

**TEKRARLAYAN DÜŞÜK TEDAVİSİNE YÖNELİK
TGF- β 1 İÇEREN MİKROEMÜLSİYON
SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ

Eskişehir, 2019

**TEKRARLAYAN DÜŞÜK TEDAVİSİNE YÖNELİK TGF- β 1 İÇEREN
MİKROEMÜLSİYON SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz, 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1604S180 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ'in "Tekrarlayan Düşük Tedavisine Yönelik TGF- β 1 İçeren Mikroemülsiyon Sistemlerinin Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 30/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN

Üye : Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ

Üye : Dr.Öğr.Üyesi Umay Merve GÜVEN

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

TEKRARLAYAN DÜŞÜK TEDAVİSİNE YÖNELİK TGF- β 1 İÇEREN MİKROEMÜLSİYON SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN

Gebelik ve bağışıklık sistemi arasında güçlü bir bağ vardır. Temel hedef, güçlü antimikrobiyel bağışıklık varlığında seçici immün tolerans, immünosüpresyon ve immunomodülasyon içeren başarılı bir gebelik sağlamak ve bu durumu sürdürmektir. Genellikle üç ya da daha fazla düşük yapılması olarak tanımlanan tekrarlayan düşük ve başarısız tüp bebek tedavisi aynı karakteristik özelliklere sahiptir. İmmün bozukluk, tekrarlayan düşükte önemli role sahiptir ve yüksek doğal öldürücü hücre aktivitesi bu durumla ilgisi olan en önemli etiyolojilerden birisidir. Çeşitli teorik ilke ve klinik verilere dayalı aşırı endometrial immün aktiviteyi azaltmayı hedefleyen tedavi, tekrarlayan düşük görülen kadınlarda başarıya ulaşmıştır. İmmünolojik risk faktörü taşıyan kadınların immünoterapi tedavisi gördükten sonra canlı doğum oranında anlamlı artış görülmüştür. Ayrıca, yüksek besin değeri olan ve formülasyonda kullanılan soya yağından dolayı fitoöstrojenik etkisi bulunan iv intralipit emülsiyonların da canlı doğumu arttırıcı özellikte olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda, transforme edici büyüme faktörü- β 'nın bir izoformu olan TGF- β 1'in tekrarlayan düşük ve tüp bebek tedavisinde kullanıldığını gösteren az sayıda da olsa bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu tez kapsamında TGF- β 1 proteini ve ejakülat içeren mikroemülsiyon formülasyonları çalışılmış ve bulunan sonuçlar etkin maddesiz emülsiyon ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Fitoöstrojenik etkiye sahip olması nedeniyle mikroemülsiyonda yağlı faz olarak soya ve keten tohumu yağı kullanılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Tekrarlayan Düşük, TGF- β 1, Ejakülat, İntralipit Emülsiyonu

ABSTRACT

PREPARATION OF TGF- β 1 LOADED MICROEMULSION SYSTEMS FOR RECURRENT MISCARRIAGE AND *IN VITRO* EVALUATION

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Murat Sami BERKMAN

There is a strong correlation between pregnancy and immune system. The main objective is to ensure and maintain a successful pregnancy involving selective immune tolerance, immunosuppression and immunomodulation in the presence of strong antimicrobial immunity. Recurrent miscarriage which is usually defined as three or more abortions and unsuccessful *in vitro* fertilization have the same characteristics. Immune disorders play a significant role in recurrent miscarriage and natural killer cell activity is one of the most important etiology related to this situation. Therapies with various theoretical principles and clinical data aiming to reduce excessive endometrial immune activity are successful in women with recurrent miscarriage. A significant increase was observed in the rate of live births following immunotherapy treatment of women with immunological risk factors. Furthermore, live birth enhancing property of iv intralipid emulsions with high nutritional value and phytoestrogenic effect due to the soybean oil in the formulation was also reported.

In recent years there are some even though few studies with TGF- β 1, the isoform of transforming growth factor- β , for recurrent miscarriage and *in vitro* fertilization treatment. In the context of this thesis, TGF- β 1 protein and ejaculate loaded microemulsion formulations were studied and the results were comparatively evaluated with the placebo emulsion. Soybean and linseed oil were used as the oil phase of microemulsions due to the pyhtoestogenic effect.

Keywords: Recurrent Miscarriage, TGF- β 1, Ejaculate, Intralipid Emulsion

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince geniş bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Yasemin YAZAN'a,

Gerek tez çalışmalarım, gerekse iş hayatım süresince geniş bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN'a,

Etkin madde miktarı tayini ve ekstraksiyon çalışmalarını yapabilmem için biyoteknoloji laboratuvarını kullanmama izin veren ve yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Çalışmalarımda yakın ilgi gösteren ve yardımlarını esirgemeyen bölüm hocalarım Prof.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç.Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Dr.Öğr.Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na, Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e, Araş.Gör.Dr. Behiye ŞENEL'e,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Akın ELMASKAYA'ya, Nur İlge Çınar'a,

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan ve yüreklendiren aileme teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Kemal Can DEMİRKİLİNÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Emülsiyon Sistemler	3
2.1.1. Mikroemülsiyon sistemler	4
2.1.2. Mikroemülsiyonların sınıflandırılması	6
2.1.2.1. <i>Y/S mikroemülsiyonu: Winsor I</i>	6
2.1.2.2. <i>S/Y mikroemülsiyonu: Winsor II</i>	6
2.1.2.3. <i>Geçişli mikroemülsiyon: Winsor III</i>	7
2.1.2.4. <i>Tek faz görünümlü mikroemülsiyon: Winsor IV</i>	7
2.1.3. Mikroemülsiyon bileşenleri	7
2.1.3.1. <i>Sulu faz</i>	8
2.1.3.2. <i>Yağlı faz</i>	8
2.1.3.3. <i>YEM</i>	9
2.1.3.4. <i>Y.YEM</i>	10
2.1.4. Hidrofilik-lipofilik denge sistemi	11
2.1.5. Mikroemülsiyon oluşum teorileri	11
2.1.5.1. <i>Ara yüzey ya da karışık film teorisi</i>	11
2.1.5.2. <i>Çözünürlük teorisi</i>	11
2.1.5.3. <i>Termodinamik teori</i>	12
2.1.6. Mikroemülsiyon hazırlama yöntemleri.....	12
2.1.6.1. <i>Faz dönüştürme yöntemi</i>	13

2.1.6.2. <i>Faz titrasyon yöntemi</i>	13
2.1.7. Mikroemülsiyon karakterizasyonu.....	14
2.1.7.1. <i>Fiziksel görünüş</i>	14
2.1.7.2. <i>Damlacık büyüklüğü</i>	14
2.1.7.3. <i>Zeta potansiyel</i>	15
2.1.7.4. <i>Reoloji</i>	15
2.1.7.5. <i>Elektriksel iletkenlik</i>	15
2.1.7.6. <i>pH</i>	16
2.1.8. Mikroemülsiyon uygulama yolları.....	16
2.1.8.1. <i>Topikal uygulama</i>	16
2.1.8.2. <i>Oral uygulama</i>	17
2.1.8.3. <i>Parenteral uygulama</i>	18
2.1.8.4. <i>Oküler uygulama</i>	18
2.2. Tekrarlayan Düşük.....	19
2.2.1. Tekrarlayan düşüğün bilinen risk faktörleri.....	19
2.2.1.1. <i>Anatomik bozukluklar</i>	20
2.2.1.2. <i>Enfeksiyon hastalıkları</i>	20
2.2.1.3. <i>Genetik faktörler</i>	20
2.2.1.4. <i>Endokrin bozukluklar</i>	21
2.2.1.5. <i>İmmün bozukluklar</i>	21
2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü	23
3. GEREÇLER.....	25
3.1. Kullanılan Maddeler.....	25
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	26
4. YÖNTEMLER.....	28
4.1. Mikroemülsiyon Formülasyonları Hazırlanması.....	28
4.2. Mikroemülsiyon Formülasyon Denemeleri	28
4.3. Üçgen Faz Diyagramı Hazırlanması ve İdeal Formülasyonların Belirlenmesi	30
4.4. Ejakulattan TGF- β 1 Ekstraksiyonu.....	30
4.5. SDS-PAGE Jel Elektrophorez ile Ejakulattan TGF- β 1 Eldesi.....	31
4.6. Etkin Madde İçeren Formülasyonların Hazırlanması	33
4.7. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu	33

4.7.1. Fiziksel görünüş.....	33
4.7.2. Tip tayini.....	34
4.7.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması.....	34
4.7.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı	34
4.7.5. Zeta potansiyel analizi	34
4.7.6. Reolojik analiz.....	34
4.7.7. pH analizi.....	34
4.7.8. Elektriksel iletkenlik analizi.....	34
4.7.9. FT-IR analizi.....	35
4.7.10.NMR analizi.....	35
4.7.11.Etkin madde miktar tayini	35
4.8. Formülasyonlarda Yapılan Kararlılık Çalışmaları	37
4.8.1. Fiziksel görünüş.....	37
4.8.2. Tip tayini.....	37
4.8.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması.....	37
4.8.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı	37
4.8.5. Zeta potansiyel analizi	37
4.8.6. Reolojik analiz	38
4.8.7. pH analizi.....	38
4.8.8. Elektriksel iletkenlik analizi.....	38
4.8.9. FT-IR analizi.....	38
4.8.10.NMR analizi.....	38
4.8.11.Etkin madde miktar tayini	38
4.9. Sitotoksikite Testi ve Hücre Kültürü Çalışmaları	39
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	41
5.1. Mikroemülsiyon Formülasyon Denemeleri	41
5.2. Üçgen Faz Diyagramı Hazırlanması ve İdeal Formülasyonların Belirlenmesi	45
5.3. Ejakulattan TGF- β 1 Ekstraksiyonu.....	58
5.4. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu	59
5.4.1. Fiziksel görünüş.....	59
5.4.2. Tip tayini.....	59
5.4.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması.....	59

5.4.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı	60
5.4.5. Zeta potansiyel analizi	62
5.4.6. Reolojik analiz	63
5.4.7. pH analizi.....	72
5.4.8. Elektriksel iletkenlik analizi.....	72
5.4.9. FT-IR analizi.....	73
5.4.10.NMR analizi.....	74
5.4.11.Etkin madde miktar tayini	75
5.5. Formülasyonlarda Yapılan Kararlılık Çalışmaları	76
5.5.1. Fiziksel görünüş.....	76
5.5.2. Tip tayini.....	77
5.5.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması.....	77
5.5.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı	78
5.5.5. Zeta potansiyel analizi	86
5.5.6. Reolojik analiz	89
5.5.7. pH analizi.....	95
5.5.8. Elektriksel iletkenlik analizi.....	98
5.5.9. FT-IR analizi.....	101
5.5.10.NMR analizi.....	103
5.5.11.Etkin madde miktar tayini	105
5.6. Sitotoksikite Testi ve Hücre Kültürü Çalışmaları	106
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	108
KAYNAKÇA.....	109
EKLER	
EK-1 Bildiriler	
EK-2 Etik Kurul Kararı	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Emülsiyon sistemlerin özellikleri	4
Tablo 2.2. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan yağlar	8
Tablo 2.3. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan YEM'ler	9
Tablo 2.4. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan Y.YEM'ler	10
Tablo 2.5. Intralipit® uygulamasının anormal NK hücre aktivitesini baskılaması	22
Tablo 4.1. Mikroemülsiyon formülasyon denemeleri için örnek tablo	28
Tablo 4.2. Mikroemülsiyon deneme çalışmaları	29
Tablo 4.3. Ejakülat örnekleri ve çökme durumları	30
Tablo 4.4. Jel elektroforez üzerinde yürütme için hazırlanan örnekler	31
Tablo 4.5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler	32
Tablo 4.6. SDS-PAGE yönteminde kullanılan yürütme tamponu	33
Tablo 4.7. Brilliant Blue çözeltisinin içeriği	33
Tablo 5.1. Tween 80 ve PEG 400 kullanılarak hazırlanan formülasyonlar	41
Tablo 5.2. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:2 olan formülasyonlar	42
Tablo 5.3. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:3 olan formülasyonlar	42
Tablo 5.4. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:4 olan formülasyonlar	42
Tablo 5.5. Karıştırma hızının su tutma kapasitesine etkisinin incelenmesi	43
Tablo 5.6. Keten Yağı ve 4:1 Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan formülasyonlar I	45
Tablo 5.7. Keten Yağı ve 4:1 Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan formülasyonlar II	46
Tablo 5.8. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun ağırlık merkezi ve bileşenlerin yüzde değerleri	57
Tablo 5.9. Mikroemülsiyon formülasyonları için kullanılacak kısaltmalar	58
Tablo 5.10. Mikroemülsiyon formülasyonlarının fiziksel görünüşü	59
Tablo 5.11. Mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)	60

Tablo 5.12.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının PDI değerleri	62
Tablo 5.13.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri	63
Tablo 5.14.	SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	64
Tablo 5.15.	SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	64
Tablo 5.16.	SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	65
Tablo 5.17.	SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	65
Tablo 5.18.	KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	66
Tablo 5.19.	KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	66
Tablo 5.20.	KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	67
Tablo 5.21.	KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	67
Tablo 5.22.	SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	68
Tablo 5.23.	SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	68
Tablo 5.24.	SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	69
Tablo 5.25.	SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	69
Tablo 5.26.	KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	70
Tablo 5.27.	KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	70
Tablo 5.28.	KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	71
Tablo 5.29.	KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	71
Tablo 5.30.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının pH değerleri	72
Tablo 5.31.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri	73
Tablo 5.32.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının kararlılık çalışmaları için kullanılan kısaltmalar	76
Tablo 5.33.	Mikroemülsiyon formülasyonlarının fiziksel görünüşü	77
Tablo 5.34.	Keten yağı mikroemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	78
Tablo 5.35.	Soya yağı mikroemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	78
Tablo 5.36.	Ortalama damlacık büyüklüğünün aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	80
Tablo 5.37.	Two way ANOVA değerlendirme tablosu	81
Tablo 5.38.	Keten yağı mikroemülsiyonlarının PDI değerleri	83

Tablo 5.39. Soya yağı mikroemülsiyonlarının PDI değerleri	84
Tablo 5.40. Ortalama PDI değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	85
Tablo 5.41. Keten yağı mikroemülsiyonlarının zeta potansiyel değerleri	86
Tablo 5.42. Soya yağı mikroemülsiyonlarının zeta potansiyel değerleri	86
Tablo 5.43. Ortalama zeta potansiyel değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	88
Tablo 5.44. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	90
Tablo 5.45. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	90
Tablo 5.46. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	91
Tablo 5.47. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	91
Tablo 5.48. KMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	92
Tablo 5.49. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	92
Tablo 5.50. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	93
Tablo 5.51. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	93
Tablo 5.52. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	94
Tablo 5.53. SMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	94
Tablo 5.54. Keten yağı mikroemülsiyonlarının pH değerleri	95
Tablo 5.55. Soya yağı mikroemülsiyonlarının pH değerleri	95
Tablo 5.56. Ortalama pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	97
Tablo 5.57. Keten yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri	98
Tablo 5.58. Soya yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri	98
Tablo 5.59. Ortalama elektriksel iletkenlik değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	100
Tablo 5.60. Kararlılık çalışması sonrası formülasyonlarda etkin madde miktar tayini sonuçları	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Basit emülsiyon sistemi	3
Şekil 2.2. Misel ve ters misel yapı	5
Şekil 2.3. Winsor'un denge durumlarına dayalı mikroemülsiyon sınıflandırması	6
Şekil 2.4. Farklı tipteki mikroemülsiyon sistemleri	7
Şekil 2.5. YEM şematik gösterimi	9
Şekil 2.6. Üçgen faz diyagramı ve farklı fazların gösterimi	14
Şekil 2.7. Tekrarlayan düşüğü etkileyen faktörler	19
Şekil 4.1. SDS Elektroforez	32
Şekil 5.1. Üçgen faz diyagramında su tutma kapasitesi	44
Şekil 5.2. Üçgen faz diyagramında bileşenlerin işaretlenmesi	47
Şekil 5.3. Formülasyon hazırlanması için üçgen faz diyagramı içerisinde seçilen noktalar	48
Şekil 5.4. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	48
Şekil 5.5. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun olduğu bölge	49
Şekil 5.6. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	49
Şekil 5.7. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun olduğu bölge	50
Şekil 5.8. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	50
Şekil 5.9. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun olduğu bölge	51
Şekil 5.10. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	51
Şekil 5.11. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun olduğu bölge	52

Şekil 5.12. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	52
Şekil 5.13. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge	53
Şekil 5.14. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	53
Şekil 5.15. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge	54
Şekil 5.16. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	54
Şekil 5.17. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge	55
Şekil 5.18. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi	55
Şekil 5.19. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge	56
Şekil 5.20. SMB mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	60
Şekil 5.21. SMT mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	60
Şekil 5.22. KMB mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	61
Şekil 5.23. KMT mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı	61
Şekil 5.24. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	64
Şekil 5.25. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	64
Şekil 5.26. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	65
Şekil 5.27. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	65
Şekil 5.28. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	66
Şekil 5.29. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	66

Şekil 5.30. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	67
Şekil 5.31. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	67
Şekil 5.32. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	68
Şekil 5.33. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	68
Şekil 5.34. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	69
Şekil 5.35. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	69
Şekil 5.36. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)	70
Şekil 5.37. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)	70
Şekil 5.38. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)	71
Şekil 5.39. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	71
Şekil 5.40. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama)	72
Şekil 5.41. Mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri	73
Şekil 5.42. TGF- β 1 maddesinin FT-IR spektrumu	74
Şekil 5.43. TGF- β 1 maddesinin ^1H -NMR spektrumu	74
Şekil 5.44. TGF- β 1 maddesine ait korelasyon ve doğru denklemi	75
Şekil 5.45. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama damlacık büyüklüğü ve dağılımı	79
Şekil 5.46. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama damlacık büyüklüğü ve dağılımı	79
Şekil 5.47. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	81
Şekil 5.48. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	81
Şekil 5.49. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	82
Şekil 5.50. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	82
Şekil 5.51. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	82

Şekil 5.52. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	82
Şekil 5.53. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı	83
Şekil 5.54. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)	83
Şekil 5.55. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama PDI değerleri	84
Şekil 5.56. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama PDI değerleri	84
Şekil 5.57. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama zeta potansiyel değerleri	87
Şekil 5.58. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama zeta potansiyel değerleri	87
Şekil 5.59. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	90
Şekil 5.60. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	90
Şekil 5.61. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	91
Şekil 5.62. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	91
Şekil 5.63. KMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	92
Şekil 5.64. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	92
Şekil 5.65. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	93
Şekil 5.66. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	93
Şekil 5.67. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	94
Şekil 5.68. SMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi	94
Şekil 5.69. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama pH değerleri	96
Şekil 5.70. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama pH değerleri	96
Şekil 5.71. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama elektriksel iletkenlik değerleri	99
Şekil 5.72. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama elektriksel iletkenlik değerleri	99
Şekil 5.73. TGF- β 1 maddesinin FT-IR spektrumu	101
Şekil 5.74. SMT-25-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu	101
Şekil 5.75. KMT-25-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu	102

Şekil 5.76. SMT-4-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu	102
Şekil 5.77. KMT-4-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu	102
Şekil 5.78. TGF- β 1 maddesinin ^1H -NMR spektrumu	103
Şekil 5.79. SMT-25-3A formülasyonunun ^1H -NMR spektrumu	103
Şekil 5.80. KMT-25-3A formülasyonunun ^1H -NMR spektrumu	104
Şekil 5.81. SMT-4-3A formülasyonunun ^1H -NMR spektrumu	104
Şekil 5.82. KMT-4-3A formülasyonunun ^1H -NMR spektrumu	104
Şekil 5.83. TGF- β 1 içeren formülasyonların ve boş formülasyonların 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılığı	106

GÖRSELLER DİZİNİ

	Sayfa
Görsel 5.1. Tablo 5.6’da verilen oranlara göre hazırlanan formülasyonlar.....	46
Görsel 5.2. Tablo 5.7’de verilen oranlara göre hazırlanan formülasyonlar.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ΔG_1	: Yüzeyler arası serbest enerji
ΔG_2	: Damlacıklar arasındaki etkileşim
ΔG_3	: Damlacıkların dağılım entropisinin neden olduğu etki
ΔG_m	: Serbest enerji değişimi
APS	: Amonyum persülfat
BCS	: Biopharmaceutical classification system (Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi)
DCM	: Diklorometan
DLS	: Dynamic light scattering (Dinamik ışık saçılımı)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FBS	: Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)
FDA	: United States food and drug administration (Amerikan gıda ve ilaç dairesi)
FT-IR	: Fourier dönüşümlü infrared
HCl	: Hidroklorik asit
HLB	: Hydrophilic-lipophilic balance (Hidrofilik-lipofilik denge)
i.v.	: İntravenöz
KMB	: TGF- β 1 içermeyen keten yağı mikroemülsiyonu
KMT	: TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
MTT	: Metil tiazol tetrazolyum
NaOH	: Sodyum hidroksit
NK	: Natural killer (Doğal öldürücü)

NMR	: <i>Nuclear magnetic resonance</i> (<i>Nükleer manyetik rezonans</i>)
Ort.	: Ortalama
PDI	: Polidisperlik indisi
PEG	: Polietilen glikol
PIT	: Phase inversion temperature (<i>Faz dönüşüm sıcaklığı</i>)
PKOS	: Polikistik over sendromu
r	: Yarıçap
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
S/Y	: Yağ içinde su
SANS	: Small angle neutron scattering (<i>Küçük açılı nötron saçılımı</i>)
SAXS	: Small angle X-ray scattering (<i>Küçük açılı X-ışını saçılımı</i>)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat Sodyum lauril sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil poliakrilamit jel elektroforezi
SH	: Standart hata
SLS	: Static light scattering (<i>Statik ışık saçılımı</i>)
Span [®] 85	: Sorbitan trioleat
SS	: Standart sapma
SMB	: TGF- β 1 içermeyen soya yağı mikroemülsiyonu
SMT	: TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF- β	: Tranforme edici büyüme faktörü
TMB	: Tetrametilbenzidin
TNF	: Tümör nekroz faktörü
Tween [®] 80	: Polioksietilen-80-sorbitan monooleat

Y/S : Su içinde yağ
Y.YEM : Yardımcı yüzey etkin madde
YEM : Yüzey etkin madde

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gebelik, bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere anneye ait tüm sistemlerin fizyolojik uyumunu gerektirmektedir. Güçlü antimikrobiyel bağışıklık varlığında seçici immün tolerans, immünosüpresyon ve immünomodülasyon içeren başarılı ve sağlıklı gebelik oluşturmak ve sürdürmek gebelikte temel hedeftir. Karmaşık olan gebelik süreci annenin bağışıklık sisteminde farklı düzeylerde değişiklik içermektedir. Bu değişikliklerin çoğu kısmen anlaşılmış ve açıklanmış olmasına karşın, yapılan yeni çalışmalar gebelik sırasında annenin dolaşımındaki immün hücre sayısında, fenotipinde ve çözünebilir faktör üretim yeteneğinde farklılığa uğradığını göstermektedir.

Tekrarlayan düşük genellikle üç ya da daha fazla düşük yapılması olarak tanımlanır ve en önemli nedenleri arasında kromozal/genetik anomali ve otoimmün sistem kaynaklı durumlar gösterilebilir. Tekrarlayan düşük ve başarısız tüp bebek tedavisi aynı karakteristik özelliklere sahip olduğu için, özellikle embriyoda erken immün aracılı hasar her iki tipte de önemli rol oynamaktadır. Belirli bir nedeni olmayan tekrarlayan düşük, trofoblast ve erken embriyoya karşı anneye ait doğal öldürücü (NK) ve T hücre aktivitesi kaynaklı da olabilir.

İmmün bozukluklar tekrarlayan düşüklüklerde önemli role sahiptir ve yüksek NK hücre aktivitesi, bu durumla ilgisi olan en önemli etiyolojilerden biridir. Tekrarlayan düşüklü hastalar yüksek NK hücre aktivitesi ile ilişkilendirilmiş ve çeşitli immünoterapi yöntemleri denenmiştir. Farklı teorik ilke ve klinik verilerle yüksek endometriyal immün aktiviteyi azaltmayı hedefleyen tedavi yöntemleri başarıya ulaşmıştır. Son çalışmalar farklı immün hücrelerin ve proteinlerin normal gebeliğin erken aşamasında etkili olduğunu göstermiştir.

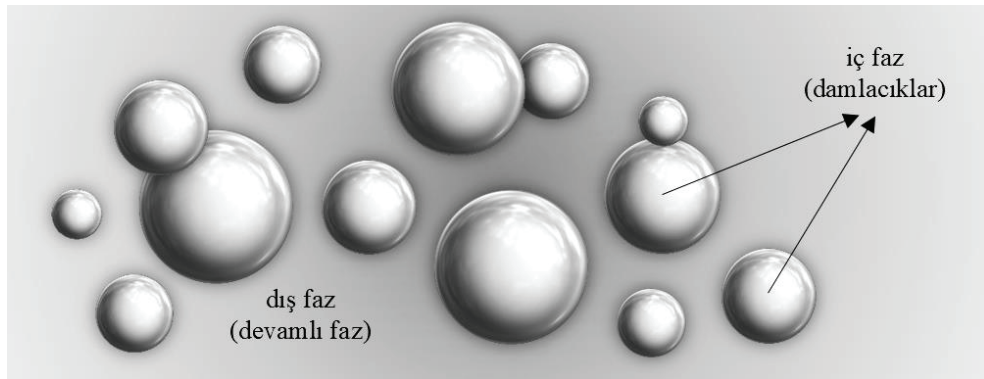
Yardımcı üreme tekniği olarak seminal faktörlerin eklenmesi fare, sıçan, hamster, koyun ve insanlarda sağlıklı gebelik oluşum oranında önemli düzeyde artış gösterdiğinden, bu çalışmada fonksiyonel immün tolerans gelişmesi için TGF- β 1 proteini içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır. Ejakülatın içerisinde immünosüpresan etkili TGF- β 1 proteini yüksek miktarda bulunduğu için intrauterin ejakülat uygulama sonrası döllenmiş ovaryumun rahme tutunma şansı artmaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında TGF- β 1 içeren formülasyonlarla birlikte ejakülat içeren formülasyonlarla da çalışılmış, ejakülatın içerisinde TGF- β 1 proteininin ekstraksiyonu için yöntemler geliştirilmiş, elde edilen ideal formülasyonlarda karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

Fitoöstrojenik etkiye sahip olması nedeniyle mikroemülsiyonda yağlı faz olarak soya ve keten tohumu yağı kullanılmıştır. Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının tekrarlayan düşük ve başarısız tüp bebek tedavisindeki rolünün belirlenebilmesi için sıçanlarda inseminasyon yöntemi kullanılarak embriyo implantasyonuna etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Emülsiyon Sistemler

Emülsiyonlar birbiriyle karışmayan iki veya daha fazla sıvının, birbiri içinde damlacıklar halinde dağıldığı, homojen görünümlü heterojen sistemlerdir (Çelebi, 2007). Emülsiyonlar, hidrofilik ve lipofilik özellikte iki fazdan meydana gelir (Şekil 2.1). Dış faz aynı zamanda sürekli faz olarak da adlandırılır ve iç faz dış fazın içerisinde damlacıklar halinde dağılmıştır (Yazan, 2002a; Yazan, 2012).



Şekil 2.1. Basit emülsiyon sistemi (Yazan, 2012)

Emülsiyonlar, damlacık büyüklüklerine göre üç başlık altında incelenebilir;

- Makroemülsiyonlar
- Nanoemülsiyonlar
- Mikroemülsiyonlar

Makroemülsiyonlar, damlacık büyüklüğü 100 nm ile 500 μ m arasında değişen emülsiyon sistemleridir. Bu damlacık büyüklüğü ışık saçılmasına izin vererek beyaz renkte görünmelerini sağlar. Nanoemülsiyonların damlacık büyüklüğü 20 - 200 nm arasında değişkenlik gösterir ve makroemülsiyonlara göre daha küçüktür yapıdadır. Nanoemülsiyonlarda damlacık büyüklüğü 80 nm'ye yaklaştığında bulanıklık görülür. Bu boyutun daha da üzerinde; mikron seviyesinde önemli miktarda saçılma nedeniyle beyaz görünürler (Bouyer vd., 2012; Burguera ve Burguera, 2012).

Mikroemülsiyon ilk olarak Hoar ve Schulman'ın bütanol, pentanol, hekzanol kısa zincirli alkanollerin varlığında emülsiyonların çok daha küçük boyutlu damlacıklara sahip çözeltilere dönüştüğünü gözlemlmeleriyle ortaya çıkmıştır. Nanoemülsiyonlar damlacık büyüklüğü, içeriğindeki su, yağ ve yüzey etkin madde (YEM)'den dolayı

mikroemülsiyonlara benzemektedir. Nanoemülsiyonlar mekanik güç ile oluşturulurken, mikroemülsiyon fazları kendiliğinden meydana gelir. Başka bir deyişle uygun miktarda su, yağ ve YEM içeren bir karışımdan spontan olarak mikroemülsiyon elde edilebilir. Bu yüzden mikroemülsiyonlar ile diğer emülsiyonlar arasındaki en büyük farklılık emülsiyonların içeriğinden ziyade, termodinamik karakterinden ileri gelmektedir (Paul ve Moulik, 1997; Taha vd., 2001; Singh vd., 2011; Singh vd., 2014; Serdaroğlu, Öztürk ve Kara, 2015). Makroemülsiyon, nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon sistemlerin özellikleri ve aralarındaki temel farklılıklar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

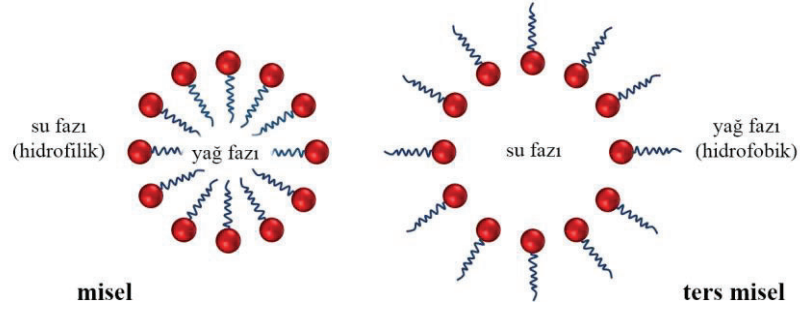
Tablo 2.1. *Emülsiyon sistemlerin özellikleri (Burguera ve Burguera, 2012)*

Parametre	Makroemülsiyon	Nanoemülsiyon	Mikroemülsiyon
Oluşma	Mekanik güç ile	Mekanik güç ile	Kendiliğinden
Termodinamik kararlılık	Kararsız	Kararsız	Kararlı
Damlacık büyüklüğü	100 nm - 500 µm	20 - 200 nm	10 - 100 nm
Görünüş	Opak (Beyaz)	Opak (Beyaz)	Berrak

2.1.1. Mikroemülsiyon sistemler

Mikroemülsiyonlar, su ve yağ gibi birbiriyle karışmayan iki sıvının, YEM ve yardımcı yüzey etkin madde (Y.YEM) yardımı ile tek faz haline getirildiği, su ve yağ fazı arasındaki yüzeyin sürekli ve kendiliğinden dalgalandığı dinamik sistemlerdir. Bu sistemler makroskobik olarak homojen görünümlü olsa da mikroskobik olarak heterojen sistemlerdir (Singh vd., 2011; Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013).

Mikroemülsiyonlar, sudaki YEM’lerin kümelenmesiyle oluşan en küçük agregat olan misellerden oluşur. Miseller, su içinde dağılmış yağ damlacıkları (Y/S) ve ters miseller ise yağ içinde dağılmış su damlacıkları (S/Y) olarak düşünülebilir (Şekil 2.2). Mikroemülsiyonlar, misellerden daha büyük damlacık büyüklüğüne sahip oldukları için “şişkin misel” olarak da bilinirler. Mikroemülsiyon elde edebilmek için belirli maddeleri belirli oranlarda karıştırma gerekliliği, mikroemülsiyon ve miseller yapı arasındaki en büyük farktır (Chevalier ve Zemb, 1990; Yazan, 2002a; Dhanapal, 2012).



Şekil 2.2. Misel ve ters misel yapı (<http-1>)

Mikroemülsiyonlar, potansiyel olarak umut vaat etmesi ve üstünlükleri nedeniyle birçok araştırmaya konu olmuştur. Geleneksel dozaj şekillerine göre sağladıkları üstünlükler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Mikroemülsiyonlar hazırlanma sırasında enerjiye ihtiyaç duymaz,
- Mikroemülsiyonlar termodinamik olarak kararlı bir sistem olup, sistemin kendiliğinden emülsiyonlaşmasına izin verir,
- Arttırılmış etkin madde çözünürlüğü ve arttırılmış biyoyararlanıma sahiptir,
- Lipofilik veya hidrofilik olan dağılmış faz; lipofilik veya hidrofilik etkin maddeler için potansiyel bir taşıyıcı sistemdir,
- Mikroemülsiyonlar, etkin maddeler için süper çözücü gibi davranırlar. Hem hidrofilik hem de hidrofobik çözücülerde nispeten çözünmeyen etkin maddeler de dahil olmak üzere hidrofilik ve lipofilik etkin maddeler taşınabilir,
- Mikroemülsiyondaki damlacıkların ortalama çapı 0,22 µm'nin altındadır. Bu nedenle filtrasyon yoluyla sterilize edilebilir,
- İstenmeyen tatların maskelenmesine yardımcı olur,
- Y/S tipi mikroemülsiyonlar, yağ fazındaki etkin maddeyi hidroliz ve oksidasyondan korur (Patravale ve Date, 2009; Singh vd., 2011; Dhanapal, 2012; Singh ve Chauhan, 2013; Singh vd., 2014; Kamaria vd., 2015).

Mikroemülsiyonların sahip olduğu sakıncalar ise şu şekildedir;

- Damlacıkların kararlılığı için yüksek oranda YEM ve Y.YEM kullanılır,
- Mikroemülsiyonların kararlılığı, pH ve sıcaklık gibi çevresel parametrelere bağlı olarak değişebilir,
- Kullanılan yüksek orandaki YEM ve Y.YEM toksik özellik gösterebilir (Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013; Singh vd., 2014; Kamaria vd., 2015).

2.1.2. Mikroemülsiyonların sınıflandırılması

Düşük YEM konsantrasyonunda fazlar arasında genellikle “Winsor fazları” olarak adlandırılan bir denge durumu söz konusudur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Winsor'un denge durumlarına dayalı mikroemülsiyon sınıflandırması (Peng vd., 2011)

Bu denge durumunda;

- Winsor I'de iki faz denge halindedir. Denge durumunun altında yer alan Y/S mikroemülsiyonu, denge durumunun üstünde yer alan yağ ile denge halindedir.
- Winsor II'de iki faz denge halindedir. Denge durumunun üstünde yer alan S/Y mikroemülsiyonu, denge durumunun altında yer alan su ile denge halindedir.
- Winsor III'de üç faz denge halindedir. Ortada yer alan geçişli (bikontinyus) mikroemülsiyon; en üstte yer alan yağ ve en altta yer alan su ile denge halindedir.
- Winsor IV'de yağ, su ve YEM tek faz görünümlü homojen bir sistemdir (Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013; Kamaria vd., 2015).

2.1.2.1. Y/S mikroemülsiyonu: Winsor I

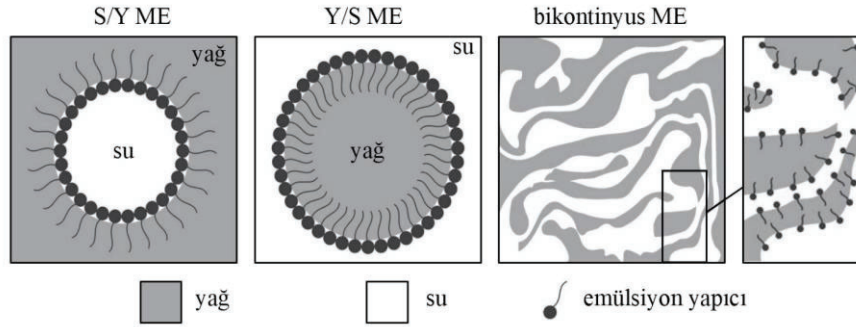
Y/S tipi mikroemülsiyonlarda iç fazı oluşturan yağ damlacıklarının etrafı, devamlı faz olan suda dağılmış haldeki YEM ile çevrilir. Bu tip mikroemülsiyon genellikle S/Y mikroemülsiyonlardan daha büyük bir etkileşim hacmine sahiptir (Singh vd., 2014).

2.1.2.2. S/Y mikroemülsiyonu: Winsor II

S/Y tipi mikroemülsiyonlarda su damlacıklarının etrafı devamlı faz olan yağ ile kaplanmıştır. Ters misel olarak bilinen bu tip mikroemülsiyonlarda, YEM'in hidrofilik baş kısmı (polar) su damlacıklarına yönelmişken, lipofilik kuyruk kısmı (apolar) ise yağ fazına yönelmiştir (Singh vd., 2014).

2.1.2.3. Geçişli mikroemülsiyon: Winsor III

Geçişli (bikontinyus) mikroemülsiyonların içerdikleri su ve yağ miktarları birbirine çok yakındır. Bu durumda, hem su hem de yağ devamlı faz olarak bulunur ve damlacık yapısından söz edilemez. Sünger şeklinde görünen düzensiz yağ ve su kanalları sürekli hareket halindedir (Singh vd., 2014). Şekil 2.4'te S/Y ve Y/S tipi mikroemülsiyonların fazları ile geçişli mikroemülsiyonların yapısındaki kanallarda emülsiyon yapıcı olarak kullanılan YEM'in yerleşim düzeni görülmektedir.



Şekil 2.4. Farklı tipteki mikroemülsiyon sistemleri (Khodakiya vd., 2012)

2.1.2.4. Tek faz görünümlü mikroemülsiyon: Winsor IV

Su, yağ ve YEM/Y.YEM'in homojen olarak karıştığı tek faz görünümlü mikroemülsiyon sistemleridir. Winsor IV sınıflandırmasına göre oluşan mikroemülsiyon Y/S yada S/Y tipinde olabilir. Ortamda, Winsor I durumunda olduğu gibi fazla miktarda yağ ya da Winsor II durumunda olduğu gibi fazla miktar su yoktur (Singh vd., 2014).

2.1.3. Mikroemülsiyon bileşenleri

Mikroemülsiyon sistemleri temel olarak 4 bileşenden oluşur.

- Sulu faz
- Yağlı faz
- YEM
- Y.YEM

Formülasyonda yer alan temel bileşenler ve diğer yardımcı maddeler biyolojik olarak uyumlu, klinik olarak kabul edilebilir ve toksik özellikleri en az seviyede olmalıdır (Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013; Singh vd., 2014).

2.1.3.1. Sulu faz

Sulu faz olarak genellikle su kullanılsa da, polar fonksiyonel grupları yardımıyla suyla karışabilen hidrofilik sıvılar da kullanılabilir. Aynı zamanda suda çözünen etkin maddeler, bu maddelerin çözeltileri ve koruyucu maddeler de sulu fazı oluşturabilir. Bazı durumlarda su fazı olarak tampon çözeltilerinin kullanıldığı formülasyonlara da rastlamak mümkündür (Yazan, 2002a; Singh vd., 2014).

2.1.3.2. Yağlı faz

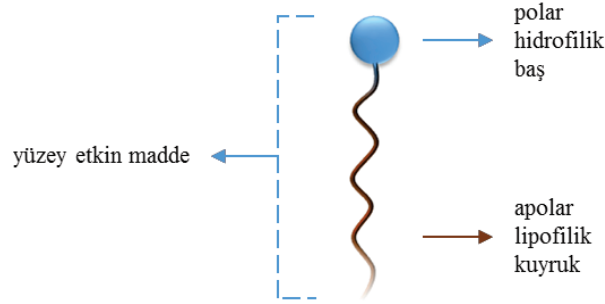
Yağ, su ile az karışan ve düşük polariteye sahip bir sıvı olarak tanımlanır. Yağlar sadece lipofilik etkin maddeleri çözebildiği için değil, aynı zamanda bağırsak lenf sistemiyle taşınan lipofilik etkin maddelerin fraksiyonunu arttırdığı için de kullanılır. Yağlı faz olarak, su ile karışmayan nonpolar özellikte ve lipofil grup içeren maddeler kullanılır. Kullanılacak yağ, etkin maddenin çözünürlüğüne göre seçilir. Çözünürlüğün fazla olduğu yağın kullanılması, yüklenen etkin maddenin uygun terapötik dozuna daha az miktarda formülasyon ile ulaşılmasını sağlar. Yağlı faz olarak bitkisel yağlar, sentetik yağlar, hidrokarbonlar, yağ asitlerinin esterleri, doymuş ve doymamış yağlar kullanılabilir (Yazan, 2002a; Çelebi, 2007; Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013). Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan yağlara örnekler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan yağlar (Patravale ve Date, 2009)

Genel Sınıf	Örnek
Sabit yağlar	Soya yağı Hint yağı
Orta zincirli trigliseritler	Kaprik/Kaprilik asit trigliseritleri (Miglyol® 810, Miglyol® 812, Labrafac™ CC)
Uzun zincirli monogliseritler	Gliseril monooleat (Peceol™)
Propilen glikol yağ asidi esterleri	Propilen glikol monokaprilat (Capryol™ 90) Propilen glikol monolaurat (Lauroglycol™ 90) Propilen glikol dikaprilat/kaprat (Miglyol® 840)
Yağ asidi esterleri	Etil oleat İzopropil miristat (IPM) İzopropil palmitat (IPP)
Yağ asitleri	Oleik asit Kaprilik asit
Vitaminler	Vitamin E

2.1.3.3. YEM

YEM, mikroemülsiyon sistemleri hazırlanırken yüzeyler arası gerilimi düşürerek su ve yağ fazının birbiriyle karışmasını sağlar. Bu sayede, homojen ve kararlı emülsiyon elde edilmiş olur. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi YEM, hidrofilik bir baş ve lipofilik bir kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bu sayede hem polar hem de apolar çözücülere afiniteleri vardır (Yazan, 2002a; Singh vd., 2014; Kamaria vd., 2015).



Şekil 2.5. YEM şematik gösterimi (<http-2>)

Mikroemülsiyonların hazırlanmasında çok farklı tipte YEM kullanılabilir. Bu maddeler katyonik, anyonik, iyonik olmayan ve amfoterik olarak sınıflandırılabilir. Hidrofilik başın sahip olduğu yüke göre anyonik veya katyonik özellik gösterir. Herhangi bir yük taşımayanlar iyonik özellikte, hem pozitif hem negatif yük taşıyanlar ise amfoterik özelliktedir (Yazan, 2012; Muzaffar, Singh ve Chahan, 2013). Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan YEM'lere örnekler Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan YEM'ler (Patravale ve Date, 2009)

Genel Sınıf	Örnek
Polisorbatlar	Polioksietilen-20-sorbitan monooleat (Tween® 80) Polioksietilen-20-sorbitan monolaurat (Tween® 20)
Sorbitan esterleri	Sorbitan monooleat (Span® 80) Sorbitan monostearat (Span® 60)
Polietilen oksit - polipropilen oksit blok kopolimerleri	Poloxamer 188 (Pluronic® F 68) Poloxamer 407 (Pluronic® F 127)
Polioksietilen alkil eter	Polioksietilen-10-oleil eter (Brij® 96 V)
Polioksietilen kastor yağı	Polioksietilen-35-kastor yağı (Cremphore EL®)
Fosfolipitler	Soya lesitini Diöleoil fosfatidil kolin

2.1.3.4. Y.YEM

Tek zincirli YEM'ler, mikroemülsiyon oluşumu için yüzeyler arası gerilimini yeterince düşüremezler. Formülasyona Y.YEM ilavesi, arayüzey filminin farklı eğimler alması için esnek olmasını sağlar. Amfifilik doğasından ötürü, Y.YEM yüzeyler arasında birikir ve mikroemülsiyon damlacıkları etrafındaki YEM tabakasına nüfuz ederek yüzeyler arasında oluşan filmin akışkanlığını arttırarak etki gösterir. Ara yüzey akışkanlığını arttırmaya yardımcı olarak genellikle etanol, butanol ve izopropanol gibi kısa zincirli alkoller, polietilen glikol ve propilen glikol gibi glikoller, orta zincirli alkoller, aminler veya asitler kullanılır (Tablo 2.4) (Khodakiya vd., 2012; Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013; Kamaria vd., 2015).

Ruth ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Y.YEM olarak kullandıkları etanol ve butanolun mikroemülsiyon formülasyonuna etkisini incelemiştir. Mikroemülsiyon oluşması için gereken etanol miktarının, butanolden 7 kat fazla olduğunu gözlemlemiştir. Bu duruma, su fazı ile yüzeyler arasındaki alkol dağılımının hidrofilik özellikte olmasının sebep olduğu düşünülmüştür. Etanol ile butanolun ara yüzey/su dağılım oranı karşılaştırıldığında, etanolün oranı butanole göre çok düşüktür. Bu nedenle suda çok çözünen butanolun yarattığı etkiyi oluşturabilmek için çok daha fazla miktarda etanol kullanılması gerekmiştir (Güven, 2017).

Tablo 2.4. Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan Y.YEM'ler (Patravale ve Date, 2009)

Genel Sınıf	Örnek
Kısa Zincirli Alkol	Etanol, Butanol, Benzil alkol, İzopropanol
Alkendiol ve Alkentirol	Propilen glikol (PG) Gliserol Bütilen glikol
Polietilen glikol (PEG)	PEG 400
Glikol eter	Dietilen glikol monoetil eter (Transcutol®) Tetrahidrofurfuril PEG eter (Tetraglikol veya Glikofurol)
Pirolidon türevleri	N-metil pirolidon (Pharmasolve™) 2-pirolidon (Soluphor P)
Safra tuzları	Sodyum deoksikolat
Organik asit ve tuzları	Kaprilik asit Sodyum kaprilat Potasyum sorbat

2.1.4. Hidrofilik-lipofilik denge sistemi

Griffin'in 1949 yılında yaptığı tanıma göre, hem hidrofilik hem de lipofilik grupları bir araya getiren emülsiyon yapıcılarda, bu iki karışık grubun boyut ve dayanım dengesine hidrofilik-lipofilik denge (HLB) denir. Kullanımda kolaylık sağlaması için, emülsiyon yapıcının hidrofilik ve lipofilik gruplarının etkin dengelerine 1 ve 20 arasında sayısal değer verilmiş ve bir cetvel oluşturulmuştur. Bu sayısal değerler, amfifilik molekülün hidrofilik kısmının yüzde ağırlığının beşe bölünmesi ile elde edilir. Yüksek HLB değerine sahip emülsiyon yapıcılar ($HLB > 8$) hidrofilik özelliğe sahip olup Y/S tipi emülsiyonların oluşmasına neden olurken, düşük HLB değerine sahip emülsiyon yapıcılar ($HLB \leq 6$) lipofilik özelliktedir ve S/Y tipi emülsiyonların oluşmasına neden olur. Hidrofilik ve lipofilik özellik gösteren YEM'lerin karışım halinde beraber kullanımları ile daha dayanıklı Y/S emülsiyonlarının oluştuğunu gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Ancak, hazırlanan YEM karışımının HLB değerini bulmak için basit hesaplamalar yapmak gerekir. Dayanıklı emülsiyonların oluşturulabilmesi için bir diğer önemli faktör yağ fazının HLB değeridir. Bu değere eşit HLB'ye sahip YEM ya da karışımı kullanılmalıdır (Sajjadi vd., 2003; Pasquali, Taurozzi ve Bregni, 2008; Schmidts vd., 2009).

2.1.5. Mikroemülsiyon oluşum teorileri

Mikroemülsiyon oluşum teorileri üç ana başlığa ayrılır.

- Ara yüzey ya da karışık film teorisi
- Çözünürlük teorisi
- Termodinamik teori (Paul ve Moulik, 1997)

2.1.5.1. Ara yüzey ya da karışık film teorisi

Schulman vd. ve Prince tarafından ortaya atılan karışık film teorisinde, ara yüzey filminin, su ve yağ fazı yüzeylerinde farklı özelliklere sahip çift tabakalı bir film olduğu düşünülmektedir (Paul ve Moulik, 1997).

2.1.5.2. Çözünürlük teorisi

Çözünürlük teorisi ilk olarak Gillberg vd. ve Shinoda vd. tarafından öne sürülmüştür. Bu teoriye göre mikroemülsiyonlar, su ve yağın misel yapılarda çözündüğü şişkin miseller sistemlerdir (Paul ve Moulik, 1997).

2.1.5.3. Termodinamik teori

Ruckenstein vd. ve Overbeck tarafından öne sürülen termodinamik teoriye göre mikroemülsiyonların termodinamik olarak kararlı olmaları için serbest enerjinin negatif değere sahip olması gerekmektedir.

Mikroemülsiyon oluşumdaki serbest enerji;

ΔG_1 : Yüzeyler arası serbest enerji

ΔG_2 : Damlacıklar arasındaki etkileşim

ΔG_3 : Damlacıkların dağılım entropisinin neden olduğu etki

olmak üzere 3 bileşenden oluşur.

Damlacık yarıçapıyla (r) serbest enerjideki değişim (ΔG_m) bir eşitlik ile verilecek olursa Eşitlik 2.1 elde edilir;

$$\Delta G_m(r) = \Delta G_1 + \Delta G_2 - \Delta G_3 \quad (2.1)$$

Bu eşitliğe göre, kararsız haldeki yapının önce kinetik olarak kararlı hale geldiği ardından da termodinamik olarak kararlı hale geldiği görülmüştür.

YEM ve Y.YEM'in yüzeyler arasında birikmesi, ara yüzey geriliminde önemli azalmaya neden olur ve toplam ΔG 'yi negatif hale getirmek için yüzeyler arasındaki toplam geriliminin neden olduğu pozitif serbest enerjiyi aşabilir. Böylece serbest enerjideki değişim negatif bir değer olarak termodinamik açıdan kararlı hale gelen mikroemülsiyon kendiliğinden oluşur. Ruckenstein ve arkadaşlarının bu teorisi, mikroemülsiyon oluşumunda yüzeyler arası gerilimin önemini vurgulamaktadır. Termodinamik teoriye göre negatif dinamik yüzeyler arası bir gerilim oluşabilir; ancak, Y/S tipi emülsiyonlar denge durumunda az da olsa pozitif bir değere sahiptir (Paul ve Moulik, 1997).

2.1.6. Mikroemülsiyon hazırlama yöntemleri

Mikroemülsiyon, yağ ve su fazı arasındaki yüzey gerilimi çok düşük seviyeye ulaştığında elde edilebilir. Yüzeyler arasındaki film tabakası çok esnek tutulmalı ve kullanılan YEM/Y.YEM miktarı, mikroemülsiyonun yüzeyler arasındaki gerilimini oldukça düşük seviyede tutması için yeterince yüksek olmalıdır. Mikroemülsiyon hazırlanmasında iki farklı yöntem vardır.

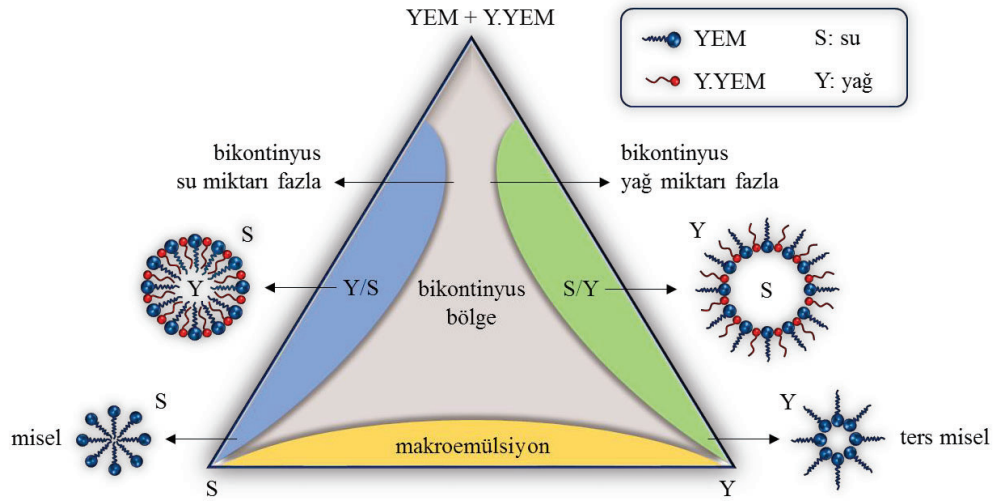
- Faz dönüştürme yöntemi
- Faz titrasyon yöntemi

2.1.6.1. Faz dönüştürme yöntemi

Faz dönüştürme yönteminde mikroemülsiyonların faz dönüşümü, fazla miktarda dağılan fazın ortama eklenmesiyle meydana gelir. Faz dönüşümü sırasında hem *in vitro* hem de *in vivo* ilaç salımını etkileyebilecek parçacık büyüklüğündeki değişiklikler de dahil olmak üzere çok hızlı fiziksel değişiklikler meydana gelir. İyonik olmayan YEM'ler için bu dönüşüm sıcaklık değişimiyle elde edilir. Düşük sıcaklıktaki Y/S tipi mikroemülsiyonu yüksek sıcaklıktaki S/Y tipi mikroemülsiyonuna geçişe zorlanır. Soğutma sırasında mikroemülsiyon sistemi sıfır spontan eğrilik noktasına ve minimum yüzey gerilimine geçerek iyi bir dağılımla yağ damlacıklarının oluşumunu sağlar. Bu yöntem faz dönüşüm sıcaklığı (PIT) yöntemi olarak da bilinir. Sıcaklık dışında, pH değeri veya tuz konsantrasyonu gibi diğer parametreler de bu dönüşümde etkili olabilir. Ayrıca, eğriliğin spontan yarıçapındaki bir geçiş, kullanılan su miktarı değiştirilerek de elde edilebilir. Mikroemülsiyonun yağ fazına su ekleyerek, öncelikle devamlı faz olan yağ fazında su damlacıkları oluşması sağlanır. Su miktarının yavaş yavaş arttırılmasıyla, dönüşüm noktasında emülsiyon yapıcının kendiliğinden eğriliği değişir ve başlangıçta S/Y tipinde olan mikroemülsiyonun Y/S tipi mikroemülsiyona dönüştüğü görülür (Singh vd., 2014).

2.1.6.2. Faz titrasyon yöntemi

Mikroemülsiyonlar, kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi (faz titrasyon yöntemi) ile hazırlanabilir ve faz diyagramları yardımıyla gösterilebilir. Faz diyagramının oluşturulması, farklı bileşenler karıştırıldığında aralarındaki etkileşimleri incelemek için kullanılabilen faydalı bir yöntemdir. Mikroemülsiyonlar, her bileşenin kimyasal yapısına ve konsantrasyonuna bağlı olarak oluşur. Faz dengesinin anlaşılması ve faz sınırlarının sınırlandırılması, faz diyagramı oluşturma temel amacıdır. Kuaterner faz diyagramı (dört bileşenli sistem) zaman alıcı ve yorumlanması zor olduğu için, üç bileşenli sistem olan üçgen faz diyagramının kullanımı daha çok yaygınlaşmıştır. Üçgen faz diyagramının her bir köşesi belirli bileşenin %100'ünü temsil edecek şekilde tasarlanmış ve diyagramda mikroemülsiyon bölgesi dahil olmak üzere farklı bölgeleri bulmak için yapılandırılmıştır (Şekil 2.6). Üçgen faz diyagramları, YEM-Y.YEM-yağ karışımının su ile titre edilmesiyle yada su-yağ-YEM karışımının Y.YEM ile titrasyonu ile elde edilir. Her ikisinde de mikroemülsiyonun berrak kaldığı bölge dikkate alınır. (Çelebi, 2007; Singh vd., 2011; Singh vd., 2014).



Şekil 2.6. Üçgen faz diyagramı ve farklı fazların gösterimi (Akter vd., 2013)

2.1.7. Mikroemülsiyon karakterizasyonu

Mikroemülsiyon sistemlerin karakterizasyon çalışmaları yapılarındaki çeşitlilik ve karmaşıklıktan dolayı zor olsa da, genellikle sahip oldukları fizikokimyasal özelliklere bağlı olarak birçok farklı teknikle gerçekleştirilebilir (Yazan, 2002a; Kamaria vd., 2015).

2.1.7.1. Fiziksel görünüş

Mikroemülsiyon sistemler optik olarak berrak, akışkan ve homojen görünüme sahip olmalı; zaman içerisinde faz ayrımı, faz dönüşümü ve kremalaşma gibi istenmeyen kararlılık sorunları oluşmamalıdır (Singh vd., 2014).

2.1.7.2. Damlacık büyüklüğü

Mikroemülsiyon sistemlerde damlacık büyüklüğünde görülen değişimlerin hem formülasyonun fiziksel görünüşünü değiştirdiği hem de herhangi bir kararsızlık sorununa işaret edebileceği unutulmamalıdır. Küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS), küçük açılı nötron saçılımı (SANS), statik ışık saçılımı (SLS) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) gibi ışık saçılımı yöntemleri mikroemülsiyonların boyut ve şekil karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerdir. Bu tekniklerin temel ilkesi, bir ışın demetinin örnek üzerine uygulanması sonucu saçılan ışın yoğunluğunun ve açısının kaydedilmesine dayanmaktadır. Saçılım, radyasyonun farklı kırılma indeksi (ışık saçılması), elektron yoğunluğu (X-ışını saçılması) veya nükleer kompozisyon (nötron saçılması) bölgeleriyle etkileşiminden kaynaklanır (Gradzielski, 2008).

SAXS tekniğinde düşük açılardaki kaydedilmiş saçılma profili; parçacık ya da damlacıkların şekil, boyut ve nano yapısı hakkında bilgi verir. Mikroemülsiyon damlacıklarının şekli ve büyüklüğünün belirlenmesinde SAXS'in uygulanması, yağ ve su fazlarının X-ışınlarını saçma kabiliyetindeki farka dayanır. Foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinen DLS yönteminde Brown hareketi altındaki damlacıkların hidrodinamik yarıçaplarının ölçülmesiyle mikroemülsiyonlarda damlacık büyüklüğü analiz edilebilir (Acharya ve Hartlery, 2012; Kamaria vd., 2015).

2.1.7.3. Zeta potansiyel

Zeta potansiyel, damlacık ya da parçacık yüzeyi ile elektronötral bölge arasındaki potansiyel farkıdır. Zetametre ile ölçülür ve birimi milivolttur (mV). Mikroemülsiyon kararlılığının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Ne kadar yüksek olursa, damlacık dağılımının dayanıklılığı da o kadar iyidir (Çelebi, 2004).

2.1.7.4. Reoloji

Mikroemülsiyonların reolojik özellikleri mevcut damlacıkların türüne, şekline, yoğunluğuna ve bu damlacıklar arasındaki etkileşime bağlıdır. Bu nedenle, mikro yapıda gerçekleşen değişimler reolojiye de yansır. Geçişli mikroemülsiyonlar düşük kayma hızından orta kayma hızına doğru Newton akış özelliği gösterir. Diğer yandan Y/S veya S/Y tipindeki mikroemülsiyonlar, daha geniş bir kayma hızında Newton davranış göstermektedir. Ancak, bu özellikler, mikroyapıdaki küçük değişiklikleri algılamak için yeterince duyarlı değildir. Mikroemülsiyon yapısının tanımlanması ve mikroemülsiyon tipinin değişmesi reolojik verilere dayanarak yapılamaz. Bu yüzden, reolojik özellikler mikroemülsiyonların karakterizasyonu için diğer tekniklerle birlikte kullanılır. (Acharya ve Hartlery, 2012).

2.1.7.5. Elektriksel iletkenlik

Elektriksel iletkenlik, mikroemülsiyon karakterizasyonu için ucuz ve basit bir yöntemdir. Bu karakterizasyon yönteminde sulu faz, yağlı faz ya da her iki fazın da sürekli olup olmadığını anlaşılır. İletkenlik ölçümü, mikroemülsiyon tipini belirlemek ve bileşimindeki ya da sıcaklıktaki değişikliklerden kaynaklanan faz sınırlarını tahmin etmek için kullanılır (Acharya ve Hartlery, 2012).

2.1.7.6. pH

Hazırlanacak mikroemülsiyonun pH'sı uygun yardımcı maddeler kullanılarak uygulanacak bölgenin özelliklerine göre tasarlanıp değiştirilebilir. Mikroemülsiyonda gerçekleşebilecek olası pH değişimleri kararlılık çalışmaları kapsamında da incelenmesi gereken önemli bir özelliktir (Attwood, 1992).

2.1.8. Mikroemülsiyon uygulama yolları

Mikroemülsiyon sistemler farmasötik alanda büyük bir potansiyele ve ilgiye sahiptir. Topikal, oral, oküler, parenteral ve nazal olmak üzere çok farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Örneğin mikroemülsiyonların oral yolla uygulanması, peptit ve protein gibi ilaçların taşınmasına imkan sağlar. Peptitler ve proteinler genellikle oral yolla verildiğinde gastrointestinal sistemde bozunurlar ve terapötik açıdan istenen etkiyi gösteremezler. Bu tür moleküllerin mikroemülsiyon sistemleri içerisinde kullanılarak verilmesi biyoyararlanımı artırır. (Kamaria vd., 2015)

2.1.8.1. Topikal uygulama

Mikroemülsiyon sistemler çözelti, jel veya krem gibi sıvı veya yarı-katı klasik ilaç taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığında, etkin maddenin deriden geçiş özelliklerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Mikroemülsiyonların hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddelerin aynı formülasyonda verilmesine olanak sağlama özellikleri, topikal uygulama için bu taşıyıcı sistemlere üstünlük sağlar. Etkin maddelerin topikal uygulanması sonucu, etkin madde diğer yöntemlerde olduğu gibi karaciğerden ilk geçiş etkisine uğramaz, gastrointestinal sistemde bozunması önlenir ve böylece olası toksik etkilerin de önüne geçilmiş olur. Bu özelliklerinden dolayı da topikal uygulama diğer uygulama yollarına göre üstünlük gösterir.

Topikal uygulamada normal işlevini bozmadan cildin bariyer özelliğinin üstesinden gelmek gereklidir. Cilt kanseri, akne, sedef hastalığı, egzama ve mikrobiyal ya da fungal enfeksiyonlar gibi çeşitli dermatolojik durumlarda topikal uygulama gereklidir. Topikal uygulamanın temel amacı, en az sistemik absorpsiyon ile etkin maddeyi ciltteki patolojik bölgeye hedeflemektir. Topikal uygulama yüksek miktarda ilk geçiş etkisine maruz kalan ve advers sistemik etkiye sahip etkin maddeler için tercih edilen bir yöntemdir (Patravale ve Date, 2009; Khodakiya vd., 2012; Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013).

2.1.8.2. Oral uygulama

Geleneksel oral dozaj şekillerine göre mikroemülsiyon formülasyonları, arttırılmış absorpsiyon, geliştirilmiş klinik potens ve azaltılmış ilaç toksisitesi gibi özellikleriyle birçok avantaj sağlar. Etkin maddenin gastrointestinal sıvıdaki kararsız yapısı veya düşük çözünürlüğe sahip olması ilaç etkinliğini oldukça sınırladığı için, oral kullanımla etkili bir sistem geliştirilmesi önemli bir konudur.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından uygulamaya konulmuş Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS), oral ilaç emilimini etkileyen faktörler içerisinde çözülme, çözünürlük ve bağırsak permeabilitesini dikkate alan deneysel bir modeldir.

BCS'ye göre, etkin maddeler aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- Sınıf I : yüksek geçirgenlik, yüksek çözünürlük
- Sınıf II : yüksek geçirgenlik, düşük çözünürlük
- Sınıf III : düşük geçirgenlik, yüksek çözünürlük
- Sınıf IV : düşük geçirgenlik, düşük çözünürlük

Etkin maddelerin bahsedilen özelliklerine göre yapılmış olan bu sınıflandırmadan başka, dozaj şekilleri yavaş veya hızlı çözünme oluşturma durumlarına göre de gruplandırılabilir. Etkin maddenin, en yüksek terapötik dozu 37 °C sıcaklıkta ve pH 1,0-7,5 aralığında 250 mL veya daha az miktarda suda çözünüyorsa yüksek çözünürlüğe sahip olduğu; uygulanan dozun %90'ından fazlası emiliyorsa, yüksek geçirgenliğe sahip olduğu kabul edilir. Bu durumun aksine 0,1 mg/mL'nin altında çözünürlüğe sahip etkin maddelerde dissolüsyonla ilgili önemli sorunlar ortaya çıkar ve genellikle 10 mg/mL'nin altındaki çözünürlüğe sahip etkin maddelerde formülasyon hazırlanması sırasında çözündürme ile ilgili zorluklar görülebilir. Çoğu etkin maddenin klinikte rutin kullanımındaki en önemli engel, suda çok az çözünürlüğe sahip olmasıdır.

Mikroemülsiyonlar, dissolüsyonla ilgili biyoyararlanım problemlerinin üstesinden gelme ve suda az çözünen ilaçların çözünürlüğünü arttırmada önemli role sahiptir. Bu özellik BCS sınıf II veya sınıf IV ilaçlar için önemlidir. Mikroemülsiyonlar, bu tür etkin maddeler için süper çözücü olarak görev yapar ve uygun biyoyararlanımı elde edebilmek için optimize edilebilir. Bunlara ek olarak, protein ve peptit gibi makromoleküller dahil olmak üzere hidrofilik ilaçların verilmesinde de mikroemülsiyonlar kullanılabilir (Muzaffar, Singh ve Chauhan, 2013; Kamaria vd., 2015).

2.1.8.3. Parenteral uygulama

Parenteral dozaj şekillerinde lipofilik ve hidrofobik etkin maddelerin formülasyonu zordur. Süspansiyon şekli kullanılmasının istenmediği durumlarda az çözünür etkin maddelerin parenteral uygulanması, Y/S tipi mikroemülsiyonlar ile mümkündür. Bu şekilde, genellikle sık uygulama gerektiren etkin maddelerin nispeten daha yüksek bir konsantrasyonda hastaya verilmesine olanak sağlar. Parenteral nütrisyonunda, yağda çözünen vitamin ve lipidlerin mikroemülsiyonu intravenöz (i.v.) yolla kolaylıkla uygulanabilir (Kamaria vd., 2015).

Bazı etkin maddelerin aşırı hidrofobik olmaları ve çok az sayıda yardımcı maddenin parenteral uygulamaya uygun olmasından dolayı, formülasyon geliştirmek zordur. Siklodekstrin inklüzyon kompleksleri ya da PEG 400 ve propilen glikol gibi yardımcı çözücüler kullanılarak parenteral uygulama için bazı teknikler geliştirilmiştir. Ancak; yardımcı çözücünün yüksek kullanım konsantrasyonu, enjeksiyon sırasında sıklıkla ağrıya neden olması ve siklodekstrinlerin kompleksleşmesindeki zorluklar bu tekniklerin kullanımını kısıtlamaktadır. Mikroemülsiyonlar, geleneksel uygulama yollarına alternatif olarak parenteral yolla kolaylıkla kullanılabilecek sistemlerdir (Patravale ve Date, 2009).

2.1.8.4. Oküler uygulama

Göz, vücudumuzun en önemli organlardandır. Oküler uygulama için formülasyon geliştirilirken gözün karmaşık fizyolojisi çok iyi bilinmelidir. Göz damlaları ve merhemler gibi geleneksel dozaj şekilleri, oküler dokunun arka kısmına etkin maddenin ulaştırılmasında yeterince etkili sistemler değildir ve zayıf oküler ilaç biyoyararlanımı görülür. Bu durumun nedeni korneal epitelyal membranın zayıf permeabilitesi, gözyaşı dinamikleri, nazolakrimal drenaj, kan-oküler bariyerin yüksek verimliliği, oküler anatomik ve fizyolojik kısıtlamaların bir sonucudur (Patravale ve Date, 2009).

İlaçların oküler biyoyararlanımını artırma çabalarının büyük kısmı, taşıyıcı sistem ve oküler yüzey arasındaki temas süresinin artırılmasına ve korneadaki ilaç geçirgenliğinin iyileştirilmesine odaklıdır. Mikroemülsiyonlar, oküler uygulamada umut verici alternatif sistemlerdir. Mikroemülsiyonların üretimi ve sterilizasyonu basit, kolay ve ucuzdur. Bu sistemler sulu ve yağlı bileşenlerden oluştuğu için hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddeleri taşıyabilir. Mikroemülsiyonlar sulu faza sahip olması, saydam ve termodinamik olarak kararlı olmaları nedeniyle de ilgi uyandıran oftalmik taşıyıcı sistemlerdir (Khodakiya vd., 2012).

2.2. Tekrarlayan Düşük

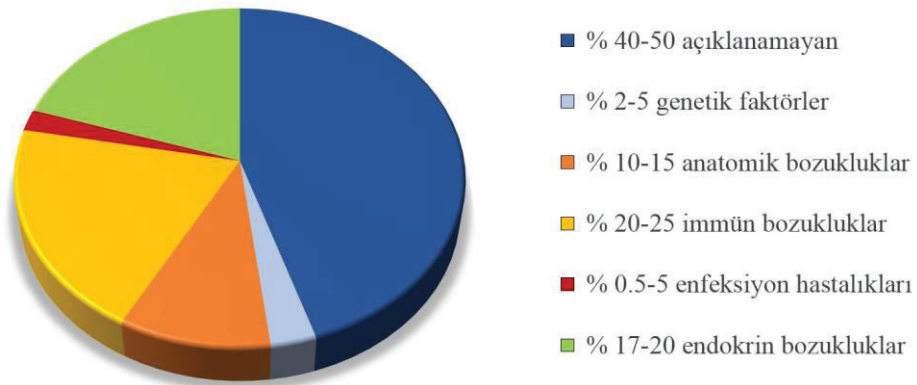
Gebelik, anneye ait tüm sistemlerin fizyolojik uyumunu gerektiren karmaşık bir süreçtir. Özellikle gebelik ve bağışıklık sistemi arasında güçlü bir bağ vardır. Gebelikte temel hedef, güçlü antimikrobiyel bağışıklık varlığında seçici immün tolerans, immünosüpresyon ve immunomodülasyon içeren başarılı bir gebelik sağlamak ve bu durumu sürdürmektir. Ancak annenin dolaşımdaki immün hücre sayısında, fenotipi ve özelliklerinde, çözünebilir faktör üretim yeteneğinde farklılıklar olduğu da görülmektedir (Luppi, 2013).

Dünya Sağlık Örgütü, gebeliğin 20. haftasından önce gebeliğin sonlanmasını veya fetus doğum ağırlığının 500 g'dan daha az olmasını düşük olarak tanımlamaktadır (Deniz, Baykuş ve Kavak, 2016). Başka bir ifadeyle düşük, fetüsün yaşayabilirliğe ulaşmadan önce spontan olarak meydana gelen gebelik kaybıdır ve gebeliğin en yaygın komplikasyonudur (Rai ve Regan, 2006).

Tekrarlayan düşük genellikle üç ya da daha fazla ardışık düşük yapılması olarak tanımlanır ve kadınların yaklaşık olarak %1-3'ünü etkiler. Daha önce canlı doğumun hiç olmadığı tekrarlayan düşük ve canlı bir doğumun ardından başlayan tekrarlayan düşük olmak üzere iki farklı durumundan söz edilebilir (Quenby, 2010; Toth vd., 2010).

2.2.1. Tekrarlayan düşüğün bilinen risk faktörleri

Anatomik bozukluklar, enfeksiyon hastalıkları, endokrin bozukluklar, immün bozukluklar ve genetik faktörler tekrarlayan düşükteki risk faktörleri arasında yer alır (Toth vd., 2010). Tekrarlayan düşüğü etkileyen faktörler ve yüzdeleri Şekil 2.7'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Tekrarlayan düşüğü etkileyen faktörler (Ford ve Schust, 2009)

2.2.1.1. Anatomik bozukluklar

Anatomik bozukluklar, tekrarlayan düşük vakalarının %10-15'ini oluşturmaktadır. Endometriumun damar sistemindeki bozukluklar, genellikle anormal ve yetersiz plasentasyona yol açarak düşüğe neden olur. Bu nedenle, endometriumun yapısındaki damarlanmayı engelleyebilecek anomaliler tekrarlayan düşükte potansiyel sebep olarak düşünülebilir.

En sık görülen uterin gelişim bozukluğu, uterin septumdur. Tüm anatomik bozuklukların %80-90'ını oluştururken, tekrarlayan düşük vakalarında %3,5 oranında görülmektedir. Uterin septum başarısız gebelikte en sık görülen bozukluk olmamasına rağmen, tekrarlayan düşük vakalarında cerrahi müdahale ile tedavi edilebilen en kolay bozukluktur (Ford ve Schust, 2009; Deniz, Baykuş ve Kavak, 2016).

2.2.1.2. Enfeksiyon hastalıkları

Tekrarlayan düşük vakalarında bakteriyel ya da viral enfeksiyonların tekrarlayan düşüğe neden olduğuna dair tartışmalar günümüzde hala devam etmektedir. Cinsel yolla bulaşan hastalık etkenlerinden *Chlamydia trachomatis*, kadınlarda servisit ve üretrit gibi enfeksiyonlara neden olurken, plasenta ve fetüse giden yol olan servikte bulunması durumunda tekrarlayan düşüğe neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak, gebeliğin ilk trimesterinde enfeksiyonların rolü hala tartışılmaktadır. Vajinal disbiyozun artan enfeksiyonlara, prostaglandin salınımına, ardışık servikal yetmezliğe, erken membran rüptürüne ve geç gebelik kaybına veya erken doğuma neden olabileceği de öne sürülmektedir (Kopuz, 2008; Toth vd., 2010; Deniz, Baykuş ve Kavak, 2016).

2.2.1.3. Genetik faktörler

Erken dönemde yaşanan tekrarlayan düşüğün en büyük sebeplerinden biri genetik faktörlerdir ve genetik anomaliler fetal veya maternal kaynaklı olabilir. Embriyonun karyotipindeki anomali çoğu düşüğün sebebidir. Genetik faktörlerden kromozom bozuklukları erken dönemde yaşanan tekrarlayan düşüklerin %50'sinden sorumludur ve ikincil trimesterlerdeki kayıplarda ise %30 gibi yüksek bir paya sahiptir. Tekrarlayan düşükte genetik anomalilerin %90'ından fazlası anöploidi ya da poliploidi gibi sayısal bozukluklardan, kalan genetik anomaliler ise translokasyon, inversiyon ya da mosaizm gibi yapısal bozukluklardan kaynaklanmaktadır (Çetin, 2014; Deniz, Baykuş ve Kavak, 2016).

2.2.1.4. Endokrin bozukluklar

Tekrarlayan düşüklerin %17-20'sini oluşturan endokrin bozukluklar arasında luteal faz defekti, polikistik over sendromu (PKOS), şeker hastalığı, tiroid hastalığı ve hiperprolaktinemi sayılabilir. Kontrol altına alınan şeker hastalığı tekrarlayan düşük için risk oluşturmazken, kontrol altına alınmayan hastalarda ise yüksek seviyede olan hemoglobin A1c, tekrarlayan düşük riskini artırmaktadır. Tedavi edilmemiş hipotiroidin, spontan ve tekrarlayan düşük ile ilişkili olsa da; ötiroid hastalarında, antitiroit antikorları ve tekrarlayan düşük arasındaki ilişki şu an için tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada ötiroid sendromu olan ve tekrarlayan düşük tanısı konulmuş kadınlarda, tiroid otoantikor varlığı ile devamındaki gebelik başarısı arasında bir ilişki bulunamamıştır (Rai ve Regan, 2006; Ford ve Schust, 2009; Chetty ve Duncan, 2014; Çetin, 2014).

2.2.1.5. İmmün bozukluklar

Çok karmaşık olan gebelik süreci annenin bağışıklık sistemindeki değişiklikleri de içermektedir. Memeli bağışıklık sistemi, monositler ve nötrofiller gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin belirli bileşenlerini aktive ederken, potansiyel olarak tehlikeli T hücreleri aracılığıyla immün cevapları azaltacak şekilde gelişmiştir. Bağışıklık sisteminin farklı bileşenleri arasındaki bu eşsiz düzensizlik annenin hamileliğe adaptasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Luppi, 2013).

Yapılan bir çok çalışma, tekrarlayan düşük ve implantasyon başarısızlığının etiyolojisinde immünolojik bozuklukların önemli bir rol oynadığı göstermektedir. Yüksek NK hücre aktivitesi ve antifosfolipid antikorları üreme bozukluğunun en yaygın immünolojik nedenleri arasındadır. Bunların dışında, tekrarlayan düşüğe sitokin ve büyüme faktörü gibi immunosupresif faktörlerin de etkili olduğunu bilinmektedir (Görgülü, 2009; Kumar ve Mahajan, 2013; Durmuş, 2015).

Tekrarlayan düşük, trofoblast ve maternal T ve NK hücrelerinin yüksek miktardaki CD4⁺ ve CD25⁺ alt grup sitotoksitesinden veya Th1 ve Th2 hücre fonksiyonlarından ileri gelebilir. Aşırı endometriyal immün aktiviteyi azaltmayı hedefleyen çeşitli teorik ilkeler ve klinik verilerle tedavi tekrarlayan düşüklü kadınlarda başarıya ulaşmıştır. Son çalışmalar farklı immün hücre ve proteinlerin normal gebeliğin erken dönemlerinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Erken embriyonun T ve NK hücre aracılığıyla reddetmeye karşı savunmasız oluşu immün bazlı tedavilerin yüksek düzeyde etkili olması gerektiğini göstermektedir (Bansal, Bajardeen ve Thum, 2012; Durmuş, 2015).

%20 oranında soya yağı içeren bir serum infüzyonu olan Intralipit®'in, T hücreleri aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin salımlarındaki etkisi incelenmiş; ancak, NK hücrelerindeki aktivatör rolü ve sitotoksitesindeki etkisi üzerinde çok durulmamıştır. Az sayıda yapılan çalışmalardan çıkan sonuç, Intralipit®'in NK hücrelerinin sitotoksitesini azaltmada etkili olduğudur. Yapılan bir çalışmada ise Intralipit®'in, tekrarlayan düşükklü 50 kadının 47'sinde NK sitotoksitesini baskıladığı belirtilmiş; doğum açısından klinik yararları açıklanmamıştır (Bansal, Bajardeen ve Thum, 2012).

Yapılan başka bir çalışma Intralipit® uygulamasının canlı doğum oranını arttırdığını ve *in vitro* uygulamalarda olduğu gibi *in vivo* uygulamalarda da NK hücrelerinin sitotoksitesini baskılamada etkili olduğunu göstermektedir (Tablo 2.5). Bu çalışmada anormal NK hücre aktivitesine sahip 50 kadın hasta %20 Intralipit® infüzyonu ile tedavi edilmiş ve NK hücre aktivite sonuçları haftalık olarak ölçülmüştür. Hastalar, anormal NK hücre aktiviteleri %15'in üzerinde ve %15'in altında olmak üzere iki gruba bölünmüştür. NK hücre aktivitesi %15'in altında olan hastaların neredeyse hepsinde (%89,3) ilk Intralipit® infüzyonundan sonra NK hücre aktivitesi normal sınır olan %10'un altına düşmüştür. NK hücre aktivitesi %15'in üzerinde olan bazı hastalarda (%43,8) ise NK hücre aktivitesi normal sınırlara ancak ikinci infüzyondan sonra düşebilmiştir. Intralipit® infüzyonu uygulanan 50 kadının 39'unda (%78) birinci hafta sonrasında NK hücre aktivitesi normal sınıra düşmüş, 11'inde (%22) ise düşüş olmasına rağmen normal sınırın üstünde kalmıştır. NK hücre aktivitesi normal sınırın üzerinde kalan bu hastalara 2-3 hafta sonra ikinci defa infüzyon uygulanmış ve bir sonraki hafta 10 hastanın NK hücre aktivitesinin normal sınıra düştüğü görülmüştür. 4 hastaya ise 2 haftalık süre içerisinde üç Intralipit® uygulaması yapılmış ve üçüncü infüzyondan sonra NK hücre aktivitesi hepsinde normal sınıra gelmiştir. 47 hastadaki Intralipit® etkisi 6 ile 9 hafta arasında bitmiştir. 2 hastada 5 hafta, 1 hastada ise 4 hafta boyunca etkinin devam ettiği görülmüştür (Roussev vd., 2008; Kumar ve Mahajan, 2013).

Tablo 2.5. *Intralipit® uygulamasının anormal NK hücre aktivitesini baskılaması (Roussev vd., 2008)*

Anormal Nka	İlk infüzyondan sonra baskılanmış NKa		İkinci infüzyondan sonra baskılanmış NKa		Baskılama süresi	
	> %10,0	< %10,0	> %10,0	< %10,0	4-6 hafta	6-9 hafta
> %15 (n=16)	7 (%43,8)	9 (%56,2)	1	6	1 (%6,3)	15 (%92,7)
< %15 (n=34)	4 (%11,7)	30 (%89,3)	-	4	2 (%5,9)	32 (%94,1)
Toplam (n=50)	11 (%22,0)	39 (%78,0)	1	10	3 (%6,0)	47 (%94,0)

2.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü

Sitokinler çeşitli hücre tipleri tarafından üretilip salgılanan, glikoprotein yapısına sahip 8-25 kDa molekül ağırlığında tek zincirli proteinlerdir. Sitokinler, hücre büyümesi, hücre iyileşmesi, hücre aktivasyonu, doku yenilenmesi, bağ doku oluşumu, morfojeniz, inflamasyon ve immünolojik cevap oluşumu gibi önemli biyolojik olayları düzenlerler. Sitokinler lenfositler tarafından üretilirse lenfokin, monosit veya makrofajlar tarafından üretilirse monokin, immün sistemin diğer hücreleri tarafından üretilirse interferon, interleukin, tümör nekroz faktörü (TNF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) veya epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çok farklı şekillerde adlandırılır (Yetkin ve Çelebi, 2001; Akdoğan ve Yöntem, 2018).

TGF- β , hücre aktivitesinin düzenlenmesinde rol alan çok işlevli bir büyüme faktörüdür. İşlevleri arasında hücre büyümesi, hücre proliferasyon ve diferansiasyonu, dokuların yeniden modellenmesi, ekstraselüler matris oluşumu, hücre yüzey moleküllerinin kontrolü, immünoregülasyon, anjiyogenez ve apoptoz yer alır (Das vd., 1992). TGF- β 'nın ayrıca gonad ve sekonder seks organ gelişimi, spermatogenez ve over fonksiyonu, gebeliğin immünoregülasyonu, embriyo implantasyonu ve plasenta gelişimi ile ilgili rolleri tanımlanmıştır. İmplantasyon sırasındaki embriyo uterus ilişkisi bu işlemlerin hepsini kapsadığından, bu büyüme faktörlerinin preimplantasyon döneminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Godkin ve Doré, 1998).

TGF- β 'nın 5 farklı izoformu vardır ve bunlardan TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 memelilerde bulunur (Güner, Özmen ve Bayındır, 1997). Hem TGF- β 1 hem de TGF- β 2 mRNA'sının gebeliğin 1-4'üncü günleri arasında fare uterusunda luminal ve glandüler epitel hücrelerde, stromanın ekstraselüler matrisinde ve desidual hücrelerde olduğu gösterilmiştir (Shooner vd., 2005). Ayrıca östrojen ve progesteron hormonlarının endometriyal ve stromal hücrelerdeki etkinliğinin TGF- β gibi moleküller üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Bir sıçan çalışmasında FSH ve hCG ile hiperstimülasyon yapılan sıçanlardan alınan uterus örneklerinde subluminal stromadaki TGF- β 1 ve TGF- β 2 boyamalarının daha zayıf olduğu ve bunun da endometriyal çevreyi bozarak başarılı embriyo implantasyonunu etkilediği saptanmıştır (Jovanovic ve Kramer, 2010). Yakın zamanda yapılan çalışmalar TGF- β 'nın embriyo implantasyonunda önemli immün-düzenleyici ve antiinflamatuvar rol oynadığını ve yine gebelik immün toleransında önemli rol alan düzenleyici T (Treg) hücrelerinin oluşumu ve farklılaşmasından sorumlu olduğunu göstermiştir (Guerin vd., 2009). TGF- β 1'in azalmış ekspresyonu sonucu artan

proinflamatuvar sitokinlerin ve Treg hücrelerinin azalmasının embriyo implantasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Guerin vd., 2009). İnsan hücreleri ile yapılan *in vitro* bir çalışmada seminal plazmanın Th hücrelerden, özellikle TGF- β gibi immünsüpresif sitokinlerin salınmasından sorumlu olan Treg hücrelere konversiyonu tetiklediği gösterilmiştir (Balandya vd., 2012).

Sitokin üreticisi CD4⁺ T hücreleri antijenlere karşı immün cevabın verilmesinde, B hücreleri tarafından gerçekleştirilen antikor üretiminin düzenlenmesinde ve sitotoksik T hücrelerinin işlevinde önemli role sahiptir. CD4⁺ T hücreleri salgıladıkları sitokin profiline ve özel transkripsiyon faktörlerine göre 4 farklı grupta incelenir. Bu gruplar; Th1, Th2, Th17 ve Treg hücreleridir. CD4⁺ T hücrelerinden farklılaşan Treg ve Th17 hücrelerinin inflamatuvar ve antiinflamatuvar etkileri birbirinden farklıdır. CD4⁺ T hücreleri IL-6 ve TGF- β etkisi ile Th17 hücrelerine dönüşürken, IL-6 yokluğunda ve yalnızca TGF- β varlığında Treg hücrelerine dönüşür (Guerin vd., 2009; Wang vd., 2010a; Chen vd., 2011; Mutluay ve Öner, 2016). Treg lenfositlerinin gebelikte oynadıkları önemli roller, ilk kez 2004 yılında farelerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Treg hücrelerinin en erken çiftleşme sonrası uterusu drene eden lenf nodüllerinde tespit edildiği bildirilmiştir. IL-10 ve TGF- β 'nın immün baskılama sırasında arttığı ve gebelik sürecinde önemli roller oynadığı bilinmektedir (Mutluay ve Öner, 2016).

Th17 hücreleri güçlü bir proinflamatuvar sitokin olan IL-17 salgılar ve inflamatuvar reaksiyonlarda önemli rol alır. Bunlar arasında otoimmünite, alerji, organ nakli reddi ve gebelik problemleri yer alır (Wang vd., 2010b; Steinborn vd., 2012). Treg hücreleri ise lenfositlerin inhibitör alt popülasyonudur ve TGF- β üreterek immün cevabı baskılar. Açıklanamayan tekrarlayan düşükklü hastalarda Th17 hücrelerinde artma ile birlikte Treg hücrelerinde azalma olduğu saptanmıştır (Wang vd., 2010b; Liu vd., 2011; Steinborn vd., 2012). Saifi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada implantasyon açısından periferik kan lenfosit oranlarına bakılmış ve açıklanamayan tekrarlayan düşükleri olan hastalarda Treg oranının daha düşük, Th17 oranının ise belirgin olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur (Saifi vd., 2014).

TGF- β bilinen en güçlü immünsüpresif moleküllerden biridir. TGF- β immün sistemin efektör T (Th1 ve Th2) hücre fonksiyonlarını ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, Treg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuvar cevabı baskılamaktadır (Vural, 2010).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

1-2-Propandiol	Merck	Almanya
2-Propanol	Merck	Almanya
Akrilamit/Bisakrilamit (%30)	Sigma-Aldrich	Almanya
APS (%99)	Applichem	Almanya
Brillant Blue G	Amresco	ABD
DCM	Sigma-Aldrich	Almanya
DMEM	Biological Industries	İsrail
DMSO	Applichem	Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich	Almanya
FBS	Sigma-Aldrich	Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich	Almanya
Gliserol	Merck	Almanya
Glisin	Merck	Almanya
İzopropil Alkol	Merck	Almanya
Keten Yağı	Carl Roth	Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich	Almanya
MTT boyası	Applichem,	Almanya
Propilen Glikol 400	Merck	Almanya
Soya Yağı	Merck	Almanya
SDS	Merck	Almanya
TEMED	Applichem	Almanya
Trizma Baz	Sigma-Aldrich	Almanya
Tween 20®	Merck	Almanya
Tween 80®	Merck	Almanya
TGF-β1	Sigma-Aldrich	Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Analitik Terazı	Mettler Toledo Xse105	ABD
Büyük Kapasiteli Santrifüj	Eppendorf 5810	Almanya
Buzdolabı	Arçelik No Frost	Türkiye
CO ₂ 'li Etüv	Hera Cell 240i	Amerika
Cytation 5 Plaka Okuyucu	BioTek	ABD
Damlacık/Parçacık Büyükülüğü Analiz Cihazı	Zeta Sizer Nano Series	İngiltere
Derin Dondurucu	Liebherr Medline Lgex 3410	Almanya
Dondurucu (-20°C)	Arçelik	Türkiye
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Scientific	Amerika
Dijital Büret	Brand Titrette	Almanya
Distile Su Cihazı	Millipore	Fransa
Floresan mikroskop	Leica 400DMI	Almanya
Güç Kaynağı	Consort E861	Belçika
İnvert Mikroskop	Leica DMIL	Almanya
Kararlılık kabini	Aymes	Türkiye
Kondüktometre	Mettler Toledo Sevencompact	ABD
Laminar Akış Kabini	Heal Force	Çin
Mekanik Karıştırıcı	Heidolph RZR 2102	Almanya
Otoklav	Hirayama	Japonya
Ph Metre	Mettler Toledo Sevencompact	ABD
Plate Okuyucu	Cytation 5	ABD
Reometre	Brookfield Rvdtv-111 Cp	ABD
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5417r	Almanya
Santrifüj	Hettich Rotina 420r	Almanya
Steril Kabin	Biowizard Xtraline 130	Finlandiya

Ultrasonik Banyo	Elma T470/H	Almanya
Yatay Elektroforez Cihazı	Thermoscientific	Amerika
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	Zeta Sizer Nano Series	İngiltere

4. YÖNTEMLER

4.1. Mikroemülsiyon Formülasyonları Hazırlanması

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarında yağlı faz olarak keten yağı ve soya yağı, YEM olarak Tween 80[®], Tween 60[®], Tween 20[®] ve Span 80[®], Y.YEM olarak ise polietilen glikol 400 (PEG 400), 2-propanol, 1-2-propandiol, izopropil alkol ve gliserol kullanılmıştır. Sulu faz olarak ise distile su kullanılmıştır.

4.2. Mikroemülsiyon Formülasyon Denemeleri

İdeal ve kararlı bir Y/S mikroemülsiyon sistemine ulaşabilmek için öncelikle etkin madde içermeyen mikroemülsiyon formülasyonları üzerinde deneme çalışmalarına başlanmıştır. YEM ve Y.YEM farklı oranlarda (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:3, 3:2, vb.) karıştırılmış ve toplam 10 g üzerinden 9 ayrı formülasyon olacak şekilde planlama yapılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Mikroemülsiyon formülasyon denemeleri için örnek tablo (1:1)

Formülasyon	Yağ (g)	YEM:Y.YEM (g)	YEM+Y.YEM (g)
F1	1,00	4,50 : 4,50	9,00
F2	2,00	4,00 : 4,00	8,00
F3	3,00	3,50 : 3,50	7,00
F4	4,00	3,00 : 3,00	6,00
F5	5,00	2,50 : 2,50	5,00
F6	6,00	2,00 : 2,00	4,00
F7	7,00	1,50 : 1,50	3,00
F8	8,00	1,00 : 1,00	2,00
F9	9,00	0,50 : 0,50	1,00

Mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanması için faz titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Yağ, YEM ve Y.YEM karışımları oda sıcaklığında ve gerekli görüldüğü durumlarda ise su banyosunda sabit sıcaklıkta tutularak mekanik karıştırıcı ile 100-500 rpm aralığında değişen hızlarda karıştırılırken, büret ile damla damla su eklenmiştir. Bu işleme, distile su eklenmeden önce saydam bir görünüme sahip olan karışımlar için bulanıklık görülen noktaya kadar devam edilmiş ve karışımın bozulmadan iç faza alabildiği distile su miktarı mL cinsinden kaydedilmeye çalışılmıştır.

Soya yağı ve keten yağı kullanılarak 10 g formülasyon olacak şekilde hazırlanan deneme formülasyonları, değiştirilen bileşen ve parametreler Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Ayrıca YEM olarak Tween 60®, Tween 20® ve Span 80® ile karışımları ve Y.YEM olarak izopropil alkol ve gliserol kullanılarak da denemeler yapılmış ve mikroemülsiyon oluşumundaki rolleri değerlendirilmiştir. Formülasyonlar hem 25±1°C hem de 40±1°C sıcaklıkta hazırlanmıştır. Aynı şekilde, bütün formülasyonlar için uygulanan karıştırma hızı hem düşük hem de yüksek seviyede tutulmuştur.

Tablo 4.2. Mikroemülsiyon deneme çalışmaları

Yağ	YEM	Y.YEM	Oran*	Sıcaklık (°C)	rpm
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	1:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	2:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	3:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	4:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	1:2	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	1:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	1:4	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	2:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	PEG 400	3:2	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	1:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	2:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	3:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	4:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	1:2	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	1:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	1:4	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	2:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	2-Propanol	3:2	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	1:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	2:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	3:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	4:1	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	1:2	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	1:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	1:4	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	2:3	25 / 40	100-500
Soya / Keten Yağı	Tween 80	1-2-propandiol	3:2	25 / 40	100-500

*YEM ve Y.YEM arasındaki oranı belirtmektedir.

4.3. Üçgen Faz Diyagramı Hazırlanması ve İdeal Formülasyonların Belirlenmesi

Mikroemülsiyon formülasyon denemeleri aşamasından sonra üçgen faz diyagramı hazırlanması ve ideal formülasyonların belirlenmesi için çalışmalara başlanmıştır. Bu aşamada saydam bir görünüme sahip olan mikroemülsiyonlar kullanılmıştır. Öncelikle farklı oranlarda YEM/Y.YEM karışımına sahip formülasyonda yer alan ve ağırlık olarak bilinen yağ, YEM/Y.YEM ve distile su miktarları yüzde oranlara dönüştürülmüştür. Her bir formülasyondan elde edilen yüzde değerler nokta olarak üçgen faz diyagramına geçirilip, distile suyun %100 olduğu köşeden karşı kenara doğru çizgiler çizilerek kapalı bir alan oluşturulmuş ve mikroemülsiyonların üçgen üzerinde kapladıkları bölgeler çizilmiştir. Çizilen her bir kapalı alan, o noktalarda mikroemülsiyon oluşabileceğini gösteren bölgeleri temsil etmektedir.

Farklı oranlarda yapılan her çalışma için, farklı bir üçgen faz diyagramı çizilmiştir. En büyük mikroemülsiyon alanına sahip formülasyon, ideal formülasyon olarak belirlenmiştir. Bu alanın ağırlık merkezi hesaplanarak o noktadaki bileşenlerin % oranları belirlenmiştir. Ağırlık merkezindeki oranlara göre yeniden etkin maddesiz mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve kararlılığını incelemek için 2 hafta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda, faz ayrımı gözlenmemiş ve etkin madde içeren formülasyonların hazırlanmasına başlanmıştır.

4.4. Ejakulattan TGF- β 1 Ekstraksiyonu

Ejakülatın yapısında bulunan büyük maddelerin uzaklaştırılması amacıyla 6 örnek hazırlanmıştır. Amonyum sülfat ve absölü alkol ile işleme tabi tutulan örnekler farklı hız ve sürelerde santifüjlenerek protein çökmesi gözlemlenmiştir. Hazırlanan ejakülat örnekleri ve çökme durumları Tablo 4.3'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Ejakülat örnekleri ve çökme durumları

No	Karıştırma Hızı	Karıştırma Süresi	Ejakülat	Seyreltici	Çökme
1	1200 rpm	10 dakika	100 μ L	Amonyum Sülfat	Yok
2	1200 rpm	10 dakika	100 μ L	Absölü Alkol	Var
3	16000 rpm	30 dakika	100 μ L	Amonyum Sülfat	Yok
4	16000 rpm	30 dakika	100 μ L	Absölü Alkol	Var
5	11000 rpm	10 dakika	100 μ L	Amonyum Sülfat	Yok
6	11000 rpm	10 dakika	100 μ L	Absölü Alkol	Var

Çökme meydana gelen örnekler üzerinden deneye devam edilmiştir. Tablo 4.3'te verilen 2, 4 ve 6 No'lu örnekler 16000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra alkolün uzaklaştırılması için 37°C'de inkübe edilmiştir. Absolü alkol ve diklorometan (DCM) eklenerek proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen örneklerdeki TGF- β 1'in kontrol grubunu oluşturmak için liyofilize haldeki 50 μ g TGF- β 1 1 mL su ile çözelti haline getirilmiştir. Jel elektroforez üzerinde yürütme yapmak için 14 farklı örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. *Jel elektroforez üzerinde yürütme için hazırlanan örnekler*

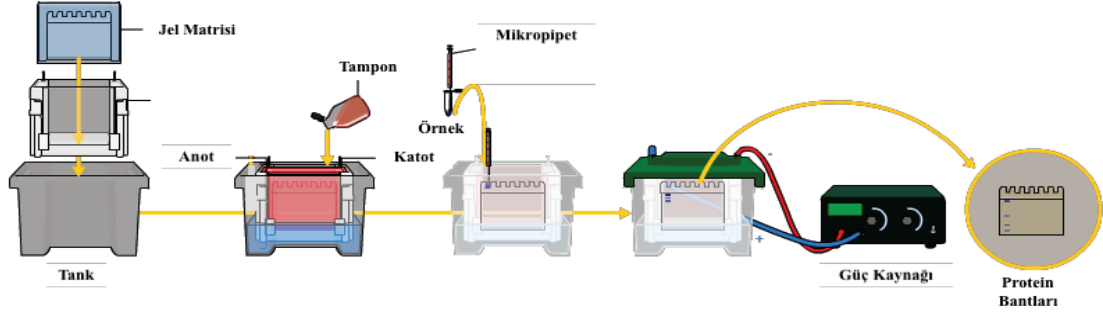
No	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)	Madde (50 μ L)	Seyreltici (50 μ L)	Uygulama
1	-	-	TGF- β 1	-	Hepsi
2	-	-	TGF- β 1	Absolü alkol	Hepsi
3	-	-	TGF- β 1	Absolü alkol	Sulu kısım
4	1200 rpm	10 dakika	Ejakulat	-	Hepsi
5	11000 rpm	10 dakika	Ejakulat	-	Hepsi
6	16000 rpm	30 dakika	Ejakulat	-	Hepsi
7	1200 rpm	10 dakika	Ejakulat	Absolü alkol	Hepsi
8	11000 rpm	10 dakika	Ejakulat	Absolü alkol	Hepsi
9	16000 rpm	30 dakika	Ejakulat	Absolü alkol	Hepsi
10	-	-	TGF- β 1	DCM	Hepsi
11	-	-	TGF- β 1	DCM	Sulu kısım
12	1200 rpm	10 dakika	Ejakulat	DCM	Hepsi
13	11000 rpm	10 dakika	Ejakulat	DCM	Hepsi
14	16000 rpm	30 dakika	Ejakulat	DCM	Hepsi

Tüm örneklerden absolü alkol ve diklorometan uçurulmuştur. Denatürasyon öncesi her bir örneğe 50 μ L su, 10 μ L sodyum dodesil sülfat, 5 μ L tampon eklenmiştir. Daha sonra 90°C'deki suda 5 dakika boyunca denature edilmiştir.

4.5. SDS-PAGE Jel Elektroforez ile Ejakulattan TGF- β 1 Eldesi

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforez) jel elektroforez, proteinlerin saflık kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılır. Akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriste elektrik akımı yardımıyla proteinler büyüklüklerine göre ayrılır (Şekil 4.1).

Örneklere eklenen SDS, proteinlerin çevresini saran bir katman oluşturarak proteinlerin negatif yüklenmesini sağlar. Bu kaplama ile jel matristen akım geçirildiği zaman moleküller kendi yüklerinden bağımsız olarak negatif yüklü bir şekilde molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde ilerler. Buna göre küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler (Şenel, 2012).



Şekil 4.1. SDS Elektroforez (<http-3>)

Ejakülattan elde edilen örnekler daha sonra farklı yoğunluktaki jeller üzerinde yürütülmüştür. %7 yoğunluğa sahip yığma ve %12 yoğunluğa sahip ayırma jeli, %5 yoğunluğa sahip yığma jeli ve %10 yoğunluğa sahip ayırma jeli ile iki farklı sistem oluşturulmuştur (Tablo 4.5). Sistem 100 V'ta 3 saat boyunca yürütülmüştür.

Tablo 4.5. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler

Sistem I		Sistem II	
%7 Yığma Jeli		%5 Yığma Jeli	
%30,0 Akrilamit/bisakrilamit	1,300 mL	%30,0 Akrilamit/bisakrilamit	1,700 mL
0,50 M Trizma baz	2,500 mL	0,50 M Trizma baz	2,500 mL
%10,0 SDS	0,100 mL	%10,0 SDS	0,100 mL
%10,0 APS	0,050 mL	%10,0 APS	0,050 mL
TEMED	0,005 mL	TEMED	0,005 mL
Distile su	5,100 mL	Distile su	5,700 mL
%12 Ayırma jeli		%10 Ayırma jeli (10 mL)	
%30,0 Akrilamit/bisakrilamit	4,000 mL	%30 Akrilamit/bisakrilamit	3,300 mL
1,50 M Trizma baz	2,500 mL	1,50 M Trizma baz	2,500 mL
%10,0 SDS	0,100 mL	%10,0 SDS	0,100 mL
%10,0 APS	0,050 mL	%10,0 APS	0,050 mL
TEMED	0,005 mL	TEMED	0,005 mL
Distile su	3,400 mL	Distile su	4,100 mL

SDS-PAGE jel elektroforez yönteminde kullanılan yürütme tamponu ve *Brillant Blue* çözeltisinin içeriği Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de açıklanmıştır.

Tablo 4.6. SDS-PAGE yönteminde kullanılan yürütme tamponu

Yürütme Tamponu (ph 8.5)	
1,92 M Glisin	144,0 g
0,25 M Trizma Baz	30,3 g
%0,1 SDS	1,0 g
Distile Su km	1000 mL

Tablo 4.7. *Brillant Blue* çözeltisinin içeriği

<i>Brillant Blue</i> Çözeltisi	
Brillant Blue	0,25 mg
Metanol: Distile Su (1:1)	90 ml
Glasiyel Asetik Asit	10 mL

4.6. Etkin Madde İçeren Formülasyonların Hazırlanması

Üçgen faz diyagramı yardımıyla seçilen ideal formülasyonlar çok fazla miktarda YEM ve Y.YEM içermektedir. Bu oranı azaltmak için hazırlanan 10 gram mikroemülsiyon 8 gram su ile seyreltilmiştir. Mikroemülsiyonların dış fazı su olduğu için seyreltme işleminde herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

Seyreltilen mikroemülsiyonlardan 1,8 gram alınmış ve üzerine 50 µg/mL konsantrasyona sahip TGF-β1 çözeltisinden 0,2 mL eklenmiştir. Hazırlanan etkin maddeli mikroemülsiyona 2 mL su eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Hazırlanan mikroemülsiyondaki TGF-β1 oranı 2,5 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

4.7. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu

Kararlı ve istenilen özelliklerde yeni bir taşıyıcı sistem oluşturulması süreci çalışmanın en zor aşamalarından birisidir. Bu nedenle formülasyonlar üzerinde yapılacak karakterizasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır.

4.7.1. Fiziksel görünüş

Taze olarak hazırlanan formülasyonların 25±1°C oda sıcaklığındaki görünüşleri incelenmiş, faz ayrımı olup olmadığı, saydamlıkları gözlenmiştir.

4.7.2. Tip tayini

Taze olarak hazırlanan Y/S tipindeki mikroemülsiyon formülasyonların dış fazları su ile seyreltilerek tipleri kontrol edilmiştir.

4.7.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

Taze olarak hazırlanan formülasyonlar 1000 ve 2000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve faz ayrımı olup olmadığı incelenmiştir.

4.7.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı

Taze olarak hazırlanan formülasyonların damlacık büyüklüğü ve dağılımı zetasizer cihazı ile ölçülmüştür. Ölçüm her formülasyon için 6 kez tekrarlanmış, ortalama, standart sapma (SS) ve standart hata (SH) hesaplanmıştır.

4.7.5. Zeta potansiyel analizi

Taze olarak hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel değerleri zetasizer cihazı ile ölçülmüştür. Partiküllerin elektroforetik hareketi Helmholtz-Smoluchowski eşitliğine bağlı yazılım ile zeta potansiyele dönüştürülmüştür. Ölçüm her formülasyon için 6 kez tekrarlanmış, ortalama, SS ve SH hesaplanmıştır.

4.7.6. Reolojik analiz

Taze olarak hazırlanan formülasyonların reolojik davranışı analiz edilerek akış tipi belirlenmiştir. Reolojik analizi için Brookfield koni-plak reometresi kullanılmıştır. Ölçümler, çapı 1,2 cm ve eğimi 1,565° olan koni ile 25±1°C oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

4.7.7. pH analizi

Taze olarak hazırlanan formülasyonların pH değeri ölçümleri pH metre ile yapılmıştır.

4.7.8. Elektriksel iletkenlik analizi

Taze olarak hazırlanan formülasyonların elektriksel iletkenliği, iletkenlik ölçüm cihazı kullanılarak incelenmiştir.

4.7.9. FT-IR analizi

Etkin maddenin Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) analizi için 500-4000 cm^{-1} arasında spektrumu alınmış ve karakteristik IR bantları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kararlılık çalışmasının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

4.7.10. NMR analizi

Etkin maddenin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) analizlerinde, çözücü olarak dötero-DMSO maddesi kullanılmış ve spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar kararlılık çalışmasının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

4.7.11. Etkin madde miktar tayini

Taze olarak hazırlanan formülasyonlarda etkin madde miktar tayini için “İnsan/Fare TGF- β 1 Kaplanmamış ELISA Kiti” kullanılmıştır. Bu ELISA testi, eşleştirilmiş bir antikor çiftinin arasına bağlanan TGF- β 1 miktarını ölçmek için tasarlanmıştır. Hedefe spesifik bir antikor (yakalama antikoru) ile bir mikropłaka kuyusunun tabanı kaplanır. Yakalama (capture) antikoruna bağlanacak olan numuneler, standartlar veya kontroller daha sonra bu kuyulara ilave edilir ve yakalama antikoruna bağlanırlar. İkinci antikorun (detektör antikor) eklenmesiyle bir sandviç oluşturulur. Ölçülebilir sinyal üretmek için enzim-antikor-hedef kompleksi ile reaksiyona giren bir substrat çözeltisi eklenir. Bu sinyalin yoğunluğu, orijinal örnekte mevcut olan hedef konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır.

ELISA testi için aşağıda belirtilen basamaklar uygulanmıştır;

1. Corning™ Costar™ 9018 ELISA kitinin her bir kuyucuğuna 100 μL kaplama tamponu eklenmiş ve plaka gece boyunca 4°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.
2. Kuyucuklar havalandırılmış ve her bir kuyucuk 250 μL yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.
3. 200 μL ELISA/ELISASPOT seyreltici ile kuyucuklar bloke edilip, oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir.
4. 1.3 mL su eklenerek standart hazırlanmıştır.
5. Hazırlanan etkin maddeli mikroemülsiyonların konsantrasyonunu 1 ng/mL'ye düşürmek için 2 defa seyreltme uygulanmıştır.

Seyreltme işleminin basamakları aşağıdaki gibidir;

1 mL mikroemülsiyon (2,5 µg/mL) + 49 mL su



50 L mikroemülsiyon (50 ng/mL) [A]



0,1 mL [A] + 4,9 mL su (1 ng/mL)

6. Latent TGF-β1'i immünoreaktif forma hale getirmek için, örnekler asitlendirilip daha sonra nötralize edilmiştir. Bu işlem için 100 µL örnek üzerine 20 µL 1 N HCl eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve 20 µL 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir.
7. Standart eğriyi oluşturmak için 2 kat seyreltme uygulanmıştır. A1'den A9'a 100 µL ELISA/ELISASPOT seyreltici eklenmiştir. A2'ye 200 µL standart eklenmiş ve seyreltici ile karışması sağlanmıştır. Ardından A2'den 100 µL alınıp A3'e aktarılmıştır. A9'a kadar bu işlem uygulanmıştır.
8. Uygun kuyucuklara 100 µL örnek eklenmiştir.
9. Plaka 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Kuyucuklar havalandırılmış ve her bir kuyucuk 250 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.
11. Tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş tespit antikoru ekleyip 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
12. Kuyucuklar havalandırılmış ve her bir kuyucuk 250 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.
13. Kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş Avidin-HRP eklenmiş 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
14. Kuyucuklar havalandırılmış ve her bir kuyucuk 250 µL Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.
15. Kuyucuklara 100 µL Tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi ekleyip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
16. Kuyucuklara 50 µL Durdurma Çözeltisi eklenmiştir.
17. Plaka 450 nm dalga boyunda okunmuştur.

4.8. Formülasyonlarda Yapılan Kararlılık Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar kararlılık çalışması için $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı ortam koşulunda üç ay süresince saklanmıştır. Fiziksel özelliklerin değerlendirilmesi ve olası değişimlerin incelenmesi için kararlılık ortamlarında bekletilen formülasyonlar üzerinde belirli aralıklarda (0., 30. ve 90. günlerde) testler yapılmıştır.

4.8.1. Fiziksel görünüş

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların fiziksel görünüşlerindeki değişim, faz ayrımı olup olmadığı, saydamlıkları belirli aralıklarda incelenmiştir.

4.8.2. Tip tayini

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan Y/S tipindeki mikroemülsiyon formülasyonlarının dış fazları su ile seyreltilerek tiplerindeki değişim belirli aralıklarda incelenmiştir.

4.8.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonlar 1000 ve 2000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve faz ayrımı olup olmadığı belirli aralıklarda incelenmiştir.

4.8.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların damlacık büyüklüğü ve dağılımındaki değişimler zetasizer cihazı ile belirli aralıklarda ölçülmüştür. Ölçüm her formülasyon için 6 kez tekrarlanmış, ortalama, SS ve SH hesaplanmıştır.

4.8.5. Zeta potansiyel analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların zeta potansiyel değerlerindeki değişimler zetasizer cihazı ile belirli aralıklarda ölçülmüştür. Ölçüm her formülasyon için 6 kez tekrarlanmış, ortalama, SS ve SH hesaplanmıştır.

4.8.6. Reolojik analiz

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların reolojik davranışları belirli aralıklarda analiz edilerek akış tipindeki değişimler incelenmiştir. Reolojik analizi için Brookfield koni-plak reometresi kullanılmıştır. Ölçümler, çapı 1,2 cm ve eğimi $1,565^{\circ}$ olan koni ile $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

4.8.7. pH analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların pH değerlerindeki değişimler pH metre ile belirli aralıklarda ölçülmüştür.

4.8.8. Elektriksel iletkenlik analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların elektriksel iletkenliğindeki değişimler, iletkenlik ölçüm cihazı ile belirli aralıklarda incelenmiştir.

4.8.9. FT-IR analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların FT-IR analizi için $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ arasında spektrumlar alınmış ve karakteristik IR bantlarındaki değişimler incelenmiştir.

4.8.10. NMR analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların NMR analizlerinde, çözücü olarak dötero-DMSO maddesi kullanılmış ve spektrumlarındaki değişimler incelenmiştir.

4.8.11. Etkin madde miktar tayini

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların etkin madde miktar tayini için “İnsan/Fare TGF- β 1 Kaplanmamış ELISA Kiti” kullanılmıştır. TGF- β 1 miktarını ölçmek için özel olarak tasarlanmış bu kit kullanılarak belirli aralıklarda etkin madde miktarındaki değişimler incelenmiş ve sıfırıncı zamanda taze hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonundaki değerlerle karşılaştırılmıştır.

4.9. Sitotoksosite Testi ve Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların hücre canlılığına etkisi NIH 3T3 fare fibroblast hücrelerinde metil tiazol tetrazolyum (MTT) tuzu testi ile araştırılmıştır. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM'de 37°C'ta %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştıktan sonra 1X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilip alt kültürlerle (1:3 oranında) ayrılmıştır. Kullanılmayan alt kültürler hücre stoğu olarak -80°C'ta uzun süre saklanmıştır.

Günümüzde MTT olarak bilinen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür yöntemi ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Hücre biyolojisinde sitotoksosite, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir (Olbrich vd., 2004; Stockert vd., 2012). MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı reaksiyon ile renk veren, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Bu yöntem mitokondrinin canlı hücrelerde, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilme ilkesine dayanmaktadır. Parçalanma sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazana indirgenmektedir. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının bir ölçütü olarak değerlendirilir ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir (Yao vd., 2011; Uchida vd., 2009).

Yapılan hücre kültürü çalışması için izlenen basamaklar aşağıdaki verilmiştir.

1. Hücreler kültüre edildikten sonra %10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiş ve *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir.
2. Bir günlük üreme periyodunun ardından sitotoksik etkiyi incelemek için hücre süspansiyonunun üzerine farklı konsantrasyonlarda formülasyonların eklenmesi için hücrelerin bulunduğu besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır.
3. Besi yeri ile belirli oranlarda seyreltilen TGF- β 1 çözeltisi, TGF- β 1 içeren ve içermeyen formülasyonlar hücreler üzerine eklenmiş ve formülasyonla muamele edilmeyen kontrol hücreleri ile birlikte 37°C'ta %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

4. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, ortamdan besiyeri çekilmiş ve her bir kuyucuğa 25 µL (5 mg/mL) MTT boyası eklenmiştir. MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37°C'ta 3 saat inkübe edilmiştir.
5. Bu sürenin sonunda her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiş ve 570 nm dalga boyunda formülasyonun kuyucuklardaki renk değişimi plaka okuyucu ile belirlenmiştir (Yao vd., 2011; Büyükköroğlu vd., 2019).
6. Deney için 6 derişim kullanılmıştır. Her bir derişim için 3 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Mikroemülsiyon Formülasyon Denemeleri

Etkin madde içermeyen mikroemülsiyon formülasyonu denemeleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de planlanan deney çalışmasına göre gerçekleştirilmiştir. Mikroemülsiyon formülasyonların hazırlanması sırasında yağ fazı olarak keten yağı ve soya yağı gibi bitkisel yağların kullanılmasından kaynaklı olduğu düşünülen sorunlar ortaya çıkmıştır. Hem soya yağı hem de keten yağı kullanılan ve Y.YEM olarak 1,2-propanol ile yapılan çalışmaların hiçbirisi sonuç vermemiştir.

Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı kullanılarak mekanik karıştırıcıyla 500 rpm hızda ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında denemeler yapılmıştır. Deneme çalışmalarının sonuçları istenilen düzeyde olmasa da hazırlanması düşünülen mikroemülsiyon formülasyonu için önemli ipuçları vermiştir. Bunlardan en önemlisi, kullanılan yağ miktarının artmasının formülasyonun bozulmasına ve berraklıktan uzaklaşmasına sebep olduğunun gösterilmiş olmasıdır. Yapılan deneme çalışmalarının sonuçları Tablo 5.1’de özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Tween 80 ve PEG 400 kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Tween 80:PEG 400	0,5 g Keten Yağı	1,0 g Keten Yağı	1,5 g Keten Yağı
4:1	✓	✓	-
5:1	✓	✓	-
6:1	✓	✓	-
7:1	✓	✓	-
8:1	✓	✓	-
9:1	✓	✓	✓
10:1	✓	✓	✓

Etkin madde içermeyen mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasında karşılaşılan en büyük sıkıntı karıştırma sırasında oluşan köpüklerden ötürü bulanıklığın başladığı noktanın görülmesindeki zorluk olmuştur. Bu sorun, ilerleyen deneme çalışmalarında uygulanan karıştırma hızının düşürülmesi ve titrasyon işlemine zaman zaman ara verip formülasyonların bir süre bekletilmesiyle düzeltilmeye çalışılmıştır. Ayrıca kullanılan YEM ve Y.YEM’in karıştırma sırasında oluşan köpükten sorumlu olabileceği bilindiği için farklı YEM ve Y.YEM’ler denenmiş ve aralarındaki oranlar değiştirilerek köpük oluşumu düzeltilmeye çalışılmıştır.

Hazırlanan ilk deneme formülasyonları ve öğrenilen bilgilerin ardından yapılan çalışmalarda keten yağı miktarı 0,5 g olacak şekilde düşük düzeyde sabit tutulmuş, 250 rpm karıştırma hızı uygulanmış ve Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM oranı 1:2, 1:3 ve 1:4 olacak şekilde formülasyonlar tekrar değerlendirilmiştir. Bu deneme formülasyonları ile elde edilen sonuçlar Tablo 5.2-5.4'te verilmiştir.

Tablo 5.2. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:2 olan formülasyonlar

Keten Yağı (g)	Toplam YEM:Y.YEM (g)	Tween 80 (g)	PEG 400 (g)	Su Miktarı (g)
0,5	10,0	3,333	6,667	1,924
0,5	9,5	3,167	6,333	1,816
0,5	9,0	3,000	6,000	1,772
0,5	8,5	2,833	5,667	1,698
0,5	8,0	2,667	5,333	1,673
0,5	7,5	2,500	5,000	1,584
0,5	7,0	2,333	4,667	1,512

Tablo 5.3. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:3 olan formülasyonlar

Keten Yağı (g)	Toplam YEM:Y.YEM (g)	Tween 80 (g)	PEG 400 (g)	Su Miktarı (g)
0,5	10,0	2,500	7,500	1,895
0,5	9,5	2,375	7,125	1,608
0,5	9,0	2,250	6,750	1,550
0,5	8,5	2,125	6,375	1,467
0,5	8,0	2,000	6,000	-
0,5	7,5	1,875	5,625	-
0,5	7,0	1,750	5,250	-

Tablo 5.4. Yağ miktarı sabit YEM:Y.YEM oranı 1:4 olan formülasyonlar

Keten Yağı (g)	Toplam YEM:Y.YEM (g)	Tween 80 (g)	PEG 400 (g)	Su Miktarı (g)
0,5	10,0	2,000	8,000	0,796
0,5	9,5	1,900	7,600	-
0,5	9,0	1,800	7,200	-
0,5	8,5	1,700	6,800	-
0,5	8,0	1,600	6,400	-
0,5	7,5	1,500	6,000	-
0,5	7,0	1,400	5,600	-

Elde edilen sonuçlar kullanılan Tween 80® miktarındaki artışın formülasyonun su tutma kapasitesi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Ancak iki önemli sorun bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, kullanılan yağ miktarının çok düşük olması, ikincisi ise benzer sonuçların soya yağı ile alınamamış olmasıdır. Ayrıca 250 rpm karıştırma hızında bile köpürme sorununun tam olarak önüne geçilememiştir.

Mikroemülsiyon formülasyon denemeleri için 50 rpm ve 100 rpm gibi daha düşük karıştırma hızlarında da çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar köpürme sorununun ve kullanılan su miktarının tam olarak kaydedilememesinin formülasyonları hazırlanırken uygulanan karıştırma hızının daha da düşürülmesi ile ancak belli bir dereceye kadar ortadan kaldırılabileceğini göstermiştir. Bu aşama ve ilerleyen aşamalarda ideal karıştırma hızını belirleyebilmek için, uygulanan karıştırma hızının formülasyonun su tutma kapasitesine etkisi incelenmiş, daha önce Tablo 5.3'te çalışılmış olan 0,5 g keten yağı ve 1:3 oranında 10 g Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı ile hazırlanmış mikroemülsiyon formülasyonu üzerinde denemeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.5'te verilmiştir.

Tablo 5.5. Karıştırma hızının su tutma kapasitesine etkisinin incelenmesi

Keten Yağı (g)	Toplam YEM:Y.YEM (g)	rpm	Su Miktarı (g)
0,5	10,0 (1:3)	1000	1,924
0,5	10,0 (1:3)	500	1,912
0,5	10,0 (1:3)	250	1,885
0,5	10,0 (1:3)	100	1,348
0,5	10,0 (1:3)	50	1,116

Karıştırma hızının su tutma kapasitesine etkisi çalışmasında elde edilen sonuçlar, karıştırma hızındaki artışın yüklenen su miktarını da arttırdığını göstermiştir. Hazırlama sırasında bütün mikroemülsiyon formülasyonlarında köpürme görülmüş, köpüğün uzaklaşması için karıştırma işlemine zaman zaman ara verilerek formülasyonlar $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilmiştir. Gerekli görüldüğü durumlarda ise ultrasonik banyoda tutularak köpük uzaklaştırma işlemi hızlandırılmaya çalışılmıştır. Oldukça uzun süren bu çalışmanın ardından formülasyonların su tutma kapasiteleri kaydedilmiştir. 500 rpm ve 1000 rpm karıştırma hızlarında elde edilen su miktarları birbirine çok yakın olduğu için (1,924 g ve 1,912 g) ilerleyen denemelerde 500 rpm hız ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Şekil 5.1’de olduğu gibi %20 yağ ve %80 YEM:Y.YEM karışımının üzerine damla damla distile su eklendiği düşünülürse, deneyin başlangıcında ortamdaki su miktarı sıfırdır. Titrasyon işlemi ile birlikte eklenen su miktarı yavaş yavaş artıp %25 su seviyesine gelirse, bileşenler için gerekli hesaplar yapıлып üçgen faz diyagramında işaretlendiğinde 1 nolu noktaya denk geldiği görülür. Aynı şekilde su miktarı daha da artıp %50 olduğunda üçgen faz diyagramında 2 nolu nokta, %75 olduğunda 3 nolu nokta işaretlenmektedir. Bu durumdan çıkarılabilecek iki temel sonuç vardır;

- 44

Titrasyon işlemi ile ilgili kavranan bu durumdan sonra üçgen faz diyagramı içerisinde mümkün olduğunca çok nokta seçilmiş, bu noktalardaki yağ, YEM:Y.YEM ve su bileşenlerinin oranları bulunmuş ve bu oranlar kullanılarak bir seri mikroemülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar 12 saat $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında bekletilmiş, köpük oluşumunun uzaklaşması sağlanmış ve mikroemülsiyon oluşumları berraklıklarına göre değerlendirilip üçgen faz diyagramının içerisinde tekrar işaretlenmiştir. Böylece hem köpürme hem de bekleme sorunu çözülmüştür. Literatür taraması yapıldığında da üçgen faz diyagramının içerisindeki noktaların hazırlandığı birçok çalışmaya rastlanmaktadır (Seljak vd., 2014; Nicholas vd., 2015; Aboutaleb vd., 2015; Li vd., 2015; Kim vd., 2018).

5.2. Üçgen Faz Diyagramı Hazırlanması ve İdeal Formülasyonların Belirlenmesi

Mikroemülsiyon formülasyon denemeleri ve yöntem bölümünde anlatıldığı gibi, YEM:Y.YEM farklı oranlarda karıştırılarak hem soya yağı hem de keten yağı ile formülasyonlar hazırlanmaya çalışılmıştır. Keten yağı ile $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında yapılan; ancak titrasyon işlemi sonucunda oluşan köpük nedeniyle tam bir şekilde okunamayan su miktarlarını da içeren örnek bir çalışma sonuçları Tablo 5.6 ve Tablo 5.7’de verilmiştir. Tek bir YEM:Y.YEM oranı içeren bu formülasyonun hazırlanması için bir hafta zaman harcanmıştır ve berraklığın olduğu noktalar için gereken bekleme süresinin çok uzun olduğu sonucuna varılmıştır.

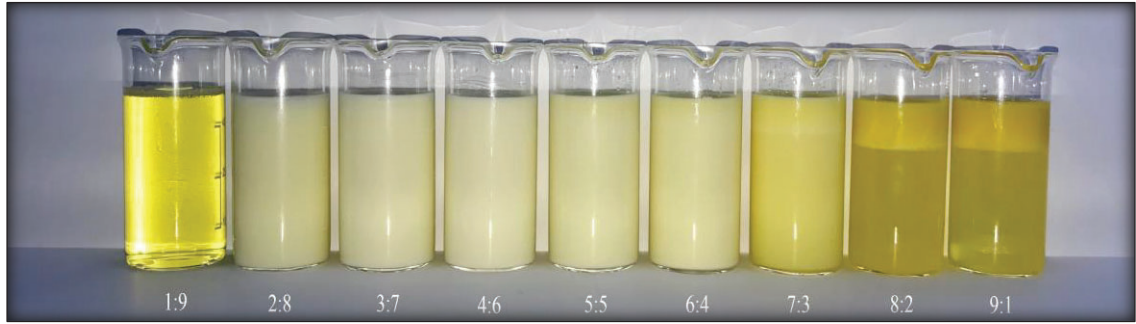
Tablo 5.6. Keten Yağı ve 4:1 Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan formülasyonlar I

Formülasyon	Keten Yağı (g)	YEM:Y.YEM (g)	YEM+Y.YEM (g)	Distile Su (g)	
				S/Y	Y/S
F1	1,00	7,20 : 1,80	9,00	1,50	15,36
F2	2,00	6,40 : 1,60	8,00	-	-
F3	3,00	5,60 : 1,40	7,00	-	-
F4	4,00	4,80 : 1,20	6,00	-	-
F5	5,00	4,00 : 1,00	5,00	-	-
F6	6,00	3,20 : 0,80	4,00	-	-
F7	7,00	2,40 : 0,60	3,00	-	-
F8	8,00	1,60 : 0,40	2,00	-	-
F9	9,00	0,80 : 0,20	1,00	-	-

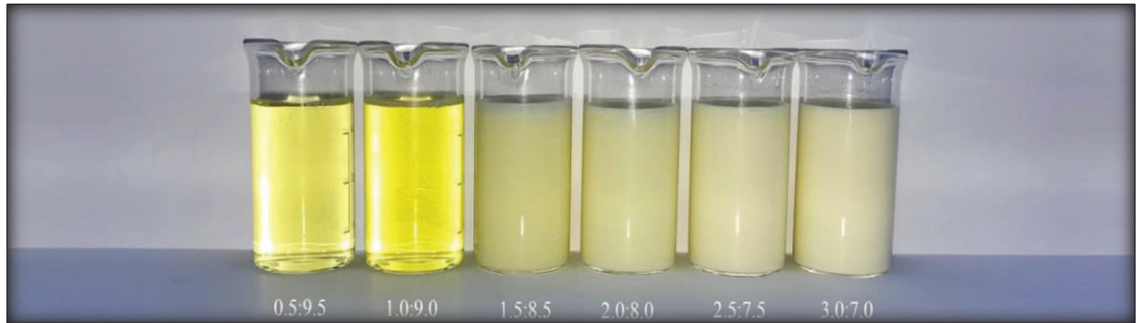
Tablo 5.7. *Keten Yağı ve 4:1 Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan formülasyonlar II*

Formülasyon	Keten Yağı (g)	YEM:Y.YEM (g)	YEM+Y.YEM (g)	Distile Su (g)	
				S/Y	Y/S
F1	0,50	7,60 : 1,90	9,50	2,64	14,74
F2	1,00	7,20 : 1,80	9,00	1,50	15,36
F3	1,50	6,80 : 1,70	8,50	2,62	-
F4	2,00	6,40 : 1,60	8,00	-	-
F5	2,50	6,00 : 1,50	7,50	-	-
F6	3,00	5,60 : 1,40	7,00	-	-
F7	3,50	5,20 : 1,30	6,50	-	-
F8	4,00	4,80 : 1,20	6,00	-	-
F9	4,50	4,40 : 1,10	5,50	-	-

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonlarda berraklığın oluştuğu, kaybolduğu ve tekrar oluştuğu noktalar belirlenmeye çalışılmıştır. Görünümdeki bu değişimin sebebi de fazlar arasındaki dönüşüm olarak yorumlanmıştır. Formülasyonların hazırlanması aşamasında titrasyon işlemlerine beherin alabildiği maksimum su miktarına kadar devam edilmiş ve elde edilen sonuçlar fotoğraflanmıştır (Görsel 5.1 ve Görsel 5.2).

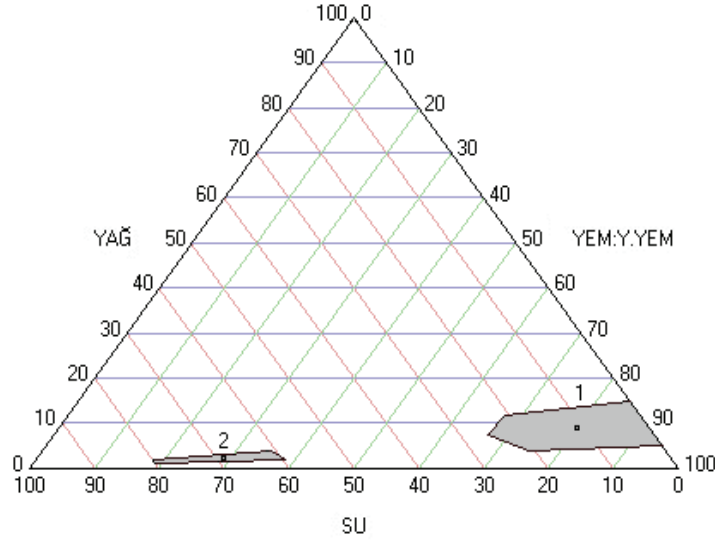


Görsel 5.1. *Tablo 5.6'da verilen oranlara göre hazırlanan formülasyonlar*



Görsel 5.2. *Tablo 5.7'de verilen oranlara göre hazırlanan formülasyonlar*

Tablo 5.6’da elde edilen sonuçlar üçgen faz diyagramına işaretleme yapmak için uygun yeterli veri içermemektedir. Tablo 5.7’de elde edilen sonuçlar ise veriler az olmasına karşın genel bir durum değerlendirmesi yapabilmek için üçgen faz diyagramında işaretlenmiştir. Elde edilen çizim Şekil 5.2’de sunulmuştur.

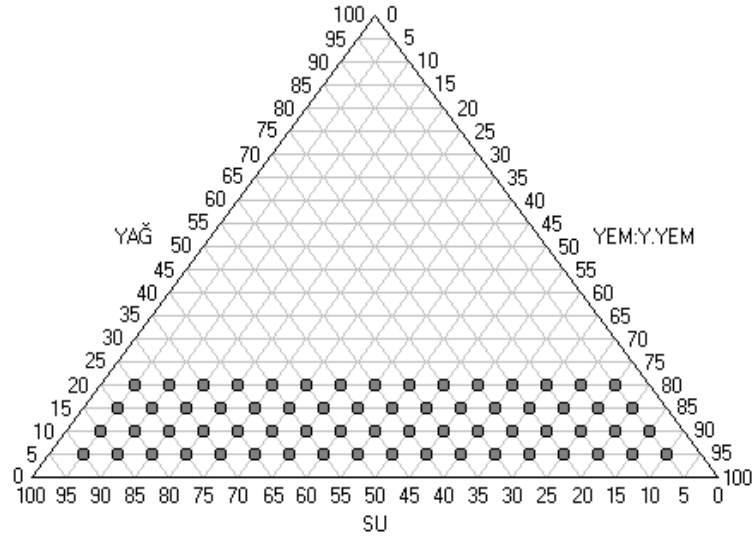


Şekil 5.2. Üçgen faz diyagramında bileşenlerin işaretlenmesi

Yapılan işaretlemeler sonucunda çizilen üçgen faz diyagramında iki kapalı bölge olduğu görülmüştür. Bölge 1 S/Y tipi mikroemülsiyonun olduğu ve bölge 2 Y/S tipi mikroemülsiyonun olduğu alan olarak yorumlanmıştır. Oluşan emülsiyonlarda tip tayini çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda yapılabilecek bir diğer açıklama iki bölgenin aslında aynı olduğu ve Y/S tipi mikroemülsiyonu temsil ettiğidir. Çünkü iki bölgenin arasında kalan noktalarda titrasyon işlemine ara verilmiş ve hazırlanan formülasyonlar çok daha uzun süre bekletilmiş olsaydı, belki de bulanıklık oluşumuna neden olan köpüklerin tamamen ortadan kalkacağı düşünülebilir. Böylece elde edilecek mikroemülsiyon alanının da çok daha büyük şekilde karşımıza çıkması mümkün gözükmemektedir.

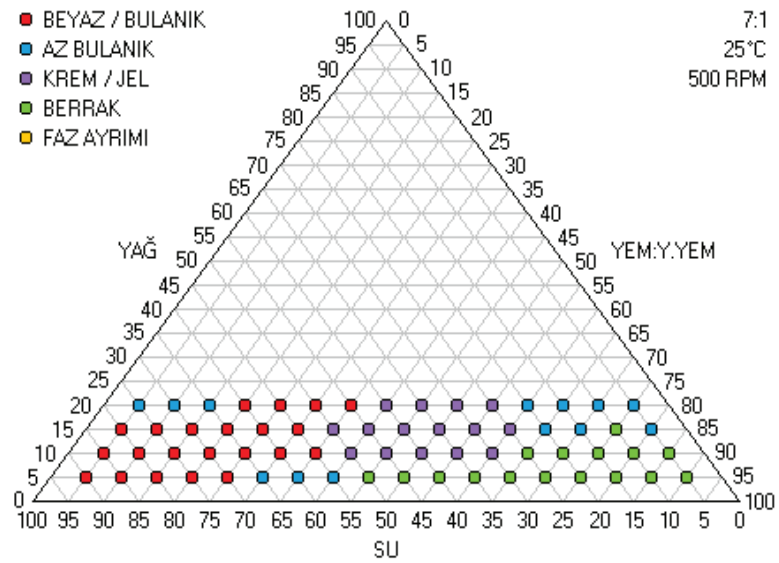
Bahsedilen bu belirsizlikler ve karışıklıklardan ötürü formülasyon çalışmaları çok daha farklı bir yol izlenerek hazırlanmıştır. Yağ ve YEM:Y.YEM karışımı mekanik karıştırıcıyla 500 rpm hızda $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında karıştırılırken damla damla su eklenmiş, hazırlanan karışımlar 24 saat $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında bekletilmiş ve fiziksel görünüşleri incelenmiştir. Formülasyonda kullanılan bileşenler üçgen faz diyagramında işaretlenmiş ve kapladıkları alanların büyüklüklerine göre değerlendirilmiştir.

Formülasyon denemeleri aşamasında üçgen faz diyagramı içerisinde mikroemülsiyonun oluşabileceği bölge tahmin edilebildiği için, Şekil 5.3'te belirlenen noktalar kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır.



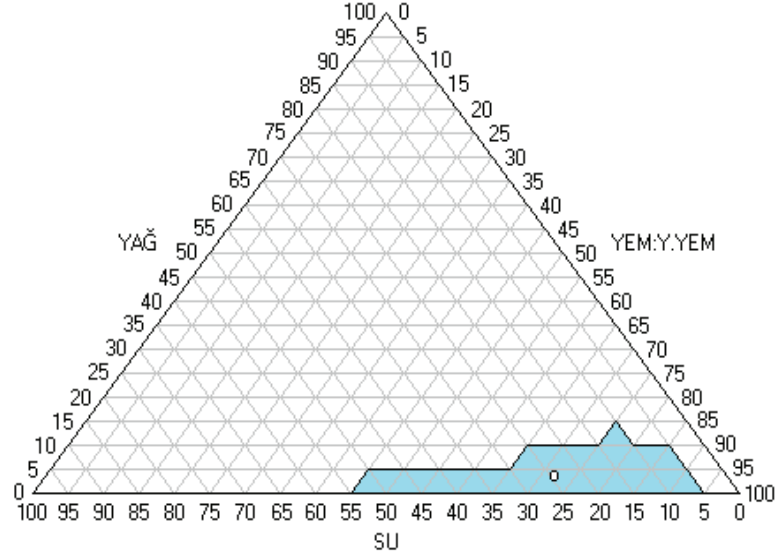
Şekil 5.3. Formülasyon hazırlanması için üçgen faz diyagramı içerisinde seçilen noktalar

Soya yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (7:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



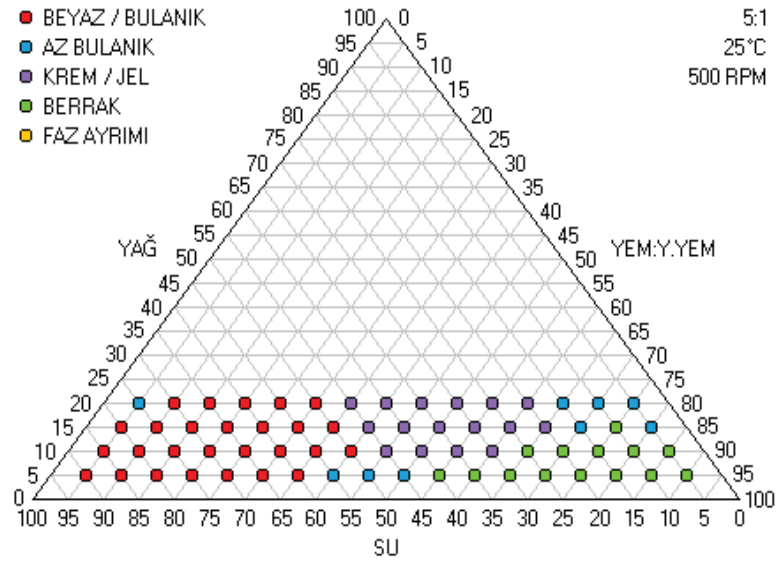
Şekil 5.4. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonunun değerlendirilmesi

Şekil 5.4'te elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.5).



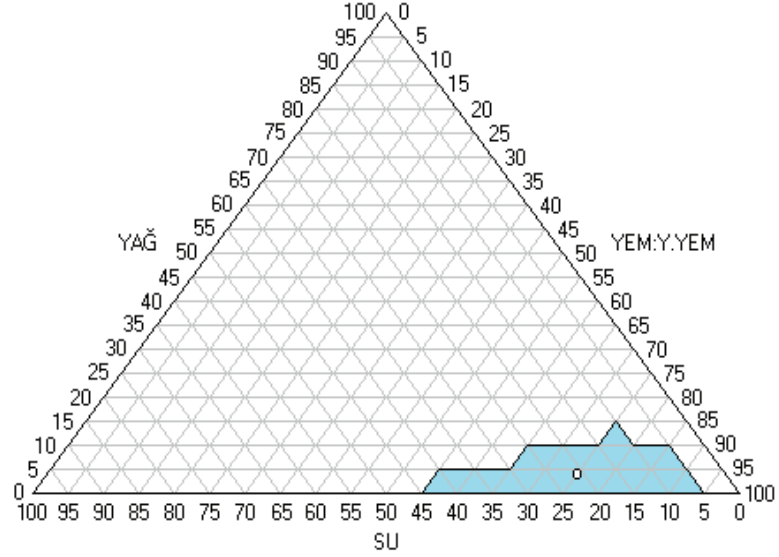
Şekil 5.5. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Soya yağı, Tween 80: PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (5:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



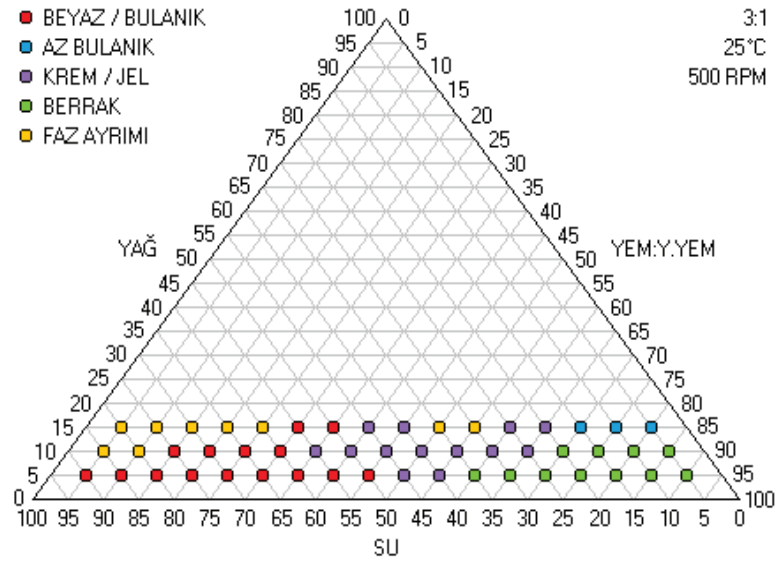
Şekil 5.6. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.6’da elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.7).



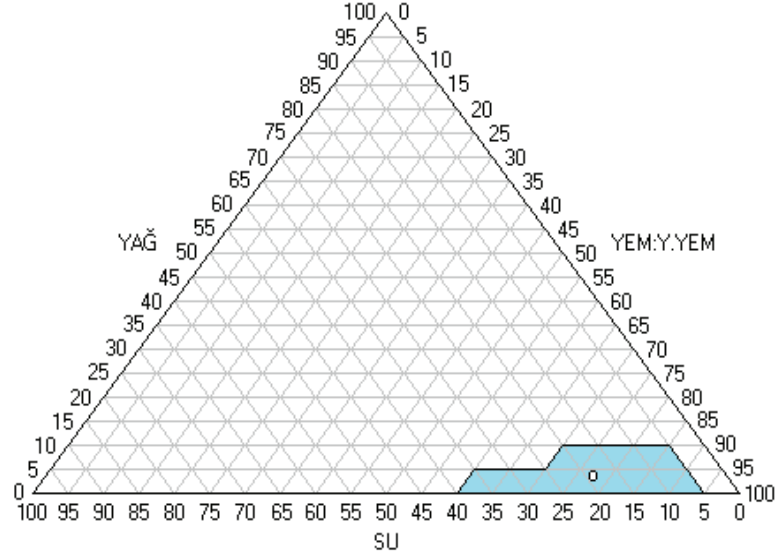
Şekil 5.7. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Soya yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (3:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



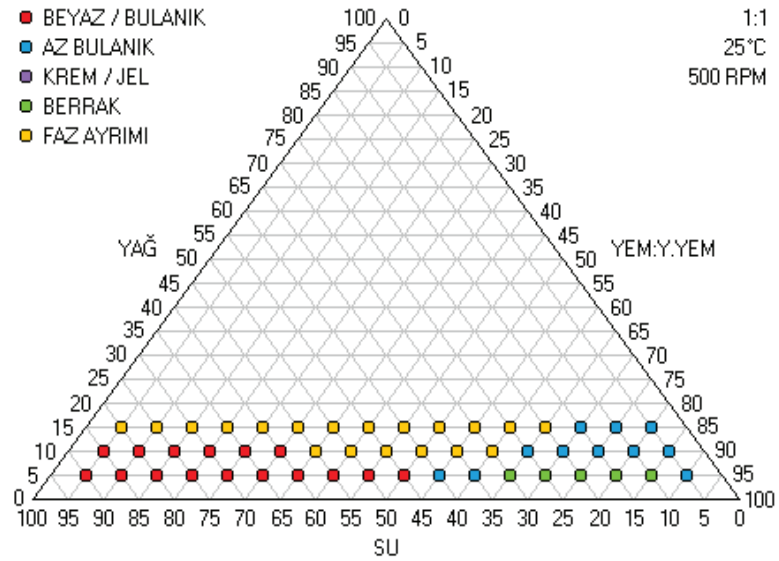
Şekil 5.8. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.8’de elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.9).



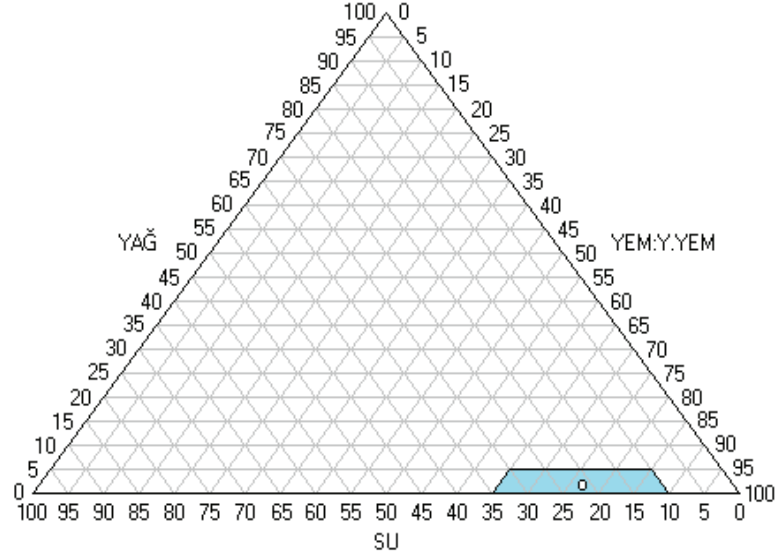
Şekil 5.9. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Soya yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (1:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



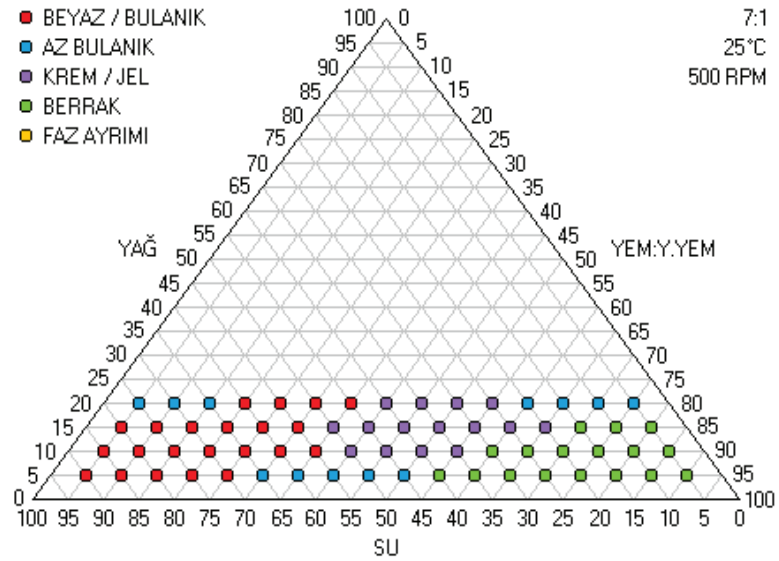
Şekil 5.10. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.10'da elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.11).



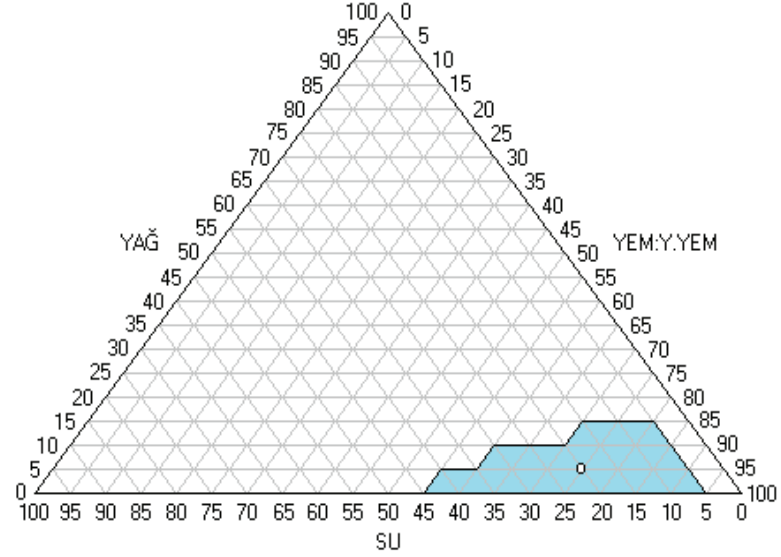
Şekil 5.11. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Keten yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (7:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



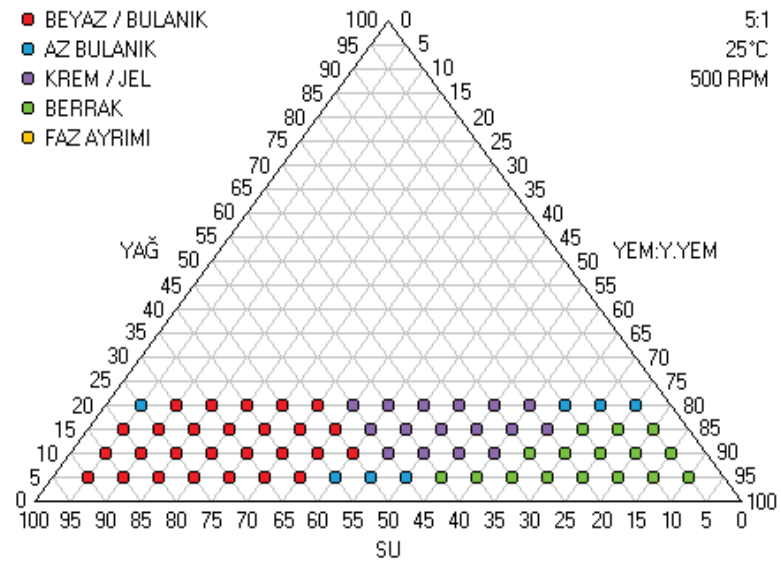
Şekil 5.12. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.12’de elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.13).



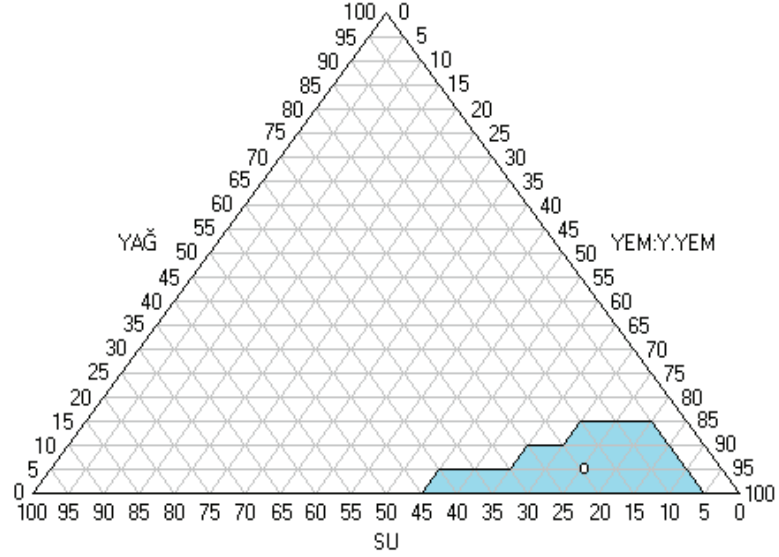
Şekil 5.13. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Keten yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (5:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



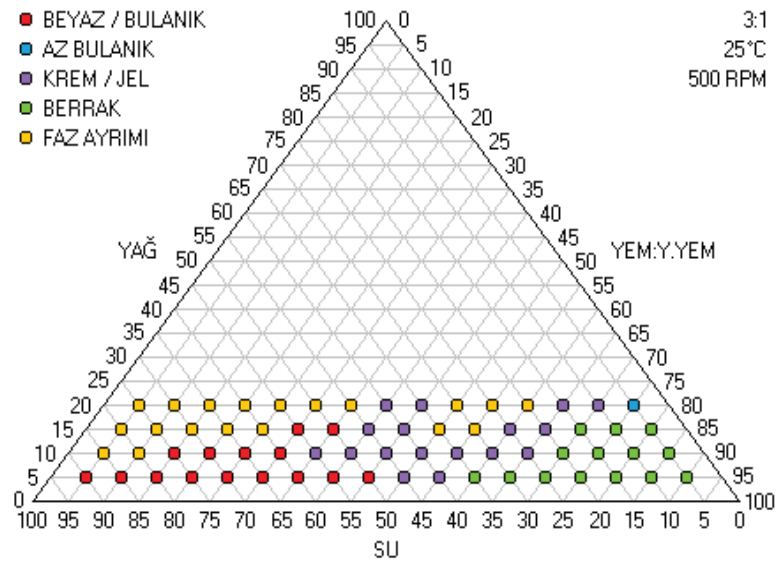
Şekil 5.14. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.14'te elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.15).



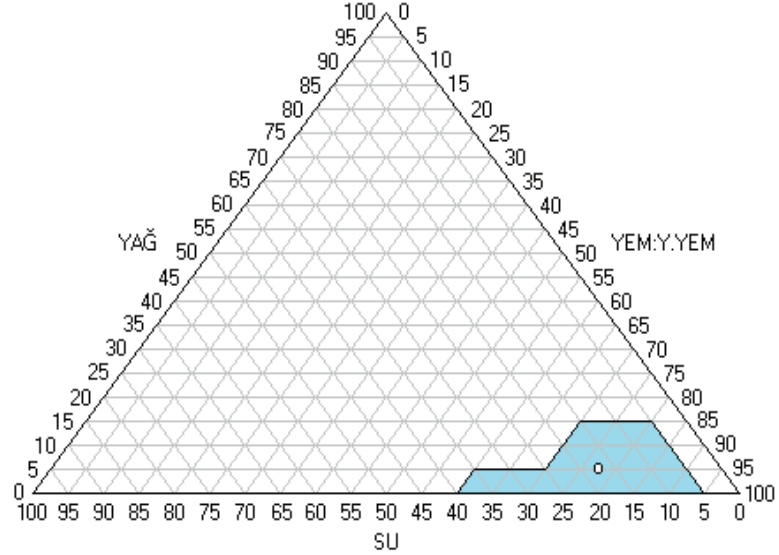
Şekil 5.15. 5:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Keten yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (3:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



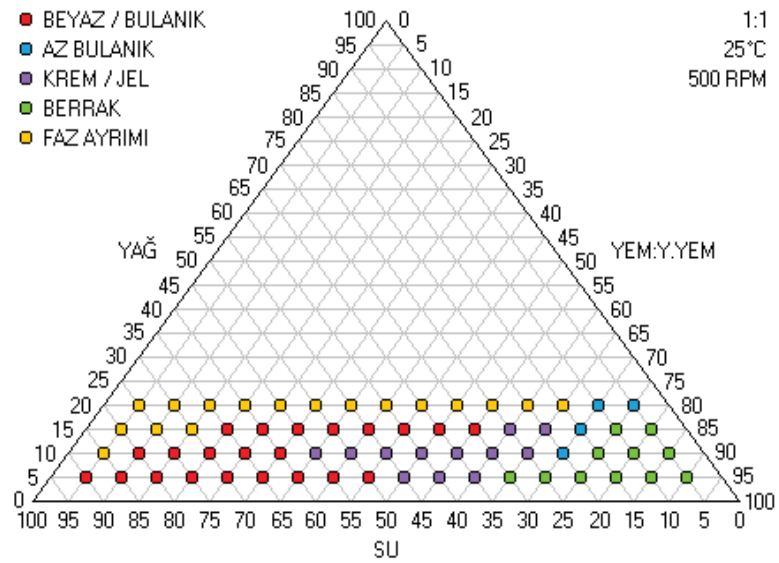
Şekil 5.16. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.16’da elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.17).



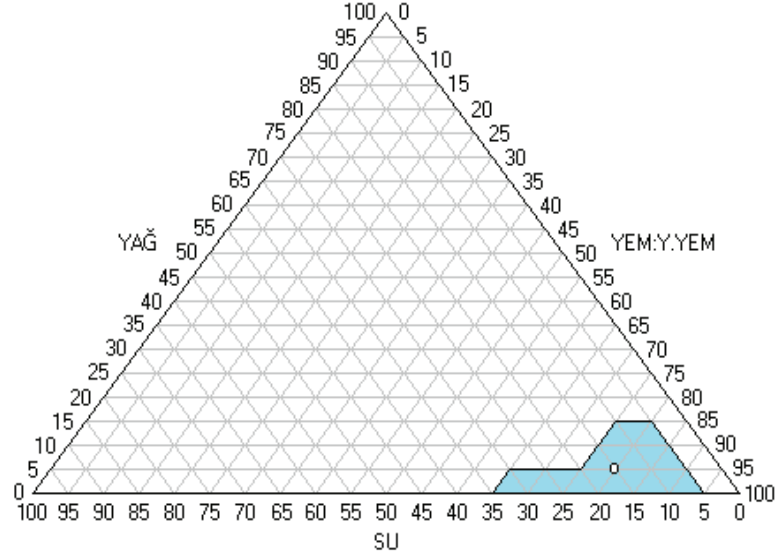
Şekil 5.17. 3:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun oluştuğu bölge

Keten yağı, Tween 80:PEG 400 YEM:Y.YEM karışımı (1:1) ve distile su ile 500 rpm karıştırma hızında ve $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonlar ve çizilen grafikler aşağıdaki gibidir.



Şekil 5.18. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonun değerlendirilmesi

Şekil 5.18’da elde edilen bilgiler kullanılarak mikroemülsiyon oluşan alan ve bu alanın ağırlık merkezi belirlenmiştir (Şekil 5.19).



Şekil 5.19. 1:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan keten yağı mikroemülsiyonunun oluştuğu bölge

Yapılan bütün çalışmalara örnek olması açısından sunulan üçgen faz diyagramlarında ayrıntılı bir şekilde tüm deney parametreleri verilmiş ve grafikler üzerinde elde edilen alanlar belirtilmiştir. Çizilen üçgen faz diyagramlarında görüldüğü gibi soya yağı ve keten yağı için kullanılan YEM:Y.YEM oranları 1:1, 3:1, 5:1 ve 7:1’dir. 9:1 gibi daha büyük bir oranda çalışılması üçgen faz diyagramı içerisinde daha büyük bir taralı alan çıkmasına olanak tanıyacaktır. Ancak, 7:1 oranının üzerine çıkılması, formülasyonda kullanılacak YEM miktarının da yükselmesi anlamına gelmektedir. Yüksek YEM miktarı ile birlikte toksik etkinin artması söz konusu olduğu için 9:1 ve daha üst oranlar denenmemiştir.

Üçgen faz diyagramında belirlenen bir çok oran içerisinde mikroemülsiyon oluşan en büyük alanın 7:1 YEM:Y.YEM oranında sağlandığı görülmüştür. Bu nedenle 7:1 YEM:Y.YEM içeren soya yağı mikroemülsiyonu ve keten yağı mikroemülsiyonu için ağırlık merkezlerindeki bileşen oranları kullanılarak iki ayrı formülasyon yeniden hazırlanmış ve bu mikroemülsiyon formülasyonları kullanılarak karakterizasyon ve kararlılık çalışmalarına başlanmıştır. Bundan sonraki çalışmaların hepsi bu iki formülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Üçgen faz diyagramı çalışmalarında hesaplanan alanlar ve ağırlık merkezindeki bileşenlerin kullanım oranları Tablo 5.8’de verilmiştir.

Tablo 5.8. 7:1 YEM:Y.YEM oranında hazırlanan soya yağı mikroemülsiyonun ağırlık merkezi ve bileşenlerin yüzde değerleri

7:1 YEM:Y.YEM	% Oran	7:1 YEM:Y.YEM	% Oran
Soya Yağı	4,31	Keten Yağı	5,81
Tween 80 + PEG 400	71,38	Tween 80 + PEG 400	74,19
Tween 80	62,46	Tween 80	64,92
PEG 400	8,92	PEG 400	9,27
Distile Su	24,31	Distile Su	20,00
Alan	*313,93	Alan	*335,58
5:1 YEM:Y.YEM	% Oran	5:1 YEM:Y.YEM	% Oran
Soya Yağı	4,60	Keten Yağı	5,69
Tween 80 + PEG 400	74,80	Tween 80 + PEG 400	75,00
Tween 80	62,33	Tween 80	62,50
PEG 400	12,47	PEG 400	12,50
Distile Su	20,60	Distile Su	19,31
Alan	270,63	Alan	313,93
3:1 YEM:Y.YEM	% Oran	3:1 YEM:Y.YEM	% Oran
Soya Yağı	4,17	Keten Yağı	5,80
Tween 80 + PEG 400	77,17	Tween 80 + PEG 400	77,00
Tween 80	57,88	Tween 80	57,75
PEG 400	19,29	PEG 400	19,25
Distile Su	18,66	Distile Su	17,20
Alan	216,51	Alan	270,63
1:1 YEM:Y.YEM	% Oran	1:1 YEM:Y.YEM	% Oran
Soya Yağı	2,41	Keten Yağı	5,26
Tween 80 + PEG 400	76,30	Tween 80 + PEG 400	79,48
Tween 80	38,15	Tween 80	39,74
PEG 400	38,15	PEG 400	39,74
Distile Su	21,29	Distile Su	15,26
Alan	97,43	Alan	205,68

* Bulunan en büyük mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir.

7:1 YEM:Y.YEM içeren soya yağı mikroemülsiyonu, keten yağı mikroemülsiyonu ve boş mikroemülsiyonlar için kullanılan kısaltmalar Tablo 5.9’da verilmiştir.

Tablo 5.9. Mikroemülsiyon formülasyonları için kullanılacak kısaltmalar

Kısaltma	Açıklama
SMB	TGF-β1 içermeyen soya yağı mikroemülsiyonu
SMT	TGF-β1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMB	TGF-β1 içermeyen keten yağı mikroemülsiyonu
KMT	TGF-β1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu

5.3. Ejakulattan TGF-β1 Ekstraksiyonu

Ejakulat içeriğinde kalsiyum, potasyum, klor, magnezyum, çinko gibi birçok minerali, semenin alkali olmasında büyük öneme sahip sitrik asit gibi vitaminleri, sperm hücrelerinin enerji kaynağı olan fruktoz şekerini, adrenalin, noradrenalin, dopamin gibi proteinlerin yanında serbest amino asitleri de barındırmaktadır. Ejakulat içerisindeki proteinler yaklaşık olarak ejakulatın ağırlıkça %50’sini oluşturmaktadır (http-4).

Ejakulatın yapısında bulunan büyük maddelerin uzaklaştırılması amacıyla amonyum sülfat ve absöü alkol ile işleme tabi tutulan örneklerden sadece absöü alkol ile çökme gözlenmiş ve SDS-PAGE çalışmalarına bu örnekler üzerinden devam edilmiştir.

Ekstraksiyonu istenen TGF-β1 proteininin jel üzerinde hangi bölgede bant oluşturduğunu tespit etmek için, proteinin saf hali de SDS-PAGE çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon yapılmak istenen örnekler ve saf TGF-β1’in uygulandığı jeller *Brillant Blue* çözeltisi ile boyanmıştır. Jel ultraviyole ışıktaki incelenmiştir. Proteinlerin jel üzerindeki yürümleri farklı yoğunluktaki jeller üzerinde denenmiş olmasına rağmen saf TGF-β1’in oluşturduğu bant, örneklerin oluşturduğu bantlar arasından ayırt edilememiştir. Ejakulatın içeriğindeki hem çeşit hem de miktar açısından çok yoğun olan proteinlerin jel üzerinde oluşturduğu bantlardan TGF-β1’in ekstraksiyonu mümkün olmamıştır.

Her ne kadar bu tez kapsamında TGF-β1 içeren formülasyonlarla birlikte ejakulat içeren formülasyonlarla da çalışılması planlanmış olsa da, ejakulatın içerisinde TGF-β1 proteininin ekstraksiyonu için geliştirilen ve denenilen yöntemler yetersiz kalmış ve bu nedenle formülasyon çalışmalarına sadece saf TGF-β1 ile devam edilmiştir.

5.4. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu

Bu bölümde hazırlanan etkin maddeli ve etkin maddesiz mikroemülsiyon formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve elde edilen sonuçlar tartışılmıştır. Formülasyonlar üzerinde yapılan incelemeler; fiziksel görünüş, emülsiyon tipi, faz ayrımı, damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel, reolojik davranış, pH, elektriksel iletkenlik, FT-IR, NMR ve etkin madde miktar tayini olarak sıralanabilir.

5.4.1. Fiziksel görünüş

Taze olarak hazırlanan formülasyonların $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığındaki görünüşleri görsel olarak incelenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, hazırlanan formülasyonların kararlı bir yapıda olduğu bulunmuş, formülasyonlarda fiziksel görünüş açısından bir değişiklik görülmemiş ve hazırlandığı andan itibaren berrak ve tekdüze görünümünü korumuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.10’da sunulmuştur.

Tablo 5.10. Mikroemülsiyon formülasyonlarının fiziksel görünüşü

Formülasyon	Açıklama
SMB	Berrak, tekdüze, kararlı
SMT	Berrak, tekdüze, kararlı
KMB	Berrak, tekdüze, kararlı
KMT	Berrak, tekdüze, kararlı

5.4.2. Tip tayini

Taze olarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının tipi dış fazları su ile seyreltilerek kontrol edilmiştir. Formülasyonlara distile su eklendiği zaman berrak, tekdüze ve kararlı yapılarını korumaya devam etmesi, hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının Y/S tipi olduğunun göstergesidir. Ayrıca, karakterizasyon çalışmalarında formülasyonların iletkenliğinin ölçülmesi de formülasyon tipinin Y/S olduğuna işaret etmektedir (Bumajdad ve Eastoe, 2004).

5.4.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

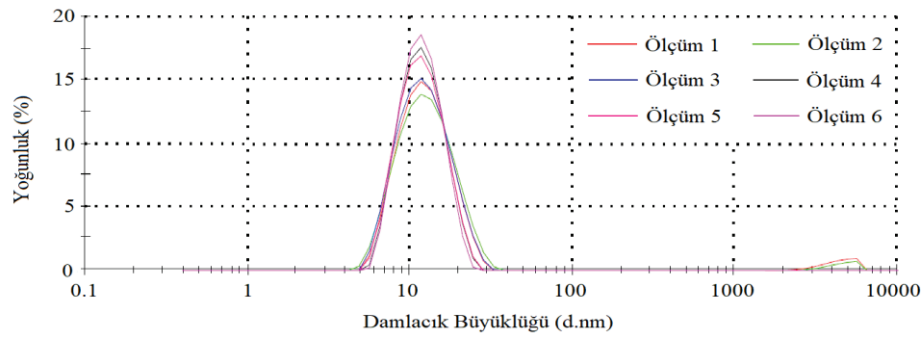
Taze olarak hazırlanan formülasyonların 1000 ve 2000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmesinden sonra görsel olarak incelenmiş ve hiç bir formülasyonda faz ayrımı görülmemiştir.

5.4.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı

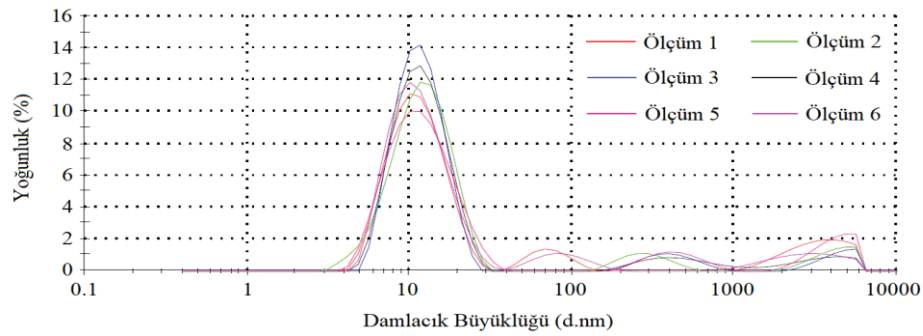
Taze olarak hazırlanan formülasyonların damlacık büyüklüğü ve dağılımı, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.11’de verilmiştir. Damlacık büyüklüğü ve dağılımını gösteren karşılaştırmalı analiz sonuçları ise Şekil 5.20-5.23’te sunulmuştur.

Tablo 5.11. Mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

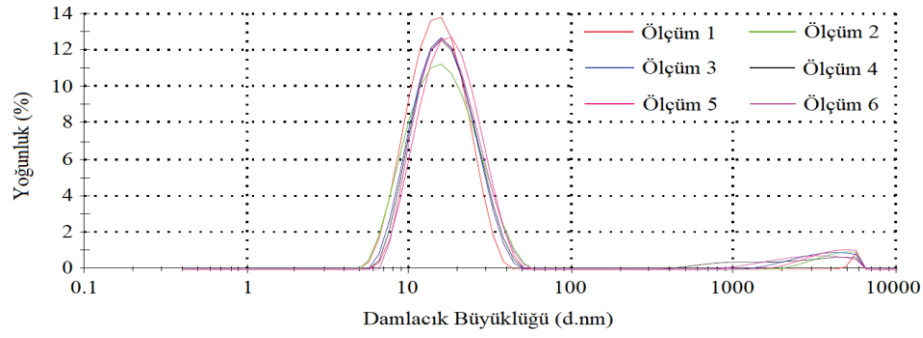
Ölçüm (d.nm)	SMB	SMT	KMB	KMT
1	12,060	14,850	15,280	23,410
2	11,880	13,070	15,680	21,580
3	11,300	12,510	15,970	32,710
4	11,120	12,390	16,570	35,100
5	11,030	16,630	17,060	42,820
6	11,120	12,620	17,160	29,890
Ort.	11,418	13,678	16,287	30,918
SS	0,440	1,709	0,765	7,836
SH	0,180	0,698	0,312	3,199



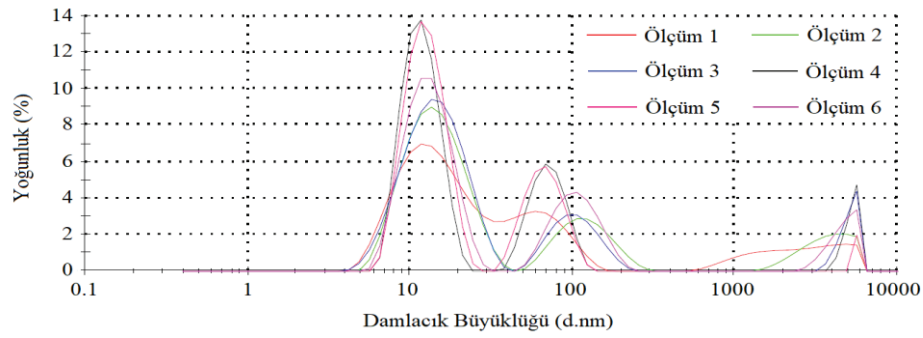
Şekil 5.20. SMB mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



Şekil 5.21. SMT mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



Şekil 5.22. KMB mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



Şekil 5.23. KMT mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

Mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık büyüklüğü dağılımı incelendiğinde, etkin madde içermeyen formülasyonların ortalama damlacık büyüklüğü soya yağı mikroemülsiyonu için 11,418 nm ve keten yağı mikroemülsiyonu için 17,160 nm olarak bulunmuştur. Bu değerler etkin maddeli SBT ve KBT formülasyonları için sırasıyla 13,678 nm ve 30,918 nm büyüklüklere yükselmiştir. Formülasyonların damlacık büyüklükleri genel olarak 50 nm altında olsa da, yapılan incelemeler sonucunda mikroemülsiyonların içerisinde 100 nm ve üzerinde yağ damlacıklarının olduğu da gözükmemektedir. Ancak analiz raporları incelendiği zaman 100 nm ve üzerindeki damlacıkların toplam damlacıklara göre yüzde oranının sadece %10 olduğu görülmektedir. Yağ damlacıklarında %90 gibi büyük bir oran 50 nm altındaki damlacıkları kapsamaktadır. Sahip oldukları bu küçük damlacık yapıları sayesinde de berrak/saydam gözükmemektedirler. Hazırlanan bu sistemler için terminolojik olarak mikroemülsiyon teriminin kullanılması yanıltıcı da olsa, aslında 10 ile 100 nm arasındaki damlacık büyüklüğüne sahip kararlı ve nano boyutlu sistemler anlaşılmaktadır (Burguera ve Burguera, 2012).

Tablo 5.12. Mikroemülsiyon formülasyonlarının PDI değerleri (n=6)

Ölçüm (PDI)	SMB	SMT	KMB	KMT
1	0,201	0,306	0,263	0,363
2	0,190	0,342	0,228	0,396
3	0,109	0,322	0,246	0,257
4	0,100	0,332	0,259	0,272
5	0,093	0,288	0,253	0,263
6	0,066	0,343	0,229	0,280
Ort.	0,127	0,322	0,246	0,305
SS	0,055	0,022	0,015	0,059
SH	0,023	0,009	0,006	0,024

Büyüklik dağılımını değerlendirmek için 0-1 arasında değerler alan polidisperslik indisi (PDI) verileri incelenmiştir. PDI sıfıra yakın değerlerde ise formülasyonun homojen bir dağılıma sahip olduğunu (monodispers) göstermektedir (Schöler vd., 2001). Yapılan çalışma sonucunda etkin maddesiz SMB ve KMB formülasyonlarının ortalama PDI değerleri sırasıyla 0,127 ve 0,246 olarak bulunmuştur. Etkin maddeli SMT ve KMT formülasyonlarında ise değerlerin büyüdüğü ve sırasıyla 0,322 ve 0,305 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlardan, etkin maddesiz formülasyonların etkin maddeli formülasyonlara göre daha homojen bir dağılıma sahip olduğu söylenebilir. Damlacıkların büyüklik dağılımları hakkında bilgi veren PDI, ortalama, SS ve SH değerleri ise Tablo 5.12’de sunulmuştur.

5.4.5. Zeta potansiyel analizi

Zeta potansiyel değeri hem dağılan damlacıkların ara yüzeyde bulunan çift tabakalı elektrik potansiyelini, hem de ara yüzeyden damlacıkların dağıtan faza karşı oluşturduğu potansiyeli ifade etmektedir. Zeta potansiyel ölçümü hem karakterizasyon hem de kararlılık çalışmalarında önemli sonuçlar edinmemizi sağlar. Pozitif ya da negatif düşük zeta potansiyel değerine sahip dispers sistemler düşük fiziksel kararlılık gösterirken, yüksek zeta potansiyele sahip sistemde itme ve çekme kuvvetlerinin gücüne bağlı olarak kararlılık daha yüksek olduğu görülmektedir (Lu ve Gao, 2010).

Taze hazırlanan etkin maddeli ve etkin maddesiz mikroemülsiyonlar için zeta potansiyeli ölçümleri tek kullanımlık zeta hücrelerinde, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında ve formülasyonlar dış faz olan distile su ile seyreltildikten sonra yapılmıştır.

Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için, kullanılan distile su ölçümlerden önce NaCl ile 50 μ S iletkenliğe ayarlanmıştır. Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri Tablo 5.13'te verilmiştir. Etkin madde yüklendikten sonra elde edilen SMT ve KMT mikroemülsiyonlarında zeta potansiyel değerlerinin düştüğü görülmektedir.

Tablo 5.13. Mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=6)

Zeta Potansiyel (mV)	SMB	SMT	KMB	KMT
1	-7,730	-1,220	-2,280	-2,220
2	-7,260	-1,280	-6,090	-1,270
3	-11,600	-1,850	-11,100	-0,184
4	-10,400	-0,654	-8,920	-1,230
5	-6,580	-1,080	-3,830	-0,354
6	-5,210	-1,110	-8,920	-1,210
Ort.	-8,130	-1,199	-6,857	-1,078
SS	2,410	0,387	3,383	0,736
SH	0,984	0,158	1,381	0,300

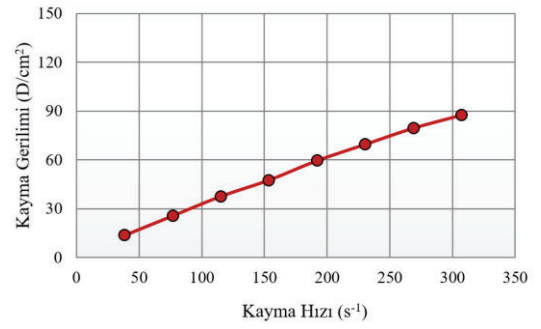
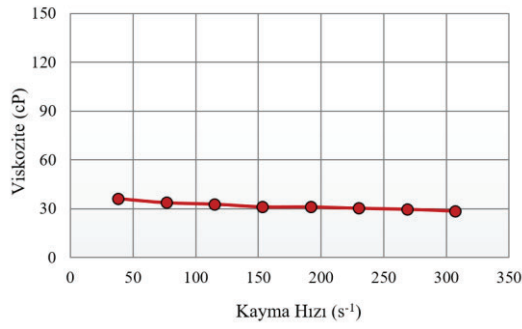
5.4.6. Reolojik analiz

Farmasötik alanda geçerli olan birçok akış tipi vardır. Kayma hızındaki değişime bağlı olarak viskozitede değişim olmaz ya da kayma gerilimi ile kayma hızı arasında doğrusal korelasyon var ise, bu akışa Newton akış adı verilir. Kayma hızındaki artış ile viskozite değişimi gösteren sistemler ise Newton olmayan akış olarak tanımlanır. Su, çok seyreltik emülsiyonlar, mikroemülsiyonlar ve bazı yağlar Newton akış gösterir. Newton olmayan akış tipleri, kayma hızına, zamana ve kayma gerilimine bağlı olarak viskozitede değişimin görüldüğü akış tipleridir (Yazan, 2002b).

Mikroemülsiyon sistemlerin Newton akış modeline uyması damlacıkların küresel olduğunu, agregat oluşturmadığını, iç faz hacim oranının düşük ve damlacık büyüklüğünün çok ufak olduğunu göstergesidir (Çelebi, 2007). Taze olarak hazırlanan formülasyonların reolojik davranışı Brookfield koni-plak reometresi kullanılarak incelenmiş, ölçümler $25\pm1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mikroemülsiyon formülasyonlarının Newton akış modeline uyum göstermesi beklenmektedir. Etkin maddeli ve etkin maddesiz formülasyonlarda reolojik analiz sonucunda elde edilen reogramlar Tablo 5.14-5.29 ve Şekil 5.24-5.39'da verilmiştir.

Tablo 5.14. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

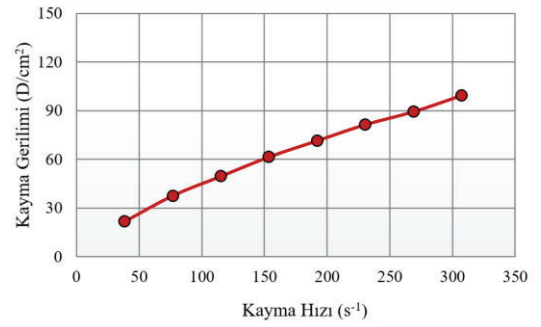
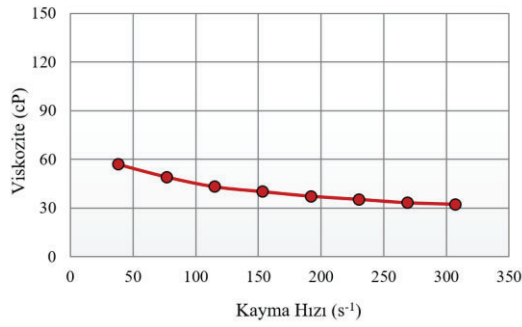
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
36,25	10,00	13,92	38,40	25,25
33,66	20,00	25,85	76,80	25,25
32,79	30,00	37,78	115,20	25,28
31,07	40,00	47,72	153,60	25,25
31,07	50,00	59,65	192,00	25,25
30,21	60,00	69,59	230,40	25,28
29,59	70,00	79,53	268,80	25,25
28,48	80,00	87,49	307,20	25,25



Şekil 5.24. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

Tablo 5.15. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

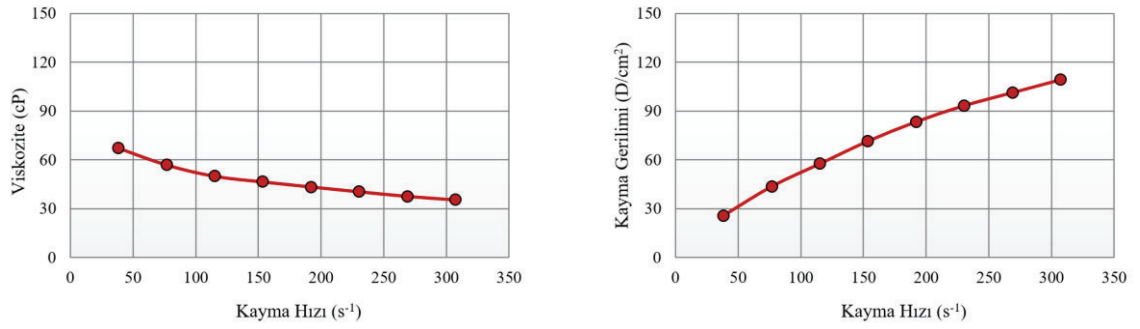
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
56,96	10,00	21,87	38,40	25,23
49,19	20,00	37,78	76,80	25,23
43,15	30,00	49,71	115,20	25,20
40,13	40,00	61,64	153,60	25,20
37,28	50,00	71,58	192,00	25,20
35,38	60,00	81,52	230,40	25,23
33,29	70,00	89,48	268,80	25,18
32,36	80,00	99,42	307,20	25,20



Şekil 5.25. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

Tablo 5.16. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

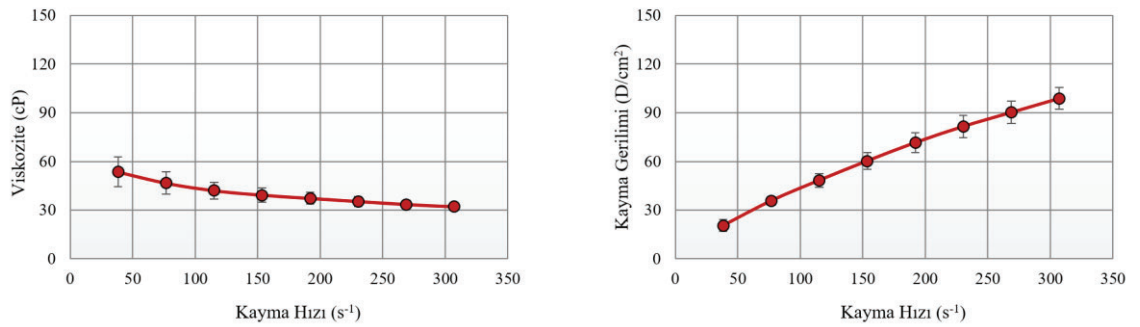
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
67,31	10,00	25,85	38,40	25,15
56,96	20,00	43,74	76,80	25,15
50,05	30,00	57,66	115,20	25,15
46,60	40,00	71,58	153,60	25,15
43,50	50,00	83,51	192,00	25,13
40,56	60,00	93,45	230,40	25,13
37,73	70,00	101,41	268,80	25,13
35,60	80,00	109,36	307,20	25,13



Şekil 5.26. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

Tablo 5.17. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

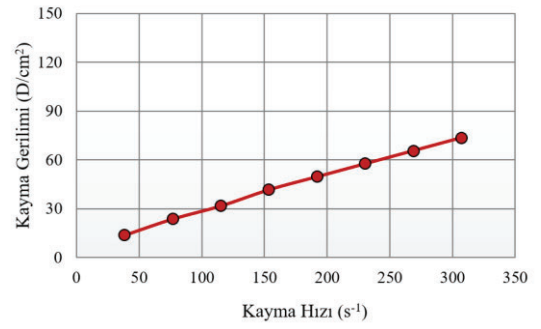
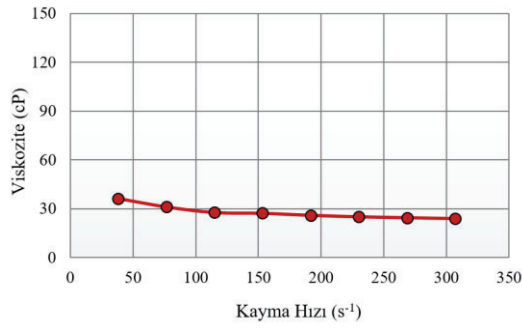
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
53,51	10,00	20,55	38,40	25,21
46,60	20,00	35,79	76,80	25,21
42,00	30,00	48,38	115,20	25,21
39,27	40,00	60,31	153,60	25,20
37,28	50,00	71,58	192,00	25,19
35,38	60,00	81,52	230,40	25,21
33,54	70,00	90,14	268,80	25,19
32,15	80,00	98,76	307,20	25,19



Şekil 5.27. SMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.18. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

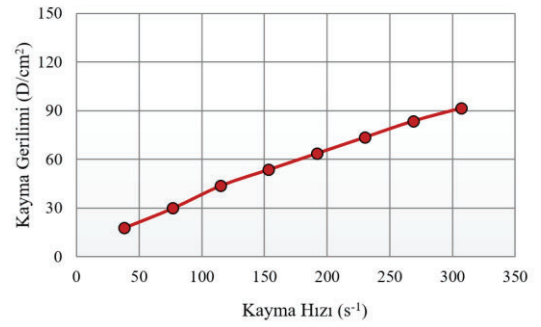
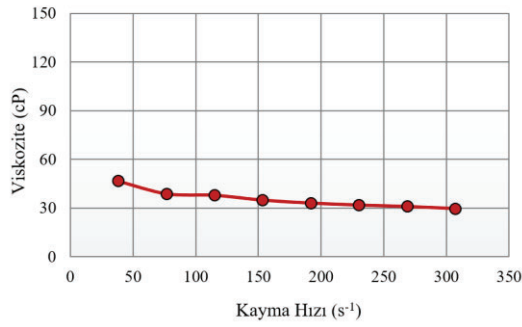
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
36,25	10,00	13,92	38,40	25,73
31,07	20,00	23,86	76,80	25,73
27,62	30,00	31,81	115,20	25,70
27,18	40,00	41,76	153,60	25,73
25,89	50,00	49,71	192,00	25,70
25,03	60,00	57,66	230,40	25,70
24,41	70,00	65,62	268,80	25,70
23,95	80,00	73,57	307,20	25,70



Şekil 5.28. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

Tablo 5.19. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

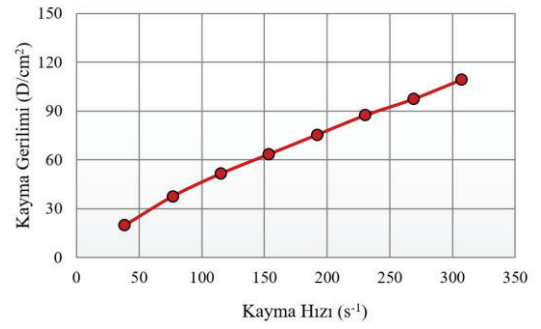
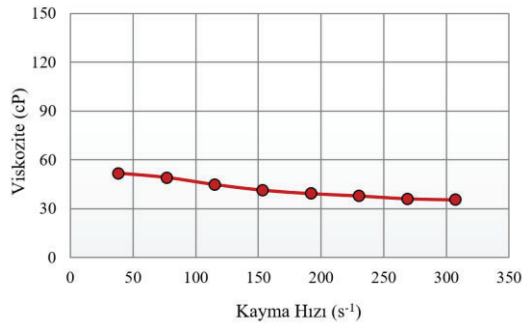
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
46,60	10,00	17,90	38,40	25,65
38,84	20,00	29,83	76,80	25,65
37,97	30,00	43,74	115,20	25,65
34,95	40,00	53,69	153,60	25,63
33,14	50,00	63,63	192,00	25,63
31,93	60,00	73,57	230,40	25,60
31,07	70,00	83,51	268,80	25,60
29,77	80,00	91,46	307,20	25,63



Şekil 5.29. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

Tablo 5.20. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

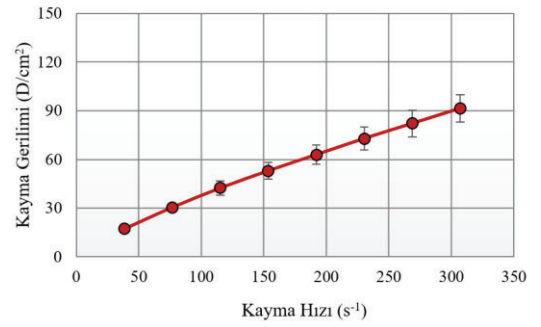
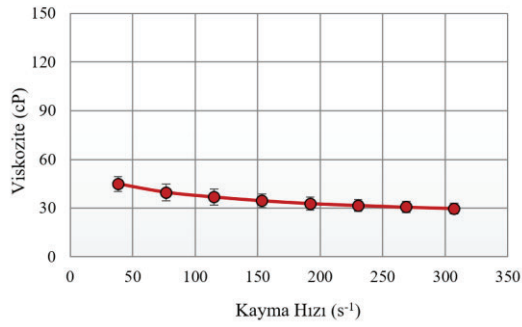
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
51,78	10,00	19,88	38,40	25,70
49,19	20,00	37,78	76,80	25,70
44,88	30,00	51,70	115,20	25,70
41,42	40,00	63,63	153,60	25,70
39,35	50,00	75,56	192,00	25,70
37,97	60,00	87,49	230,40	25,70
36,25	70,00	97,43	268,80	25,70
35,60	80,00	109,36	307,20	25,60



Şekil 5.30. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

Tablo 5.21. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

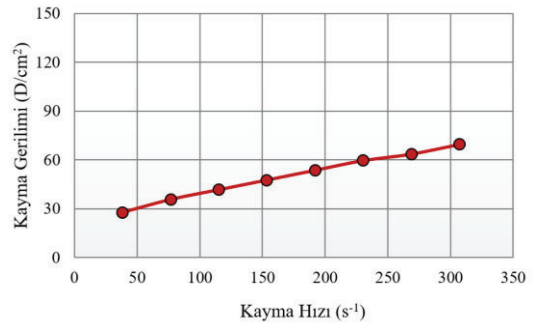
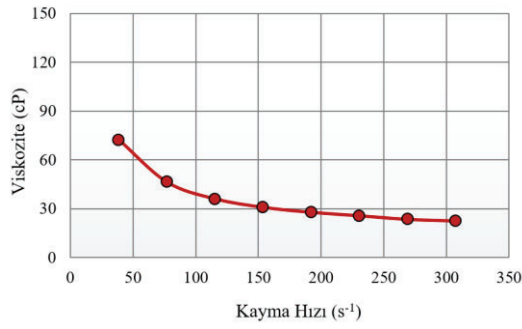
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
44,88	10,00	17,23	38,40	25,69
39,70	20,00	30,49	76,80	25,69
36,82	30,00	42,42	115,20	25,68
34,52	40,00	53,03	153,60	25,69
32,79	50,00	62,97	192,00	25,68
31,64	60,00	72,91	230,40	25,67
30,58	70,00	82,19	268,80	25,67
29,77	80,00	91,46	307,20	25,64



Şekil 5.31. KMB mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.22. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

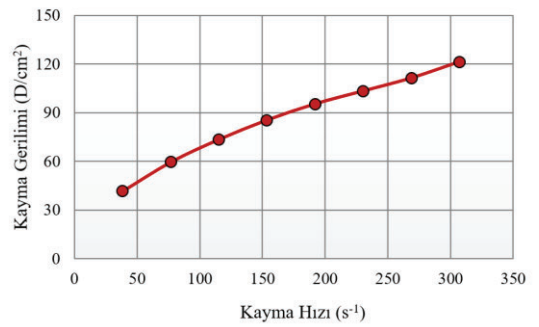
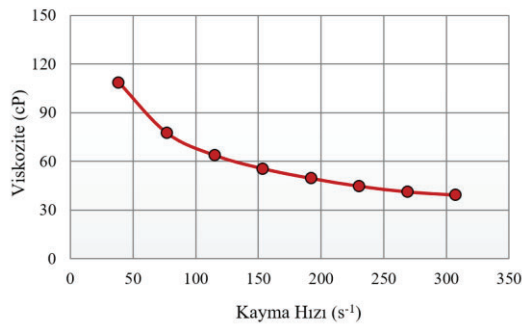
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
72,49	10,00	27,84	38,40	25,85
46,60	20,00	35,79	76,80	25,85
36,25	30,00	41,76	115,20	25,85
31,07	40,00	47,72	153,60	25,83
27,96	50,00	53,69	192,00	25,83
25,89	60,00	59,65	230,40	25,83
23,67	70,00	63,63	268,80	25,83
22,65	80,00	69,59	307,20	25,83



Şekil 5.32. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

Tablo 5.23. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

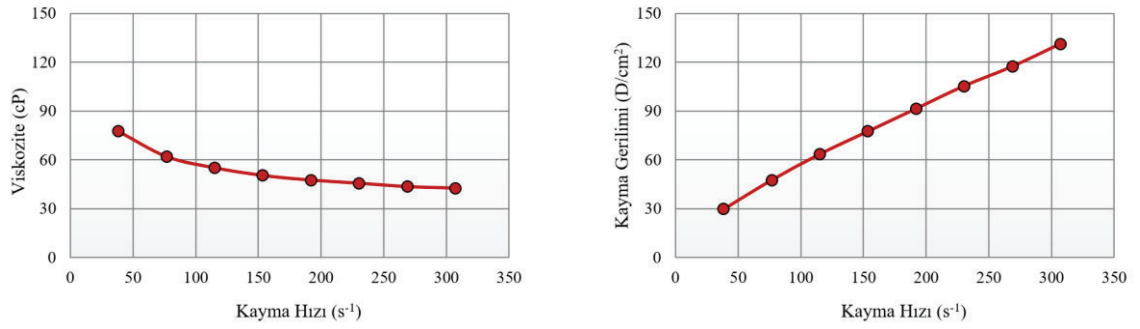
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
108,74	10,00	41,76	38,40	25,65
77,67	20,00	59,65	76,80	25,65
63,86	30,00	73,57	115,20	25,65
55,66	40,00	85,50	153,60	25,68
49,71	50,00	95,44	192,00	25,65
44,88	60,00	103,39	230,40	25,65
41,42	70,00	111,35	268,80	25,65
39,48	80,00	121,29	307,20	25,65



Şekil 5.33. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

Tablo 5.24. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

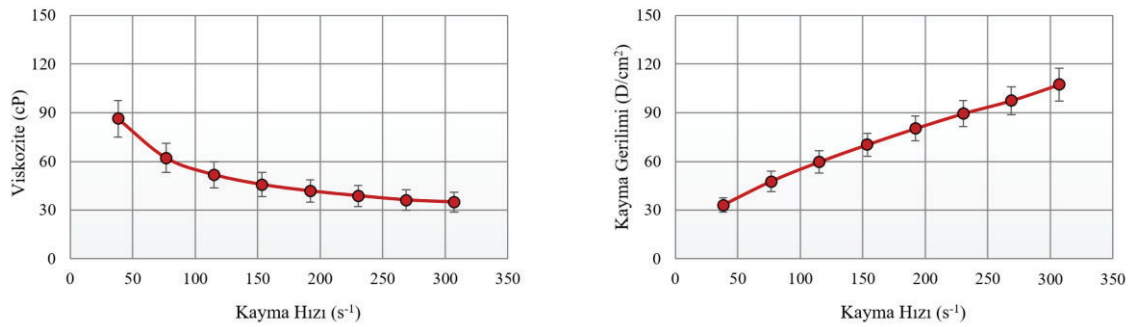
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
77,67	10,00	29,83	38,40	25,65
62,14	20,00	47,72	76,80	25,63
55,23	30,00	63,63	115,20	25,65
50,49	40,00	77,55	153,60	25,63
47,64	50,00	91,46	192,00	25,63
45,74	60,00	105,38	230,40	25,65
43,64	70,00	117,31	268,80	25,65
42,72	80,00	131,23	307,20	25,65



Şekil 5.34. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

Tablo 5.25. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

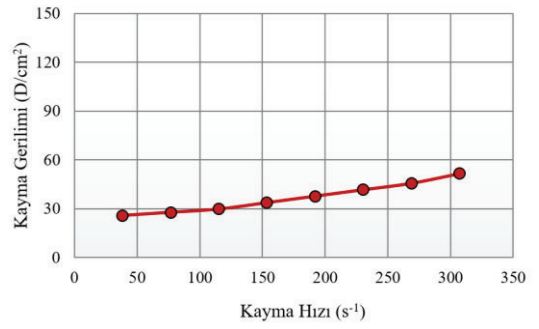
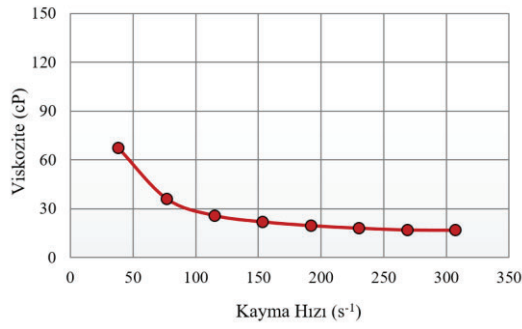
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
86,30	10,00	33,14	38,40	25,72
62,14	20,00	47,72	76,80	25,71
51,78	30,00	59,65	115,20	25,72
45,74	40,00	70,26	153,60	25,71
41,77	50,00	80,20	192,00	25,70
38,84	60,00	89,47	230,40	25,71
36,24	70,00	97,43	268,80	25,71
34,95	80,00	107,37	307,20	25,71



Şekil 5.35. SMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.26. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

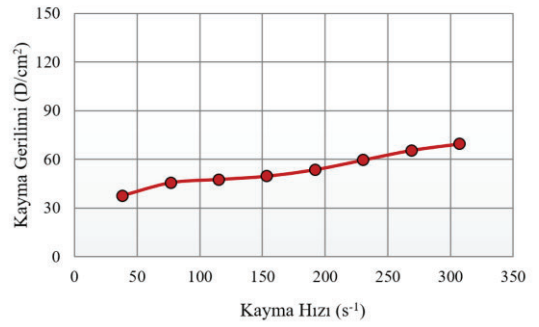
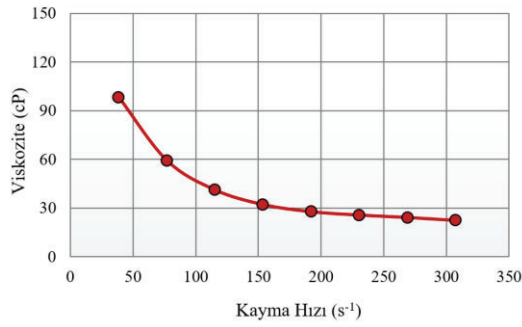
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
67,31	10,00	25,85	38,40	25,83
36,25	20,00	27,84	76,80	25,83
25,89	30,00	29,83	115,20	25,80
22,01	40,00	33,80	153,60	25,80
19,68	50,00	37,78	192,00	25,80
18,12	60,00	41,76	230,40	25,80
17,01	70,00	45,73	268,80	25,80
16,83	80,00	51,70	307,20	25,80



Şekil 5.36. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 1)

Tablo 5.27. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

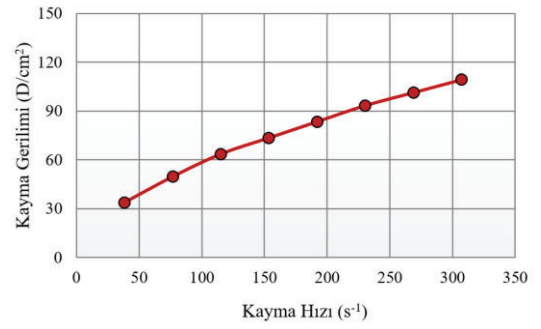
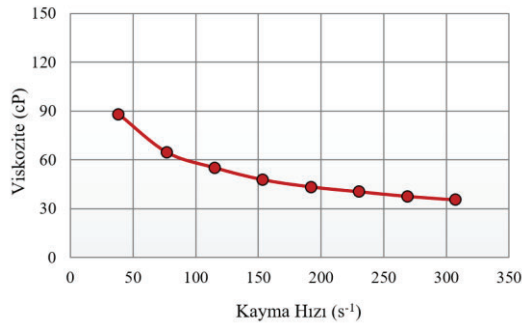
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
98,38	10,00	37,78	38,40	25,70
59,55	20,00	45,73	76,80	25,70
41,42	30,00	47,72	115,20	25,70
32,36	40,00	49,71	153,60	25,68
27,96	50,00	53,69	192,00	25,70
25,89	60,00	59,65	230,40	25,68
24,41	70,00	65,62	268,80	25,68
22,65	80,00	69,59	307,20	25,68



Şekil 5.37. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 2)

Tablo 5.28. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

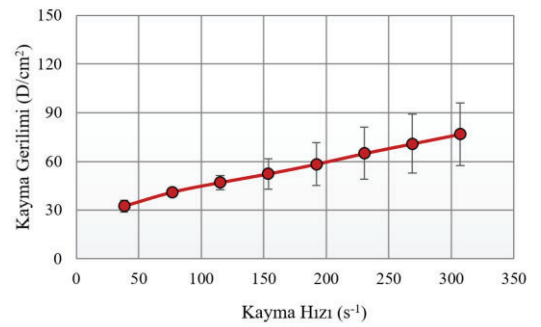
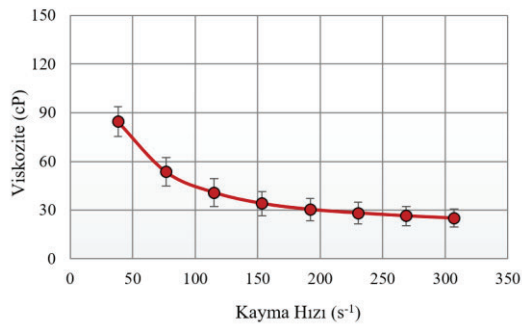
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
88,03	10,00	33,80	38,40	25,68
64,73	20,00	49,71	76,80	25,68
55,23	30,00	63,63	115,20	25,68
47,90	40,00	73,57	153,60	25,68
43,50	50,00	83,51	192,00	25,68
40,56	60,00	93,45	230,40	25,68
37,73	70,00	101,41	268,80	25,68
35,60	80,00	109,36	307,20	25,65



Şekil 5.38. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ölçüm 3)

Tablo 5.29. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
84,57	10,00	32,48	38,40	25,74
53,51	20,00	41,09	76,80	25,74
40,85	30,00	47,06	115,20	25,73
34,09	40,00	52,36	153,60	25,72
30,38	50,00	58,33	192,00	25,73
28,19	60,00	64,95	230,40	25,72
26,38	70,00	70,92	268,80	25,72
25,03	80,00	76,88	307,20	25,71



Şekil 5.39. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

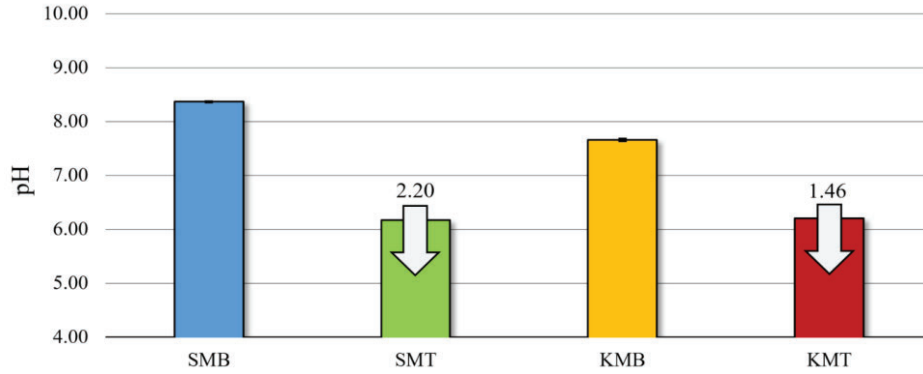
5.4.7. pH analizi

Taze olarak hazırlanan etkin maddeli ve etkin maddesiz mikroemülsiyon formülasyonların pH değeri ölçümleri pH metre ile yapılmış ve Tablo 5.30'daki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 5.30. Mikroemülsiyon formülasyonlarının pH değerleri (n=6)

pH Ölçüm	SMB	SMT	KMB	KMT
1	8,41	6,17	7,69	6,23
2	8,35	6,21	7,61	6,23
3	8,43	6,14	7,73	6,15
4	8,35	6,17	7,56	6,23
5	8,32	6,21	7,63	6,23
6	8,36	6,14	7,74	6,15
Ort.	8,37	6,17	7,66	6,20
SS	0,04	0,03	0,07	0,04
SH	0,02	0,01	0,03	0,02

SMB ve KMB formülasyonlarına TGF- β 1 eklendiği zaman pH değerinde sırasıyla 2.20 ve 1.46 düşüş görülmektedir (Şekil 5.40). Kararlılık çalışmalarında bu değerlerdeki değişim takip edilecektir.



Şekil 5.40. KMT mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

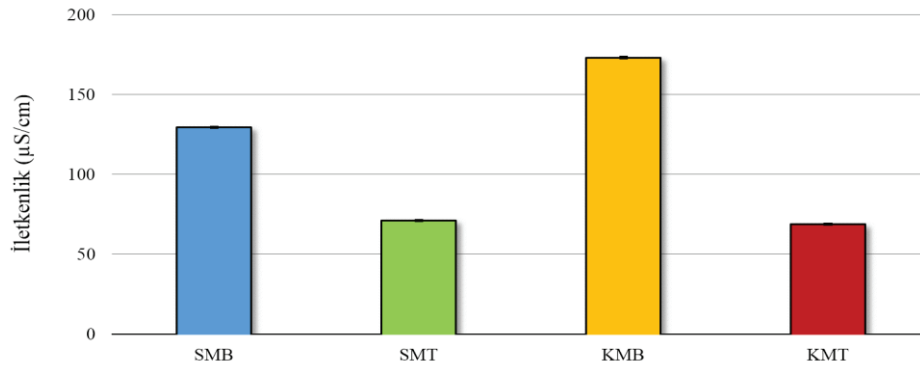
5.4.8. Elektriksel iletkenlik analizi

Elektriksel iletkenlik mikroemülsiyonların yapısal davranışları hakkında bilgi verir. Özellikle mikroemülsiyonun sürekli fazını ve faz tipini belirlemek için kullanılan önemli bir parametredir. Y/S emülsiyon sistemlerinin elektriksel iletkenliği S/Y sistemlerine göre daha yüksektir (Müller ve Heinemann, 1993).

Y/S tipi mikroemülsiyonda görülen direnç yüksek olmasına rağmen, S/Y tipi mikroemülsiyonda sadece damlacık koagülasyonu (biraraya gelme) olduğunda iletkenlik gözlenmektedir (Kaş, 1996). Taze olarak hazırlanan formülasyonların ölçülen elektriksel iletkenlik, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.31 ve Şekil 5.41’de verilmiştir.

Tablo 5.31. Mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)

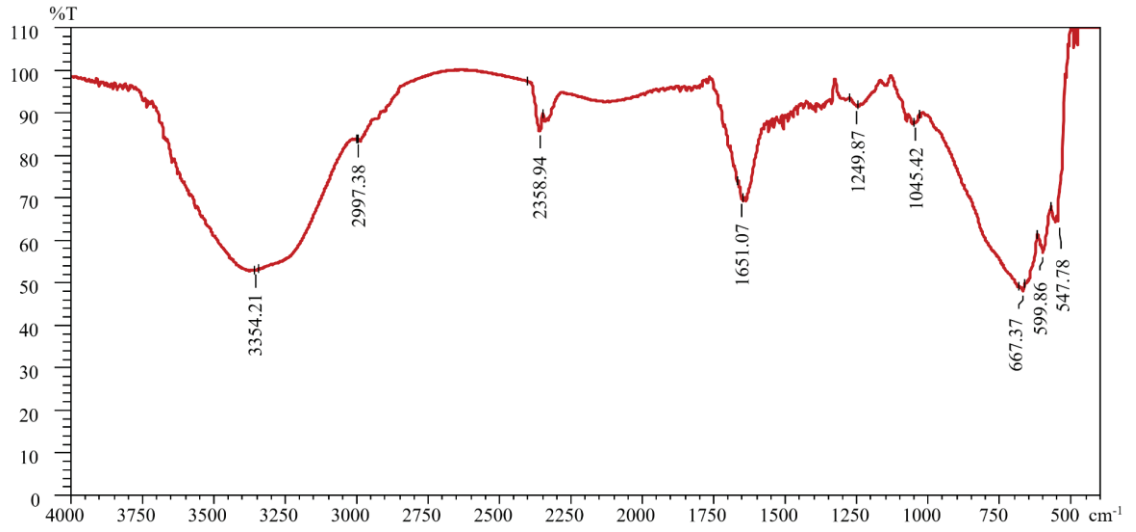
Elektriksel İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	SMB	SMT	KMB	KMT
1	128,0	70,3	171,0	68,0
2	129,0	72,3	172,0	68,0
3	129,0	75,0	173,0	68,0
4	129,0	70,5	175,0	68,3
5	129,0	70,4	174,0	68,9
6	132,0	70,4	174,0	72,0
Ort.	129,3	71,5	173,2	68,9
SS	1,4	1,9	1,5	1,6
SH	0,6	0,8	0,6	0,6



Şekil 5.41. Mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)

5.4.9. FT-IR analizi

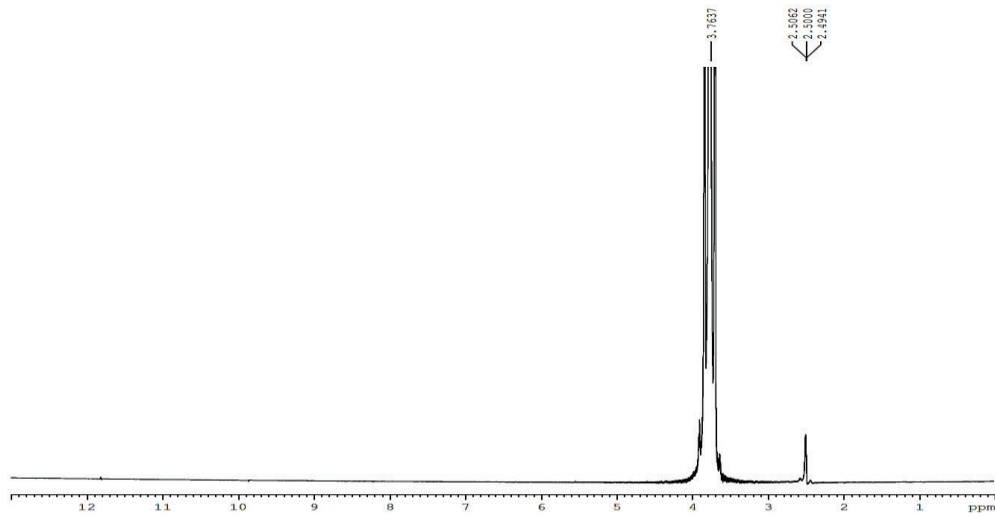
Karakterizasyon çalışması kapsamında etkin maddenin $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ arasında Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumu alınmış ve karakteristik IR bantları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kararlılık çalışmasının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Etkin madde ve $4\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$ ve $40\pm 1^\circ\text{C}$ ’lik ortam koşullarında saklanan mikroemülsiyon formülasyonlarının FT-IR analizlerinde; TGF- $\beta 1$ maddesine özgü parmak izi bölgesi olan $600\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki spekturum incelenmiş ve yapılan tüm analizlerde birbiriyle uyuşması etkin maddenin bozunması açısından değerlendirilmiştir. TGF- $\beta 1$ maddesine ait FT-IR spektrumu Şekil 5.42’de verilmiştir.



Şekil 5.42. TGF- β 1 maddesinin FT-IR spektrumu

5.4.10. NMR analizi

Karakterizasyon çalışması kapsamında etkin maddenin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) analizlerinde, çözücü olarak dötero-DMSO maddesi kullanılmış ve spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar kararlılık çalışmasının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Etkin madde ve $4\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$ ve $40\pm 1^\circ\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan mikroemülsiyon formülasyonlarının ^1H -NMR analizlerinde; TGF- β 1 maddesine ait 3,76 ppm'deki pik incelenmiştir. TGF- β 1 maddesine ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.43'te verilmiştir.

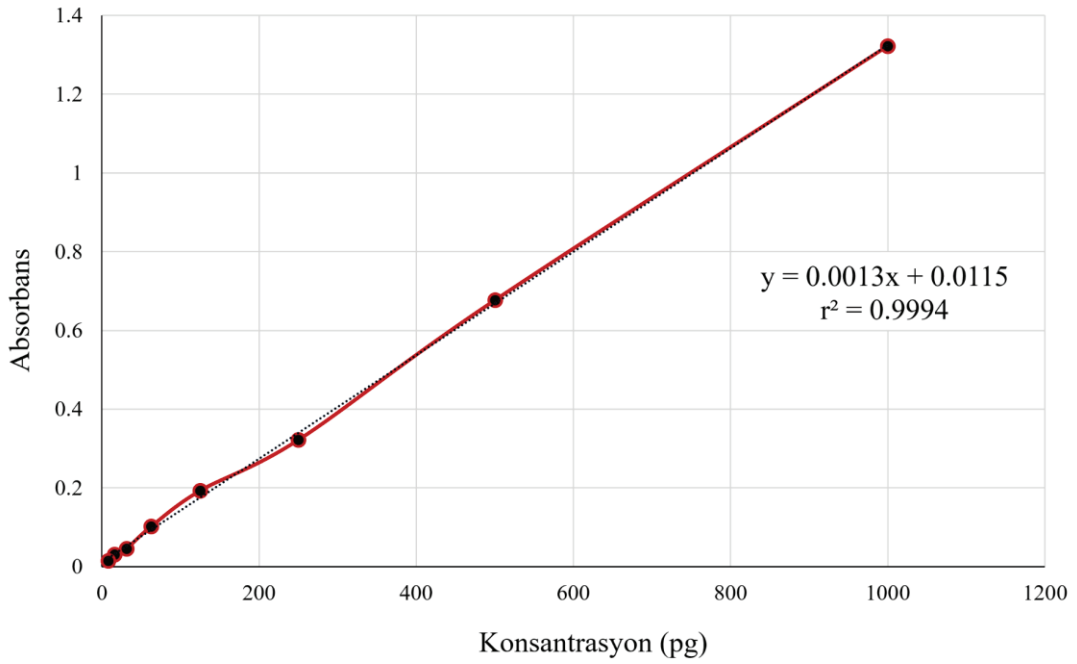


Şekil 5.43. TGF- β 1 maddesinin ^1H -NMR spektrumu

5.4.11. Etkin madde miktar tayini

Hazırlanan formülasyonların etkin madde miktar tayini, eşleştirilmiş bir antikör çiftinin arasına bağlanan TGF- β 1 miktarını ölçmek için özel olarak tasarlanmış “İnsan/Fare TGF- β 1 Kaplanmamış ELISA Kiti” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 4.7.11’de anlatıldığı gibi 2,5 μ g/mL TGF- β 1 maddesi içeren formülasyonlar etkin madde miktar tayini için seyreltilmiştir. Bu seyreltme işleminden sonra etkin madde konsantrasyonu 1 ng/mL’ye düşmüştür. Hazırlanan formülasyonlar bu sefer korelasyon işlemi için ELISA Kitinde seyreltme işlemlerinden geçirilmiş ve 450 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Gerekli hesaplamalar yapılarak Şekil 5.44’teki doğru denklemi elde edilmiştir.



Şekil 5.44. TGF- β 1 maddesine ait korelasyon ve doğru denklemi

Çalışma sonucunda elde edilen doğru denklemi $y=0,0013+0,0115$ olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğru çalıştığının gösterilmesi amacıyla 1000 pg/mL etkin madde konsantrasyonuna sahip mikroemülsiyon üzerinde ölçüm yapılmış ve 1,313 absorban elde edilmiştir. Gerekli hesaplamalar yapıp etkin madde konsantrasyonuna geri dönüldüğünde 1001,154 pg etkin madde olduğu bulunmuştur.

Çalışma sonucunda elde edilen doğru denklemi formülasyonların kararlılık çalışmalarında etkin madde miktar tayini için kullanılacaktır.

5.5. Formülasyonlarda Yapılan Kararlılık Çalışmaları

Fiziksel özelliklerin değerlendirilmesi ve olası değişimlerin incelenmesi için $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonlar üzerinde belirli aralıklarda (0., 30. ve 90. günlerde) testler yapılmıştır. Yapılan kararlılık çalışmalarının daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla hazırlanmış olan formülasyonlar için kullanılan kısaltmalar Tablo 5.32’de verilmiştir.

Tablo 5.32. Mikroemülsiyon formülasyonlarının kararlılık çalışmaları için kullanılan kısaltmalar

Kısaltma	Açıklama
SMB-0Z	Taze hazırlanmış etkin maddesiz soya yağı mikroemülsiyonu
SMT-0Z	Taze hazırlanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMB-0Z	Taze hazırlanmış etkin maddesiz keten yağı mikroemülsiyonu
KMT-0Z	Taze hazırlanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-25-1A	$25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-25-1A	$25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-25-3A	$25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-25-3A	$25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-4-1A	$4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-4-1A	$4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-4-3A	$4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-4-3A	$4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-40-1A	$40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-40-1A	$40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 1 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu
SMT-40-3A	$40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren soya yağı mikroemülsiyonu
KMT-40-3A	$40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 3 ay saklanmış TGF- β 1 içeren keten yağı mikroemülsiyonu

5.5.1. Fiziksel görünüş

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların görünüşleri 0., 30. ve 90. günlerde görsel olarak incelenmiştir. Kararlılık çalışmaları sırasında $40\pm1^{\circ}\text{C}$ ’lik ortamda bekletilen formülasyonların sıcaklıktan etkilenecek bozulduğu görülmüştür. Bu formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

Yapılan gözlemler sonucunda, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların kararlı bir yapıda olduğu bulunmuş, formülasyonlarda fiziksel görünüş açısından bir değişiklik görülmemiş ve hazırlandığı andan itibaren berrak ve tekdüze görünümünü korumuştur.

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C’lik kararlılık ortamlarında bekletilen formülasyonların 30. ve 90. günlerde gerçekleştirilen fiziksel görünüş incelemesinde elde edilen sonuçlar Tablo 5.33’te sunulmuştur.

Tablo 5.33. Mikroemülsiyon formülasyonlarının fiziksel görünüşü

Kısaltma	Açıklama
SMT-25-1A	Berrak, tekdüze, kararlı
KMT-25-1A	Berrak, tekdüze, kararlı
SMT-25-3A	Berrak, tekdüze, kararlı
KMT-25-3A	Berrak, tekdüze, kararlı
SMT-4-1A	Berrak, tekdüze, kararlı
KMT-4-1A	Berrak, tekdüze, kararlı
SMT-4-3A	Berrak, tekdüze, kararlı
KMT-4-3A	Berrak, tekdüze, kararlı
SMT-40-1A	Bozunmuş / kararsız
KMT-40-1A	Bozunmuş / kararsız
SMT-40-3A	Bozunmuş / kararsız
KMT-40-3A	Bozunmuş / kararsız

5.5.2. Tip tayini

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların tipi dış fazları su ile seyreltilerek kontrol edilmiştir. Formülasyonlara 0., 30. ve 90. günlerde distile su eklendiği zaman berrak, tekdüze ve kararlı yapılarını korumaya devam etmişlerdir. Bu durum Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarında tip değişimi olmadığının göstergesidir. Kararlılık çalışmalarında ölçülen iletkenlik değerleri de formülasyon tipinin Y/S olarak devam ettiğine işarettir. 40±1°C’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır (Bumajdad ve Eastoe, 2004).

5.5.3. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonlar 0., 30. ve 90. günlerde 1000 ve 2000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiş, görsel olarak incelenmiş ve hiç bir formülasyonda faz ayrımı görülmemiştir. 40±1°C’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

5.5.4. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 0., 30. ve 90. günlere ait damlacık büyüklüğü ve dağılımı, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.34 ve Tablo 5.35'te verilmiştir. 40±1°C'lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

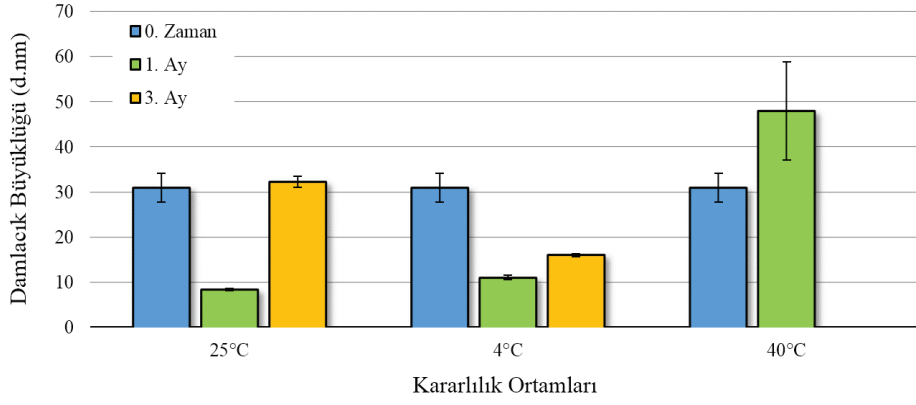
Tablo 5.34. Keten yağı mikroemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

Ölçüm (d.nm)	KMT-25-1A	KMT-25-3A	KMT-4-1A	KMT-4-3A	KMT-40-1A	KMT-40-3A
1	7,922	31,310	12,880	16,680	28,980	-
2	9,124	27,670	10,560	17,110	85,440	-
3	8,014	32,960	11,720	16,530	76,460	-
4	9,071	32,980	9,824	15,340	39,370	-
5	8,035	31,250	10,980	15,280	37,830	-
6	7,663	37,130	9,996	14,910	19,370	-
Ort.	8,305	32,217	10,993	15,975	47,908	-
SS	0,628	3,089	1,152	0,907	26,725	-
SH	0,257	1,261	0,470	0,370	10,910	-

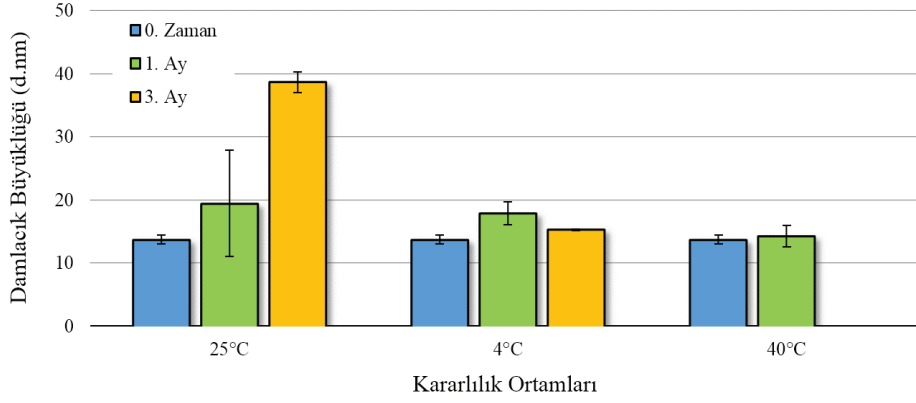
Tablo 5.35. Soya yağı mikroemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

Ölçüm (d.nm)	SMT-25-1A	SMT-25-3A	SMT-4-1A	SMT-4-3A	SMT-40-1A	SMT-40-3A
1	12,970	38,020	20,210	14,930	21,820	-
2	8,392	37,910	13,660	15,530	15,480	-
3	8,524	37,640	24,260	15,080	12,920	-
4	10,590	32,030	19,280	15,170	11,200	-
5	14,870	43,080	11,940	15,280	12,900	-
6	61,180	43,180	17,900	15,380	11,190	-
Ort.	19,421	38,643	17,875	15,228	14,252	-
SS	20,613	4,146	4,499	0,215	4,027	-
SH	8,415	1,692	1,837	0,088	1,644	-

Kararlılık çalışmalarından elde edilen damlacık büyüklüğü ve dağılımı sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi için veriler grafiklere (Şekil 5.45 ve Şekil 5.46) dönüştürülmüş ve zaman içinde görülen değişimler SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken KMT-40-3A ve SMT-40-3A formülasyonları dikkate alınmamıştır.



Şekil 5.45. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



Şekil 5.46. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

Keten yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama damlacık büyüklüğü 30,918 nm bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, 25±1°C’lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8,305 nm ve 4±1°C’lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 10,993 nm bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalar mikroemülsiyon damlacık büyüklüğünün zaman içerisinde küçülebileceğini göstermektedir. Ancak, bu küçülmenin sebebi genellikle, sedimentasyon olan bir formülasyonda örnek alma sırasında yaşanan problemler olarak gözükmemektedir (Kotmakchiev vd., 2012). Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama damlacık büyüklüğü, 25±1°C’lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 32,217 nm ve 4±1°C’lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 15,975 nm bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün damlacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim 25±1°C’lık kararlılık ortamında bekletilen keten yağı mikroemülsiyonlarında görülmüştür ($p>0,05$).

Soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama damlacık büyüklüğü 13,678 nm bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 19,421 nm ve $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 17,875 nm bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama damlacık büyüklüğü, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 38,643 nm ve $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 15,228 nm bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün damlacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında bekletilen soya yağı mikroemülsiyonlarında görülmüştür ($p>0,05$).

Ortalama damlacık büyüklüğünün ya da damlacıkların büyüklük dağılımlarının değişmesi, mikroemülsiyon sistemlerde kararlılığının değerlendirilmesi amacıyla kullanılabilen önemli bir parametredir. Dayanıklı iki emülsiyon sistemde, damlacık büyüklüğünde başlangıçta hızlı bir artış ve bunu takiben yavaş bir değişme gözlenebilir. Damlacık büyüklüğü, damlacık yüzey alanı veya damlacık hacmi zamanla değişebilmektedir. Farklı sıcaklık ortamlarında saklanan örneklerdeki damlacık büyüklüğündeki bu artış kararlılığın bozulduğunu gösterir (Rieger, 1986). Zamana karşı değişimi inceleyebilmek için hem keten yağı hem de soya yağı mikroemülsiyonu damlacık büyüklüklerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları Tablo 5.36'da gösterilmiştir.

Tablo 5.36. Ortalama damlacık büyüklüğünün aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

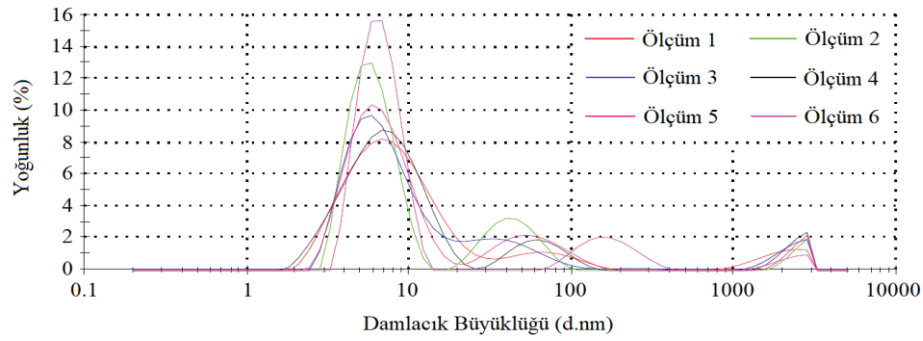
Formülasyonlar	<i>p</i> Değeri	Karar Olasılığı
KMT-0Z / KMT-25-1A	0,0010	$p\leq 0,001$
KMT-0Z / KMT-25-3A	0,6886	$p>0,05$
KMT-0Z / KMT-4-1A	0,0020	$p\leq 0,01$
KMT-0Z / KMT-4-3A	0,0076	$p\leq 0,01$
KMT-25-1A / KMT-25-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
KMT-4-1A / KMT-4-3A	0,0001	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-25-1A	0,5329	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-25-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-4-1A	0,1278	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-4-3A	0,0830	$p>0,05$
SMT-25-1A / SMT-25-3A	0,0515	$p>0,05$
SMT-4-1A / SMT-4-3A	0,2219	$p>0,05$

Bir karşılaştırmada istatistiksel olarak “önemli/anlamlı fark vardır” kararı verileceği zaman, yapılacak olası hata miktarını p değeri gösterir. Ünlü istatistikçi Fisher tarafından hatanın maksimum kabul edilebilir düzeyi 0,05 olarak önerilmiş ve kabul görmüştür. Bulunan p değeri 0,05’in altında ise karşılaştırma sonucunda önemli farklılık olduğu anlamına gelir. Genellikle bütün programlar p değeri ifadesini kullanırken, SPSS programında p değeri yerine *Sig.* kısaltması kullanılır. Yapılan istatistiksel çalışmaların karar olasılığı ve değerlendirme sonuçları için Tablo 5.37’deki bilgiler kullanılmıştır.

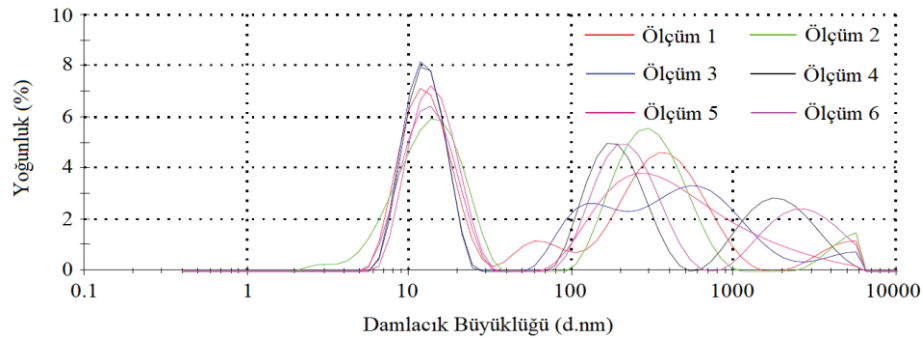
Tablo 5.37. Two way ANOVA değerlendirme tablosu

Karar Olasılığı	Karar
$p > 0,05$	Önemli fark yoktur
$p \leq 0,05$	Önemli fark vardır
$p \leq 0,01$	Çok önemli fark vardır
$p \leq 0,001$	İleri düzeyde önemli fark vardır

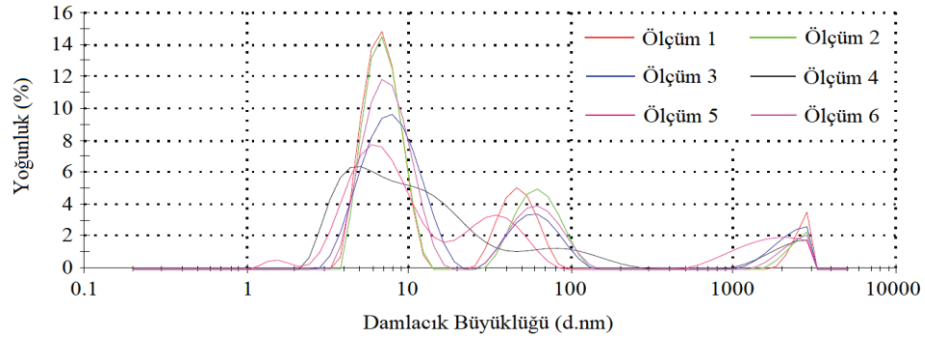
Kararlılık çalışmasında formülasyonların damlacık büyüklüğü ve dağılımında görülen değişimler ise Şekil 5.47-5.54’te verilmiştir.



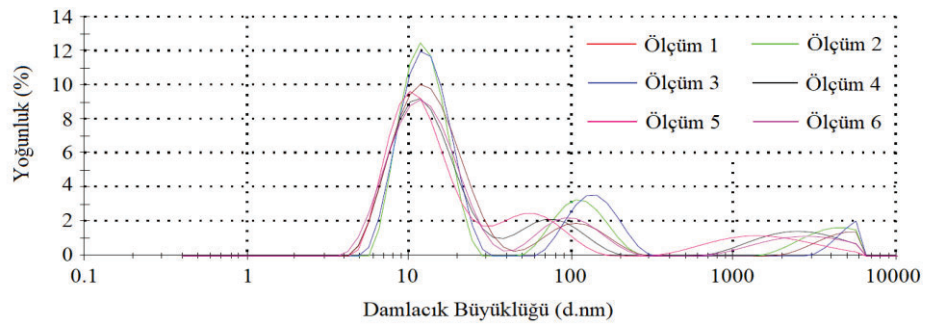
Şekil 5.47. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



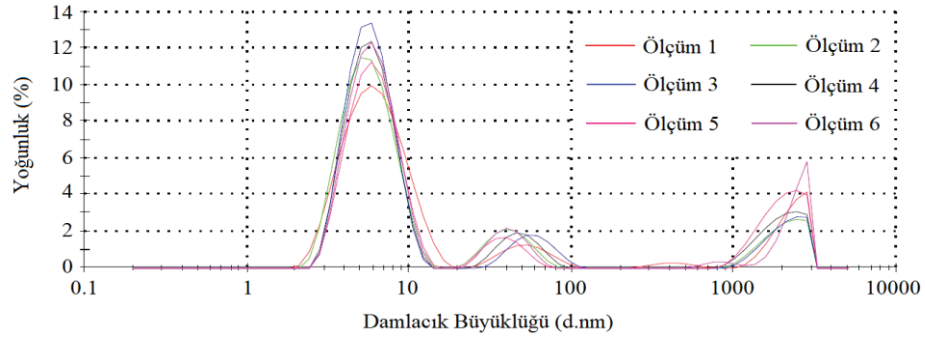
Şekil 5.48. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



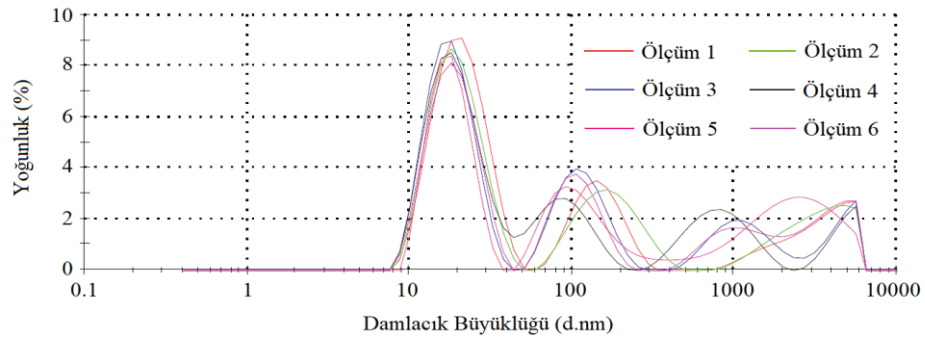
Şekil 5.49. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı ($n=6$)



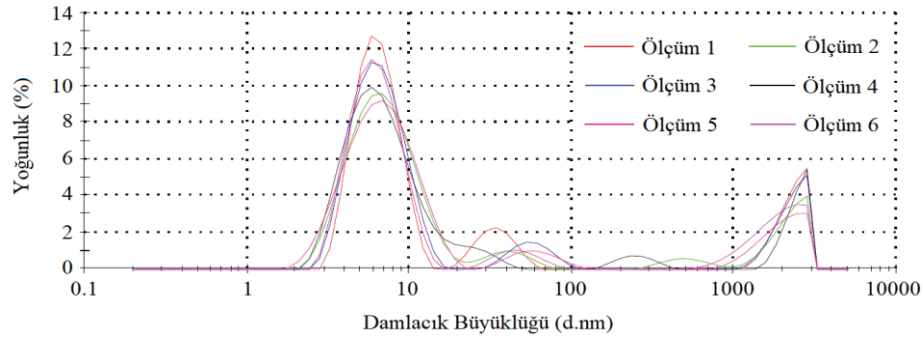
Şekil 5.50. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı ($n=6$)



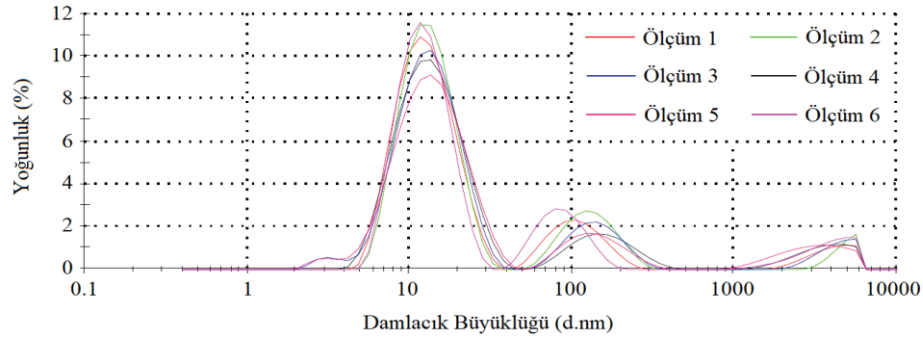
Şekil 5.51. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı ($n=6$)



Şekil 5.52. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı ($n=6$)



Şekil 5.53. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)



Şekil 5.54. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=6)

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 0., 30. ve 90. günlere ait PDI, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.38 ve Tablo 5.39'da verilmiştir. 40±1°C'lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

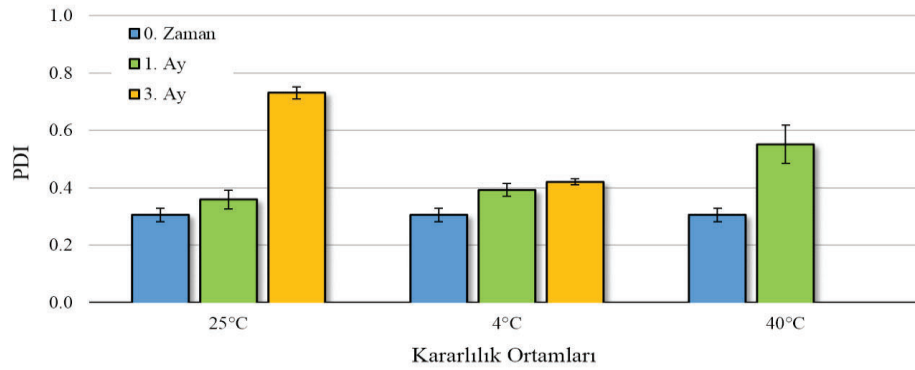
Tablo 5.38. Keten yağı mikroemülsiyonlarının PDI değerleri (n=6)

Ölçüm (PDI)	KMT-25-1A	KMT-25-3A	KMT-4-1A	KMT-4-3A	KMT-40-1A	KMT-40-3A
1	0,405	0,685	0,303	0,444	0,492	-
2	0,232	0,806	0,466	0,407	0,733	-
3	0,439	0,717	0,361	0,401	0,659	-
4	0,299	0,724	0,407	0,442	0,376	-
5	0,425	0,771	0,406	0,443	0,368	-
6	0,358	0,681	0,413	0,390	0,682	-
Ort.	0,360	0,731	0,393	0,421	0,552	-
SS	0,081	0,049	0,055	0,025	0,161	-
SH	0,033	0,020	0,023	0,010	0,066	-

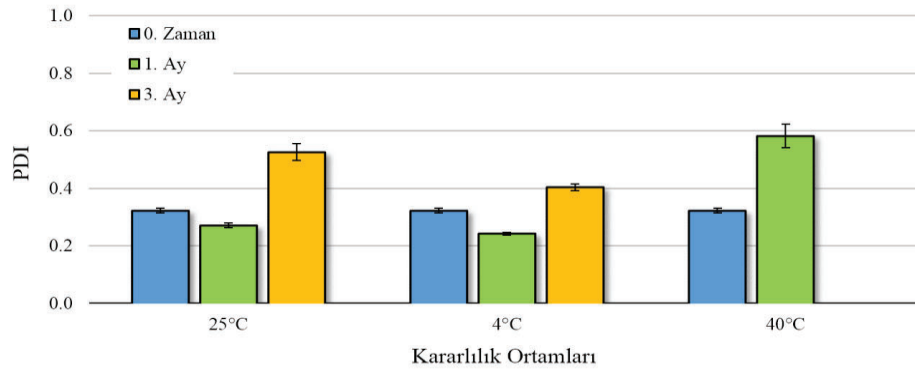
Tablo 5.39. Soya yağı mikroemülsiyonlarının PDI değerleri (n=6)

Ölçüm (PDI)	SMT-25-1A	SMT-25-3A	SMT-4-1A	SMT-4-3A	SMT-40-1A	SMT-40-3A
1	0,251	0,396	0,253	0,347	0,519	-
2	0,291	0,528	0,259	0,417	0,717	-
3	0,292	0,524	0,240	0,410	0,674	-
4	0,256	0,592	0,243	0,404	0,578	-
5	0,282	0,593	0,231	0,426	0,442	-
6	0,250	0,519	0,228	0,420	0,561	-
Ort.	0,270	0,525	0,242	0,404	0,582	-
SS	0,020	0,072	0,012	0,029	0,101	-
SH	0,008	0,029	0,005	0,012	0,041	-

Kararlılık çalışmalarından elde edilen PDI sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi için veriler grafiklere (Şekil 5.55 ve Şekil 5.56) dönüştürülmüş ve zaman içinde görülen değişimler SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.55. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama PDI değerleri (n=6)



Şekil 5.56. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama PDI değerleri (n=6)

Keten yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama PDI değeri 0,305 bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,360 ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,393 bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama PDI değeri, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,731 ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,421 bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün damlacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında bekletilen keten yağı mikroemülsiyonlarında görülmesine rağmen değerler arasında çok önemli fark bulunmuştur ($p\leq0,01$).

Soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama PDI değeri 0,322 bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,270 ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,242 bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama PDI değeri, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,525 ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 0,404 bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün damlacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında bekletilen soya yağı mikroemülsiyonlarında görülmesine rağmen değerler arasında çok önemli fark bulunmuştur ($p\leq0,01$).

Keten yağı ve soya yağı mikroemülsiyonu PDI değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları Tablo 5.40'ta gösterilmiştir.

Tablo 5.40. Ortalama PDI değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Formülasyonlar	<i>p</i> Değeri	Karar Olasılığı
KMT-0Z / KMT-25-1A	0,3312	$p>0,05$
KMT-0Z / KMT-25-3A	0,0000	$p\leq0,001$
KMT-0Z / KMT-4-1A	0,0389	$p\leq0,05$
KMT-0Z / KMT-4-3A	0,0065	$p\leq0,01$
KMT-25-1A / KMT-25-3A	0,0005	$p\leq0,001$
KMT-4-1A / KMT-4-3A	0,3525	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-25-1A	0,0096	$p\leq0,01$
SMT-0Z / SMT-25-3A	0,0011	$p\leq0,01$
SMT-0Z / SMT-4-1A	0,0003	$p\leq0,001$
SMT-0Z / SMT-4-3A	0,0015	$p\leq0,01$
SMT-25-1A / SMT-25-3A	0,0002	$p\leq0,001$
SMT-4-1A / SMT-4-3A	0,0001	$p\leq0,001$

5.5.5. Zeta potansiyel analizi

Mikroemülsiyonlar için zeta potansiyeli ölçümleri tek kullanımlık zeta hücrelerinde, $25\pm1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında ve formülasyonlar dış faz olan distile su ile seyreltildikten sonra yapılmıştır. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için, kullanılan distile su ölçümlerden önce NaCl ile $50\ \mu\text{S}$ iletkenliğe ayarlanmıştır.

$4\pm1^\circ\text{C}$, $25\pm1^\circ\text{C}$ ve $40\pm1^\circ\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 0., 30. ve 90. günlere ait zeta potansiyel ölçümü, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.41 ve Tablo 5.42’de verilmiştir. $40\pm1^\circ\text{C}$ ’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

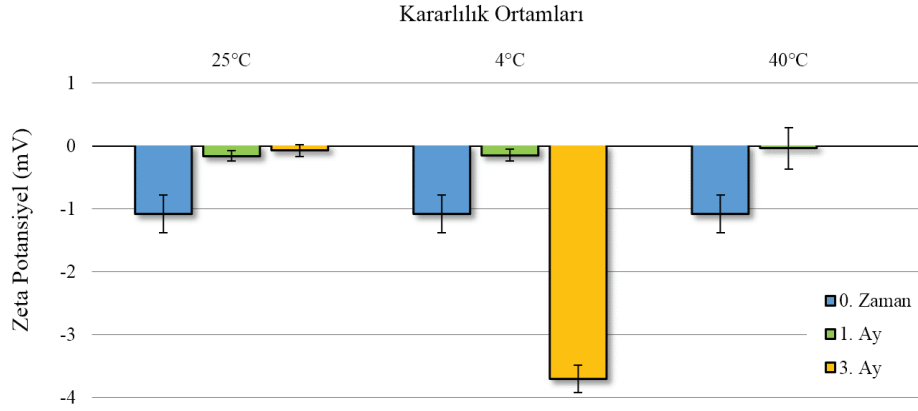
Tablo 5.41. Keten yağı mikroemülsiyonlarının zeta potansiyel değerleri ($n=6$)

Ölçüm (mV)	KMT-25-1A	KMT-25-3A	KMT-4-1A	KMT-4-3A	KMT-40-1A	KMT-40-3A
1	-0,181	-0,111	0,138	-3,090	-0,022	-
2	-0,272	-0,059	-0,285	-3,830	0,674	-
3	-0,067	0,015	-0,526	-2,990	-1,130	-
4	-0,370	0,204	-0,114	-4,170	-0,617	-
5	0,183	-0,462	-0,013	-4,150	1,060	-
6	-0,249	-0,036	-0,095	-4,030	-0,200	-
Ort.	-0,159	-0,075	-0,149	-3,710	-0,039	-
SS	0,196	0,219	0,231	0,534	0,808	-
SH	0,080	0,089	0,094	0,218	0,330	-

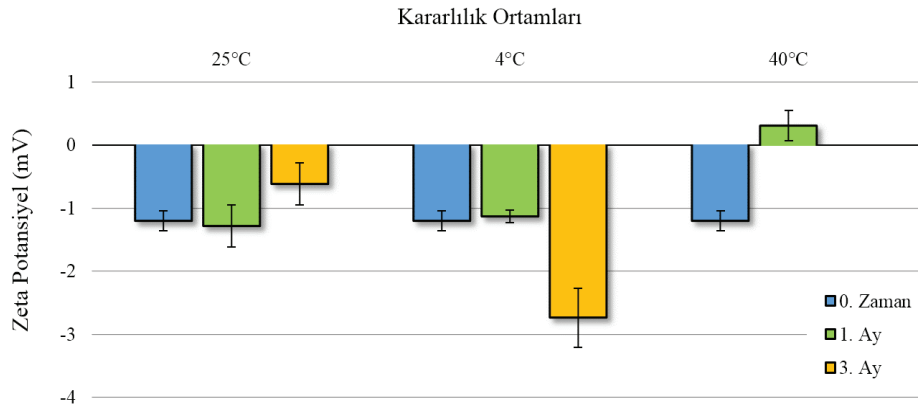
Tablo 5.42. Soya yağı mikroemülsiyonlarının zeta potansiyel değerleri ($n=6$)

Ölçüm (mV)	SMT-25-1A	SMT-25-3A	SMT-4-1A	SMT-4-3A	SMT-40-1A	SMT-40-3A
1	-1,110	-0,498	-1,070	-2,980	1,070	-
2	-1,390	0,908	-1,320	-2,180	-0,449	-
3	-0,659	-0,561	-1,130	-1,740	0,749	-
4	-0,871	-1,080	-0,875	-2,410	0,655	-
5	-2,860	-1,010	-1,490	-2,180	-0,101	-
6	-0,805	-1,440	-0,889	-4,930	-0,063	-
Ort.	-1,283	-0,614	-1,129	-2,737	0,310	-
SS	0,814	0,823	0,242	1,148	0,596	-
SH	0,332	0,336	0,099	0,469	0,243	-

Kararlılık çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi için veriler grafiklere (Şekil 5.57 ve Şekil 5.58) dönüştürülmüş ve zaman içinde görülen değişimler SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken KMT-40-3A ve SMT-40-3A formülasyonları dikkate alınmamıştır.



Şekil 5.57. Keten yağı mikroemülsiyonlarının ortalama zeta potansiyel değerleri (n=6)



Şekil 5.58. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama zeta potansiyel değerleri (n=6)

Keten yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel değeri -1,078 mV bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -0,159 mV ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -0,149 mV bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel değeri, 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -0,075 mV ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -3,710 mV bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün zeta potansiyel

bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında bekletilen keten yağı mikroemülsiyonlarında görülmesine rağmen değerler arasında önemli fark bulunmuştur ($p\leq0,05$).

Soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel değeri -1,199 mV bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -1,283 mV ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -1,129 mV bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel değeri, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -0,614 mV ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için -2,737 mV bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün damlacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; en az değişim $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında bekletilen soya yağı mikroemülsiyonlarında görülmüştür ($p>0,05$).

Zamana karşı değişimi inceleyebilmek için hem keten yağı hem de soya yağı mikroemülsiyonu zeta potansiyel değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları Tablo 5.43'te gösterilmiştir.

Tablo 5.43. Ortalama zeta potansiyel değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Formülasyonlar	<i>p</i> Değeri	Karar Olasılığı
KMT-0Z / KMT-25-1A	0,0171	$p\leq0,05$
KMT-0Z / KMT-25-3A	0,0302	$p\leq0,05$
KMT-0Z / KMT-4-1A	0,0532	$p>0,05$
KMT-0Z / KMT-4-3A	0,0011	$p\leq0,01$
KMT-25-1A / KMT-25-3A	0,6286	$p>0,05$
KMT-4-1A / KMT-4-3A	0,0000	$p\leq0,001$
SMT-0Z / SMT-25-1A	0,8414	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-25-3A	0,2190	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-4-1A	0,6821	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-4-3A	0,0350	$p\leq0,05$
SMT-25-1A / SMT-25-3A	0,2204	$p>0,05$
SMT-4-1A / SMT-4-3A	0,0289	$p\leq0,05$

Kolloidal sistemlerin zeta potansiyeli dış faz ile iç fazdaki damlacık arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlamaktadır. Pozitif ya da negatif düşük zeta potansiyel değerine sahip sistemler düşük fiziksel kararlılık gösterirken, yüksek zeta potansiyele sahip sistemde itme ve çekme kuvvetlerinin gücüne bağlı olarak kararlılık daha yüksektir.

Bu nedenle mikroemülsiyon sistemde zeta potansiyel ölçümü kısa ve uzun dönemde kararlılık ile ilgili bilgi verir (Lu ve Gao, 2010). Patel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Y/S tipi mikroemülsiyon sistemleri hazırlanmış ve distile su ile dış ortamın seyreltilmesinin zeta potansiyele etkisi gözlenmiştir. Bulunan sonuçlar seyreltmeden önce -6,34 mV ve seyreltmeden sonra -3,02 mV olarak bulunmuştur (Patel vd., 2010). Zeng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise hazırlanan Y/S tipi mikroemülsiyon sistemlerinin ortalama zeta potansiyeli yine 3,20 mV olarak bulunmuştur (Zeng vd., 2010). Keten yağı ve soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel değerleri sırasıyla -1,078 mV ve -1,199 mV bulunmuştur. Bulunan zeta potansiyel değerleri küçük olmasına rağmen, $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlarda zeta potansiyel değerlerinin negatif olarak arttığı görülmüş ve bu durumun formülasyonların kararlılığını olumlu etkilediği sonucuna varılmıştır.

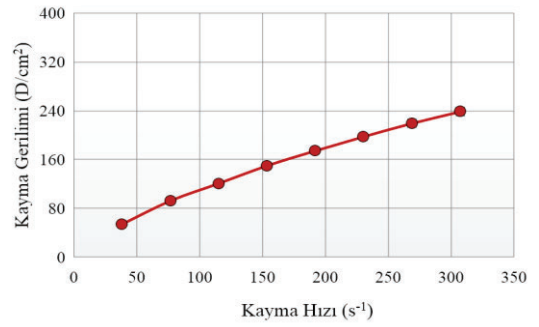
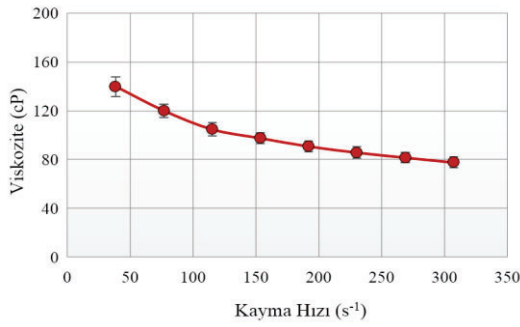
5.5.6. Reolojik analiz

$4\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların reolojik davranışları 0., 30. ve 90. günlerde analiz edilerek akış tipindeki değişimler incelenmiştir. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

Hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının Newton akış modeline uyum göstermesi beklenmektedir. Elde edilen reogramlar incelendiğinde sapmalar olmasına rağmen kayma gerilimi ile kayma hızı arasında doğrusal korelasyon olduğu görülmektedir. Mikroemülsiyon sistemin viskozitesi içeriğindeki YEM/Y.YEM ve yağ fazlarının cinsi ve miktarlarının fonksiyonudur. Su fazının hacim oranındaki artışla birlikte formülasyonların viskozite değeri de düşmektedir (Moulik ve Paul, 1998; Hathout vd, 2010). Hazırlanan mikroemülsiyonların viskozitesinin genellikle 30-60 cP arasında değişen değerlerde olduğu görülmüştür. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında saklanan formülasyonlarda su kaybı yaşanmasından dolayı viskozite değerleri 200 cP'nin üzerine çıkmıştır. Benzer şekilde $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lık kararlılık ortamında saklanan bazı formülasyonlar için de viskozite değerlerinin artarak 100 cP'nin üzerine çıktığı görülmektedir. Reolojik analiz sonuçları Tablo 5.44-5.53 ve elde edilen reogramlar Şekil 5.59-5.68'de sunulmuştur.

Tablo 5.44. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

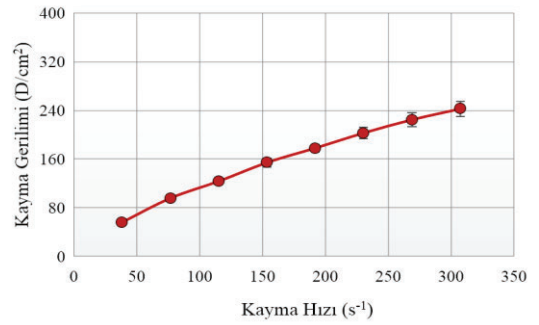
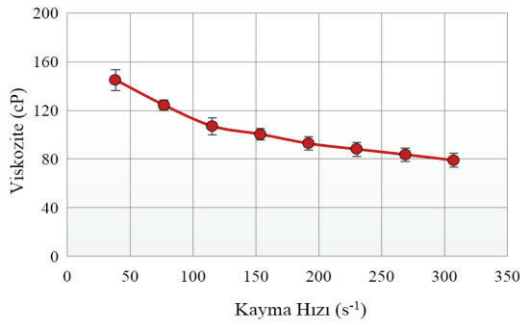
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
139,81	10,00	53,69	38,40	25,45
119,96	20,00	92,13	76,80	25,46
104,71	30,00	120,63	115,20	25,47
97,52	40,00	149,79	153,60	25,45
90,79	50,00	174,31	192,00	25,44
85,72	60,00	197,51	230,40	25,44
81,62	70,00	219,38	268,80	25,44
77,67	80,00	238,60	307,20	25,45



Şekil 5.59. KMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.45. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

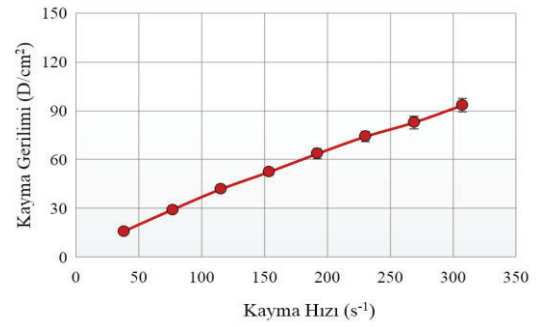
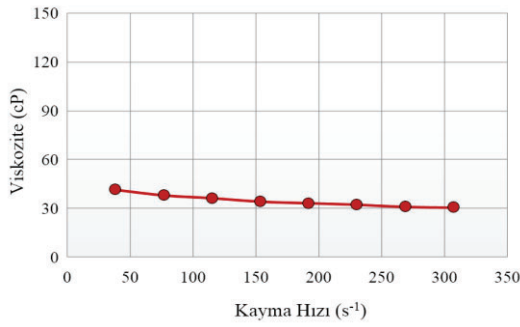
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
144,99	10,00	55,68	38,40	25,41
124,27	20,00	95,44	76,80	25,42
107,01	30,00	123,28	115,20	25,43
100,33	40,00	154,10	153,60	25,40
92,69	50,00	177,96	192,00	25,39
88,03	60,00	202,82	230,40	25,39
83,59	70,00	224,69	268,80	25,39
78,96	80,00	242,58	307,20	25,41



Şekil 5.60. KMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.46. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

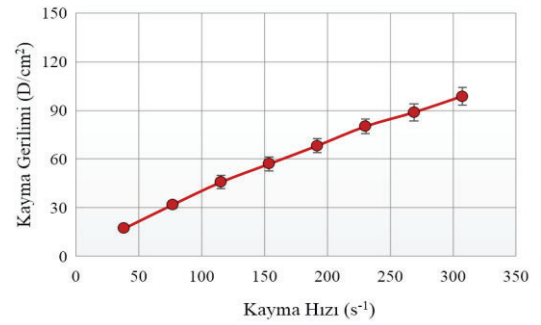
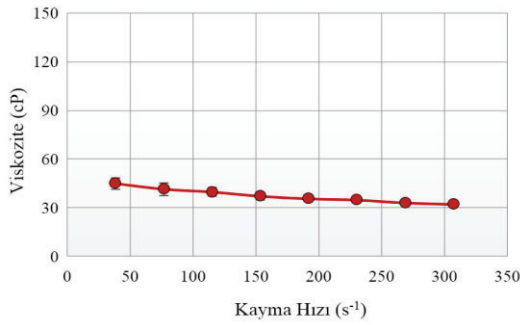
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
41,42	10,00	15,91	38,40	25,44
37,98	20,00	29,17	76,80	25,43
36,25	30,00	41,76	115,20	25,44
34,09	40,00	52,36	153,60	25,44
33,14	50,00	63,63	192,00	25,44
32,22	60,00	74,23	230,40	25,45
30,82	70,00	82,85	268,80	25,44
30,42	80,00	93,45	307,20	25,44



Şekil 5.61. KMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.47. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

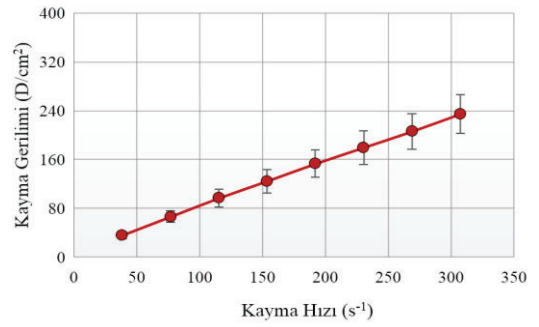
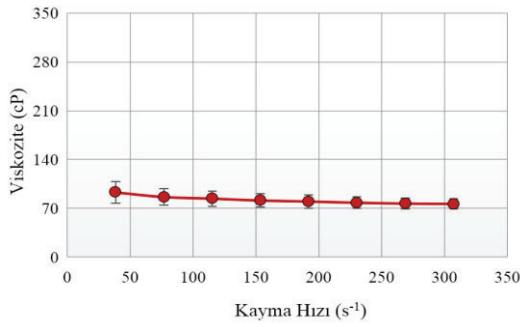
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
44,87	10,00	17,23	38,40	25,53
41,43	20,00	31,82	76,80	25,53
39,70	30,00	45,73	115,20	25,53
37,11	40,00	57,00	153,60	25,53
35,55	50,00	68,27	192,00	25,53
34,81	60,00	80,20	230,40	25,53
33,04	70,00	88,81	268,80	25,53
32,15	80,00	98,76	307,20	25,50



Şekil 5.62. KMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.48. KMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

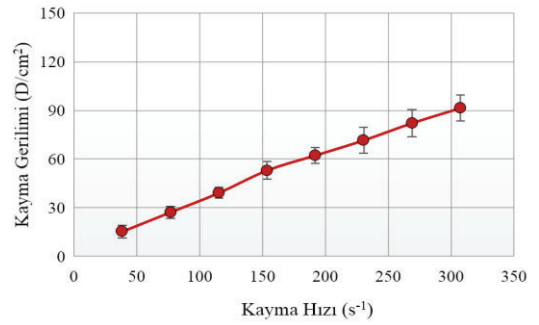
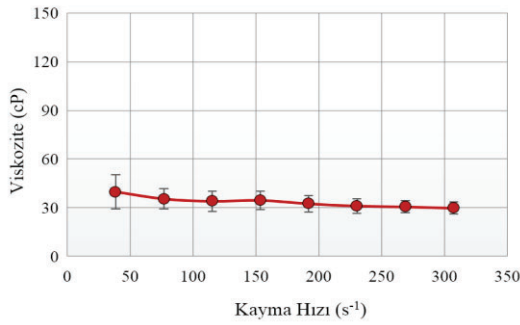
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
93,21	10,00	35,79	38,40	25,61
86,30	20,00	66,28	76,80	25,61
84,00	30,00	96,77	115,20	25,61
81,13	40,00	124,60	153,60	25,61
79,74	50,00	153,10	192,00	25,61
77,96	60,00	179,62	230,40	25,58
76,69	70,00	206,12	268,80	25,60
76,38	80,00	234,63	307,20	25,60



Şekil 5.63. KMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.49. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

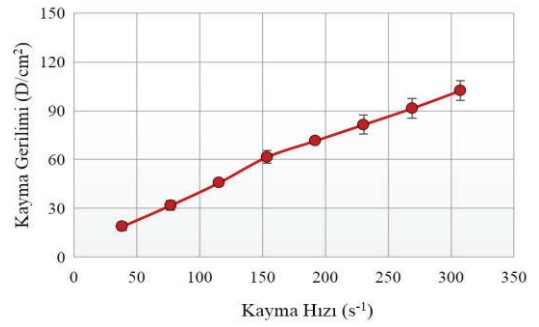
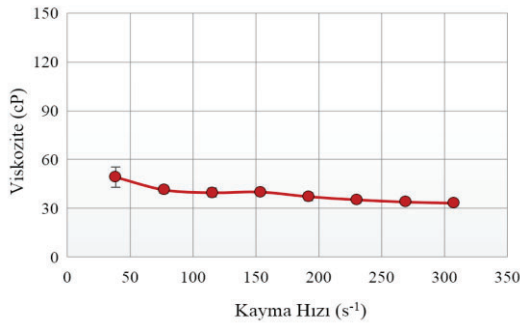
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
39,70	10,00	15,24	38,40	25,62
35,38	20,00	27,18	76,80	25,63
33,95	30,00	39,11	115,20	25,64
34,52	40,00	53,02	153,60	25,64
32,45	50,00	62,30	192,00	25,63
31,07	60,00	71,58	230,40	25,63
30,58	70,00	82,19	268,80	25,63
29,77	80,00	91,46	307,20	25,63



Şekil 5.64. SMT-25-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.50. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

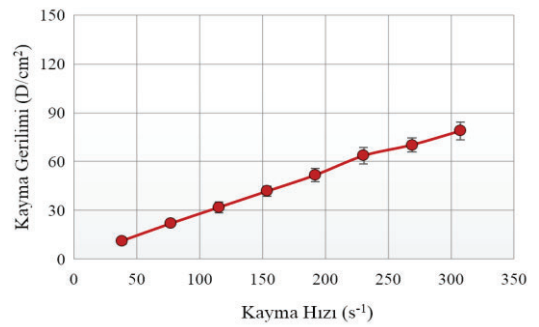
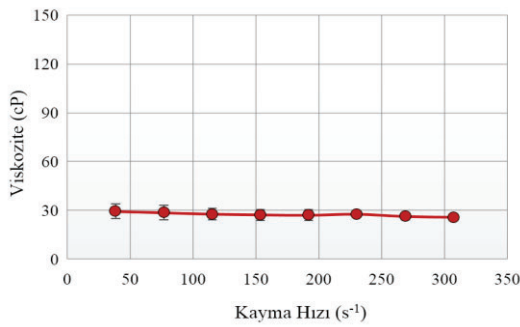
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
49,19	10,00	0,94	18,89	38,40
41,43	20,00	1,63	31,82	76,80
39,70	30,00	2,28	45,74	115,20
40,13	40,00	3,13	61,64	153,60
37,28	50,00	3,56	71,59	192,00
35,38	60,00	4,09	81,53	230,40
34,03	70,00	4,60	91,47	268,80
33,34	80,00	5,15	102,40	307,20



Şekil 5.65. SMT-25-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.51. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

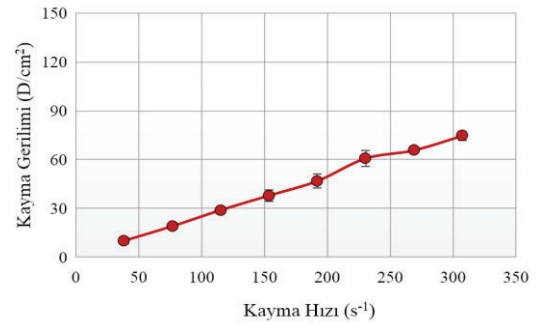
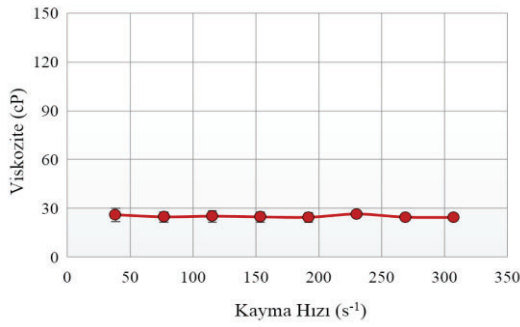
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
29,34	10,00	11,27	38,40	25,25
28,48	20,00	21,87	76,80	25,24
27,61	30,00	31,81	115,20	25,24
27,18	40,00	41,75	153,60	25,24
26,92	50,00	51,70	192,00	25,25
27,62	60,00	63,63	230,40	25,25
26,14	70,00	70,25	268,80	25,24
25,67	80,00	78,87	307,20	25,24



Şekil 5.66. SMT-4-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.52. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

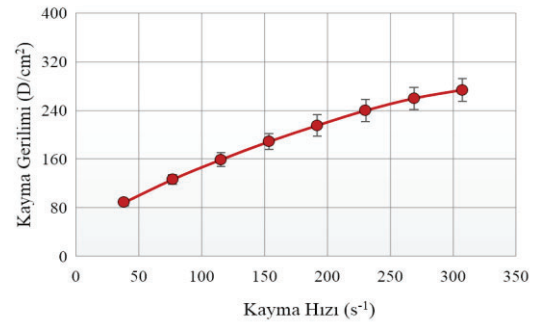
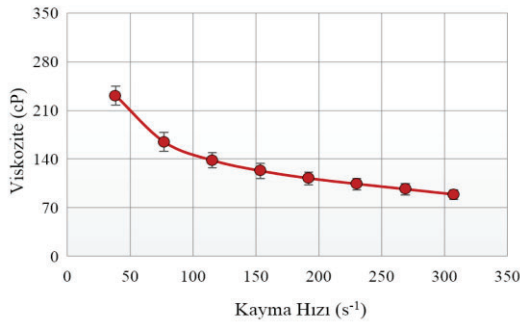
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
25,89	10,00	9,94	38,40	25,26
24,60	20,00	18,89	76,80	25,24
25,03	30,00	28,83	115,20	25,24
24,60	40,00	37,78	153,60	25,23
24,34	50,00	46,73	192,00	25,25
26,32	60,00	60,65	230,40	25,25
24,41	70,00	65,62	268,80	25,25
24,27	80,00	74,56	307,20	25,24



Şekil 5.67. SMT-4-3A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Tablo 5.53. SMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
231,29	10,00	88,81	38,40	25,41
164,84	20,00	12,59	76,80	25,41
138,08	30,00	15,07	115,20	25,41
122,98	40,00	18,90	153,60	25,40
112,19	50,00	21,41	192,00	25,41
104,13	60,00	23,93	230,40	25,40
96,66	70,00	25,81	268,80	25,39
89,11	80,00	273,73	307,20	25,40



Şekil 5.68. SMT-40-1A mikroemülsiyon formülasyonunun reolojik analizi (ortalama, n=3)

5.5.7. pH analizi

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 0., 30. ve 90. günlere ait pH ölçümü, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.54 ve Tablo 5.55'te verilmiştir. 40±1°C'lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

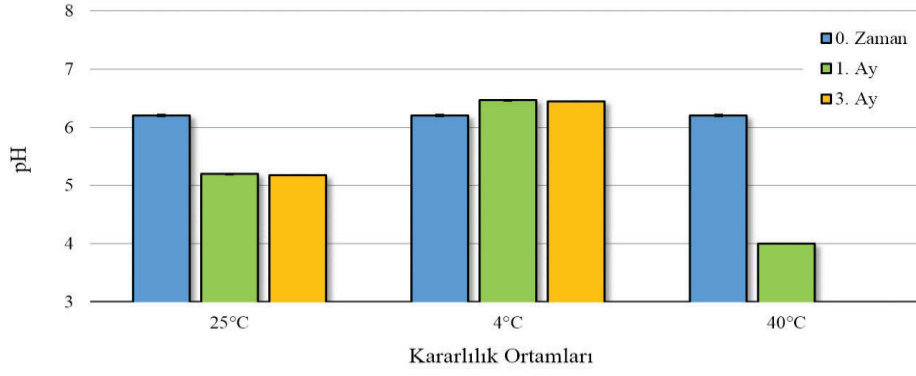
Tablo 5.54. Keten yağı mikroemülsiyonlarının pH değerleri (n=6)

Ölçüm	KMT-25-1A	KMT-25-3A	KMT-4-1A	KMT-4-3A	KMT-40-1A	KMT-40-3A
1	5,180	5,180	6,430	6,450	4,000	-
2	5,200	5,200	6,480	6,440	4,010	-
3	5,190	5,170	6,490	6,450	3,990	-
4	5,210	5,190	6,480	6,460	3,980	-
5	5,170	5,180	6,450	6,430	3,990	-
6	5,220	5,170	6,460	6,440	4,000	-
Ort.	5,195	5,182	6,465	6,445	3,995	-
SS	0,019	0,012	0,023	0,010	0,010	-
SH	0,008	0,005	0,009	0,004	0,004	-

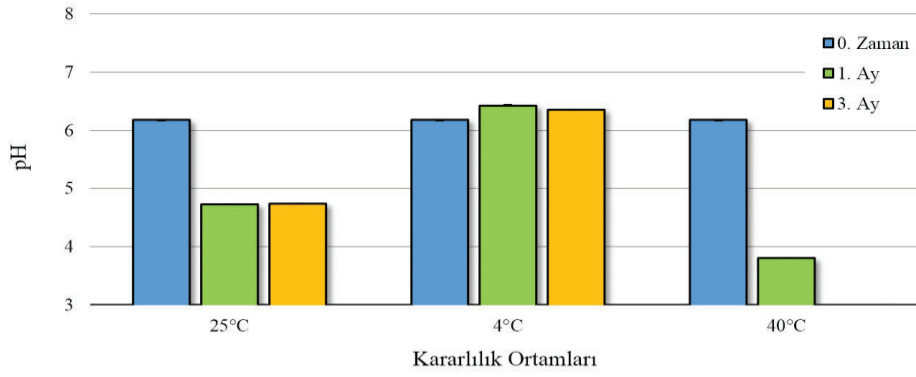
Tablo 5.55. Soya yağı mikroemülsiyonlarının pH değerleri (n=6)

Ölçüm	SMT-25-1A	SMT-25-3A	SMT-4-1A	SMT-4-3A	SMT-40-1A	SMT-40-3A
1	4,730	4,720	6,380	6,320	3,800	-
2	4,730	4,750	6,440	6,350	3,830	-
3	4,720	4,730	6,450	6,380	3,790	-
4	4,710	4,740	6,440	6,360	3,790	-
5	4,740	4,760	6,400	6,370	3,800	-
6	4,720	4,710	6,450	6,340	3,790	-
Ort.	4,725	4,735	6,427	6,353	3,800	-
SS	0,010	0,019	0,029	0,022	0,015	-
SH	0,004	0,008	0,012	0,009	0,006	-

Kararlılık çalışmalarından elde edilen pH sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi için veriler grafiklere (Şekil 5.69 ve Şekil 5.70) dönüştürülmüş ve zaman içinde görülen değişimler SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken KMT-40-3A ve SMT-40-3A formülasyonları dikkate alınmamıştır.



Şekil 5.69. Ketan yağı mikroemülsiyonlarının ortalama pH değerleri (n=6)



Şekil 5.70. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama pH değerleri (n=6)

Ketan yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama pH değeri 6,203 bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 5,195 ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 6,465 bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama pH değeri, 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 5,182 ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 6,445 bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında ileri düzeyde önemli fark gözükmesine rağmen ($p \leq 0,001$); 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonların pH değerlerinin 5,170-5,220 arasında ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonların pH değerlerinin de 6,430-6,490 arasında kaldığı görülmektedir.

Soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama pH değeri 6,173 bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, 25±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 4,725 ve 4±1°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 6,427 bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama pH değeri, 25±1°C'lık

ortamda bekletilen formülasyonlar için 4.735 ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 6.353 bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında ileri düzeyde önemli fark gözükmesine rağmen ($p\leq0,001$); $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonların pH değerlerinin 4,710-4,760 arasında ve $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonların pH değerlerinin de 6,320-6,450 arasında kaldığı görülmektedir.

Sağlıklı bir kadında genital yolun pH'sı 3,5-4,5 arasında asidik özellik göstermektedir (Sahoo vd., 2013). Yaş, adet döngüsünün evreleri, enfeksiyonlar ve cinsel uyarılma pH'da değişime yol açabilir. Örneğin adet, servikal ve uterus salgıları ve semen alkalize edici ajanlar olarak işlev görür ve pH'nın artmasına sebep olabilir (Punitha vd., 2018). Jauniaux ve arkadaşlarının 11 kişi üzerinde yaptığı bir çalışmada hamilelik sırasında amniyotik boşluk ve plasental yatak pH değeri 7,09 olarak ölçülmüştür (Jauniaux vd., 1999). Bu nedenle 0. zaman ve 90. gün pH bulguları istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli fark işaret etmesine rağmen ($p\leq0,001$) formülasyonların pH değerleri istenen aralıkta kalmayı başarmıştır.

Zamana karşı değişimi inceleyebilmek için hem keten yağı hem de soya yağı mikroemülsiyonu pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları Tablo 5.56'te gösterilmiştir.

Tablo 5.56. Ortalama pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Formülasyonlar	p Değeri	Karar Olasılığı
KMT-0Z / KMT-25-1A	0,0000	$p\leq0,001$
KMT-0Z / KMT-25-3A	0,0000	$p\leq0,001$
KMT-0Z / KMT-4-1A	0,0001	$p\leq0,001$
KMT-0Z / KMT-4-3A	0,0000	$p\leq0,001$
KMT-25-1A / KMT-25-3A	0,1910	$p>0,05$
KMT-4-1A / KMT-4-3A	0,0756	$p>0,05$
SMT-0Z / SMT-25-1A	0,0000	$p\leq0,001$
SMT-0Z / SMT-25-3A	0,0000	$p\leq0,001$
SMT-0Z / SMT-4-1A	0,0001	$p\leq0,001$
SMT-0Z / SMT-4-3A	0,0001	$p\leq0,001$
SMT-25-1A / SMT-25-3A	0,2031	$p>0,05$
SMT-4-1A / SMT-4-3A	0,0012	$p\leq0,01$

5.5.8. Elektriksel iletkenlik analizi

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 0., 30. ve 90. günlere ait elektriksel iletkenlik, ortalama, SS ve SH değerleri Tablo 5.57 ve Tablo 5.58’de verilmiştir. 40±1°C’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları 1. aydan sonra gerçekleştirilememiş ve değerlendirilmeye alınmamıştır.

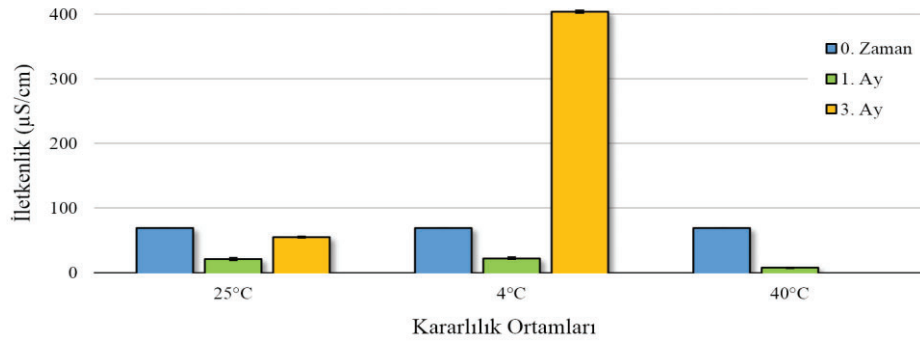
Tablo 5.57. Keten yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)

Ölçüm (µS/cm)	KMT-25-1A	KMT-25-3A	KMT-4-1A	KMT-4-3A	KMT-40-1A	KMT-40-3A
1	18,3	53,4	31,6	395,0	6,9	-
2	20,8	51,1	20,9	400,0	6,5	-
3	31,3	52,2	20,6	404,0	6,3	-
4	18,3	53,7	20,2	407,0	6,1	-
5	18,4	56,5	19,8	409,0	7,0	-
6	18,4	62,0	19,5	411,0	12,2	-
Ort.	20,9	54,8	22,1	404,3	7,5	-
SS	5,2	4,0	4,7	6,0	2,3	-
SH	2,1	1,6	1,9	2,4	1,0	-

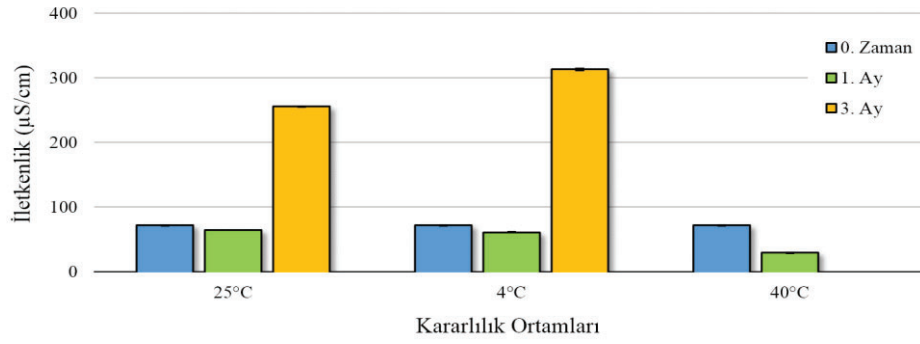
Tablo 5.58. Soya yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)

Ölçüm (µS/cm)	SMT-25-1A	SMT-25-3A	SMT-4-1A	SMT-4-3A	SMT-40-1A	SMT-40-3A
1	63,3	253,0	64,6	304,0	33,0	-
2	63,5	254,0	60,1	314,0	28,5	-
3	63,7	256,0	60,4	316,0	27,9	-
4	65,2	256,0	60,1	315,0	27,8	-
5	64,5	256,0	59,8	315,0	27,8	-
6	63,1	257,0	59,7	315,0	28,0	-
Ort.	63,9	255,3	60,8	313,2	28,8	-
SS	0,8	1,5	1,9	4,5	2,1	-
SH	0,3	0,6	0,8	1,9	0,8	-

Kararlılık çalışmalarından elde edilen elektriksel iletkenlik sonuçlarının daha iyi değerlendirilebilmesi için veriler grafiklere (Şekil 5.71 ve Şekil 5.72) dönüştürülmüş ve zaman içinde görülen değişimler SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken KMT-40-3A ve SMT-40-3A formülasyonları dikkate alınmamıştır.



Şekil 5.71. Ketan yağı mikroemülsiyonlarının ortalama elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)



Şekil 5.72. Soya yağı mikroemülsiyonlarının ortalama elektriksel iletkenlik değerleri (n=6)

Keten yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama elektriksel iletkenlik değeri 68,9 $\mu\text{S/cm}$ bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 20,9 $\mu\text{S/cm}$ ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 22,1 $\mu\text{S/cm}$ bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama elektriksel iletkenlik değeri, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 54,8 $\mu\text{S/cm}$ ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 404,3 $\mu\text{S/cm}$ bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün elektriksel iletkenlik bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve değerler arasında çok önemli fark bulunmuştur ($p\leq 0,01$).

Soya yağı mikroemülsiyon formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama elektriksel iletkenlik değeri 71,5 $\mu\text{S/cm}$ bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 63,9 $\mu\text{S/cm}$ ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 60,8 $\mu\text{S/cm}$ bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama elektriksel iletkenlik değeri, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen

formülasyonlar için 255,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 313,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bulunmuştur. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün elektriksel iletkenlik bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve değerler arasında çok önemli fark bulunmuştur ($p\leq 0,01$). Zamana karşı değişimi inceleyebilmek için hem keten yağı hem de soya yağı mikroemülsiyonu elektriksel iletkenlik değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları Tablo 5.59'da gösterilmiştir.

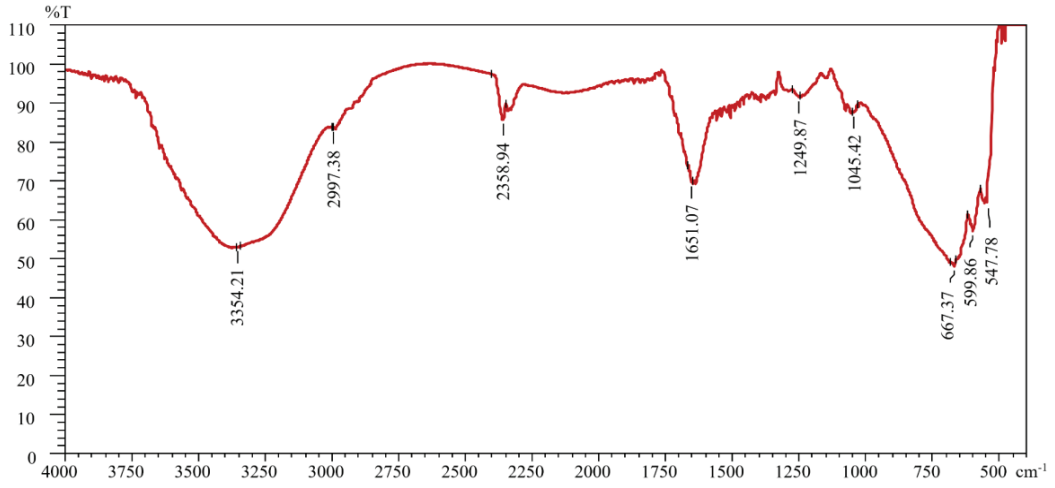
Tablo 5.59. Ortalama elektriksel iletkenlik değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Formülasyonlar	<i>p</i> Değeri	Karar Olasılığı
KMT-0Z / KMT-25-1A	0,0000	$p\leq 0,001$
KMT-0Z / KMT-25-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
KMT-0Z / KMT-4-1A	0,0000	$p\leq 0,001$
KMT-0Z / KMT-4-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
KMT-25-1A / KMT-25-3A	0,0001	$p\leq 0,001$
KMT-4-1A / KMT-4-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-25-1A	0,0004	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-25-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-4-1A	0,0003	$p\leq 0,001$
SMT-0Z / SMT-4-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
SMT-25-1A / SMT-25-3A	0,0000	$p\leq 0,001$
SMT-4-1A / SMT-4-3A	0,0000	$p\leq 0,001$

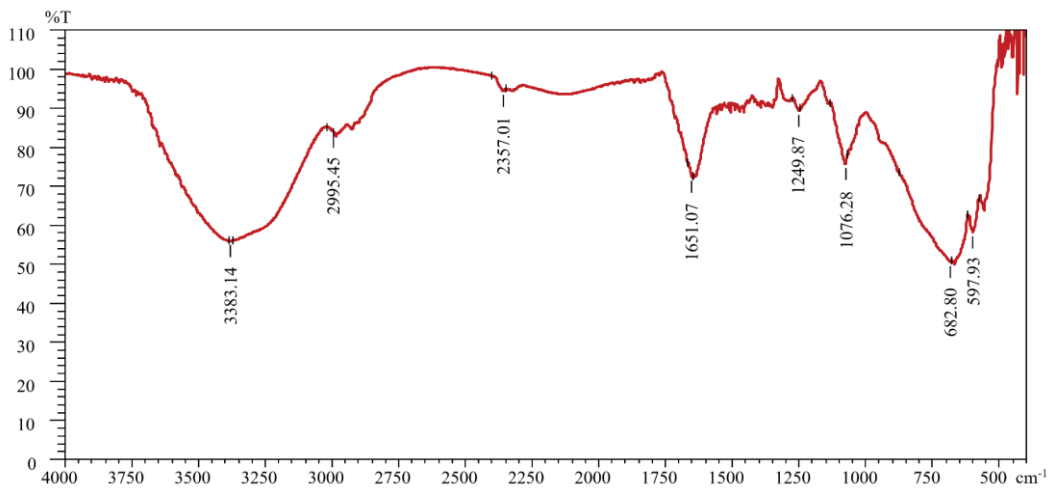
$25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen keten yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerlerinin 18.3-62.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonların 19.5-411.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında kaldığı görülmektedir. $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen soya yağı mikroemülsiyonlarının elektriksel iletkenlik değerlerinin ise 63,1-257,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonların 59,7-316,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında kaldığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada dış fazı yağ olan mikroemülsiyonlarda iletkenlik değerlerinin sıfıra yakın çıktığı ve su oranının %10'u aşmasından itibaren iletkenlik değerinin ölçülebildiği belirtilmiştir (Boonme vd., 2006). Dış fazı su olan mikroemülsiyon formülasyonlarının elektriksel iletkenlikleri yüksek iken dış fazı yağ olan mikroemülsiyonlarda iletkenlik ya çok zayıftır ya da yoktur (Moulik ve Paul, 1998; Heuschkel vd, 2008; Santos vd, 2008). Çalışmamızda elde edilen yüksek elektriksel iletkenlik verilerine göre, hazırlanan mikroemülsiyonların kararlılık sonunda Y/S tipinde olduğu sonucuna varılmıştır.

5.5.9. FT-IR analizi

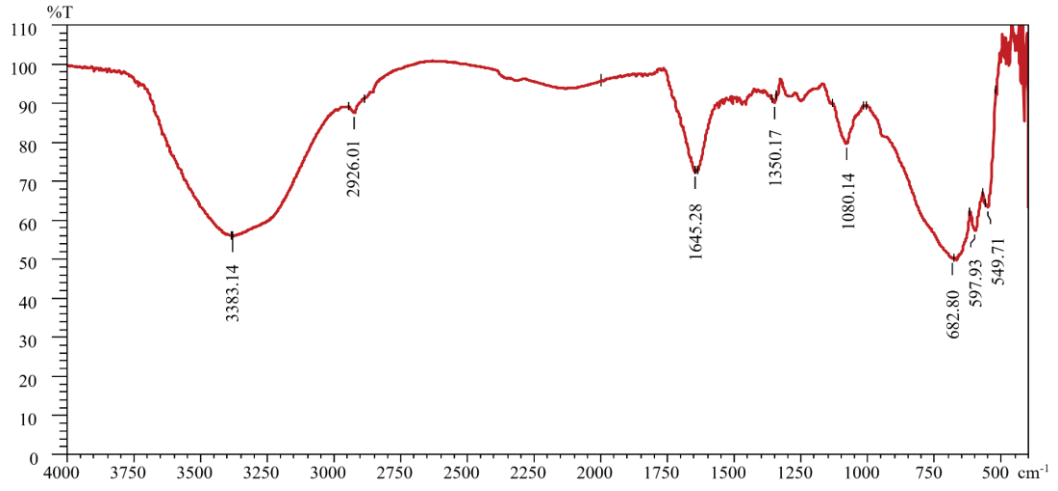
$4\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 90. gün FT-IR spektrumları Şekil 5.73-5.77’de verilmiştir. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için ölçüm yapılmamış ve değerlendirilmeye alınmamıştır. Spektrumlar $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ arasında alınmış ve karakteristik IR bantları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar formülasyonların kararlılık değerlendirilmesinde kullanılmıştır. FT-IR spektrumları incelendiğinde 1600 cm^{-1} bölgesindeki pikler karbonil varlığını, 3300 cm^{-1} bölgesindeki yayvan bant ise OH varlığını göstermektedir. TGF- $\beta 1$ etkin maddesine özgü parmak izi bölgesi olan $600\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler, yapılan tüm analizlerde birbiriyle uyumuş ve etkin maddenin bozulmadığını göstermiştir.



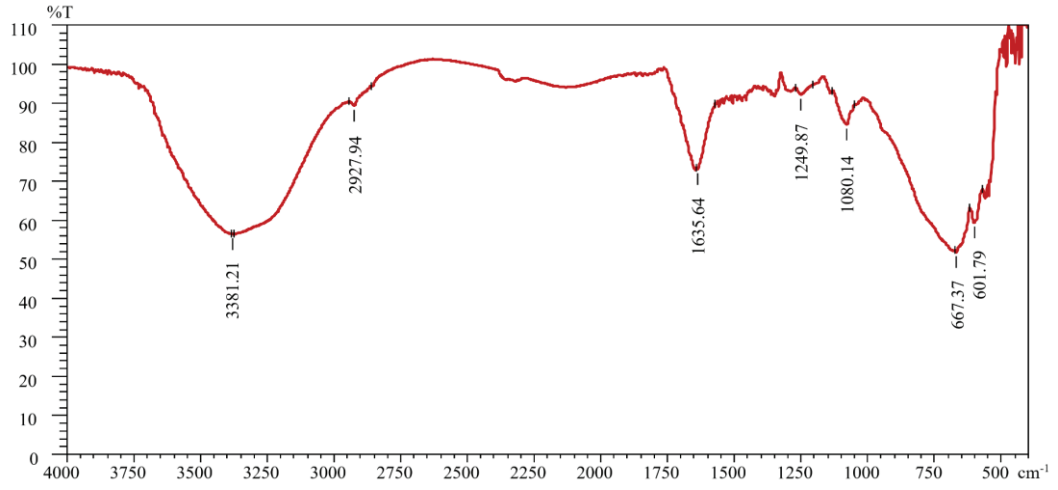
Şekil 5.73. TGF- $\beta 1$ maddesinin FT-IR spektrumu



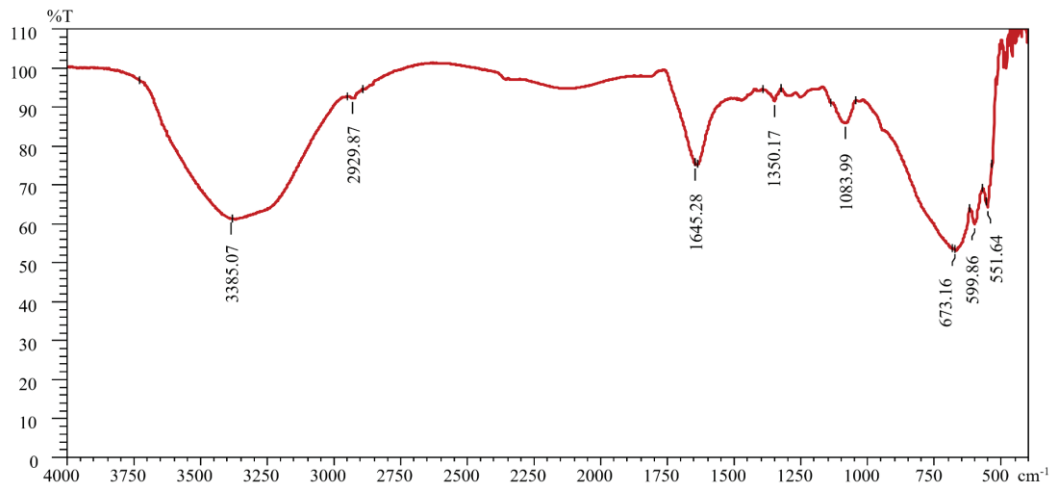
Şekil 5.74. SMT-25-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu



Şekil 5.75. KMT-25-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu



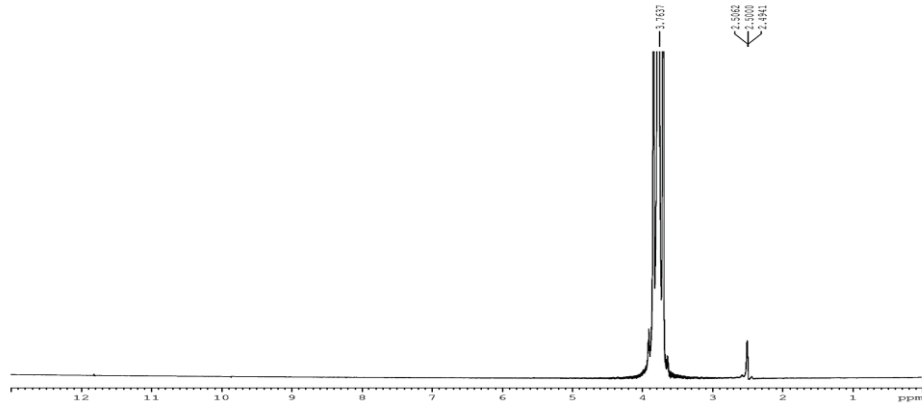
Şekil 5.76. SMT-4-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu



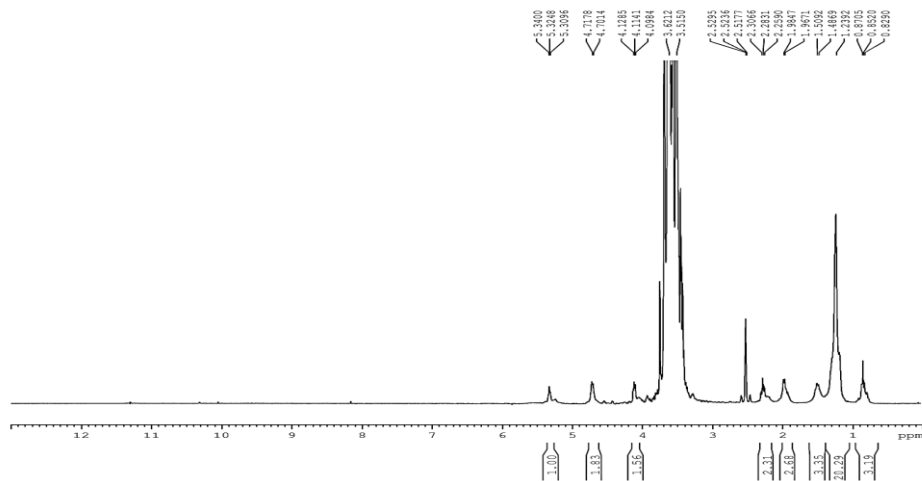
Şekil 5.77. KMT-4-3A formülasyonunun FT-IR spektrumu

5.5.10. NMR analizi

$4\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 90. gün ^1H -NMR spektrumları Şekil 5.78-5.82’de verilmiştir. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’lik ortamda bekletilen formülasyonlar için ölçüm yapılmamış ve değerlendirilmeye alınmamıştır. ^1H -NMR analizlerinde çözücü olarak dötero-DMSO maddesi kullanılmış ve spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar formülasyonların kararlılık değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Gözlenen TGF- $\beta 1$ piki 6 ppm’den küçük olması nedeniyle aromatik yapıda olmadığı anlaşılmıştır. Tüm hidrojenler ise alifatik yapıya sahiptir. Karakterizasyon çalışmasında TGF- $\beta 1$ piki 3,76 ppm’de görülmüştür. Kararlılık çalışmasında ise KMT-4-3A için 3,66 ppm’de, SMT-4-3A için 3,67 ppm’de, KMT-25-3A için 3,62 ppm’de ve SMT-25-3A için 3,62 ppm’de aynı yapının görülmesi etkin maddenin bozulmadığını göstermiştir.



Şekil 5.78. TGF- $\beta 1$ maddesinin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 5.79. SMT-25-3A formülasyonunun ^1H -NMR spektrumu

5.5.11. Etkin madde miktar tayini

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların 90. güne ait etkin madde miktar tayinleri için $y=0,0013+0,0115$ doğru denklemi kullanılmıştır. 40±1°C'lik ortamda bekletilen formülasyonlar için kararlılık çalışmaları değerlendirilmeye alınmamıştır.

4±1°C ve 25±1°C kararlılık ortamında saklanan ve 2,5 µg/mL TGF-β1 maddesi içeren formülasyonlar etkin madde miktar tayini için seyreltilmiştir. Bu seyreltme işleminden sonra etkin madde konsantrasyonu 1000 pg/mL'ye düşmüştür. Hazırlanan formülasyonlar bu sefer korelasyon işlemi için ELISA Kitinde seyreltme işlemlerinden geçirilmiş ve 450 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbanslar ve bu absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar Tablo 5.60'ta verilmiştir.

Tablo 5.60. Kararlılık çalışması sonrası formülasyonlarda etkin madde miktar tayini sonuçları

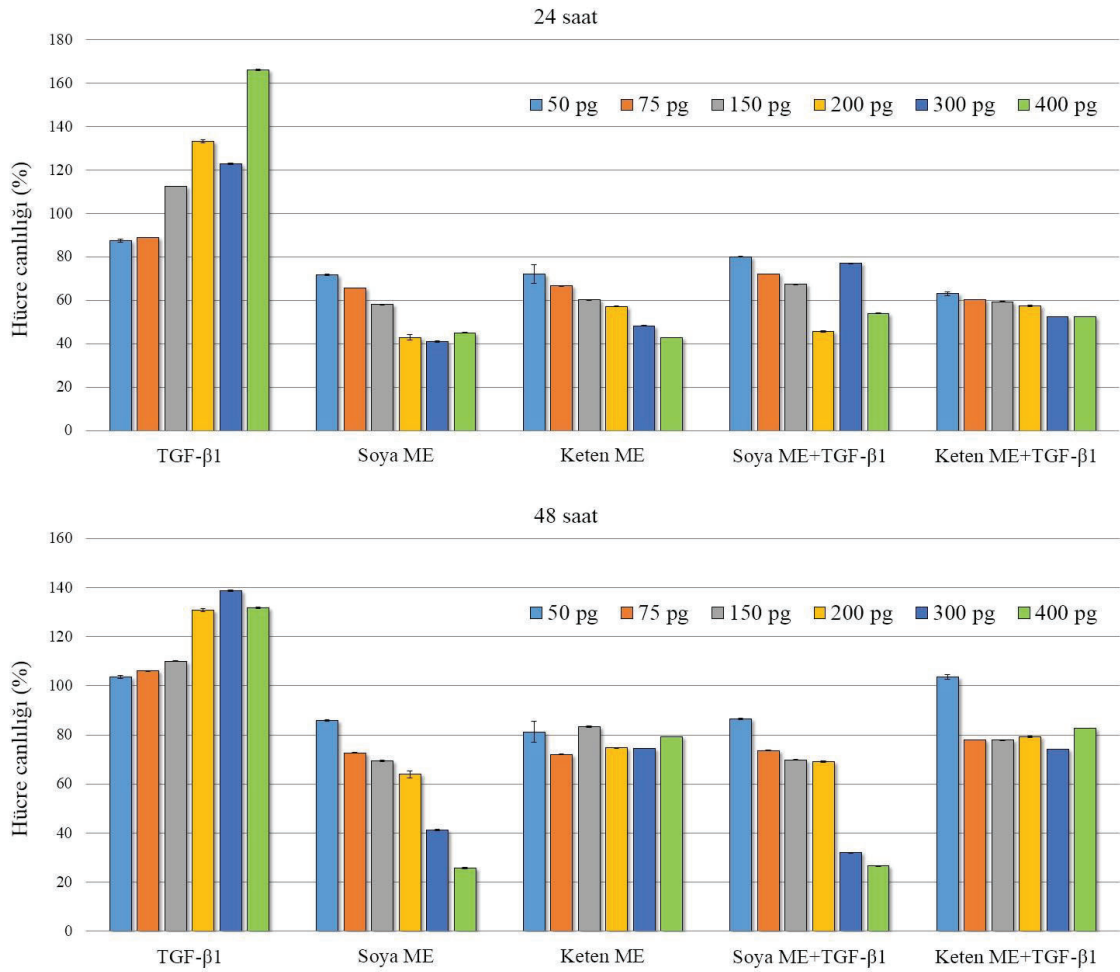
Formülasyonlar	Absorbans	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
KMT-25-1A	1,301	991,923	99,19
SMT-25-1A	1,298	989,615	98,96
KMT-4-1A	1,303	993,462	99,35
SMT-4-1A	1,302	992,692	99,27
KMT-25-3A	1,267	965,769	96,58
SMT-25-3A	1,276	972,692	97,27
KMT-4-3A	1,267	965,769	96,58
SMT-4-3A	1,294	986,538	98,65

Kararlılık çalışması sonrası 4±1°C ve 25±1°C kararlılık ortamında saklanan formülasyonların etkin madde miktar tayini sonuçları 1000 pg'a kıyasla çok az düşmüş durumdadır ($p \leq 0,05$). Bu durumun formülasyonlardaki etkin maddenin zaman içerisinde bozunmasından kaynaklanabileceği gibi, uygulanan ELISA Kiti yöntemindeki seyreltme aşamalarından gelebilecek hatalardan ötürü de olabileceği düşünülmüştür.

Bu aşamada, daha önce yapılan çalışmalardan FT-IR ve ¹H-NMR spektrumlarının etkin madde açısından değerlendirilmesi aydınlatıcı bilgiler vermektedir. Spektrumlardan elde edilen sonuçlar ve etkin madde miktar tayini çalışması birlikte değerlendirildiğinde TGF-β1 maddesinin kararlı yapıda kaldığı sonucu çıkarılmıştır. 40±1°C'lik ortamda bekletilen formülasyonlarda çalışma yapılmamış olmasına rağmen TGF-β1 maddesinin bu sıcaklıktan etkilenip bozunması da olası olarak değerlendirilmiştir.

5.6. Sitotoksosite Testi ve Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücrelerde TGF- β 1 ve formülasyonların etkilerinin belirlenmesi için, TGF- β 1 çözeltisi 100 μ L besiyerinde 50, 75, 150, 200, 300 ve 400 pg olacak şekilde seyreltilmiş ve hücrelere uygulanmıştır. TGF- β 1 içeren formülasyonların miktarları, hücrelere uygulanan TGF- β 1 oranları dikkate alınarak hesaplanmıştır. Boş formülasyonlar da TGF- β 1 içeren formülasyonlara eş değer olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlardan % hücre canlılığı hesaplanmış ve grafiğe aktarılmıştır (Şekil 5.83).



Şekil 5.83. TGF- β 1 içeren formülasyonların ve boş formülasyonların 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılığı

TGF- β 1, epitelyal ve endotelyal hücreler de dahil olmak üzere çoğu hücre tipi için güçlü bir büyüme inhibitörüdür. Hücre çoğalması, hücre dışı matriks sentezi, anjiyogenez, immün yanıt, apoptoz ve farklılaşma dahil olmak üzere çoklu biyolojik süreci düzenlediği belirlenmiştir (Huang ve Huang, 2005).

Bu nedenlere bağlı olarak, yaptığımız çalışmada, TGF-β1'in artan dozlarda ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. 24 saat sonunda ilk iki dozda %100 oranında artış gözlenmezken, en yüksek dozda %160 oranında bir artış gözlenmiştir. 48 saat sonunda ise tüm dozlarda hücre canlılığının %100'n üzerinde olduğu; ancak, en yüksek dozun 24 saat sonrasında olduğu gibi %160'a ulaşmadığı ve %130 civarında kaldığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, soya yağı ile hazırlanmış olan boş formülasyonun keten yağı ile hazırlanmış formülasyona oranla daha toksik olduğu gözlenmiştir. Bu toksisite oranının ilk 24 saat sonunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, 48 saat sonunda keten yağı ile hazırlanan formülasyonun toksistesinin olmadığı, soya ile hazırlananın hala toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, doza bağlı toksisitenin arttığını ama zamana bağlı olarak azaldığını işaret etmektedir. Toksisite nedeninin, formülasyon aşamasında kullanılan sürfektan miktarının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Arechabala vd., 1999). Bu toksik zellik, TGF-β1 içeren keten yağı formülasyon için 48 saat sonrasında tamamen ortadan kalkmış ve TGF-β1'in hücre çoğalmasına olan etkisi ise devam etmiştir. Soya ile hazırlanmış formülasyonlarda ise bu etki görülmemiştir. Bu durumun, soya yağı ile TGF-β1'in geçimsizlik sorununa bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu konu, başka bir araştırma konusu olarak gelecekte çalışılabilecek niteliktedir.

Sonuç olarak, TGF-β1 hücre çoğalmasında etki göstermektedir ve keten yağı ile formüle edildiğinde 48 saat sonunda toksik özellik göstermemektedir. Soya yağı ile hazırlanmış formülasyonların toksisitesi yüksek bulunmuştur ve tedavi için uygun görülmemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Etkin madde içermeyen mikroemülsiyonlar kararı sistemler olmasına rağmen, TGF- β 1 proteini yüklediği zaman kararlılık sorunlarının başladığı görülmektedir. $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonlar incelendiğinde $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda bekletilen formülasyonların sıcaklıktan etkilenerek bozunduğu görülmüştür. Üç ay olarak gerçekleştirilmiş kararlılık çalışması $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda bekletilen formülasyonlar için olumlu sonuçlanmasına rağmen, 6 aylık ölçüm sonucunda $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda bekletilen formülasyonların da sıcaklıktan etkilenmesi olasıdır. Bu nedenle mikroemülsiyonların $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ve altında saklanması raf ömrü açısından daha uygun görülmektedir.

Yapılan sitotoksikite testi ve hücre kültürü çalışmalarında TGF- β 1 maddesinin hücre çoğalmasında etki gösterdiği; ancak, soya yağı ile hazırlanmış olan boş formülasyonun keten yağı ile hazırlanmış formülasyona oranla daha toksik olduğu gözlenmiştir. Bu sonucun TGF- β 1 içeren formülasyonları da etkilediği görülmüş ve soya yağı ile TGF- β 1'in geçimsizlik sorununa bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu konu, başka bir araştırma konusu olarak gelecekte çalışılabilecek niteliktedir.

Çalışmamızda, TGF- β 1 içeren yeni mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanmış, karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlerleyen aşamalarda Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ile birlikte *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi ve formülasyonların döllenmiş ovaryumun rahme tutunma şansını arttırdığının gösterilmesi planlanmıştır.

Tez kapsamında, günümüzde büyük sorun teşkil eden tekrarlayan düşük tedavisi için kullanımı pratik bir formülasyon ve yöntem elde edilmesi amaçlanmıştır. Ancak etkin madde ve formülasyonlarının kullanım dozunu tam olarak belirleyebilmek için çalışmanın kapsamı genişletilebilir.

KAYNAKÇA

- Aboutaleb, H.A., Kharshoum, R.M., Ismail, H.R. (2015). Formulation and optimization of solid self-nanoemulsifying system using porous carriers for oral delivery of cinnarizine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 433-438.
- Acharya, D.P., Hartley, P.G. (2012). Progress in microemulsion characterization. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 274-280.
- Akdoğan, M., Yöntem, M. (2018). Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
- Akter, N., Radiman, S., Mohamed F., Reza, M.I. (2013). Self-assembled potential bio nanocarriers for drug delivery. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(9), 1327-1339.
- Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L.J., de Roeck-Holtzhauer, Y. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*, 19(3), 163-165.
- Attwood, D. (1992). Microemulsions. J. Kreuter (Ed), *Colloidal drug delivery systems* içinde (s. 31-72). New York, Marcel Dekker, Inc.
- Balandya, E., Wieland-Alter, W., Sanders, K., Lahey, T. (2012). Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor- β 1 expression. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68(4), 322-330.
- Bansal, A.S., Bajardeen, B., Thum M.Y. (2012). The basis and value of currently used immunomodulatory therapies in recurrent miscarriage, *Journal of Reproductive Immunology*, 93(1), 41-51.
- Boonme, P., Krauel, K., Graf, A., Rades, T., Junyaprasert, V.B. (2006). Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/brij 97:1-butanol. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, 7 (2), 1-6.

- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.L., Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 359-378.
- Bumajdad A., Eastoe, J., (2004). Conductivity of water-in-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 274, 268–276
- Burguera, J.L., Burguera, M., (2012). Analytical applications of emulsions and microemulsions. *Talanta*, 96, 11-20.
- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Yenilmez, E. (2019). Vaginal suppositories with siRNA and paclitaxel-incorporated solid lipid nanoparticles for cervical cancer: Preparation and *in vitro* evaluation. L.D. Kumar (Ed), *RNA Interference and Cancer Therapy: Methods and Protocols* içinde (s.303-328). Springer Science+Business Media.
- Chen, Z., Lin, F., Gao, Y., Li, Z., Zhang, J., Xing, Y., Deng, Z., Yao, Z., Tsun, A., Li, B. (2011). FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17, *International Immunopharmacology*, 11(5), 536-542.
- Chetty, M., Duncan, W.C. (2014). Investigation and management of recurrent miscarriage. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 25(2), 31-36.
- Chevalier, Y., Zemb, T. (1990). The structure of micelles and microemulsions. *Reports on Progress in Physics*, 53(3), 279-371.
- Çelebi, N. (2004). Koloitler. A.Z. Gürsoy (Ed), *Farmasötik teknoloji temel konular ve dozaj şekilleri içinde* (s.245-255). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını.
- Çelebi, N. (2007). Emülsiyonlar. F. Acartürk (Ed), *Modern farmasötik teknoloji içinde* (s.277-299). Ankara: Türk Eczacıları Birliği Akademik Yayını.
- Çetin, M. (2014). *Nedeni Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Genetik Varyasyonlarının Araştırılması*, Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi.
- Das, S.K., Flanders, K.C., Andrews, G.K., Dey, S.K. (1992). Expression of transforming growth factor- β isoforms (beta 2 and beta 3) in the mouse uterus: Analysis of the

- preimplantation period and effects of ovarian steroids. *Endocrinology*, 130(6), 3459-3466.
- Deniz, R., Baykuş Y., Kavak, E.Ç. (2016). Tekrarlayan Gebelik Kayıplarına Yaklaşım, *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 6(2), 130-137.
- Dhanapal, R. (2012). A review-microemulsion. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 23-29.
- Durmuş, H., (2015). *Tekrarlayan gebelik kaybı nedeni ile daha önce tetkik edilip, MTHFR gen polimorfizmi tespit edilen folik asit veya düşük molekül ağırlıklı heparin tedavisi alan hastaların gebeliklerinin ve gebelik sonuçlarının değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi.
- Ford, H.B., Schust, D.J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 2(2), 76-83.
- Godkin, J.D., Doré, J.J.E. (1998). Transforming growth factor β and the endometrium. *Reviews of Reproduction*, 3(1), 1-6.
- Görgülü, V. (2009). *Tekrarlayan Düşük Etiyolojisinde Antifosfolipid Antikor Sendromu Belirteçlerinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- Gradzielski, M. (2008). Recent developments in the characterisation of microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 263-269.
- Guerin, L.R., Prins, J.R., Robertson, S.A. (2009). Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: A new target for infertility treatment?. *Human Reproduction Update*, 15(5), 517-535.
- Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O., (1997). Sitokinler, *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 17(2), 65-74.
- Güven, U.M. (2017). *Antihistaminik etkili oftalmik kontrollü salım gösteren farklı sistemler üzerinde çalışmalar*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Hathout, R.M., Woodman, T.J., Mansour, S., Mortada, N.D., Geneidi, A.S. Guy, R.H. (2010). Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), 188-196.

- Heuschkel, S., Goebel, A., Neubert, R.H.H. (2008). Microemulsion-modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 603-631.
- Huang, S.S., Huang, J.S. (2005). TGF-beta control of cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(3), 447-462.
- Jauniaux, E., Watson, A., Ozturk, O., Quick, D., Burton, G. (1999). In-vivo measurement of intrauterine gases and acid-base values early in human pregnancy. *Human Reproduction*, 14(11), 2901-2904.
- Jovanović, A., Kramer, B. (2010). The effect of hyperstimulation on transforming growth factor beta(1) and beta(2) in the rat uterus: possible consequences for embryo implantation. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1509-1517.
- Kaş, S. (1996). Kozmetik ürünlerde stabilite çalışmaları. S. Hekimoğlu (Ed), A. Hıncal, A.(Ed), Kozmetoloji Günleri-1 toplantı kitapçığı içinde (s.41-58).
- Kamaria, P., Saxena, A., Patwa A., Dashora A. (2015). Micro-emulsion: an overview. *ASIO Journal of Pharmaceutical & Herbal Medicines Research*, 1(1), 5-16.
- Khodakiya, A.S., Chavada, J.R., Jivani, N.P., Patel, B.N., Khodakiya, M.S., Ramoliya, A.P. (2012). Microemulsions as enhanced drug delivery carrier: an overview. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(4), 206-226.
- Kim, D.H., Kim, Y.J., Kim, R.M., Maharjan, P., Ji, Y., Jang, D., Min, K.A., Koo, T., Cho, K.H. (2018). Orlistat-loaded solid SNEDDS for the enhanced solubility, dissolution, and in vivo performance. *International Journal of Nanomedicine*, 2018(13), 7095-7106.
- Kopuz, M., (2008). *Tekrarlayan Düşük (Recurrent Abortion) Olgularında Oksidan-Antioksidan Dengenin L-Karnitin ile İlişkisi*, Yüksek Lisans Tezi. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kotmakchiev, M., Kantarcı, G., Çetintaş, V.B., Ertan, G. (2012). Cytotoxicity of a novel oil/water microemulsion system loaded with Mitomycin-C in in vitro lung cancer models. *Drug Development Research*, 73(4), 185-195.

- Kumar, P., Mahajan, S. (2013). Preimplantation and postimplantation therapy for the treatment of reproductive failure. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(2), 88-92.
- Li, F., Song, S., Guo, Y., Zhao, Q., Zhang, X., Pan, W.; Yang, X. (2015). Preparation and pharmacokinetics evaluation of oral self-emulsifying system for poorly water-soluble drug Lornoxicam. *Drug Delivery*, 22(4), 487-498.
- Liu, Y.S., Wu, L., Tong, X.H., Wu, L.M., He, G.P., Zhou, G.X., Luo, L.H., Luan, H.B. (2011). Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion, *American Journal of Reproductive Immunology*, 65(5), 503-511.
- Lu, G.W., Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. V.S. Kulkarni (Ed.), *Handbook of non-invasive drug delivery systems* içinde (s.59-94). Elsevier Inc.
- Luppi, P., (2013). How immune mechanisms are affected by pregnancy, *Vaccine*, 21(24), 3352-3357.
- Moulik, S.P., Paul, B.K. (1998). Structure, Dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloidal and Interface Science*, 78(2), 99-195.
- Mutluay, D., Öner, J. (2016). Role of Cytokines During Pregnancy. *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 23(1), 126-131.
- Muzaffar, F., Singh, U.K., Chauhan L. (2013). Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 39-53.
- Müller, R. H., Heinemann, S. (1993). Fat emulsions for parenteral nutrition II: Characterisation and physical long-term stability of Lipofundin MCT/LCT, *Clinical Nutrition*, 12(5), 298-309.
- Nicholas, O., Lydia, U., Lawrence E., Sunday, O., Vegil, O., Amarauche C. (2015). Ibuprofen self-emulsifying drug delivery system. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 887-899.

- Olbrich, C., Gessner, A., Schröder, W., Kayser, O., Müller, R.H. (2004). Lipid-drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene-cytotoxicity testing and mouse serum adsorption. *Journal of Controlled Release*, 96(3), 425-435.
- Pasquali, R.C., Taurozzi, M.P., Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 44-51.
- Patel, V., Kukadiya, H., Mashru R., Surti, N., Mandal, S. (2010). Development of microemulsion for solubility enhancement of clopidogrel. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 327-334.
- Patravale, V.B., Date, A.A. (2009). Microemulsions: Pharmaceutical Applications. C. Stubenrauch(Ed.), *Microemulsions: background, new concepts, applications, perspectives* içinde (s.259-301). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Paul, B.K., Moulik, S.P. (1997). Microemulsions: an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 18(4), 301-367.
- Peng, C.C., Bengani, L.C., Jung, H.C., Leclerc, J., Gupta, C., Chauhan, A. (2011). Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(1), 111-121.
- Punitha, E., Anbazhagan, S., Sathya, B., Vimalson, D.C. (2018). Recent approaches in vaginal drug delivery systems. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 97-106.
- Quenby, S. (2010). Recurrent Miscarriage. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 20(10), 306-310.
- Rai, R., Regan, L. (2006). Recurrent Miscarriage. *Lancet*, 368(9535), 601-611.
- Rieger, M. (1986). Emulsions. L. Lachman, H.A. Lieberman, J.L. Kanig (Ed), *Theory and practice of industrial pharmacy* içinde (s.502-533). Philadelphia: Lea and Febiger.
- Roussev, R.G., Acacio, B., Ng, S.C., ve Coulam, C.B. (2008). Duration of Intralipid's Suppressive Effect on NK Cell's Functional Activity, *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(3), 258-263.

- Sahoo, C.K., Nayak, P.K., Sarangi, D.K., Sahoo, T.K. (2013). Intra vaginal drug delivery system: An overview. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 1, 43-55.
- Saifi, B., Rezaee, S.A., Tajik, N., Ahmadpour, M.E., Ashrafi, M., Vakili, R., SoleimaniAsl, S., Aflatoonian, R., Mehdizadeh, M. (2014). Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window, *Reproductive BioMedicine Online*, 29(4), 481-489.
- Sajjadi, S., Jahanzad, F., Yianneskis, M., Brooks, B.W. (2003). Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions 2. effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(15), 3571-3577.
- Santos, P., Watkinson, A.C., Hadgraft, J., Lane, M.E. (2008). Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology*, 21(5), 246-259.
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., Runkel, F. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 184-192.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785-796.
- Seljak, K.B., Berginc, K., Trontelj, J., Zvonar, A., Kristl, A., Gašperlin, A. (2014). A self-microemulsifying drug delivery system to overcome intestinal resveratrol toxicity and presystemic metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(11), 3491-3500.
- Serdaroğlu, M., Öztürk, B., Kara, A. (2015). An Overview of Food Emulsions: Description, Classification and Recent Potential Applications. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(6), 430-438.
- Shooner, C., Caron, P.L., Fréchette-Frigon, G., Leblanc, V., Déry, M.C., Asselin, E. (2005). TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(20), 1-18.

- Schöler, N., Olbrich, C., Tabatt, K., Müller, R. H., Hahn, H., Liesenfeld, O. (2001). Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1-2), 57-67.
- Singh, P.K., Iqbal, M.K., Shukla, V.K., Shuaib M.. (2014). Microemulsions: Current Trends in Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 1(1), 39-51.
- Singh, V., S.S , B., Raju S,A., Ahmad, R., Singh, M., Bisht, A. (2011). Microemulsions as Promising Delivery Systems: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(4), 392-401.
- Steinborn, A., Schmitt, E., Kisielewicz, A., Rechenberg, S., Seissler, N., Mahnke, K., Schaier, M., Zeier, M., Sohn, C. (2012). Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs, *Clinical & Experimental Immunology*, 167(1), 84-98.
- Şenel, B. (2012). *siRNA Taşıyıcı sistem geliştirme ve değerlendirme çalışmaları*, Doktora Tezi. Eskişehir:Anadolu Üniversitesi.
- Taha, M.O., Al-Ghazawi, M., Abu-Amara, H., Khalil, E. (2001). Development of quantitative structure–property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and cosurfactants: application of data mining and molecular modeling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(5), 461-478.
- Toth, B., Jeschke, U., Rogenhofer, N., Scholz, C., Würfel W., Thaler, C.J., Makrigiannakis, A., (2010). Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment, *Journal of Reproductive Immunology*, 85(1), 25-32.
- Uchida, M., Li, X.W., Mertens, P., Alpar, H.O. (2009). Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(8), 754-764.
- Vural, P. (2010). Transforming Growth Factor β 'nın Kanserde Baskılayıcı Rolü. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 8(1), 35-42.

- Wang, W.J., Hao, C.F., Yin, G.J., Bao, S.H., Qiu, L.H., Lin, Q.D. (2010a). Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients, *Journal of Reproductive Immunology*, 84(2), 164-170.
- Wang, W.J., Hao, C.F., Qu, Q.L., Wang, X., Qiu, L.H., Lin, Q.D. (2010b). The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage, *Human Reproduction*, 25(10), 2591-2596.
- Yao, J., Ruan, Y., Zhai, T., Guan, J., Tang, G., Li, H., Dai, S. (2011). ABC block copolymer as “smart” pH-responsive carrier for intracellular delivery of hydrophobic drugs. *Polymer*, 52(15), 3396-3404.
- Yazan, Y. (2002a). Emülsiyon sistemler. A.Z. Gürsoy (Ed), *Kontrollü salım sistemleri içinde* (s.133-150). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını.
- Yazan, Y. (2002b). Reoloji ve Kozmetolojideki Yeri, *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, 3(2), 115-128.
- Yazan, Y. (2012). Emülsiyon sistemler. A.Z. Gürsoy (Ed), *Farmasötik teknoloji temel konular ve dozaj şekilleri içinde* (s.273-288). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını.
- Yetkin, G., Çelebi, N. (2001). Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor) Alfa'nın Özellikleri, Kanser Hücreleri ve Ülser Yaraları Üzerindeki Etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 185-196.
- Zeng, Z., Zhou, G., Wang, X., Huang, E.Z., Zhan, X., Liu, J., Wang, S., Wang, A., Li, H., Pei, X., Xie, T. (2010). Preparation, characterization and relative bioavailability of oral elemene o/w microemulsion. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 567-572.
- http-1:** <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/metal-oxide-nanoparticles-part-2-nanotechnology>
(Erişim Tarihi: 01.07.2019)
- http-2:** <http://www.bristol.ac.uk/chemistry/research/eastoe/what-are-surfactants>
(Erişim Tarihi: 01.07.2019)

http-3: https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis#/media/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png

(Erişim Tarihi: 01.07.2019)

http-4: <https://examine.com/nutrition/is-semen-high-in-protein>

(Erişim Tarihi: 17.08.2019)

EK-1
BİLDİRİLER

GLOBAL SUMMIT ON NANOTECHNOLOGY AND MATERIAL SCIENCE

04-06 Aralık 2017

Birleşik Arap Emirlikleri / Dubai

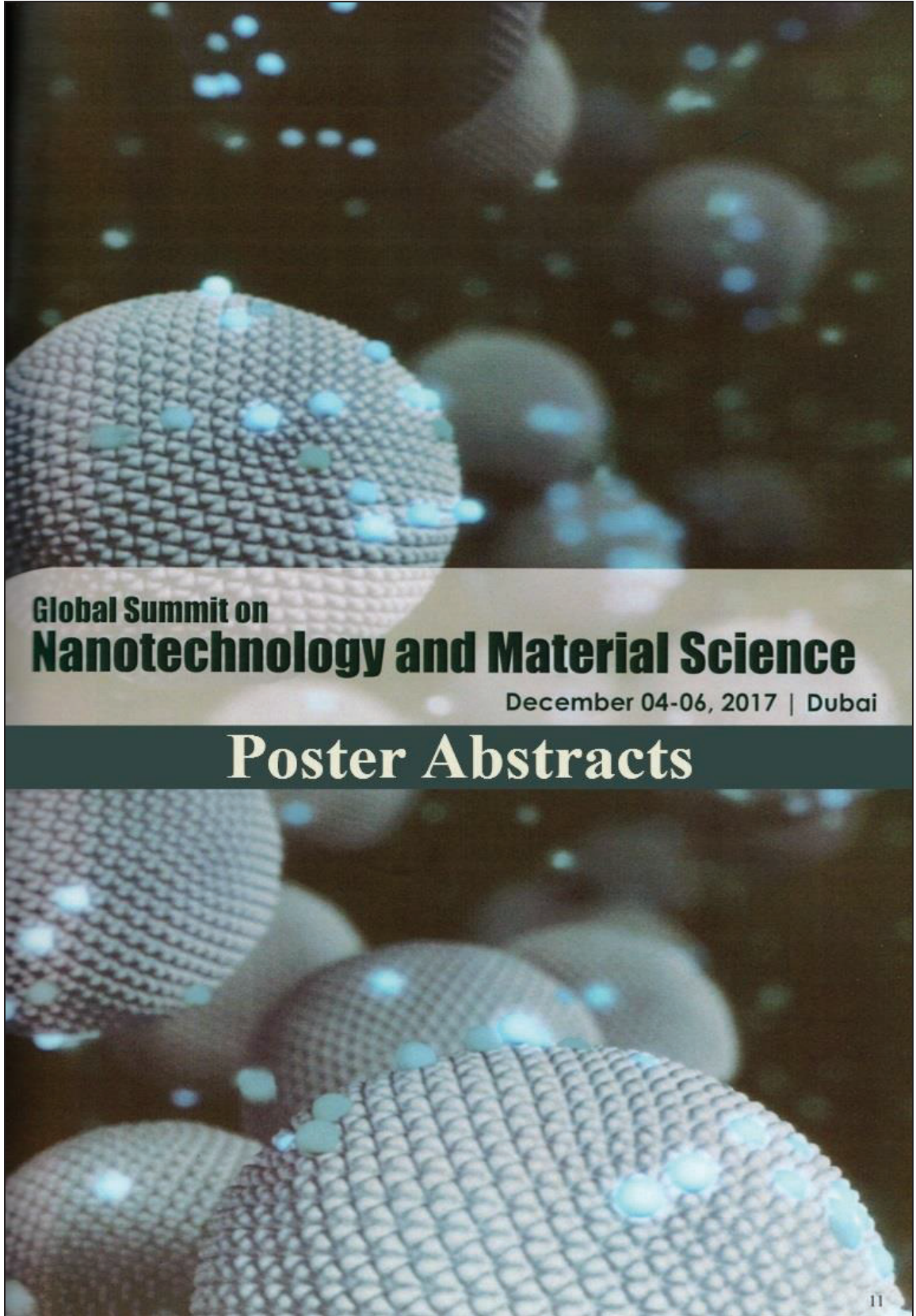
POSTER BİLDİRİ

DEMİRKİLİNÇ KC, BERKMAN MS, YAZAN Y

A New Microemulsion Formulation for Oil-Soluble Drugs

Bildiri Kitabı - Dış Kapak





Global Summit on Nanotechnology and Material Science

December 04-06, 2017 | Dubai

A New Microemulsion Formulation for Oil-Soluble Drugs

Kemal Can Demirkilinc¹, Murat Sami Beikman, Yasemin Yazan

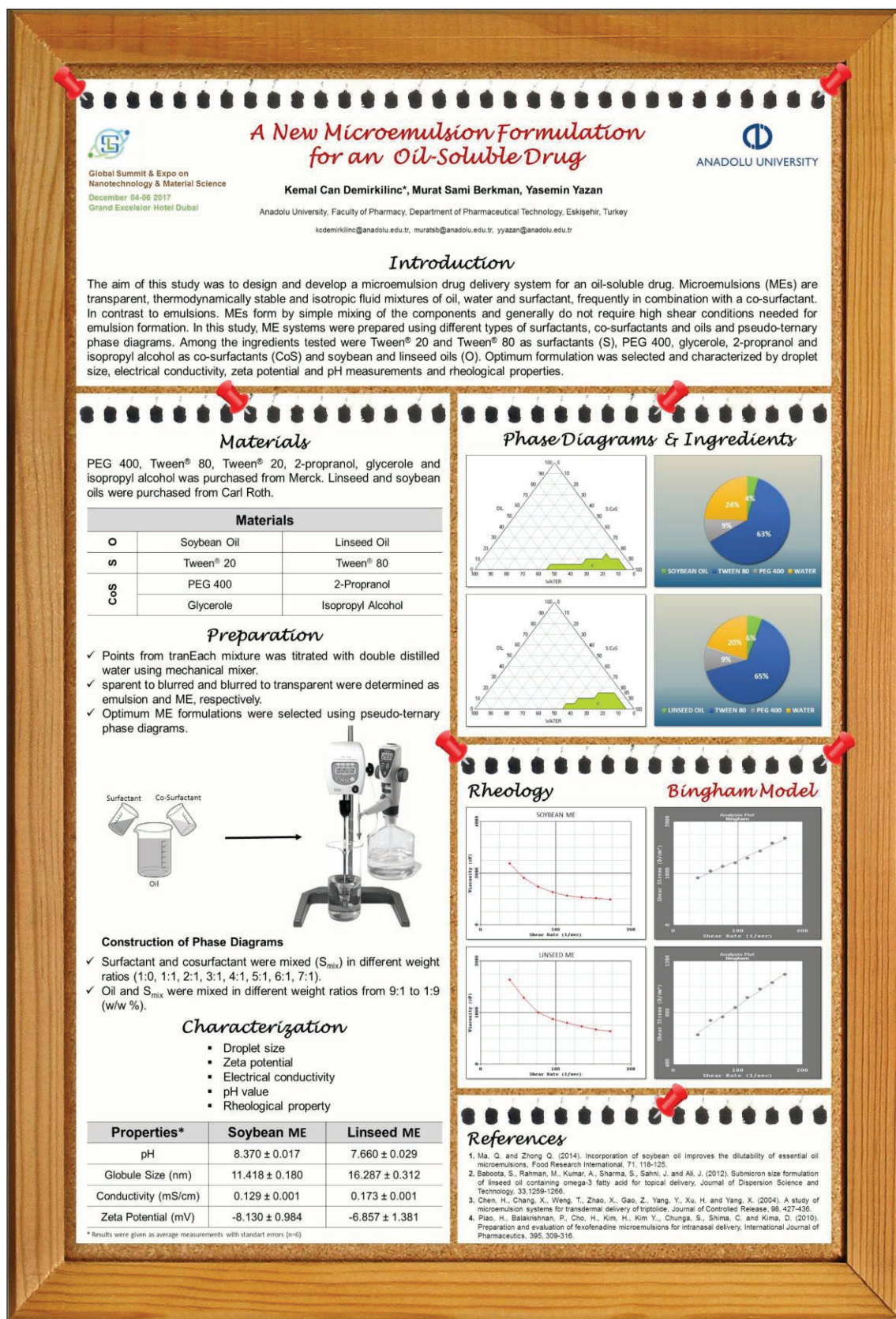
Anadolu University, Turkey

The aim of this study is to design and develop a microemulsion drug delivery system for oil-soluble drugs. Microemulsions are transparent, thermodynamically stable and isotropic fluid mixtures of oil, water and surfactant, frequently in combination with a cosurfactant. In contrast to emulsions, microemulsions form upon simple mixing of the components and generally do not require high shear conditions used for emulsions formation. In this study, microemulsion systems were prepared using different surfactant, co-surfactant and oil ingredients. Among the ingredients tested were Tween[®] 20 and Tween[®] 80 as surfactants, PEG 400, glycerole, 2-propanol and isopropyl alcohol as co-surfactants soybean and linseed oils. Microemulsions were prepared using pseudo-ternary phase diagrams. Optimum formulation was selected and characterized by droplet size, electrical conductivity, zeta potential and pH measurements.



Notes:

Poster Bildiri





EK-2

ETİK KURUL KARARI

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 14. 01. 2016
TOPLANTI SAYISI : 91
DOSYA KAYIT NUMARASI : 497
KARAR NUMARASI : 497
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Yrd.Doç.Dr. Murat Sami BERKMAN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof.Dr. Kevser EROL
Prof.Dr. Emine Yasemin YAZAN
Prof.Dr. Hikmet HASSA
Doç.Dr. Yunus AYDIN
Yrd.Doç.Dr. Melih VELİPAŞAOĞLU
Yrd.Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU
Yrd.Doç.Dr. İyimser ÜRE
Arş.Gör. Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL
Kemal Can DEMİRKİLİNCİ
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Sprague Dawley (48 adet dişi)

Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Murat Sami BERKMAN'nın araştırma yürütücüsü olduğu 497/2016 kayıt numaralı ve "TGF-β1 ve Ejakülat İçeren Yeni Emülsiyon Sistemlerin Hazırlanması ve Tekrarlayan Düşük ve Başarısız Tüp Bebek Tedavisinde Araştırılması" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)

Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd.Doç.Dr.Nurdağ KIRIMLIOĞLU (Üye)

Vet.Hek .Yrd.Doç.Dr.Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü 26480 Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)