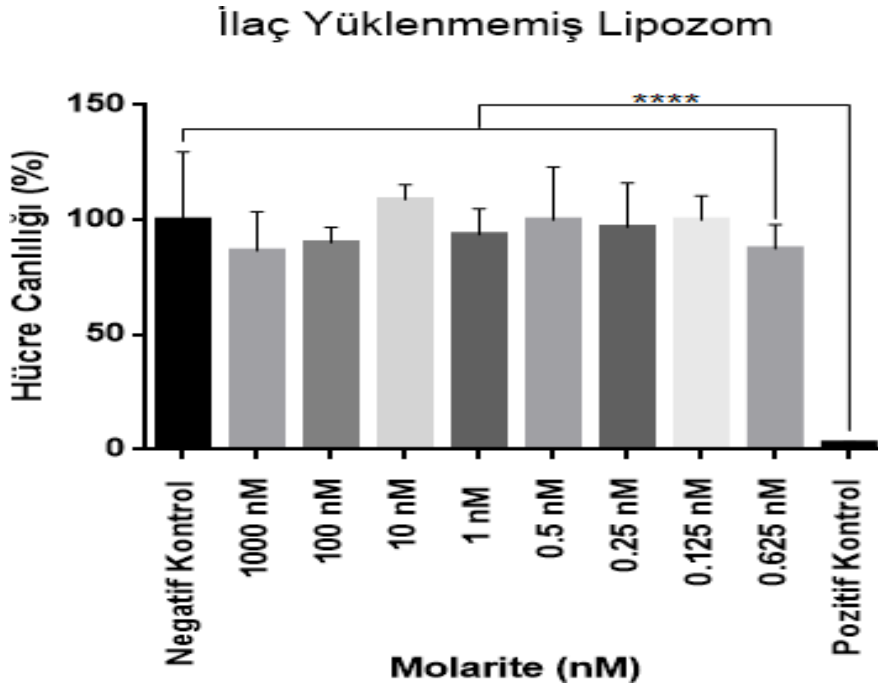
İlk olarak serbest ilaç çalışmaları yapılmıştır. Bu doğrultuda, çeşitli konsantrasyonlar hazırlanarak (10, 25, 50, 75, 125, 250, 500, 750, 1000 µM) hücelere serbest ilaç verilmiştir. Elde edilen grafiğe bakıldığında (Şekil 4.9.), lipozom formülasyonlarında kullanmış olduğumuz konsantrasyonun çok daha üstüne çıktığımız halde, hücrelerde yaklaşık %70 canlılık gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda etkin maddenin hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.

İlaç içermeyen lipozom (Boş-Lipozom) formülasyonu, beklendiği üzere herhangi bir toksik etki göstermemiştir (Şekil 4.10.).

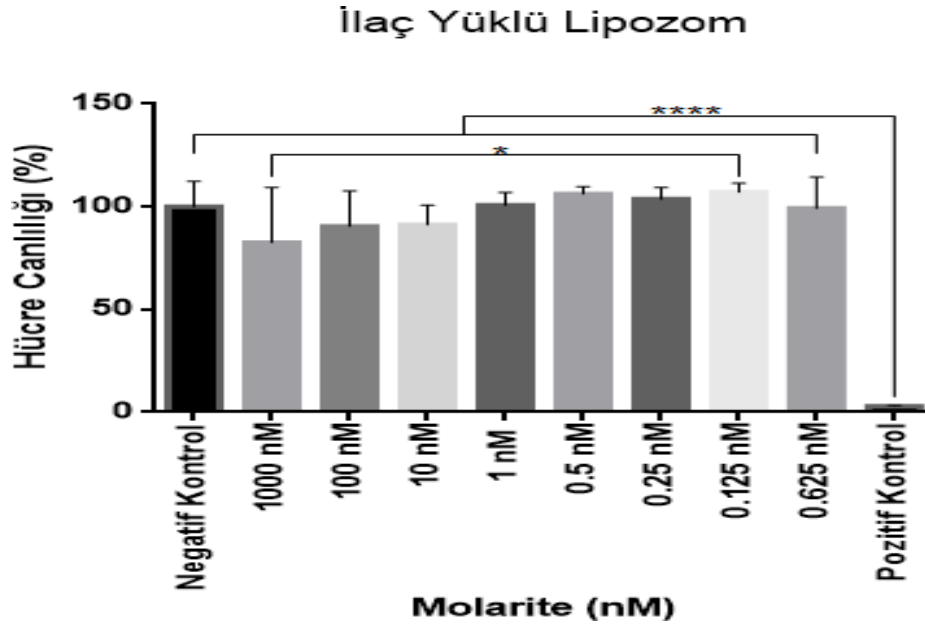
İlaç yüklenmiş lipozomun da konsantrasyona ve zamana bağlı olarak toksik etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.11.).



Şekil 4.9. Serbest ilaç çözeltisi (10-1000 µM)'ne ait hücre canlılığı grafiği



Şekil 4.10. İlaç Yüklenmemiş Lipozom (1000-0.625 nM) formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiği. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak one-way ANOVA yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.



Şekil 4.11. İlaç Yüklü Lipozom (1000-0 nM) formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiği. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak one-way ANOVA yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında; vitiligo tedavisi için topikal uygulamaya yönelik, pimekrolimus yüklü lipozom formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyon/in vitro çalışmalar ile değerlendirilmesi planlanmıştır.

Pimekrolimus immünsupresif etkisini, sitoplazmik reseptör FKBP-immünofiline bağlanması ve kalsinörin ile birleşmesi sonucunda, fosfataz aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirmektedir. T-lenfosit aktivasyonu inhibisyona yani immünsüpresyona neden olmakta ve böylece inflamasyon baskılanmaktadır.

Pimekrolimusun, kullanılmasının asıl amacı organ nakli yapılan hastalarda doku reddini önlemek olsa da günümüzde daha çok inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır. Ancak deriden penetreyonunun düşük olması ve derinin dermis tabakasına kadar ulaşamaması sebebiyle, tedavide başarısı yetersiz kalmaktadır. Bu durum da yenilenen dozlarda uzun süreli kullanım gerektirmektedirler.

İmmünsüpresif ajanlar, uzun süreli kullanımlarında deride incelme, damarlanma, sivilce, tüylenme gibi birçok yan etkiye neden olmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla tez kapsamında, kullandığımız lipozom teknolojisi ile, etkin maddenin deri yüzeyinde kalış süresinin uzatılarak, kontrollü bir salım sağlanması hedeflenmiştir. Bu sayede etkin maddenin uygulama sıklığının ve dozunun azaltılmasıyla yan etkiler minimum seviyeye inebilecektir Aynı zamanda lipozomlar, derinin dermis tabakasına kadar nüfuz edebildiği için, etkin maddenin hedef dokulara ulaşması sağlanacak ve böylece daha etkin bir tedavi sağlanabilecektir.

Bu doğrultuda tez kapsamında;

İlk aşamada; etkin madde karakterizasyonu (erime derecesi, çözünürlük, DSC çalışmaları), miktar tayini ve analitik yöntem validasyon çalışmaları yapılmıştır. Pimekrolimus etkin maddesinin kullanılan difüzyon ortamında Etanol:Su (pH= 7.4) (70:30, v/v) çözünürlüğü, 20 mg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca pimekrolimus, ~155°C civarında erimeye başlamış, 166.98°C civarında keskin endotermik erime piki gözlenmiştir. Analitik yöntemin, özgünlük, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, sağlamlılık ve tutatlılık kriterlerini karşıladığı ve etkin maddenin çalışma süresince stabilitesini koruduğu ispatlanmıştır.

İkinci aşamada; formülasyon ve yöntem optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yöntem parametrelerinin (sonikasyon süresi, fosfolipit yapısı ve kolesterol miktarı), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Lipozom formülasyonları ince film tabaka oluşturma yöntemi ile hazırlanmış ve PB, ZP, PDI ve EE bakımından değerlendirilmiştir. Hazırlama sırasında, üç farklı sonikasyon süresi (3, 4 ve 5 dk) uygulanarak çalışmalar yürütülmüş ve soya-fosfotidilkolin ile hazırlanan lipozomlarda sonikasyon süresinin artışına bağlı olarak daha homojen ve daha küçük partikül boyutuna sahip ($116.1 \pm 0.737 \text{nm}$) lipozomlar elde edilmiştir. Hazırlanan tüm formülasyonlarda, sonikasyon süresinin 5 dk olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.

Lipit yapısının formülasyon üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, üç farklı lipit (soya-fosfotidilkolin, Lipoid S100 ve DPPC) kullanılarak lipozomlar hazırlanmış, soya-fosfotidilkolin ile hazırlanan formülasyonlarda en yüksek %EE değeri (%72.85) bulunmuştur. Yine bu formülasyonda, en düşük PDI değeri (0.455 ± 0.011) ve en ideal ZP değeri ($-19.5 \pm 0.473 \text{mV}$) gözlenmiş olup, ileri dönem çalışmalarda, lipit olarak soya-fosfotidilkolin kullanılmasına karar verilmiştir.

Kolesterol miktarının formülasyonlardaki etkisini görebilmek amacıyla, üç farklı kolesterol miktarı (5mg, 6mg, 12mg) kullanılarak lipozomlar hazırlanmıştır. 6mg kolesterol kullanılarak hazırlanan lipozomların stabilitelerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Genel olarak, farklı lipit türevleri, kolesterol miktarı ve sonikasyon süresi değerlendirildiğinde, etkin madde enkapsülasyon oranı ve stabilite açısından en iyi sonuçların 50:6mg soya-fosfotidilkolin:kolesterol ve 5 dk sonikasyon olan formülasyonlarla elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara bu formülasyon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Üçüncü aşamada; diyaliz membran yöntemi ile *in-vitro* salım çalışmaları ve Franz difüzyon hücreleri ile penetrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PMC (etkin madde çözeltisi) ile karşılaştırıldığında Lipo-PMC formülasyonu ile uzatılmış bir salım profili elde edilmiştir. Bu durum lipozomların çekirdek/çeper yapısındaki ilaç salımına dayandırılmıştır. Salım sonuçlarına kinetik modeller uygulanarak formülasyonların salım mekanizmaları belirlenmiştir. *In-vitro* salım grafiklerine bakıldığında Lipo-PMC formülasyonunun ilaç salımında difüzyonun baskın olduğu Langenbucher salım kinetiğine sahip olduğu ($r^2=0.9332$) görülmüştür. Franz difüzyon çalışmalarına bakıldığında; hazırlanmış olduğumuz lipozom formülasyonunun, ticari ürün preparatına

göre daha uzun sürede penetre olduğu (2.saatin sonunda sırasıyla 358 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve 397 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) gözlenmiştir.

Son aşamada; lipozomların L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Etkin madde içermeyen formülasyonun (boş lipozom), hücreler için toksik olmadığı saptanmıştır, güvenilirliğinin ve biyoyumluluğunun yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda ilaç yüklü lipozom formülasyonunda hücreler üzerinde toksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Serbest ilaç çözeltisinin de yüksek konsantrasyonlarda dahi, hücreler üzerinde yaklaşık %70 canlılık gösterdiği sonucu bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, kullanmış olduğumuz pimekrolimus yüklü lipozom formülasyonların biyoyumlu oldukları bulunmuştur.

İleri dönem çalışmalar için lipozom formülasyonlarının etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla, konvansiyonel preparat ile kıyaslamalı olarak ex-vivo penetrasyon çalışmalarının ve in-vivo çalışmaların yürütülmesi planlanmıştır.

Sonuç olarak; optimize edilen lipozom formülasyonu (Lipo-PMC) ile penetrasyonun artırılarak uzun süreli etki sağlanabileceği, sık kullanımın önlenmesine bağlı olarak yan etkilerinin azaltılabileceği ve hasta uyuncunun artırılabilceği gözlenmiş olup, toksik özellikte olmayan, biyoyumlu bir formülasyon geliştirilmiştir. Böylece geliştirilen lipozom formülasyonunun, konvansiyonel formülasyonlardan daha etkin bir seçenek olarak değerlendirilebileceği görülmüş, vitiligo tedavisine yönelik topikal yenilikçi bir formülasyon sunulmuştur.

6. KAYNAKLAR

1. Wang, P., et al., *Enhanced ascomycin production in Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus by employing polyhydroxybutyrate as an intracellular carbon reservoir and optimizing carbon addition*. Microbial Cell Factories, 2021. **20**(1).
2. Tocci, M., et al., *The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes*. The Journal of Immunology, 1989. **143**(2): p. 718-726.
3. Eichenfield, L.F. and L. Beck, *Elidel (pimecrolimus) cream 1%: A nonsteroidal topical agent for the treatment of atopic dermatitis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **111**(5): p. 1153-1168.
4. Boguniewicz, M., et al., *A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1998. **102**(4): p. 637-644.
5. Lecomte, P., et al., *Psk6 Belgian Drug Utilisation Study Of Elidel® In Routine Practice In Atopic Dermatitis*. Value in Health, 2006. **9**(6): p. A268.
6. *Safety and efficacy of pimecrolimus cream 1% in the daily practice - results of the Elidel Patient Self-Observation (El Paso) study in 3502 patients with atopic dermatitis in Germany*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **56**(2, Supplement 2): p. AB74.
7. Paller, A., et al., *A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2001. **44**(1): p. S47-S57.
8. Lin, A.N., *Innovative Use of Topical Calcineurin Inhibitors*. Dermatologic Clinics, 2010. **28**(3): p. 535-545.
9. Eroğlu, İ., et al., *Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations*. Drug Delivery, 2014: p. 1-12.
10. Bhalekar, M.R., et al., *Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery*. Aaps Pharmscitech, 2009. **10**(1): p. 289-296.
11. Liu, J., et al., *Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery*. International journal of pharmaceutics, 2007. **328**(2): p. 191-195.
12. Li, L.-F., et al., *Deep learning in skin disease image recognition: A review*. IEEE Access, 2020. **8**: p. 208264-208280.
13. Yousef, H., M. Alhajj, and S. Sharma, *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. 2022: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
14. Rahmati, M., et al., *Designing multigradient biomaterials for skin regeneration*. Materials Today Advances, 2020. **5**: p. 100051.
15. Burns DA, B.S., Cox N, *Griffiths CE Rook's Textbook of Dermatology*, ed. t. ed. 2004: Mass: Blackwell Science.
16. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes*. Nature, 1977. **265**(5593): p. 421-4.
17. Mohamed, S.A. and R. Hargest, *Surgical anatomy of the skin*. Surgery (Oxford), 2022. **40**(1): p. 1-7.
18. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plastic and reconstructive surgery, 2006. **117**(7S): p. 12S-34S.

19. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-343.
20. Gonzales, K.A.U. and E. Fuchs, *Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche*. Developmental Cell, 2017. **43**(4): p. 387-401.
21. Emilia Costin, G.K.M., *Know Your Skin Cells: III. The Melanocytes*. 2018.
22. Sturm, R.A., N.F. Box, and M. Ramsay, *Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep*. Bioessays, 1998. **20**(9): p. 712-21.
23. Gilchrist, B.A., F.B. Block, and G. Szabo, *Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1979. **73**(2): p. 141-143.
24. Halder, R.M. and K.M. Bang, *Skin Cancer in Blacks in the United States*. Dermatologic Clinics, 1988. **6**(3): p. 397-405.
25. Tadokoro, R., Y. Shikaya, and Y. Takahashi, *Wide coverage of the body surface by melanocyte-mediated skin pigmentation*. Developmental Biology, 2019. **449**(2): p. 83-89.
26. Park, H.-Y. and M. Yaar, *Chapter 72. Biology of Melanocytes*, in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8e*, L.A. Goldsmith, et al., Editors. 2012, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.
27. Ito, S., *A Chemist's View of Melanogenesis*. Pigment Cell Research, 2003. **16**(3): p. 230-236.
28. Lakhan, M.K. and M. Lynch, *Skin pigmentation*. Medicine, 2021. **49**(7): p. 447-452.
29. Halder, R.M., M.A. Nandedkar, and K.W. Neal, *Pigmentary disorders in ethnic skin*. Dermatologic Clinics, 2003. **21**(4): p. 617-628.
30. Çiğdem, D.A., *vitiligo dışı hipopigmentasyon bozuklukları*. Türkderm deri hastalıkları ve frengi arşivi dergisi, 2011. **45**: p. 122-126.
31. Boniface, K., et al., *Vitiligo: Focus on Clinical Aspects, Immunopathogenesis, and Therapy*. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2018. **54**(1): p. 52-67.
32. Iannella, G., et al., *Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches*. Autoimmunity Reviews, 2016. **15**(4): p. 335-343.
33. Marchioro, H.Z., et al., *Update on the pathogenesis of vitiligo*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2022. **97**(4): p. 478-490.
34. Önder, A., A.S. Çinar, and A.M. Gürsoy, *Herbal Remedies and New Approaches in Vitiligo Treatment*. Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2018. **7**(1): p. 49-60.
35. Ezzedine, K., et al., *Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2012. **25**(3): p. E1-E13.
36. Said-Fernandez, S., et al., *Novel immunological and genetic factors associated with vitiligo: A review*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2021. **21**(4).
37. Zhang, Y., et al., *The prevalence of vitiligo: a meta-analysis*. PLoS one, 2016. **11**(9): p. e0163806.
38. Sehgal, V.N. and G. Srivastava, *Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features*. Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology, 2007. **73**(3): p. 149.
39. Martis, J., et al., *A clinical study of vitiligo*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2002. **68**(2): p. 92-3.

40. Krüger, C. and K.U. Schallreuter, *A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults*. International journal of dermatology, 2012. **51**(10): p. 1206-1212.
41. Cesar Silva de Castro, C. and H.A. Miot, *Prevalence of vitiligo in Brazil—A population survey*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2018. **31**(3): p. 448-450.
42. Bahadır, S. and S. Yaylı, *Childhood Vitiligo: Epidemiology and Etiology*. Turkderm-Turk Arch Dermatol Venereol, 2006. **40**(3): p. 81-86.
43. Laddha, N.C., et al., *Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system*. Experimental Dermatology, 2013. **22**(4): p. 245-250.
44. Spritz, R.A. and S.A. Santorico, *The Genetic Basis of Vitiligo*. Journal of Investigative Dermatology, 2021. **141**(2): p. 265-273.
45. Tang, X.-F., et al., *Association analyses identify three susceptibility Loci for vitiligo in the Chinese Han population*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**(2): p. 403-410.
46. Alkhateeb, A., et al., *Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families*. Pigment Cell Research, 2003. **16**(3): p. 208-214.
47. van den Boorn, J.G., et al., *Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(9): p. 2220-32.
48. Mohammed, G.F., A.H. Gomaa, and M.S. Al-Dhubaibi, *Highlights in pathogenesis of vitiligo*. World J Clin Cases, 2015. **3**(3): p. 221-30.
49. Garcia-Melendez, M.E., et al., *Protein tyrosine phosphatase PTPN22 +1858C/T polymorphism is associated with active vitiligo*. Experimental and therapeutic medicine, 2014. **8**(5): p. 1433-1437.
50. Ongenaes, K., N. Van Geel, and J.M. Naeyaert, *Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo*. Pigment Cell Res, 2003. **16**(2): p. 90-100.
51. Zhang, M., et al., *Vitiligo: An immune disease and its emerging mesenchymal stem cell therapy paradigm*. Transplant Immunology, 2023. **76**: p. 101766.
52. Falabella, R. and M.I. Barona, *Update on skin repigmentation therapies in vitiligo*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2009. **22**(1): p. 42-65.
53. Lepe, V., et al., *A Double-blind Randomized Trial of 0.1% Tacrolimus vs 0.05% Clobetasol for the Treatment of Childhood Vitiligo*. Archives of Dermatology, 2003. **139**(5).
54. Mahmoud, B.H., C.L. Hexsel, and I.H. Hamzavi, *An update on new and emerging options for the treatment of vitiligo*. Skin Therapy Lett, 2008. **13**(2): p. 1-6.
55. Gargoom, A.M., et al., *Calcipotriol in the treatment of childhood vitiligo*. International journal of clinical pharmacology research, 2004. **24**(1): p. 11-14.
56. Pacifico, A. and G. Leone, *Photo(chemo)therapy for vitiligo*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2011. **27**(5): p. 261-77.
57. Faria, A.R., et al., *Vitiligo--Part 2--classification, histopathology and treatment*. An Bras Dermatol, 2014. **89**(5): p. 784-90.
58. Radmanesh, M., *Depigmentation of the normally pigmented patches in universal vitiligo patients by cryotherapy*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2000. **14**(3): p. 149-52.
59. Chen, Y.F., et al., *Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: analysis of 120 cases*. J Am Acad Dermatol, 2004. **51**(1): p. 68-74.

60. Tanioka, M. and Y. Miyachi, *Waterproof camouflage age for vitiligo of the face using Cavilon 3M as a spray*. Eur J Dermatol, 2008. **18**(1): p. 93-4.
61. Palit, A. and A.C. Inamadar, *Childhood vitiligo*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2012. **78**(1): p. 30-41.
62. Gupta, A. and M. Chow, *Pimecrolimus: A review*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2003. **17**(5): p. 493-503.
63. Gschwind, H.-P., et al., *Pimecrolimus: Skin disposition after topical administration in minipigs in vivo and in human skin in vitro*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(1): p. 9-19.
64. Bhaskar, S., et al., *Crystal structure of pimecrolimus Form B, C43H68ClNO11*. Powder Diffraction, 2021. **36**(1): p. 35-42.
65. Al Johani, K.A., et al., *Calcineurin inhibitors in oral medicine*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2009. **61**(5): p. 829-840.
66. Shao, M., et al., *Drug nanocarrier, the future of atopic diseases: Advanced drug delivery systems and smart management of disease*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **147**: p. 475-491.
67. Suhaimi, N.A.A., et al., *Application of liposomes in the treatment of infectious diseases*. Life Sciences, 2022. **305**: p. 120734.
68. He, Y., et al., *Liposomes and liposome-like nanoparticles: From anti-fungal infection to the COVID-19 pandemic treatment*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022. **17**(6): p. 817-837.
69. De Leo, V., et al., *Liposomes containing nanoparticles: preparation and applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022. **218**: p. 112737.
70. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, in Validation of Analytical Procedure:Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals Human Use, 2005.
71. Yingfang, F., et al., *Pimecrolimus micelle exhibits excellent therapeutic effect for Keratoconjunctivitis Sicca*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **140**: p. 1-10.
72. Lade, S. and Y.R. Prasad. *A New Validated Stability Indicating Rp-Hplc Method For Estimation Of Pimecrolimus In Bulk And Topical Formulations*. 2015.
73. Grassberger, M., et al., *A novel anti-inflammatory drug, SDZ ASM 981, for the treatment of skin diseases: in vitro pharmacology*. Br J Dermatol, 1999. **141**(2): p. 264-73.