

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

**RİVAROKSABAN NANOKRİSTALLERİNİN HAZIRLANMASI
VE İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Huriye DEMİR KABAŞ

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

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

**RİVAROKSABAN NANOKRİSTALLERİNİN HAZIRLANMASI
VE İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Huriye DEMİR KABAŞ

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Levent ÖNER**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Selma ŞAHİN**

**ANKARA
2018**

**RİVAROKSABAN NANOKRİSTALLERİNİN HAZIRLANMASI VE İN
VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Huriye Demir KABAŞ

Danışman: Prof. Dr. Levent ÖNER

İkinci Danışman: Prof. Dr. Selma ŞAHİN

Bu tez çalışması 27.04.2018 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. İmran VURAL
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Hakan EROĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN
(Gazi Üniversitesi)



Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

30 Nisan 2018



Prof. Dr. Diclehan ÖRHAN

Enstitü Müdürü 

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 27.04.2023 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

27/04/2018


Huriye DEMİR KABAŞ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Levent ÖNER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Uzm. Ecz. Huriye DEMİR KABAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca beni yönlendiren ve her aşamasında bilimsel bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgisi ve desteğiyle yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Levent ÖNER'e

Tez çalışmam süresince bilgisi, sabrı ile her zaman yanımda olan çalışmalarım beni cesaretlendiren ikinci danışmanım Prof. Dr. Selma ŞAHİN'e

Bilimsel katkılarından dolayı doktora tez izleme komitemdeki hocalarım Prof. Dr. İmran VURAL ve Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e

Çalışmalarım yardımcı olan Doç. Dr. Erol ŞENER, Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU Yrd. Doç. Dr. M.Hacer ÖZKAN ve Dr. Ecz. Tugba GÜLSÜN İNAL'a

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve destek veren Ecz. Naile ÖZTÜRK, Dr.Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI, ve Ecz. Nihan İZAT, başta olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarıma, elamanlarına ve arkadaşlarıma

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a (SBAG 113S200) ve H.Ü Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine (THD-2017-13071 ve 17137)

Doktora çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için gerekli izni her koşulda sağlayan Op. Dr. Alper DELİER, Özcan BULUT ve Hicabi UZUN'a

Son olarak tüm yaşamım boyunca olduğu gibi doktora tez çalışmam sırasında da daima yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen, bana inanan ve güvenen aileme ve bu tez çalışması sırasında kolum kanadım olan canım eşime, teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi kızım Ece Su ve doğacak olan oğlum Efe'ye ithaf ederim.

ÖZET

Demir Kabaş H., Rivaroksaban Nanokristallerinin Hazırlanması ve İn Vitro - İn Vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Doktora Programı, Ankara, 2018. Bu tez çalışmasında doğrudan etkili faktör Xa inhibitörü ve Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi Sınıf II bir ilaç olan Rivaroksabanın (RXB) düşük çözünürlüğüne bağlı yüksek dozlarında karşılaşılan doz orantısallığı sorunun çözülmesi amaçlanmıştır. RXB'nin çözünürlüğünü artırmak amacıyla nanokristal formülasyonları hazırlanmış ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Pluronic F 127 ve Pharmacoat 603 stabilizan olarak kullanılarak ultra turaks, bilyeli değirmen ve yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile nanosüspansiyonlar hazırlanmıştır. Nanokristal teknolojisi ile partikül büyüklüğü küçültülmüş, in vitro çözünmesi ve geçirgenlik katsayısı artırılmıştır. Kristal yapının varlığı ve rivaroksabanın kimyasal yapısının korunduğu tespit edilmiştir. En iyi partikül büyüklüğü dağılımı, in vitro çözünme profili ve geçirgenlik sonuçları elde edilen nanosüspansiyon formülasyonu tavşanlara 3 mg/kg, 10 mg/kg ve 15 mg/kg dozlarda oral gavaj ile uygulanmıştır. Plazma RXB düzeyleri LC/MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen eğri altında kalan alan ve maksimum plazma konstrasyonu parametreleri doz orantısallığı yönünden değerlendirilmiştir. Basit doğrusal regresyon, varyans analizi ve eşdeğerlik kriteri yöntemlerinden elde edilen sonuçlar 3 mg-15 mg ve 10 mg -15 mg dozları arasında doz orantısallığının sağlandığının gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoyararlanım, doz orantısallığı, LC/MS/MS, nanosüspansiyon, rivaroksaban.

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma TÜBİTAK (Proje numarası: 113S200) ve H.Ü Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (Proje numaraları: THD-2017-13071 ve 17137) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Demir Kabaş H., Preparation of Rivaroxaban Nanocrystals and In Vitro - In Vivo Assays, Hacettepe University Institute of Health Sciences, PhD Thesis in Biopharmaceutical and Pharmacokinetic, Ankara, 2018. The aim of this thesis is to solve the dose-proportionality problem encountered in high doses as a result of low solubility of rivaroxaban (RXB) which is a direct factor Xa inhibitor and a Biopharmaceutical Classification System Class II drug. To increase the solubility of RXB, its nanocrystal formulations were prepared and their physicochemical characterizations were examined. Pluronic F 127 and Pharmacoat 603 were used as the stabilizers to prepare nanosuspensions with a combination of ultra turrax, ball mill and high pressure homogenization methods. With nanocrystal technology, the particle size is reduced, the in vitro dissolution and permeability coefficient is increased. The presence of crystal structure and the chemical structure of RXB have been found to be preserved. The nanosuspension formulation with the best particle size distribution, in vitro dissolution profile and permeability results was applied by oral gavage to rabbits at doses of 3 mg / kg, 10 mg / kg and 15 mg / kg. Plasma RXB levels were determined by LC / MS / MS method. The area under the curve and the maximum plasma concentration parameters were evaluated in terms of dose proportionality. The results obtained from simple linear regression, analysis of variance and equivalence criterion methods showed that dose proportionality between 3 mg-15 mg and 10 mg -15 mg doses were achieved.

Key words: Bioavailability, dose proportionality, LC-MS/MS, nanosuspension rivaroxaban,

Supporting Institutions: This work was supported by TÜBİTAK (Project number: 113S200) and HU Scientific Research Coordination Unit (Project numbers: THD-2017-13071 and 17137).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Venöz Tromboembolizm Tedavisi	5
2.2. İlaçlarda Biyoyararlanım Çalışmaları ve Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler	8
2.3. Nanokristal Teknolojisi	13
2.3.1. Nanokristal Hazırlama Yöntemleri	14
2.3.2. Nanosüspansiyonların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitesi	25
2.3.3. Nanosüspansiyonların Katı Şekle (Nanokristal) Dönüştürülmesi	27
2.3.4. Nanokristal Formülasyonlarının Uygulama Yolları	29
2.3.5. Nanokristal Formülasyonlarının İn Vivo Performansı	34
2.4. İlaçların Membranlardan Geçiş Mekanizmaları	37
2.4.1. GİS’de İlaç Absorpsiyonu	38
2.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	39
2.5. Çalışmada Kullanılan Etkin Madde RXB’ye Ait Bilgiler	42
2.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri	43
2.5.2. Miktar Tayini	45
2.5.3. Stabilite	46
2.5.4. Farmakolojik Özellikleri	47
2.6. Farmakokinetik Sonuçların Doz Orantısallığının Değerlendirilmesi	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59

3.1. Gereçler	59
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	59
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	61
3.2. Yöntemler	63
3.2.1. RXB ve Nanokristal Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	63
3.2.2. RXB ve Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünmenin Tayini	64
3.2.3. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	65
3.2.4. Stabilité Çalışmaları	65
3.2.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Stabilizanların Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışmalar	66
3.2.6. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonu Hazırlanması ve Karakterizasyonu	76
3.2.7. RXB'nin HPLC ile ACN: Su (80:20, h:h) ve % 0,4 SDS İçeren pH 4,5 Fosfat Tamponu İçindeki İn Vitro Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	77
3.2.8. HBSS içinde RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirme ve Validasyonu	81
3.2.9. Tavşan Plazmasında RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu	84
3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	87
3.2.11. İn Vivo Biyoyararlanım Çalışması	89
3.2.12. İstatistiksel Analiz	92
4.BULGULAR	94
4.1. RXB'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	94
4.1.1. UV Spektrumu	94
4.1.2. IR Spektrumu	94
4.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi	96
4.1.4. X-Işını Kırınımı Analizi	96
4.1.5. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	96
4.1.6. Çözünürlük Tayini	97
4.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü Tayini	98
4.3. RXB'nin Stabilité Çalışmaları	98

4.4. RXB'nin HPLC ile ACN: Su (80:20, h:h) ve % 0,4 SDS İçeren pH 4,5 Fosfat Tamponu İçindeki Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	102
4.4.1. Özgüllük	103
4.4.2. Doğrusallık	104
4.4.3. Doğruluk	105
4.4.4. Kesinlik	107
4.4.5. Duyarlılık	109
4.4.6. Stabilité	109
4.4.7. Sağlamlık	109
4.5. HBSS'de RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini ve Kromotografik Koşulların Belirlenmesi	110
4.5.1. Özgüllük	115
4.5.2. Doğrusallık	118
4.5.3. Doğruluk	119
4.5.4. Kesinlik	119
4.5.5. Kararlılık	121
4.5.6. Sistem Uygunluk Testleri	122
4.6. Tavşan plazmasından RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirme ve Validasyonu	122
4.6.1. Doğrusallık	123
4.6.2. Doğruluk	124
4.6.3. Kesinlik	124
4.6.4. Özgüllük	126
4.6.5. Duyarlılık	127
4.7. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Stabilizanların Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışma Sonuçları	128
4.7.1. Farklı Stabilizanlar Kullanılarak ve Tek Yöntem İle Hazırlanan Formülasyona İlişkin Sonuçlar	128
4.7.2. Çöktürme Yöntemi İle Hazırlanan Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar	129
4.7.3. İki Farklı Stabilizan Kullanılarak BD Yöntemi İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar	130
4.7.4. Birden Fazla Nanokristal Hazırlama Yönteminin Kombinasyonu İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar	131

4.7.5. RXB'nin Partikül Büyüklüğü Dağılımında Meydana Gelen Değişim Üzerine Yöntem ve Stabilizan Etkisi	136
4.7.6. Partikül Büyüklüğü Dağılımına BD Öğütme Süresinin Etkisinin İncelenmesi	138
4.7.7. Partikül Büyüklüğü Dağılımına YH'de Yapılan Döngü Sayısının Etkisinin İncelenmesi	139
4.7.8. Mannitol İlavesinin Partikül Büyüklüğüne Etkisinin İncelenmesi	142
4.8. Nanokristal Ön Formülasyonlara Ait Karakterizasyon Sonuçları	142
4.9. Nanokristal Ön Formülasyonların İn vitro Çözünme Sonuçları	146
4.10. Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü Analizi	149
4.11. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Karakterizasyonu	153
4.11.1. DSC Analizi	153
4.11.2. X-Işını Kırınımı Analizi	156
4.11.3. IR Spektrumu	159
4.11.4. SEM Analizi	161
4.11.5. Çözünürlük Tayini	162
4.12. Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünme Testleri	162
4.13. RXB Nanokristal Formülasyonlarının Stabilite Çalışması	164
4.14. Hücre Kültürü Çalışmaları	167
4.14.1. Caco-2 Tek Tabaka Hücre Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	167
4.14.2. Geçirgenlik Çalışmaları Sonuçları	167
4.15. İn Vivo Oral Uygulamada Kullanılan Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Sonuçları	168
4.16. İn Vivo Miktar Tayini Sonuçları	169
4.17. Nanokristal Formülasyonlarının Oral Uygulanmasından Sonra Elde Edilen Farmakokinetik Bulgular	169
4.17. Doz Orantısallığı Sonuçları	181
5.TARTIŞMA	189
5.1. RXB'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	190
5.2. RXB Stabilite Çalışmaları	192
5.3. RXB'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu	193
5.4. Farklı Stabilizanlar Kullanılarak ve Tek Yöntem İle Hazırlanan Formülasyona İlişkin Sonuçlar	197

5.5. Çöktürme Yöntemi İle Hazırlanan Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar	198
5.6. İki Farklı Stabilizan Kullanılarak Bilyeli Değirmen Yöntemi İle Hazırlanan	199
5.7. Birden Fazla Nanokristal Hazırlama Yönteminin Kombinasyonu İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar	199
5.8. RXB'nin Partikül Büyüklüğü Dağılımına Yöntem ve Stabilizan Etkisi	201
5.9. Partikül Büyüklüğü Dağılımına Bilyeli Değirmende Öğütme Süresinin ve Homojenizasyon Döngü Sayısının Etkisinin İncelenmesi	203
5.10. Mannitol İlavesinin Partikül Büyüklüğüne Etkisinin incelenmesi	204
5.11. Nanokristal Ön Formülasyonlara İlişkin Karakterizasyon Sonuçları	204
5.12. Nanokristal Ön Formülasyonlara İn Vitro Çözünme Sonuçları	204
5.13. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Formülasyonların Hazırlanması	205
5.14. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Karakterizasyonu	207
5.15. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Çözünürlük Tayini	210
5.16. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünme Testleri	211
5.17. Hücre Kültürü Çalışmaları	214
5.18. İn Vivo Çalışmada kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması	216
5.19. İn Vivo Çalışmalardaki Kullanılan Formülasyondaki RXB Miktar Tayini	217
5.20. Tavşanlarda İn Vivo Çalışmalar	218
5.21. İn Vivo Çalışmadan Elde Edilen Farmakokinetik Verilerin Değerlendirilmesi	219
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	225
7. KAYNAKLAR	227
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
ANOVA	Varyansların analizi
AKS	Akut koroner sendrom
BCRP	Meme kanseri rezistans protein
BÇ	Birlikte çöktürme
BD	Bilyeli değirmen
BSS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
CL/F	Görünür klerens
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CYP450	Sitokrom P450 izoenzim
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetrik Analizi
DVT	Derin ven trombozu
EAA	Eğri altında kalan alan
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
F 68	Pluronic F 68
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
HBSS	Hanks Dengeli Tuz Çözeltisi
HEPES	Hidroksietil-piperazinetan-sülfonik asit tampon
HPC	Hidroksipropil selüloz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksipropil metilselüloz
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı
IC₅₀	İnhibitor konsantrasyonu
GIS	Gastro intestinal system

LC/MS/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografi - tandem kütle spektrometrisi
LD₅₀	Letal doz
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Miktar tayini sınırı
MC	Metil selüloz
MDR	Çoklu ilaç rezistansı
MEAA	Moment eğrisi altında kalan alan
MN	Mannitol
MRM	Çoklu reaksiyon izleme, (Multiple reaction monitoring)
MRT	Ortalama kalış süresi
MRP	Çoklu ilaç rezistans ilişkili protein
OBH	Ortalama bağıl hata
P127	Pluronic F 127
P 603	Pharmacoat 603
P 75	Pluronic P 75
P 188	Poloxamer 188
PB	Partikül büyüklüğü
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDI	Polidispersite indeksi
PE	Pulmoner emboli
PEG	Polietilen glikol
P-gp	P glikoprotein
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
RH	Bağıl nem
RP-HPLC	Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-UPLC	Ters fazlı ultra performanslı sıvı kromatografisi
RXB	Rivaroksaban
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
SIM	Tek iyon izleme (Single iyon monitoring)

SH	Standart hata
SRM	Seçici reaksiyon izleme, (Selectif reaction monitoring)
SS	Standart sapma
TEER	Transepitelyal elektrik direnci
t_{lag}	Gecikme süresi
t_{maks}	Maksimum konsantrasyona erişme zamanı
t_½	Terminal yarılanma ömrü
TPGS	D-alfa-tokoferil-polietilen glikol 1000 süksinat
UP	Ultrasonik prob
UT	Ultra turaks
Vd	Dağılım hacmi
VK	Varyasyon katsayısı
VKA	Vitamin K antagonisti
VKOR	Vitamin K epoksid redüktaz enzim
VTE	Venöz tromboembolizm
YH	Yüksek basınçlı homojenizasyon
ZP	Zeta potansiyel

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Oral yol ile uygulanan katı dozaj şeklinden etkin maddenin absorpsiyon süreci.	9
2.2.	Stabilizanların partikül küçülmesindeki (1) etki mekanizması; Sterik stabilizasyon (2), elektrostatik stabilizasyon (3).	25
2.3.	RXB'nin kimyasal yapısı.	44
2.4.	Doz orantısallığı (a) ve doz doğrusallığı (b) durumunda konsantrasyon (C) ve doz arasındaki ilişki $\alpha > 0$.	52
4.1.	RXB'nin ACN:su (80:20, h:h) içindeki çözeltisine ait UV spektrumu.	94
4.2.	RXB'a ait IR spektrumu.	95
4.3.	RXB'a ait DSC Termogramı.	96
4.4.	RXB'a ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	96
4.5.	RXB'nin başlangıç (t=0), ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve % 60 ± 5 bağıl nem ortamında 6 ay sonundaki SEM görüntüleri (x250, x500, x1000).	97
4.6.	RXB'nin partikül büyüklüğü dağılımı.	98
4.7.	RXB'nin liyofilizasyon sonrası X-ışını kırınımı difraktogramı.	99
4.8.	RXB'nin $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve % 60 ± 5 bağıl nem ortamında 6. ay sonundaki X-ışını kırınımı difraktogramı.	100
4.9.	RXB'nin $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ve % 60 ± 5 bağıl nem ortamında 6. ay sonundaki IR spektrumu.	101
4.10.	RXB'nin başlangıç ve $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, % 60 ± 5 bağıl nem ortamında pH 4,5 asetat tamponu+% 0,4 SDS ortamındaki in vitro çözünme profilleri.	102
4.11.	SDS içeren (% 0,4 a/h) pH 4,5 asetat tamponuna formülasyon çalışmalarında kullanılan stabilizanların (P 603, P 127) % 0,4 (a:h) konsantrasyondaki çözeltisinin eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı.	103
4.12.	ACN:su (80:20, h:h) çözücü sisteminde $80 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan RXB'nin enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı.	103
4.13.	SDS içeren (% 0,4 a/h) pH 4,5 asetat tamponuna RXB ($80 \mu\text{g/mL}$) ilave edildikten sonra elde edilen HPLC kromatogramı.	104
4.14.	RXB'nin % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponundaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	104
4.15.	RXB'nin ACN:Su (80:20, h:h) çözücü ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	105

4.16.	Pozitif ESI altında RXB iyonlarının kütle spektrumu (437 m/z).	110
4.17.	RXB'nin pozitif ESI'da % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışımli hareketli fazdaki kromatogramı.	111
4.18.	RXB'nin 437 m/z için 176 V fregman voltajında SIM kromotogramı.	111
4.19.	RXB'nin 176 V freg voltajı ile kütle spektrumu.	112
4.20.	RXB'nin 40 enerjide kütle spektrumu.	112
4.21.	RXB'nin negatif ESI modunda % 0,1 formik asit su ve % 0,1 formik asit ACN karışımli hareketli fazdaki kütle spektrumu.	113
4.22.	RXB'nin negatif ESI'da % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışımli hareketli fazdaki kromatogramı.	113
4.23.	RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.	114
4.24.	RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kütle spektrumu.	115
4.25.	RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.	116
4.26.	RXB'nin 144,7 m/z ve 231 m/z 'de kütle spektrumu.	116
4.27.	ACN'in +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.	117
4.28.	ACN'e ait 144,7 m/z ve 231 m/z 'de kütle spektrumu.	117
4.29.	RXB'nin 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su asetonitril karışımı hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu.	118
4.30.	RXB'nin tavşan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu.	123
4.31.	Metanol içindeki boş plazmaya ait kromatogram.	126
4.32.	ACN içindeki boş plazmaya ait kromatogram.	127
4.33.	ACN içindeki 1000 ng/mL konsantrasyondaki RXB'ye ait kromatogram.	127
4.34.	Metanol içindeki 1000 ng/mL konsantrasyondaki RXB'ye ait kromatogram.	127
4.35.	BD'de farklı stabilizanlar ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarının liyofilizasyon öncesi ve sonrası ortalama partikül büyüklükleri.	129
4.36.	RXB, liyofilize RXB, BD ile hazırlanmış formülasyona ilişkin X-ışını kırınımı difraktogramları.	137
4.37.	RXB nanosüspansiyonlarının farklı öğütme sürelerine bağlı partikül büyüklüğü dağılımı ve PDI'leri.	139

4.38.	YH'de yapılan döngü sayısının partikül büyüklüğü ve PDI üzerine etkisi-F1.	140
4.39.	YH'de yapılan döngü sayısının partikül büyüklüğü ve PDI üzerine etkisi-F2	141
4.40.	6-UT+BD formülasyonunun SEM görüntüsü	143
4.41.	1-UT+YH+BD formülasyonunun SEM görüntüsü	143
4.42.	3-UT+BD+YH formülasyonunun SEM görüntüsü.	143
4.43.	6-UT+BD, 3-UT+BD+YH, 1-UT+YH+BD, formülasyonlarının DSC termogramları.	144
4.44.	6-UT+BD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	145
4.45.	3-UT+BD+YH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı	145
4.46.	1-UT+BD+YH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı	146
4.47.	Nanokristal ön formülasyonların in vitro çözünme profilleri.	146
4.48.	6-UT+BD yöntemi ile hazırlanan formülasyonun liyofilizasyon öncesi (nanosüspansiyon) ve sonrası (nanokristal) in vitro çözünme profili.	147
4.49.	UT, BD, YH kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri.	151
4.50.	UT, BD, YH kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonların liyofilizasyon sonrası büyüklüğü dağılımı grafikleri.	152
4.51.	0811AUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı.	153
4.52.	0811BUTYHBD formülasyonunun DSC termogramı.	153
4.53.	0911CUTYHBD formülasyonunun DSC termogramı	154
4.54.	0911DUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı	154
4.55.	2412AUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı	155
4.56.	2412BUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı	155
4.57.	Formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin DSC termogramı	156
4.58.	RXB'nin X- ışını kırınımı difraktogramı.	156
4.59.	0811AUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	156
4.60.	0811BUTYHBD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	157
4.61.	0911CUTYHBD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	157
4.62.	0911DUTBDYH formülasyonunun X- ışını kırınımı difraktogramı.	157
4.63.	2412AUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	158
4.64.	2412BUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.	158

4.65.	Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelere ait X-ışını kırınımı difraktogramları.	159
4.66.	RXB ve 0811AUTBDYH, 0811BUTYHBD, 0911CUTYHBD, 0911DUTBDYH, 2412AUTBDYH, 2412BUTBDYH formülasyonlarının IR spektrumları.	160
4.67.	Nanokristal formülasyonlarının SEM görüntüleri.	161
4.68.	RXB'nin ve nanokristal formülasyonlarının % 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponunda in vitro çözünme profilleri	163
4.69.	40°C ve % 75 bağıl nem ortamında 1 ay ve 6 ay süreyle bekletilen formülasyonların t=0 zamanındaki çözünme profilleriyle karşılaştırılması.	166
4.70.	3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri.	177
4.71.	10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri	178
4.72.	15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri	179
4.73.	Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası ortalama plazma konsantrasyon - zaman profilleri	180
4.74.	Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası ortalama yarı logaritmik plazma konsantrasyon - zaman profilleri	180
4.75.	Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası doza göre normalize edilmiş plazma konsantrasyon - zaman profilleri	181
4.76.	3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen C_{maks} değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)	182
4.77.	3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen EAA_{0-t} değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)	182
4.78.	3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen $EAA_{0-\infty}$ değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)	183

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Yeni oral antikoagülanların VKA olan varfarin ile karşılaştırılması.	7
2.2. Mide bağırsak sisteminde ilacın çözünmesine etki eden fizikokimyasal ve fizyolojik etkenler ve in vitro yansımaları.	12
2.3. Nanokristal hazırlamada kullanılan yöntemler.	15
2.4. Nanokristal Teknolojisi ile üretilmiş FDA tarafından onaylanmış piyasadaki ilaçlar.	23
2.5. Nanokristal teknolojisini üretim yöntemlerinin üstünlükleri ve sakıncaları	24
2.6. 2002-2006 yılları arası doz orantısallığının değerlendirildiği literatür sayıları.	57
3.1. Nanokristal hazırlamada kullanılan yöntem kombinasyonları.	71
3.2. Plazmadan RXB tayini yöntemine ilişkin mobil faza ait akış gradiyenti.	85
3.3. Deney hayvanları olarak kullanılan tavşanların ağırlık değişim tablosu.	90
3.4. Tavşanlara uygulanan formülasyonlar.	91
4.1. RXB'nin farklı ortamlarda çözünürlük değerleri.	98
4.2. RXB'nin $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $60 \pm 5\%$ bağıl nem ortamında 12 ay sonundaki partikül büyüklüğü.	99
4.3. RXB'nin çözünme profilleri için tayin edilen f_2 benzerlik faktörü değerleri.	102
4.4. RXB'ye ait doğrusallık bulguları.	105
4.5. RXB'nin ACN:Su (80:20,h:h) içindeki doğruluk sonuçları.	106
4.6. RXB'nin % 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponundaki doğruluk sonuçları.	106
4.7. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait tekrar edilebilirlik sonuçları.	107
4.8. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait ara kesinlik sonuçları.	108
4.9. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait tekrar elde edilebilirlik sonuçları.	108
4.10. RXB'nin analiz süresince stabilite sonuçları.	109
4.11. RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait doğrusallık bulguları.	118
4.12. RXB'nin LC/MS/MS 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren Su:ACN (80:20,h:h) içindeki doğruluk sonuçları.	119

4.13.	RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait tekrar edilebilirlik sonuçları.	120
4.14.	RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait ara kesinlik sonuçları.	120
4.15.	RXB'nin LC/MS/MS tayini yöntemine ait tekrar elde edilebilirlik sonuçları.	121
4.16.	RXB'nin LC/MS/MS ile miktar tayininde analiz süresince stabilite sonuçları.	121
4.17.	RXB'nin LC/MS/MS ile miktar tayininde sistem uygunluk parametreleri.	122
4.18.	RXB ve iç standartın iyonlaşma ürünlerine ilişkin bilgiler.	122
4.19.	RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait doğrusalılık bulguları.	123
4.20.	RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait doğruluk bulguları.	124
4.21.	RXB'nin plazmadan LC/MS-MS yöntemiyle tayinine ilişkin tekrar edilebilirlik bulguları	125
4.22.	RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait ara kesinlik bulguları.	126
4.23.	SDS, P 127 ve HPMC ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin parametreler ve ortalama partikül büyüklüğü değerleri	128
4.24.	Bilyeli değirmen ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ait parametreler ve ortalama partikül büyüklüğü değerleri.	129
4.25.	BÇ yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.	130
4.26.	BÇ yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları	130
4.27.	İki farklı stabilizan ve BD yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.	130
4.28.	BD yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları.	131
4.29.	İki hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.	132
4.30.	İki hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları	133
4.31.	Üç nanokristal hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.	135

4.32.	Üç farklı nanokristal hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri.	135
4.33.	RXB'nin partikül büyüklüğüne yöntem ve stabilizan etkisi.	137
4.34.	RXB nanosüspansiyonlarının farklı öğütme sürelerine bağlı olarak elde edilen ortalama PB, PDI ve ZP değerleri.	138
4.35.	YH'de yapılan döngü sayısının PB, PDI ve ZP değerleri üzerine etkisi- F1.	140
4.36.	YH'de yapılan döngü sayısının PB, PDI ve ZP değerleri üzerine etkisi -F2.	141
4.37.	Kriyoprotektan olarak MN ilavesinin partikül büyüklüğüne etkisi.	142
4.38.	Nanokristal formülasyonlarından % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponundaki % çözünen RXB değerleri ve f_2 benzerlik faktörleri.	148
4.39.	Farklı yöntemlerin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonları.	149
4.40.	RXB nanokristal formülasyonlarına ilişkin PB, PDI ve ZP değerleri.	150
4.41.	RXB nanokristal formülasyonlarının farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri.	162
4.42.	RXB'nin ve RXB nanokristal formülasyonlarının in vitro çözünme testi sonuçları.	163
4.43.	RXB nanokristal formülasyonlarının stabilite çalışması sonuçları	164
4.44.	40°C ve % 75 bağıl nem ortamında 1 ay ve 6 ay süreyle bekletilen formülasyonların t=0 zamanındaki f_2 benzerlik faktörleri.	167
4.45.	Toz RXB ve RXB nanokristal formülasyonlarına ait geçirgenlik katsayıları.	168
4.46.	Nanokristal formülasyonlarının PB, PDI ve ZP'lerine ilişkin değişim tablosu.	168
4.47.	Uygulama öncesi nanosüspansiyonlardaki mL'deki RXB miktarları.	169
4.48.	3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri.	170
4.49.	10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri.	171
4.50.	15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri	172
4.51.	3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.	173

4.52.	10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.	174
4.53.	15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.	175
4.54.	RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen ortalama farmakokinetik değerler.	176
4.55.	RXB'nin doz orantısallığının güç modeli ile değerlendirilmesi.	183
4.56.	RXB'nin doz normalize edilmiş doğal logaritması alınmış farmakokinetik verilerine ait varyans analizi özeti.	184
4.57.	C_{maks} için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.	185
4.58.	EAA_{0-t} için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.	186
4.59.	$EAA_{0-\infty}$ için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.	187
4.60.	Doz normalize edilmiş ve logaritma dönüştürülmüş farmakokinetik verilere ilişkin basit doğrusal regresyon analizi sonuçları.	188
4.61.	Doz normalize edilmiş ve doğal logaritması alınmış farmakokinetik verilere ilişkin % 90 güven aralığı sonuçları.	188

1. GİRİŞ

Venöz tromboembolizm (VTE); derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) gibi hastalıkları tanımlayan, yeni taburcu olmuş veya hastanede yatmakta olan hastalarda genellikle morbitide ve mortaliteye neden olan bir durumdur (1, 2). Epidemiyolojik model çalışmasında Avrupa’da yılda her 100.000 kişiden 148’inde DVT ve her 100.000 kişiden 95’inde PE görüldüğü tahmin edilmektedir (3). Semptomatik VTE’li hastalarda, özellikle bir anda VTE görülen hastalarda yıllarca VTE tekrarlama (ölümcül olmayan ve ölümcül PE dahil) riski devam eder (4). Bunun yanında uzun dönemde PE sonrası kronik pulmoner hipertansiyon ve DVT sonrası post-trombotik sendrom gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (2). Bu nedenle VTE, tedavisi mutlaka yapılması gereken bir rahatsızlıktır. Tedavinin amacı pıhtının yayılımını durdurmak ve yeniden pıhtının tekrarlamasını önlemektir (5). Hem akut DVT için hem de PE için medikal tedavinin temel taşı antikoagülasyondur (2). Antikoagülan tedavi amacıyla heparin, vitamin K antagonistleri (VKA), faktör Xa inhibitörleri, doğrudan trombin inhibitörleri ve trombolitikler kullanılmaktadır (6, 7). Doğrudan etkili faktör Xa inhibitörlerinden başka tromboembolik hastalıkların tedavisinde oral olarak kullanılan diğer VKA’lerinin, etkilerinin yavaş başlaması ve yavaş durması, ilaç etkileşimlerinin çok olması, dar terapötik indeksli ilaçlar olmaları ve izleme gerekliliklerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. Ayrıca birçok ilaç ve besin ile etkileşime girmektedirler. Bu nedenle farmakodinamik ve farmakokinetik profili tahmin edilebilir iyi oral biyoyararlanıma sahip faktör Xa inhibitörleri üzerine yoğunlaşmıştır (8). Kalça ve diz protezi ameliyatları sonrası DVT ve PE profilaksisi gibi tromboembolik hastalıkların uzun süreli önlenmesinde kullanılmak üzere yeni oral antikoagülanlar (ör. rivaroksaban, dabigatran, apiksaban) geliştirilmiştir (9, 10). VKA’ların aksine, yeni oral antikoagülan ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik profilleri doğrudan tahmin edilebilir, daha düşük potansiyelde ilaç-ilaç etkileşimi gözlenir, sabit dozda verilip koagülasyon izlemesine gerek yoktur ve etkileri daha hızlıdır.

Bu ilaçlardan biri olan rivaroksaban (RXB) yüksek seçicilikte doğrudan faktör Xa inhibitörü bir ilaçtır (11). RXB, DVT ve aynı patolojik sürecin farklı bir şekli olan PE tedavisi ve önlenmesi ile VTE tekrarını önlemek için oral olarak uygulanan bir ilaçtır. RXB Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da çeşitli tromboembolik endikasyonlarda kullanımı için onaylanmıştır. Yetişkin hastalarda kalça veya diz protezi ameliyatlarında VTE'nin önlenmesi, bir veya daha fazla riskli valvüler olmayan atriyal fibrilasyonlu hastalarda iskemi ve sistemik emboliden korunmak için kullanılmaktadır. Ayrıca Avrupa'da aspirin ve/veya klopidoğrel veya tiklopin gibi tienopiridinler ile kombine olarak kardiyak biyolojik belirteçleri yükselmiş akut koroner sendrom sonrası aterotrombotik olayların önlenmesinde ikincil olarak kullanılmaktadır (12, 13). RXB'nin farmakokinetik bulguları incelendiğinde 1 mg intravenöz infüzyon çözeltisi ile 5 mg tablet ve 20 mg tablet ile yapılmış çalışmalarda sırasıyla 5 mg tablette absorpsiyon (f_{abs}) tamamlanmış (% 100), 20 mg tablette ise f_{abs} % 66 olarak bulunmuştur. Yüksek dozda ise doz orantısallığından daha düşük eğri altında kalan alan (EAA) artışı ve maksimum konsantrasyon (C_{maks}) artışı olduğu görülmüştür. Çözünürlüğe bağlı sınırlı absorpsiyon sebebiyle yarılanma ömründe de artış gözlenmektedir. Bu bulgular flip-flop kinetiği olabileceğine de işaret etmektedir (10). Yüksek dozlardaki doz orantısallığının sağlanamamasının nedeni düşük çözünürlüğe bağlı düşük absorpsiyondur. 20 mg dozda yiyecek etkisinin incelendiği çalışmalarda ise EAA % 39 ve C_{maks} % 76 oranında artmıştır. Bu durum açlık koşullarında ilacın biyoyararlanımında hız kısıtlayıcı basamak olan çözünme hızının düşük olmasına bağlanmaktadır. Yiyecek etkisinin karşılaştırıldığı randomize çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre [$EAA_{10\text{ mg}}$ (0,93-1,05, %90 güven aralığı (CI)), $EAA_{20\text{ mg}}$ (1,29-1,49, %90 CI)] 10 mg dozda yiyecek etkisi olmadığı ancak 20 mg dozda yiyecek etkisinin olduğu görülmektedir (10, 14). RXB etkin maddesi Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BSS) göre düşük çözünürlüğe ve yüksek geçirgenliğe sahip sınıf II bir ilaçtır. Farmasötik ilaç geliştirme alanındaki en önemli sorun, geliştirilen birçok ilaç etkin maddesinin RXB gibi düşük çözünürlüğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Düşük çözünürlükteki ilaçların çözünürlük problemleri çözünme hızında dolayısı ile biyoyararlanımda hız kısıtlayıcı bir etken olarak ortaya çıkmaktadır. Düşük çözünürlük ve çözünme hızına bağlı olarak düşük biyoyararlanım, açlık/tokluk koşullarındaki varyasyonlarda artış, gecikmiş etki, doz

orantısallığının sağlanamaması gibi sorunları beraberinde getirmektedir. İlacın absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamaklardan biri de ilacın çözünmesi olduğundan ilacın çözünürlüğü ve çözünmesi ilaç etkinliği için önemli bir noktayı oluşturmaktadır (15). Çözünürlük ve çözünme sorunu formülasyon tasarımı ve klinik testlerin yanında farmakolojik aktivite için de oldukça önemlidir, bu durum etkin maddelerde düşük ve değişken biyoyararlanım sorunları ile karşımıza çıkmaktadır (16-18). RXB gibi düşük çözünürlükteki etkin maddeler ile hazırlanan formülasyonların da performansları düzensiz ve değişkendir. Bu nedenle RXB formülasyonlarında da yukarıda bahsedilen düşük çözünürlüğe bağlı biyoyararlanım problemleri ortaya çıkmaktadır (14, 19). Son yıllarda, yeni geliştirilen düşük çözünürlükteki RXB gibi etkin maddelerin performansını artırmak üzere birçok yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Çözünmeye etki eden etkenler arasında etkin maddeye ait partikül büyüklüğü, tuz şekli, polimorfizm, solvatlar gibi fizikokimyasal parametreler sayılabilir. İlaçların çözünürlüğünü artırmada partikül büyüklüğünün küçültme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de nanokristal veya nanokristallerin süspande edilmesi ile oluşturulan nanosüspansiyon formülasyonları geliştirilmesidir. Nanokristal formülasyonları ile çözünmeye bağlı olarak yüksek dozlarda azalan biyoyararlanımda artış sağlanarak doz orantısallığı sağlanabilir, açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasındaki değişkenlik azaltılabilir (20-23). Literatürde Jinno ve ark. (24)'nin hazırladığı silostazol nanokristal formülasyonu kullanıldığında çözünme artırılarak yiyecek etkisi ortadan kaldırılmıştır. Bu çalışmada RXB etkin maddesinin yüksek dozlarda biyoyararlanım sorununu çözmek için öncelikle nanokristal formülasyonları hazırlanarak in vitro çözünürlük testleri yapılmıştır. Daha sonra RXB'nin nanokristal teknolojisi ile hazırlanan en iyi in vitro performansa sahip formülasyonu ile tavşanlarda in vivo biyoyararlanım çalışmasının yapılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada RXB nanokristal formülasyonunun in vivo biyoyararlanımında artış olup olmadığının, yüksek dozlarda doz orantısallığının sağlanıp sağlanmadığının gösterilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca RXB'nin yüksek dozlarında da açlık koşullarındaki biyoyararlanımın artması ve böylece yiyecek etkisinin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda aşağıda yer alan çalışmalar yapılmıştır.

- RXB etkin maddesinin çözünme hızını artırmak amacıyla nanokristal formülasyonlarının hazırlanması,
- RXB'nin fizikokimyasal karakterizasyonu,
- İn vitro çözünme ortamlarından elde edilen örneklerin miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve validasyonu,
- Nanokristal hazırlanmasında kullanılacak yöntem ve stabilizanların belirlenmesi için ön denemeler,
- Belirlenen yöntem ve stabilizanlar ile nanokristal formülasyonları hazırlanması ve fizikokimyasal karakterizasyonları,
- Etkin maddenin ve formülasyonların in vitro çözünme ve çözünürlük deneyleri,
- Etkin maddenin ve nanokristal formülasyonlarının kararlılık çalışmaları,
- Hücre kültürü ortamlarından elde edilen örneklerin miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve validasyonu,
- Caco-2 hücre kültür ortamında geçirgenlik (permeabilite) çalışmaları,
- Tavşan plazmasından elde edilen örneklerin miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve validasyonu,
- Nanokristal teknolojisi ile hazırlanan formülasyonların Yeni Zelanda cinsi tavşanlara oral gavaj yoluyla uygulanarak toplanan plazma örneklerin LC/MS/MS ile analiz edilmesi ve RXB nanokristal formülasyonuna ait EAA, C_{maks} , maksimum konsantrasyona erişme zaman (t_{maks}), terminal yarı ömür ($t_{1/2}$) gibi farmakokinetik parametrelerin hesaplanması.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda nanokristal teknolojisi ile hazırlanan formülasyonların, yüksek dozlarda elde edilen farmakokinetik sonuçların iyileştirilmesine yardımcı olup olmadığı, doz orantısallığı ile birlikte ilacın plazma konsantrasyon-zaman profilinde EAA değerinin de aynı oranda artıp artmadığı incelenmiştir. Yüksek dozlarda çözünürlüğün düşük olmasından dolayı ilacın absorpsiyonunun tamamlanamama durumu, hazırlanan formülasyonlar ile çözüme kavuşturulmaya çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Venöz Tromboembolizm Tedavisi

VTE; miyokard enfarktüsü ve inmeden sonra üçüncü en sık görülen kardiyovasküler hastalıktır (25, 26). VTE'nin görülme sıklığı yaklaşık 1000 kişi/yıl'dır. (27-29). VTE en sık DVT şeklinde bacaklarda görülür. VTE'nin potansiyel olarak yaşamı tehdit eden en önemli komplikasyonu PE oluşturması ve pulmoner arterlerde bir trombusun embolizasyonudur. Çoğunlukla kendiliğinden veya herhangi bir hastalığın komplikasyonu ve cerrahi müdahaleler sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu gibi durumlarda düşük doz antikoagülasyon tedavisi ile profilaksi etkili olmaktadır. Uzun yıllar boyunca akut VTE'nin tedavisi düşük molekül ağırlıklı heparin veya fondaparinuxs ve devamında oral VKA uygulanması ile yapılmıştır (30). Bu tedavi rejimi tekrarlayan VTE'in önlenmesinde oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla birlikte VKA dar terapötik indeksli ilaçlar olmaları nedeniyle yakın izlem gerektiren ve kanama komplikasyonları nispeten yüksek ilaçlardır. Bunun yanında VKA'nin etkisinin başlaması geç olduğu için akut VTE tedavisi düşük molekül ağırlıklı heparinler ve fondaparinuxsun subkütan enjeksiyonu ile parenteral antikoagülasyon gerektirmektedir. Günümüzde antikoagülan tedavi amacıyla heparin, VKA, faktör Xa inhibitörleri, doğrudan trombin inhibitörleri ve trombolitikler kullanılmaktadır (6, 7). Uzun yıllar boyunca oral antikoagülan olarak sadece VKA kullanılmıştır. Ancak, etkili olmalarına rağmen yavaş etki başlangıcı ve dengesine sahip olması, birçok ilaç ve besin ile etkileşmesi ve öngörülemez farmakodinamik yanıt oluşturabilmesi nedeniyle doz ayarlaması ve sürekli olarak koagülasyon izlemesi gerekebilmektedir. Antikoagülan ilaçların bu kısıtlamalarını aşmak üzere son yıllarda özellikle tek bir pıhtılaşma faktörünü (örneğin faktör Xa veya trombin) doğrudan hedef alan oral antikoagülanlar geliştirilmiştir (31, 32). Faktör Xa, kan pıhtılaşmasında merkezi bir rol oynar ve hem iç hem dış pıhtılaşma yollarında etkinleştirilir. Faktör Xa; protrombini protrombinaz kompleksi ile doğrudan trombine dönüştürür (33). Trombin ile fibrin pıhtı oluşumu trombosit aktivasyonuna neden olur. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar faktör Xa ve trombinin antikoagülan etki için uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Doğrudan faktör Xa inhibitörleri ve doğrudan trombin inhibitörleri, yapılan klinik

çalışmalarda tromboembolik endikasyonların birçoğunda VKA ve düşük molekül ağırlıklı heparinler gibi konvansiyonel antikoagülanlar ile karşılaştırıldığında benzer veya daha iyi etkinlik ve güvenlik profili göstermiştir. Doğrudan etkili faktör Xa inhibitörlerinden başka tromboembolik hastalıkların tedavisinde oral olarak kullanılan diğer VKA, yukarıda da belirtildiği gibi etkilerinin yavaş başlaması ve yavaş durması, ilaç etkileşimlerinin fazla olması, dar terapötik indeksli ilaçlar olmaları ve izleme gerekliliklerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. Ayrıca birçok ilaç ve besin ile etkileşime girmektedir. Bu nedenle farmakodinamik ve farmakokinetik profili tahmin edilebilir yüksek oral biyoyararlanıma sahip faktör Xa inhibitörleri üzerine yoğunlaşmıştır (8). Kalça ve diz protezi ameliyatları sonrası DVT ve PE profilaksisinde kullanılmak üzere RXB, apiksaban, dabigatran gibi yeni ilaçlar geliştirilmiştir (9, 10). Bu yeni oral antikoagülanların farmakokinetiği ve farmakolojisi VKA olan varfarinden farklıdır. Bulgular Tablo 2.1.'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir (28, 34).

VKA'ların aksine, yeni oral antikoagülanların farmakokinetik ve farmakodinamik profilleri doğrudan tahmin edilebilir, daha düşük potansiyelde ilaç-ilac etkileşimi gözlenir, sabit dozda düzenli olarak verilebildiğinden koagülasyon izlemesine gerek olmamaktadır ve daha hızlı etki etmektedir (31, 32).

Bu bileşikler (RXB, apiksaban, dabigatran eteksilat) spesifik tromboembolik hastalıklarda kullanılmak üzere faz III çalışmalarının sonuçlarına dayanarak ruhsatlandırılmıştır. Bu ilaçlardan RXB yüksek seçicilikte doğrudan faktör Xa inhibitörü bir ilaçtır (11). RXB protrombinaz ve pıhtı bağlayıcı faktör Xa aktivitesini inhibe eder (35). RXB, DVT ve aynı patolojik sürecin farklı bir şekli olan PE tedavisi ve önlenmesi ve VTE tekrarını önlemek için oral olarak uygulanmaktadır. Tekrarlama riskinin önlenmesi için kısa dönemli tedaviler etkilidir.

Tablo 2.1. Yeni oral antikoagülanların VKA olan varfarin ile karşılaştırılması.

Parametre	Varfarin	Dabigatran	RXB	Apiksaban
Etki mekanizması	VKOR inhibisyonu	Direkt trombin inhibisyonu (geri dönüşür)	Faktör Xa inhibisyonu (geri dönüşür)	Faktör Xa inhibisyonu (geri dönüşür)
Etki başlama	Yavaş	Hızlı	Hızlı	Hızlı
Etki durması	Uzun	Kısa	Kısa	Kısa
Absorpsiyon	Hızlı	Hızlı-asit bağımlı	Hızlı	Hızlı
Biyoyararlanım (%)	100	6,5	80*	50
t _{maks} (saat)	2-4	1-3	2,5-4	1-3
Vd(L)	10	60-70	50-55	21
Proteine bağlanma	99	35	95	87
t _{1/2} (saat)	40	12-17	9-13	8-15
İdrar ile atılım		80	33	25
Dışkı ile atılım		20	28	50-70
CL/F(L/saat)	0,35	70-40	10	5
Yiyecek etkisi	Absorpsiyona etkisi yok diyet ile alınan Vit. K farmakodinamik olarak etkilidir	Gecikmiş absorpsiyon, biyoyararlanıma etkisi yok	Gecikmiş absorpsiyon , artmış biyoyararlanım	
İlaç taşıyıcısı		P-gp	P-gp, BCRP	P-gp, BCRP
CYP aracılı metabolizma	CYP2C9, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2		CYP3A4/5, CYP2J2 (eşit)	CYP3A4/5, CYP2J2 (minör), CYP1A2 (minör)

BCRP: meme kanseri rezistans proteini (Breast cancer resistance protein), CL/F(L/saat): görünür klerens, P-gp:P-glikoprotein, CYP450: sitokrom P450 izoenzim t_{maks}(saat) : maksimum konsantrasyona erişme zamanı, t_{1/2} (saat): terminal yarılanma ömrü VKOR: Vitamin K epoksid reduktaz enzim, Vd(L): dağılım hacmi *Biyoyararlanım doza (10 mg'dan fazla) ve gıda alımına bağlıdır. Bu nedenle, 10 mg'dan daha fazla RXB dozu gıda ile birlikte verilmelidir. Bununla birlikte, 10 mg RXB'nin, sadece elektif kalça veya diz cerrahisi sonrası tromboemboli profilaksisi için ruhsatı vardır.

2.2. İlaçlarda Biyoyararlanım Çalışmaları ve Biyoyararlanımı Etkileyen Faktörler

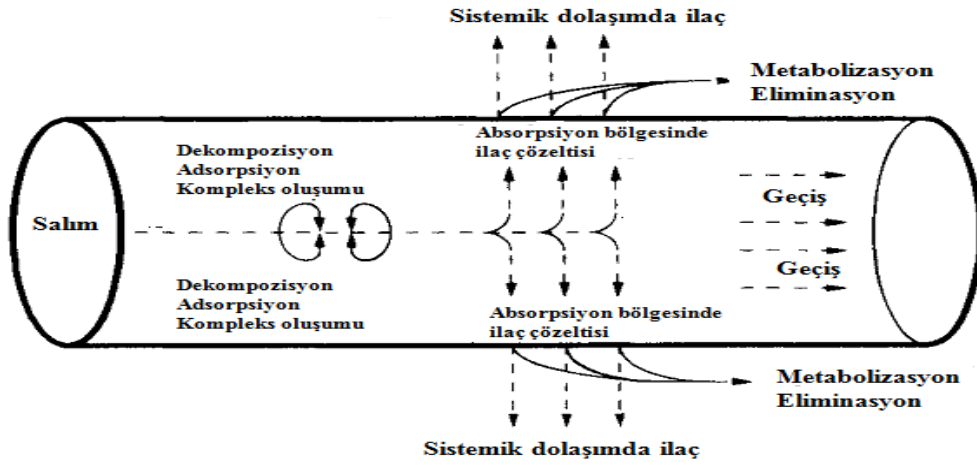
Biyoyararlanım, oral olarak uygulanan dozun sistemik dolaşımında absorplanan fraksiyonunu ifade eder başka anlatımla bir farmasötik dozaj şeklinden (intravenöz yol ile kullanılanlar hariç) etkin maddenin absorpsiyon hız ve derecesidir (36-38). Oral alınan ilaçların biyoyararlanımı uygun bir referans ürün ile sistemik profilin karşılaştırılması ile elde edilebilir. Profil etkin maddenin sistemik dolaşımında zamana karşı konsantrasyonun ölçülmesi ile elde edilir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ilaçların biyoyararlanım çalışmalarında referans ürünün iv enjeksiyon dozaj şeklinde olmasını önermektedir. Referans ürün olarak iv enjeksiyon kullanılması ile etkin maddenin ne kadar absorbe olduğu saptanır, bu çalışmalar mutlak biyoyararlanım olarak değerlendirilir (38). FDA düzenlemelerinde etkin maddenin absorpsiyon hız ve derecesi genellikle biyoyararlanım olarak tanımlamaktadır. Sistemik dolaşıma geçen ilacın gösterilebilmesi için kan, plazma, serum gibi biyolojik sıvılardan elde edilen ölçümler ile farmakokinetik verilerin elde edilmesi önerilmektedir. Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında genellikle absorpsiyon derecesini değerlendirmek için EAA, hızını değerlendirmek için C_{maks} ve t_{maks} değerleri kullanılmaktadır. Çalışmalar çapraz tasarım uygulanarak yürütülmektedir. Böylece gönüllülerin birey içi ve bireyler arası değişkenliklerinin azaltılması buna bağlı olarak formülasyonlar arasındaki farklılıkların ayırt edilmesi sağlanır. Biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik çalışmalarının genellikle açlık koşullarında yapılması önerilmektedir. Yiyecek etkisinin değerlendirileceği çalışmalar ise, ilgili kılavuzlar doğrultusunda tasarlanmalıdır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda genellikle piyasadaki en yüksek dozda çalışma yapılması ve oral katı dozaj şekilleri için 240 mL su ile alınması önerilmektedir. Her bir dönem arasında en az 5 yarılanma ömrü kadar sürenin geçmesi gerekmektedir. En az 3 veya daha fazla terminal yarı ömür içerecek ve EAA'nın %90'nını kapsayacak kadar zaman aralığında örnek toplanmalıdır (38).

Bir ilaç tablet, kapsül gibi katı dozaj şekilleri aracılığı ile oral yol ile alındığında biyoyararlanımından bahsedebilmek için öncelikle önce mide-bağırsak sistem sıvılarında çözünür olması ve absorplanması gerekmektedir. Oral yolla uygulanan katı

dozaj şekillerinden etkin maddenin absorpsiyon hız ve derecesini sınırlayan etkenler ise aşağıdaki gibi açıklanabilir (39):

1. İlacın absorpsiyon bölgesine ulaşmadan önce farmasötik dozaj şeklinden salınmaması,
2. İlacın mide bağırsak kanalında parçalanması veya absorplanmayan kompleksler haline dönüşmesi,
3. İlacın etkin bir şekilde bağırsak duvarından apikalden bazolateral yöne taşınmaması,
4. İlacın sistemik dolaşıma girmeden önce metabolizasyona ve eliminasyona uğraması

Bir ilacın oral biyoyararlanımında etkin maddenin çözünürlüğü ve geçirgenliği kritik parametrelerdir. Katı bir dozaj şeklinin oral uygulamasından sonra ilaç absorpsiyonundaki basamaklar Şekil 2.1’de gösterilmiştir (39).



Şekil 2.1. Oral yol ile uygulanan katı dozaj şeklinden etkin maddenin absorpsiyon süreci (39).

Etkin maddenin absorpsiyon hız ve derecesini sınırlayan etkenlerden 1. ve 3. madde BSS ile açıklanmaktadır. BSS etkin maddeleri çözünürlük ve geçirgenlik özelliklerine göre sınıflandıran bilimsel bir yaklaşımdır. BSS’e göre hemen salım sağlayan oral katı dozaj şekillerinden etkin maddenin kana geçiş hız ve derecesini belirleyen etkenler etkin maddenin çözünürlüğü, farmasötik dozaj şeklinden etkin

maddenin in vitro çözünmesi, etkin maddenin mide bağırsak sistemi mukozasındaki geçirgenliği, şeklinde sıralanmaktadır (40).

BSS'e göre yüksek çözünürlük ve yüksek geçirgenliğe sahip ilaçlar sınıf I, düşük çözünürlüğe ve yüksek geçirgenliğe sahip ilaçlar sınıf II, yüksek çözünürlük ve düşük geçirgenliğe sahip ilaçlar sınıf III, ve düşük çözünürlük ve düşük geçirgenliğe sahip ilaçlar ise sınıf IV olarak değerlendirilmiştir (40).

Piyasadaki ilaçların % 40'ı birçok organik çözücünde düşük çözünürlüğe sahiptir (41). Düşük çözünürlük, dozaj şekliinden düzensiz salım, düzensiz absorpsiyon ve düşük oral biyoyararlanıma neden olmaktadır. BSS sınıf II'de yer alan ve düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar yüksek geçirgenliğe sahip olduğu için bu ilaçların absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamak çözünme hızıdır. Bu nedenle bu ilaçların transferi ve oral biyoyararlanımı kısıtlıdır. İntravenöz enjeksiyon ise çok büyük miktarda çözücü gerektirmesi nedeniyle alternatif veriliş yolu olarak kullanılamamaktadır.

Çözünme hızı katı dozaj şekliinden birim zamanda çözünerek çözünme ortamına geçen etkin madde miktarı olarak tanımlanmıştır. Çözünme hızı ilk olarak Noyes ve Whitney tarafından tanımlanmıştır (Eşitlik 2.1.). Difüzyon tabakası (difusion layer) çözünme teorisine göre çözünme sürecinde, katı etrafında "h" kalınlıkta bir sıvı difüzyon tabakası (durağan bir film tabakası) bulunduğ u varsayımından hareket edilir. İlk basamakta katı sıvı ara yüzeyinde, kararlı bir doymuş tabaka, ikinci basamakta ise konsantrasyonun yüksek olduğu (C_s) bir tabaka yer almaktadır. Bu ara yüzeyden konsantrasyonun daha düşük olduğu çözünme ortamına difüzyon ile çözünme gerçekleşir. Noyes-Whitney çözünme modeli daha sonra Nernst-Brunner tarafından değiştirilmiş ve ilacın çözünme kinetiğinde önemli olan etkenler Eşitlik 2.2.' deki gibi tanımlanmıştır (39, 42, 43)

$$dC/dt=k(C_s-C) \quad (2.1.)$$

$$dC/dt=DS/Vh(C_s-C) \quad (2.2.)$$

dC/dt : t zamanında etkin maddenin çözünme hızı, k: Çözünme hızı sabiti, C_s : İlacın doyma konsantrasyonu, C: t zamanında V çözünme hacmindeki çözünmüş madde miktarı, S: İlacın spesifik yüzey alanı, D: Difüzyon katsayısı, h: Difüzyon tabakasının kalınlığı

İlaçların görünür çözünürlüğü sadece ilaç bileşiğine, çözünme ortamına ve sıcaklığına değil, aynı zamanda 1 μm 'nin altında olduğunda parçacık boyutuna da bağlıdır. Ostwald-Freundlich eşitliğine (Eşitlik 2.3.) göre, sıvı damlacıklarının buhar basıncı, azalan damlacık yarıçapı ile damlacık / buhar ara yüzey geriliminin artması nedeniyle değişir. Damlacık yarıçapı azaldıkça, yüksek damlacık yüzey gerilimi daha yüksek bir buhar basıncına yol açar. Sıvı damlacıktan bir gaz fazına molekül aktarımı işlemi, katı fazdan (nanokristallerden) sıvı faza (çözünme ortamı) molekül aktarımı işlemiyle benzerdir. Buhar basıncı çözünme basıncına eşdeğerdir. Böylece nanokristallerin görünür doyma çözünürlüğü, yüksek yüzey gerilimi ve çözünme basıncı ile artar (44, 45).

$$pv \frac{RT}{M} \ln \frac{S_r}{S_\infty} = \frac{2\lambda_{sl}}{r} \quad (2.3.)$$

S_r : r yarıçapındaki partiküllerin çözünürlüğü, S_∞ : Katı yüzeyin çözünürlüğü (büyük partikülleri içeren) λ_{sl} = Yüzeylerarası gerilim M: Molar kütle, ρ : Yoğunluk v: Bir mol elektrolitten oluşan iyon mol sayısı v elektrolit olmayanlar için 1'e eşittir R: Gaz sabiti, T: Mutlak sıcaklık

Ayrıca ilacın fizikokimyasal özellikleri (ör. çözünürlüğü, kristal şekli, difüzlenebilirliği, molekül yapısı), formülasyona ait etkenler (ör. yardımcı maddeler, kaplama, üretim parametreleri), in vitro çözünme yöntemine ait etkenler (ör. aygıt tipi, hacim, yüzey gerilimi, ortamın pH'sı, viskozite) de çözünmeye etki etmektedir.

İlacın sistemik dolaşımdaki profili ilacın dozaj şeklinden salımı ve salım sonrası presistemik ve sistemik dolaşımdaki olaylardan etkilenmektedir. İlacın mide bağırsak sistemindeki çözünürlüğüne etki eden etkenler; bağırsak sıvılarının içeriği, hacmi ve ilaç alımını takiben meydana gelen hidrodinamik davranışlardır. Bir ilacın in vivo çözünürlüğü ve çözünme hızı birçok fizyolojik işlem sonucunda gerçekleşmekte olduğundan mide bağırsak sisteminin motilitesi gibi faktörlerden de etkilenmektedir (46). İlaç ile birlikte alınan sıvılar ve gıdaların dışında mide bağırsak sisteminde çeşitli sıvılar salgılanmaktadır. Hidroklorik asit, bikarbonatlar, enzimler, yüzey etkin maddeler, elektrolitler, mukus ve su bunlardan birkaçıdır. Bu nedenle mide bağırsak

sistemi pH'sı, tamponlama kapasitesi, yüzey etkin madde konsantrasyonu, sıvı hacmi, viskozite, iyonik güç ve gıdaların varlığı ilacın çözünürlük ve çözünme hızını etkilemektedir (39). Çözünmeye etki eden fizikokimyasal, fizyolojik etkenler ve bunların in vitro ortamdaki yansımaları Tablo 2.2.' de özetlenmiştir (47, 48).

Tablo 2.2. Mide bağırsak sisteminde ilacın çözünmesine etki eden fizikokimyasal ve fizyolojik etkenler ve in vitro yansımaları.

Parametre	Fizikokimyasal etken	Fizyolojik etken	İn vitro etken
A	Partikül büyüklüğü	Mide sıvısında yüzey etkin madde ve safra tuzu varlığı	Yüzey etkin madde varlığı
D	Molekül büyüklüğü	Lümen içi sıvısının viskozitesi	Ortamin viskozitesi
h	-	Mide bağırsak sistemi motilitesi ve hızı	Karıştırma hızı ve sistemin hidrodinamiği
C _s	Hidrofilik özellik, kristal yapı, çözünürlük	pH, safra tuzu, tamponlama kapasitesi, gıda içeriği	pH ve yüzey etkin madde
C	-	Geçirgenlik	-
V	-	Mide bağırsak sistemi sıvılarının hacmi, sekresyonu ve alınan sıvı miktarı	Çözünme hacmi

A:Yüzey alanı, D:Difüzyon katsayısı, h:Difüzyon tabakasının kalınlığı, C_s: İlacın doyumluk konsantrasyonu, C: t zamanında V çözünme hacminde çözünmüş madde miktarı, V:Çözünme hacmi

İlaçların çözünürlüğü yardımcı çözücü (ko-solvan), siklodekstrinler ve mikronizasyon gibi geleneksel yöntemler ile artırılabilir. Buna rağmen biyoyararlanım sorunu birçok durumda çözülmemektedir. Örneğin, çok az çözünen ilaçların mikronizasyonu ile çözünmeyi arttırmak için yeterince büyük bir yüzey oluşturulamaz. Bunun sonucu olarak mikronizasyon yerini nanonizasyona bırakmıştır (49-51). Bu ilaçların çözünürlüğünü artırmak için birçok strateji

geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar çözünürlüğü ve yüzey alanı artırmaya yönelik fiziksel ve kimyasal değişikliklerdir. Fiziksel modifikasyonlar partikül büyüklüğünü küçültmek (mikronizasyon, nanonizasyon), psödopolimorfların/polimorfların oluşturulması (solvat içeren), kompleks oluşturma/çözündürme (sümfaktanlar veya siklodekstrin kullanarak), dendrimerlere konjugasyon ve yardımcı çözücü eklenmesi ve ilaçların taşıyıcılar içinde dispersiyonlarının hazırlanmasını (ötektik karışımlar, non-moleküler katı dispersiyonlar, katı çözeltiler) kapsamaktadır. Kimyasal değişiklikler ilaçların çözünebilen ön ilaç ve tuz şekillerinin sentezlenmesini kapsamaktadır (44, 49, 52-54).

Partikül büyüklüğünün küçültülmesi uzun yıllardır kullanılan bir yaklaşımdır. İlaç etkin maddelerinin mikronizasyonu ile yüzey alanı artırılarak çözünme hızı ve absorpsiyon hızı orantısal olarak artmaktadır. Buna rağmen düşük çözünürlükteki bileşiklerde mikronizasyon doygunluk çözünürlüğünü ve biyoyararlanımı artırmada başarısız olmaktadır. Bu nedenle partikül boyutunun nanometre boyutuna azaltılması keşfedilmiştir (55).

2.3. Nanokristal Teknolojisi

İlaç nanokristalleri nanometre boyutunda ve kristalin karaktere sahip nanopartiküllerdir şeklinde tanımlanabilmektedir. Nanokristaller ise bu alandaki ilk patentlerde 2000 nm altındaki partiküller olarak tanımlanmıştır (56-58). Kristal yapıdaki nanopartiküller olmalarından yola çıkıldığında ise 1000 nm ve altındaki partiküller olarak tanımlanabilmektedir. Nanopartikül tanımı hakkında ise farklı disiplinler arasında tartışmalar vardır, kolloidal kimyada 100 nm veya 20 nm altı nanopartikül olarak tanımlanmaktadır. Farmasötik alanda ise nanopartiküller 1000 nm altı, mikropartiküller ise 1-1000 µm aralığındaki partiküller olarak tanımlanmaktadır. İlaç nanokristalleri, %100 ilaç içeren, taşıyıcı veya polimerik nanopartikül içermeyen partiküllerdir. İlaç nanokristallerinin dispersiyonuna nanosüspansiyon adı verilmektedir. Genellikle disperse partiküllerin yüzey etkin maddeler veya polimerik stabilizanlar ile stabilize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Dispersiyon ortamı su, sulu çözeltiler veya susuz ortamlar olabilir (sıvı polietilen glikol gibi) (44, 59). Hazırlama yöntemine bağlı olarak özellikle çöktürme işlemi uygulandığında mikrokristalin formdan nanopartiküle geçişte kristal veya amorf yapı elde edilebilir.

Esasen amorf yapıdaki nanopartiküller nanokristal olarak değerlendirilmemelidir (44). Nanokristal teknolojisinin son yıllarda önemli hale gelmesi çeşitli üstünlüklerine bağlanabilir. Bunlar;

- Oral biyoyararlanımı artırır
- Hızlı etki gösterir
- Doz orantısallığını iyileştirir
- Yüksek biyoyararlanımdan dolayı doz azaltılabilir
- Su bazlı olabilir, organik çözücü kullanılmayabilir
- Mikronize edilmiş ilaçların aksine nanokristaller birçok yol ile uygulanabilir
- Üretim şekli ve uygulaması kolaydır
- Ölçek büyütme işleminin uygulanabilirliği kolaydır
- Suda çözünürlüğü az olan lipofilik ilaçlarda gözlenen açlık ve tokluk durumlarındaki biyoyararlanım farklılığı nanokristal teknolojisi ile azaltılabilir
- Açlık tokluk koşullarındaki değişkenlik azaltılır
- Hızlı, basit ve ucuz formülasyon geliştirilir (21, 60-62)
- Artan güvenilirlik; genellikle yan etkiler ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır, bu yüzden aktif ilaç maddelerinin azalan konsantrasyonu hastalar için artırılmış güvenilirlik sağlar (61, 62)
- Sürekli kristal yapı; nanokristal teknolojisi partikülün kristal morfolojisini koruyarak partikül boyutunun küçültülmesi ile yüzey alanının artırılması sonucu çözünme hızında bir artışa yol açar (62, 63)
- Artırılmış stabilite; stabilizan ilavesi ile yeniden agregasyonun önüne geçilmiş olur. Süspansiyon halindeki nanokristaller yüzey etkin madde ve polimerler ile stabilize edilir
- Bütün az çözünen ilaçlara uygulanabilir (62).

2.3.1. Nanokristal Hazırlama Yöntemleri

Nanokristal hazırlamada aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) yaklaşımlar ve yukarıdan aşağıya (*top-down*) yaklaşımlar olmak üzere iki farklı yaklaşım bulunmaktadır. Yukarıdan aşağıya yöntemlerde büyük partiküller daha küçük partiküllere dönüştürülür (ör. yaş öğütme, yüksek basınçlı homojenizasyon), aşağıdan yukarıya yöntemlerde ise genellikle nanoboyutlarda partikül elde etmek üzere

moleküller çözündürülür (ör. çöktürme) (59). Bu yöntemler kullanılarak hazırlanan ve piyasada mevcut preparatlar Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Nanokristal hazırlamada kullanılan yöntemler.

Yöntem		Nanokristal	Firma
Çöktürme	Aşağıdan Yukarı	Hydrosol ®	Sandoz/Novartis
Çöktürme	Aşağıdan Yukarı	Nanomorph®	Soligs/Abbott
Yaş Ögütme	Yukarıdan	NanoCrystal®	Nanosystems/Elan
	Aşağıya		
Yüksek Basıncılı	Yukarıdan	IDD-P ®	SkyePharma
Homojenizasyon	Aşağıya		Canada Inc
Yüksek Basıncılı	Yukarıdan	Discocubes ®	SkyePharma
Homojenizasyon	Aşağıya		
Yüksek Basıncılı	Yukarıdan	Nanopure®	Pharmasol
Homojenizasyon	Aşağıya		
Kombine	-	NanoEdge®	Baxter
Yöntemler			
Kombine	-	SmartCrystal®	Pharmasol
Yöntemler			Berlin/Abbott

Aşağıdan Yukarıya (Bottom-Up) Teknikler

Çöktürme yöntemi uzun yıllar boyunca küçük partiküller hazırlamak için kullanılmıştır ve 1988 yılından itibaren ise nanopartikül ilaç hazırlamasında kullanılmaya başlanmıştır. Aşağıdan yukarı teknik ile nanosüspansiyon hazırlamadaki ana prensip çözücünden çözünmüş moleküllerin çöktürülerek nanopartikül boyutunun büyümesidir. Nükleasyon ve kristal büyümesi nanokristal oluşumundaki iki ana basamağı oluşturmaktadır. List ve Sucker tarafından 1988 yılında kontrollü çöktürme yöntemiyle Hydrosol® hazırlanması rapor edilmiştir, ilk fikri mülkiyet hakkı bugün Sandoz firmasına aittir (64). Daha sonra rapor edilen Nanomorph® teknolojisi ise kararlı amorf ilaç nanopartiküllerinin hazırlanabildiği bir diğer çöktürme yöntemidir. Bu teknik Soligs/Abbott (önceden Knoll/BASF)'e aittir (44).

Çöktürme teknolojileri dört farklı yöntemden oluşmaktadır; sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi ile çöktürme, süperkritik sıvı varlığında çöktürme, çözücü uzaklaştırması ile çöktürme ve yüksek enerji yöntemi ile çöktürme (65). Bunlardan sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi en çok kullanılan ve basit bir yöntemdir. İlaç bir çözücü içinde çözündürülür, daha sonra karışabilir bir antiçözücü karıştırma ve sonikasyon ile ortama eklenir. Doygun ilaç antiçözücü ilavesiyle önce büyük çekirdek (nuclei) oluşturur daha sonra çekirdekler büyüyerek nanopartikülleri oluştururlar. Bu yöntemde çekirdeklenme ve kristalizasyonu kontrol eden ajitasyon ve ultrason, moleküler difüzyonu ve kütle transferini kolaylaştıran yöntemlerdir (66). Moleküler birleşme ve kristal büyümesini önlemek için çözücü ve antiçözücüye stabilizan eklenmelidir. Çözücü içindeki ilaç konsantrasyonu, antiçözücü hacmi, karıştırma hızı veya ultrasonikasyon zamanı gibi enerji girişleri, çöktürme sıcaklığı, stabilizanlar gibi birçok deneysel parametre nanokristal oluşumunu etkileyebilir (67, 68). Etkin madde konsantrasyonunun fazla olması nedeniyle iki faz arasında difüzyonun gerçekleşmemesi sonucu tekdüze olmayan süpersatürasyon gerçekleşir. Ayrıca yüksek etkin madde konsantrasyonu agregat oluşumuna da neden olabilir (69). Antiçözücü seçimi süpersaturasyon derecesini belirlediğinden önemlidir. Yüksek düzeyde süpersatürasyon hızlı çekirdeklenme hızına ve küçük çekirdek büyüklüğüne neden olmaktadır. Büyük miktarlarda çekirdek aynı anda meydana gelir ve çekirdeklerin aynı anda büyümesi aynı büyüklükteki küçük kristallerin oluşmasını sağlar (70). Çözünürlüğü zayıf olan ilaçlar için su en çok kullanılan antiçözücüdür, ancak bazı durumlarda hem çözücü hem antiçözücü organik yapıdadır (71).

Süperkritik çözelti varlığında çöktürme, süperkritik çözeltinin hızlı genişmesi (RESS, *rapid expansion of supercritical solution*), Süperkritik bir çözeltinin sıvı çözücü içine hızlı genişmesi (RESOLV, *rapid expansion of a supercritical solution into aliquid solvent*) veya süperkritik antiçözücü (SAS, *supercritical antisolvent*) teknikleri ile de nanokristal hazırlanabilmektedir (65). Farmasötik uygulamalarda en çok kullanılan süperkritik çözücü CO₂'dir. Bir başka antiçözücü yöntemi olan çok girişli girdaplı karıştırıcı (MIVM, *multi-inlet vortex mixer*) yönteminde, ani ve homojen çekirdeklenmeyi gerçekleştirirken istenen boyutun ötesinde partikül büyümesini stabilizanlar yardımı ile baskılayarak daha hızlı ve tam bir sıvı mikrokariştirme sağlanabilir (72, 73).

Literatürde aşağıdan yukarıya teknikleri ile hazırlanmış birçok nanokristal örneği bulunmaktadır. Mou ve ark. (74) çözünürlüğü pH'ya bağımlı olan itrakanazolün nanosüspansiyonunu hazırlamak için asit baz nötralizasyonunu kullanmışlardır. İlaç hidroklorik asit ve etanol karışımında (1:10,h:h) çözündürülmüş, ve sodyum hidroksit çözeltisi nötralizasyon gerçekleşene kadar karıştırılarak eklenmiştir. Antihelmentik bir ilaç olan albendazolün formik asit içerisindeki organik çözeltisi stabilizan çözeltisine eklenerek 1200 rpm'de homojen bir süspansiyon elde edilene kadar karıştırılarak nanokristalleri hazırlanmış ve doyumluk çözünürlüğü saf albendazole göre 9 kat artmış ve daha hızlı bir çözünme profili elde edilmiştir. Bunun yanında kristal yapı varlığı, X-ışını difraktogramlarında görülmüş ve stabilite çalışmaları sonrasında da kristal yapı varlığını korumuştur (75). Mikroakışkan nanoçöktürme işlemi kullanılarak hazırlanan hidrokortizon nanosüspansiyonda ilaç organik bir çözücünde çözündürülür ve stabilizan içeren antiçözücü fazı (örn:su) mikrokannallardan dökülür ve difüzyon tabakasında çekirdek oluşumu gözlenir (76, 77). Sıvı atomizasyon tabanlı püskürterek kurutma (*spray drying*) (78), elektropüskürtme (*electrospraying*) (79), aerosol akış reaktör (aerosol flow reactor) (80) nanokristal üretmede kullanılan diğer yöntemlerdir.

Bu teknik farklı çözücü karışımlarında etkin maddenin çözünmesi gibi üstünlüklere sahip olmakla birlikte partiküller büyüme eğilimindedir. Bu partiküllerin büyümesini engellemek için ortama stabilizan eklenmelidir. Tekdüze partiküller elde edebilmek için bazı parametreler (karıştırma hızı, çözücü ve anti çözücü oranı, etkin madde içeriği, sıcaklık) optimize edilmelidir. Karıştırma hızının artması partikül büyüklüğünün azalmasını iyileştirir (81). Bu yöntemin kullanılabilmesi için etkin maddenin en az bir çözücünde çözünmesi, çözücü ve antiçözücünün karışabilir olması ve kullanılan çözücünün kabul edilebilir limitler doğrultusunda uzaklaştırılması gerekir (49). Yukarıdan aşağıya yöntemlerinden farklı olarak, aşağıdan yukarıya yaklaşımının, daha düşük enerjili işlemleri, daha basit ekipmanları ve daha az masraflı olması ve düşük sıcaklıkta çalışılabilir olması bu yöntemi özellikle ısıya duyarlı maddeler için uygun hale getirmektedir (82). Aşağıdan yukarıya teknikler laboratuvar ölçeğinde oldukça fazla çalışılmıştır, ancak ölçek büyütme genellikle sorunludur. Ayrıca partikül boyutu büyümesini kontrol etmede, uygun bir çözücü/antiçözücü kombinasyonunun bulunmasında ve çözücülerin hacimlerine bağlı olarak uzaklaştırma

işlemlerinde genellikle zorluklarla karşılaşilmektedir. Özellikle çözücü/antiçözücü işlemlerinde ilaçların zayıf çözünürlük özelliklerinden dolayı çoğunlukla organik çözücülerin kullanılmasını gerektirmektedir (83). Özellikle sıvı atomizasyon teknikleri, son derece hızlı uzaklaştırma işlemi nedeniyle amorf maddeler üretebilir. İlaç kristalleşmeye başladığında stabilite sorunlarına neden olabilmektedir (83, 84).

Yukarıdan Aşağıya (Top-Down) Teknikler

Yukarıdan aşağıya nanokristal hazırlama yöntemleri aşağıdaki başlıklar altında verilebilir (44, 85).

- a. Bilyeli değirmende öğütme (*Nanosystems/Elan* teknoloji) (BD)
- b. Yüksek basınçlı homojenizasyon (YH)
 - Mikroakışkan teknoloji (IDD-PTM)
 - Su içinde piston boşluk homojenizasyon (*Dissocubes®* teknoloji)
 - Su veya susuz ortamda piston boşluk homojenizasyonu (*Nanopure* teknoloji)
- c. Kombine teknolojiler
 - NanoEdge teknoloji
 - SmartCrystal teknoloji

Bilyeli değirmende öğütme yöntemi tipik bir yukarıdan aşağıya yöntemdir. İnci öğütme tekniği (*Nanocrystal®*) 1990 yılında Liversidge tarafından geliştirilmiştir. Eskiden Nanosystems şirketine ait olan bu yöntem şimdilerde Elan Drug Delivery Systems şirketine aittir (86, 87). Bu yöntemde, öğütme haznesi inci bilyeler, ilaç, stabilizan ve dispersiyon ortamı ile doldurularak yüksek hızda döndürülür.

Bilyelerin dönmesi ile ilacın bilyeler, diğer ilaç molekülleri ve öğütme haznesi ile çarpışma hareketi ve yüksek kayma gücü ile birlikte ilaç kristalleri nano boyutlu partiküller halinde kırılır. Öğütme amacıyla çinko oksit, paslanmaz çelik, cam ya da yüksek düzeyde çapraz bağlanmış polistiren reçine gibi birçok materyal kullanılır. İşlem toplu veya sürekli şekilde devam ettirilebilir. Öğütme süresi öğütme araçları, öğütme parametreleri, seri büyüklüğü ve bileşenlere bağlı olarak 30-60 dakikadan birkaç güne kadar devam edebilir. Uzun süreli öğütme işlemleri mikrobiyal üreme ve kararlılık sorunları ve maliyet gibi riskler taşır.

Öğütme sonuçlarını birçok faktör etkilemektedir. Etkin maddenin özellikleri (sertlik, yoğunluk), konsantrasyonu ve stabilizan tipi, süspansiyonun viskozitesi, öğütme kabındaki ilaç miktarı, bilyelerin yarıçapı ve yoğunluğu, hız ve zaman gibi öğütme parametreleri bu faktörlere örnek olarak verilebilir (88, 89). Öğütmede kullanılan bilyelerin sertliği ve yoğunluğu, öğütme haznesi önemlidir. Bilyelerin büyüklüğü 0,01- 20 mm arasında değişmektedir. Genellikle daha küçük bilyeler daha fazla çarpışma noktası oluşturdukları için daha iyi nanopartikül oluştururlar. Fakat çok küçük (0,03 veya 0,015 mm) bilyeler öğütme için iyi bir seçim değildir. Çünkü hafif olmaları nedeniyle ilaç için yeterli çarpma enerjisini sağlayamazlar (90). Yüksek yoğunlukta çok sayıda bilye daha iyi partikül dağılımı için yararlıdır. Griseofulvinin yaş öğütme yöntemi ile nanokristallerinin hazırlandığı bir çalışmada her bir öğütme hızında en düşük partikül büyüklüğünü elde etmek için ideal bilye büyüklüğünün olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada hidrodinamik parametreler bilye boyutunun düşmesinin, daha az enerji ile daha fazla çarpışma olduğuna dair etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmaktadır (91). Uzun öğütme zamanı ve yüksek hız daha küçük partiküllerin yüzdesini artırmaktadır ancak uzun süreler bazı durumlarda partikül büyüklüğünü artırmaktadır. Yüksek hız öğütme süresini azalmaktadır. Öğütme haznesine en az ilaç dolum miktarı bilyelerin ve haznenin aşınmasını önlemek için gerekli iken yüksek konsantrasyon çarpışma olasılığını artıracaktır. Normal ilaç konsantrasyonu bir haznede 1-400 mg/mL arasında değişmektedir.

Bu teknik, organik çözücü kalıntısını önlemesi ve ilaç yükleme etkinliğinin yüksek olması gibi üstünlükleri nedeniyle ticarileşebilir. Islak öğütme işlemi boyunca polimerik geçiş sorun teşkil etmez ve ilacın kristal yapısı bozulmaz, iyi bir kararlılık ve yarı ömür sağlar (92). Öğütme işleminde ana sorunlardan biri bilyelerin aşınması sonucu kontaminasyon oluşmasıdır. Öğütme ortamının parçaları öğütülmüş örneklerin içinde bulunmuştur (68). *NanoCrytals®* teknolojisinde kullanılan yüksek düzeyde çapraz bağlı polistiren reçine ile kaplanmış bilyelerin kullanılması ile bu aşınma en aza indirilebilir (93). Bir diğer sorun ise ilacın, öğütme kabı ve bilyelerin yüzeylerine yapışmasına bağlı kayıbdır. Bu durum özellikle pahalı ilaçlar için önemli bir konudur (94).

Yüksek basınçlı homojenizasyon bir diğer nanokristal hazırlama tekniğidir. Bu amaçla kullanılan iki homojenizatör tipi bulunmaktadır; Piston-boşluk homojenizatör (örn: APV Gaulin, Avestin) ve mikroakışkan homojenizatörler (*microfluidics*).

Piston-boşluk homojenizatörlerde su içinde homojenizasyon (*DissoCubes*®) Müller ve ark. (95) tarafından geliştirilmiştir. Homojenizasyondan önce toz halindeki etkin madde veya yüzey etkin madde çözeltisinde disperse edilmiş etkin madde jet öğütme (86), basit homojenizatörler (96, 97), sonikasyon (98) gibi yöntemler ile homojenizasyon boşluğunu tıkamayacak şekilde mikropartikül haline getirilir. Mikronize süspansiyon 3 cm yarıçapındaki (APV LAB 40) silindire koyulur dar bir boşluktan (yaklaşık 25 µm) geçtiğinde, oda sıcaklığında sıvı buhar basıncından daha düşük bir değere düşer ve sıvı kaynar. Sonuç olarak, homojenizasyon boşluğunda gaz kabarcıklarının oluşumu ve patlaması kavitasyon oluşumu partiküllerin kırılmasını sağlar. Güçlü kavitasyon kuvvetleri, yüksek kayma kuvvetleri ve parçacıkların birbirlerine karşı çarpışması, nanokristal üretmek için gerekli ana güçleri oluşturur. Elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı, uygulanan homojenizasyon basıncı, döngü sayısı ve ilacın sertliği ile ilişkilidir. PX-18 maddesinin yüksek basınçlı homojenizasyon ile hazırlanan nanosüspansiyonunda homojenizasyon döngüsü artıkça partikül büyüklüğü doğrusal bir azalma göstermek yerine üssel olarak azalmıştır (99). Bu durum etkin maddenin daha kolay kırılabilen zayıf noktaları olduğuna işaret etmektedir.

Piston-boşluk homojenizatörlerin ikinci jenerasyonu *Nanopure*® teknoloji olarak isimlendirilmektedir. Bu yöntemde susuz ortam kullanılır. Bazı amaçlar ve verilmiş yolu nedeniyle bazı ilaçların susuz ortamlarda disperse edilmesi gerekir. Örnek olarak yumuşak jelatin kapsüllerde kullanılmak üzere veya iv enjeksiyon için izotonik süspansiyonlar (su-gliserol karışımları), kolay kuruma için su-etanol karışımları verilebilir (59).

Mikroakışkan homojenizatörler jet akış prensibi ile çalışmaktadır. Bu yöntem SkyePharma Canada tarafından geliştirilmiştir. Mikron boyutun altındaki çözünürlüğü düşük olan ilaçların nano boyutta partikülleri üretilmiş ve IDD-P® (*Insoluble Drug Delivery Particle Technology*) olarak adlandırılmıştır (85). İlaç süspansiyonu etkileşim hücresinden yüksek basınçta geçirilir. Mikroakışkan teknolojisi yumuşak etkin maddeler için kullanılabilir bir yöntemdir. Çok sayıda döngü yapılması

gerekliliğinden dolayı (50-100 döngü) büyük hacimdeki üretimler için elverişli değildir (100). Akış yönüne bağlı olarak iki farklı tipte homojenizasyon hücresi kullanılmaktadır; Z-tipi ve Y-tipi. Sıvı süpersonik hız ile insan saç telinden daha ince bir kanal içinde birbirlerine ve hücre çeperlerine karşı bir türbülans oluşturur. Partikül büyüklüğü, yüksek kayma enerjisi, türbülans, çarpma ve kavitasyon ile küçülür. Bu yöntemin sakıncası geniş partikül büyüklüğü dağılımıdır (101). Hao ve ark. (22) mikroakışkan teknolojisi ile amiton B nanokristallerini hazırlamıştır. Nanosüspansiyonun partikül büyüklüğü 256 nm ve polidispersite indeksi (PDI) 0.206 olarak bulunmuştur. Verna ve ark. (102) tasarımda kalite yaklaşımını kullanarak mikroakışkan yöntemi ile nanosüspansiyon hazırlamıştır. Zaman, basınç, stabilizan tipi, işlem sıcaklığı ve stabilizan konsantrasyonu indometazin nanokristali hazırlamada kritik parametreler olarak belirlenmiştir. Xiong ve ark. (103) basınç, döngü sayısı ve parçalama prensiplerinin nanosüspansiyonun partikül büyüklüğü ve polidispersiteye etkisini incelemiştir. Bu çalışmada farklı homojenizasyon tekniklerine sahip *Niro-Soavi*, *EmulsiFlex* ve *Microfluidizer* yöntemlerinden *Microfluidizer* yönteminin partikülleri parçalamada en güçlü ve en uygun yöntem olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada nimodipinin partikül büyüklüğü basınç 1.500 bara çıkarılana kadar sürekli azalmıştır. Partikül büyüklüğü 5 döngüden sonra daha az azalmış ve 10-20 döngü arasında değişmemiştir.

Her iki öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon teknikleri süspansiyon halinde yapılır, çoğunlukla süspansiyon ortamı sudur, ancak yağlar veya polietilen glikol (PEG) de kullanılabilir (59, 104). Organik çözücü maddelerden kaçınma imkânı, bu teknikleri çevre dostu yapmıştır (83). Su varlığı da içeriği amorf materyal oluşumuna karşı korur, çünkü su moleküler hareketliliği artırır ve camsı geçiş sıcaklığını düşürür (96). Öğütmeden sonra ilacın kristal bir yapısı vardır ancak polimorfik değişiklikler mümkündür (86, 105) . Yüksek basınçlı homojenizasyonda ise kristal özelliği koruma zorlaşır, ancak aynı zamanda suyun varlığı ilaç kristallerini stabilize eder (84, 86, 96).

Kombine Teknolojiler

Kombine teknolojiler tek tek her bir tekniğe ait olumsuzlukların üstesinden gelebilmektedir. Bu teknolojiler ön işlem basamağını YH gibi yüksek bir enerji

basamağı ile bütünleştiren kombinasyon teknikleridir. Günümüzde, yukarıdan aşağıya yöntemler, bir ön-muamele olarak önce kullanılmış daha sonra homojen hale getirebilmek için yukarıdan-aşağı yöntemleri izlenmiştir. Örnek olarak *NanoEdge®54* (mikrokristalizasyon, ardından YH), H 69 ('*cavi-precipitation*' olarak da adlandırılan mikroçöktürme ardından YH) ve kombinasyon teknolojisi (öğütme ve ardından YH) yöntemleri verilebilir. Nanokristaller sıvı şekilde stabil olmadıkları için genellikle katı şekile püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma yöntemleri ile dönüştürülürler. Bu iki yöntem ve YH tekniklerinin birlikte kullanıldığı kombine teknolojiler mevcuttur; H42 (püskürterek kurutma ardından YH) ve H42 (dondurarak kurutma ardından YH) (73). Baxter International Inc. tarafından geliştirilen kombine teknoloji *NanoEdge®* olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntemde çöktürme basamağını yüksek enerji basamağı takip etmektedir. İkinci enerji ekleme basamağı çöktürme sonrası kristal büyümesi ve agregasyonu önlemekte, amorf ve yarı stabil kristal formu kristal forma dönüştürmektedir. Ayrıca ilk basamaktan sonra kristaller ufalanabildiğinden daha sonraki basamak daha hızlı ve etkili olur. Çöktürme ve YH tekniği ile 10-hidroksikamptotesin nanosüspansiyonları ve nitrendipin nanokristalleri hazırlanmıştır (106, 107) . Burada ilk basamakta mikro çöktürme kullanılarak homojenizasyon için gerekli enerjinin azaldığı ve işlemin kolaylaştığı tespit edilmiştir. Homojenizasyon işlemi yüzey etkin maddelerin nanokristal yüzeyine adsorbe olmasına yardımcı olarak nanosüspansiyonun kararlılığını artırmaktadır. Diğer bir kombinasyon metodu ise eriterek emülsülfikasyon-YH işlemidir. Bu yöntem ile orlistat nanosüspansiyonları hazırlanmıştır (108).

SmartCrystal® teknolojisi ikinci kuşak teknoloji olarak bilinmektedir. Birden fazla teknoloji yerine bir seri teknolojinin bir arada kullanılmasıdır. Bu teknolojiye ön işlem ve sonrasındaki ana işlem yüksek basınçlı homojenizasyon, püskürterek kurutma-YH, çöktürme-YH, liyofilizasyon-YH, öğütme-YH kombinasyonlarını içerir. Bu yöntemler daha hızlı üretim işlemi, daha küçük nanokristaller ve artırılmış kararlılık sağlar (109). Tablo 2.4.'de FDA tarafından onaylanmış ticari preparatlar ve hangi yöntem ile hazırlandıkları verilmiştir. Öğütme, çöktürme ve YH yöntemlerinin üstünlük ve sakıncaları Tablo 2.5.'de verilmiştir

Tablo 2.4. Nanokristal Teknolojisi ile üretilmiş FDA tarafından onaylanmış piyasadaki ilaçlar (110-112).

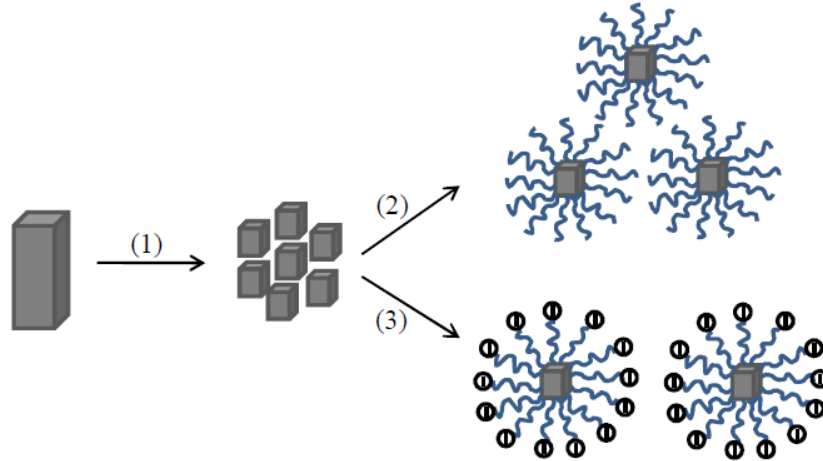
Ürün Adı	Firma	Etkin Madde	Kullanılan Yöntem	Uygulama Yolu	Terapötik Yararı	Kabul tarihi
Emend®	Merck	Aprepitant	Yaş öğütme	Oral	Artırılmış biyoyararlanım, yiyecek etkisinin önlenmesi	2003
Invega® Sustenna®	Janssen	Paliperidon palmitat	Yaş öğütme	İntramusküler enjeksiyon	Uzatılmış etki için tablet şeklinde uzatılmış salım için yeniden formülasyon	2009
Megace® ES	Strativa Pharm.	PAR Megestrol asetat	Yaş öğütme	Oral	Artırılmış biyoyararlanım, yiyecek etkisinin önlenmesi	2005
Rapamune®	Pfizer/Wyeth	Sirolimus	Yaş öğütme	Oral	Çözeltiden yeniden formülasyon, yüksek biyoyararlanım, uzatılmış saklama süresi	2000
Tricor®	Abbot/Abbvie	Fenofibrat	Yaş öğütme	Oral	Artırılmış biyoyararlanım, yiyecek etkisinin önlenmesi	2004
Trilide®	Skye Pharma/Shinogi	Fenofibrat	YH	Oral	Artırılmış biyoyararlanım, yiyecek etkisinin önlenmesi	2005

Tablo 2.5. Nanokristal teknolojisi üretim yöntemlerinin üstünlükleri ve sakıncaları (44, 85).

Yöntem	Üstünlükleri	Sakıncaları
Çöktürme	İyi disperse olmuş ilaç İstenen büyüklüğün en iyi şekilde kontrolü Düşük enerjili teknik	Partikül büyümesinin devam etmesi Organik çözücü artığı Her koşulda uygulanamaz belirli özellikteki ilaçlara uygulanabilir (örneğin; en az bir çözücüde çözünen maddeler) Stabilize edilmesi gerekir
Öğütme	Düşük enerjili teknik Piyasada FDA tarafından onaylanmış 4 ürün olması	Öğütme ortamının kalıntısı Yavaş bir işlem olması (günlerce sürebilir) Stabilize edilmesi gerekir Büyük hacimler için öğütme haznesinin boyutları nedeniyle uygun olmaması
YH	Her koşulda uygulanabilir Büyük hacimde üretimde sorun yok Hızlı Susuz üretim mümkün	Yüksek enerji gerektirir Deneyim gerektirir

2.3.2. Nanosüspansiyonların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitesi

Nanokristallerin uzun bir dönem kararlılığa sahip olmaları en önemli özelliklerinden biridir. Yüksek yüzey enerjisi nanokristallerde agregat oluşmasına ve partikül büyümesine neden olmaktadır. Agregasyonu önlemek amacı ile formülasyonlara stabilizanlar eklenmektedir. Stabilizanlar partikül büyüklüğünün küçültülmesi ve nanosüspansiyonların stabilitesinde önemli bir rol oynarlar. Stabilizanlar partikül yüzeyine kendiliğinden adsorplanır ve yüzeyini kaplar. Bu şekilde; partiküllerin yüzeyler arası gerilimi ve sistemin serbest enerjisi azalır, hidrofobik partiküller etrafında yoğun bir hidrofilik tabaka oluşturarak partiküller arasında sterik engel ve güçlü itme oluştururlar (sterik stabilizasyon). Eğer stabilizanların iyonize olabilen grupları mevcut ise partikül yüzeyini yükleyerek itici kuvveti artırır (elektrostatik stabilizasyon). Ayrıca elektrostatik ve sterik stabilizasyonu birlikte sağlarlar. Genellikle nanosüspansiyon kombinasyonlarında stabilizan olarak polimerler ve yüzey etkin maddeler ve bunların kombinasyonu kullanılır (45, 49, 113, 114). Stabilizanların partikül küçülmesindeki etki mekanizmaları Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Stabilizanların partikül küçülmesindeki (1) etki mekanizması; Sterik stabilizasyon (2), elektrostatik stabilizasyon (3) (45).

Bir nanosüspansiyonun stabilitesini öğütme enerjisinin şiddeti, etkin madde miktarı, bilye büyüklüğü, logP, ilacın morfolojisi, erime noktası, yoğunluk,

çözünürlük gibi yöntem ve etkin maddeye ait özellikler etkilemektedir (88, 113, 115, 116). Bununla birlikte stabilizan seçimi çoğunlukla deneysel olarak belirleniyor gibi görünse de stabilizanların hidrofobik yüzeylere ilgisi olduğu bilinmektedir. İlacın hidrofobik olması stabilizan seçiminde kritik bir noktayı oluşturmaktadır (88). Fiziksel stabilite için iyonik yüzey etkin maddeler, non-iyonik yüzey etkin maddeler veya kopolimerler kullanılmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla sodyum dodesil sülfat (SDS), lesitin, dokusat sodyum, pluronik®, tween 80, PEG, polivinil alkol (PVA), polivinil pirolidon (PVP), hidroksipropil selüloz (HPC) ve hidroksipropil metilselüloz (HPMC) gibi selüloz polimerleri kullanılmaktadır (117).

Nanokristal formülasyonlarının yapısında hidrofilik omurga zinciri içeren PVP, PVA, HPC, HPMC ve metil selüloz (MC) kullanılmaktadır. Bu polimerler partikül yüzeyine hidrofilik bir sınır tabakası oluşturacak şekilde hidrojen bağları ile adsorblanabilir. Douroumis ve ark. (118) yardımcı çözücü tekniğini kullanarak karbamazepin'in farklı stabilizanlar ile stabilizasyonunu hedeflemiştir. Selüloz eterler metoksi ve hidroksipropoksi (MC ve HPMC) gibi yüksek süstitisyon derecesine sahiptir. İlacın hidrojen bağlarına bağlanarak kristal büyümesi kontrol edilir. Nanosüspansiyonun stabilitesi süstitisyon derecesine bağlıdır. PVP her bir molekülde karbonil grubuna bağlı bir hidrojen bağına sahip olması sonucu zayıf kristal inhibisyonu göstermesi nedeniyle ilaç polimeri olarak daha az tercih edilir. Ancak diğer bir çalışmada polar fonksiyonel grup içermeyen hidrofobik ilaç yüzeyleri için HPC ve PVP'nin fiziksel adsorpsiyon ve sterik stabilizasyon için ideal oldukları belirtilmektedir. Hidrofobik ve hidrofilik zincirlerden oluşan amfifilik blok polimerleri homopolimerlere göre stabilizan olarak daha umut vericidir. Hidrofobik parçaları partikülün yüzeyine hidrofobik etkileşimler ile adsorbe olurlar. Hidrofilik parçalar ise partikülü sararak sterik engel oluşturur, partikül agregasyonu ve büyümeyi önlerler. En sık kullanılan bu polimerler; poloksamer 407 (Pluronic F 127, P 127) ve poloksamer 188 (Pluronic F 68, F68)'dir (45). Polimerlerin morfolojik yapısı, fonksiyonel grupları, hidrofilik/hidrofobik oranı, molekül ağırlığı gibi faktörler nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ve stabiliteye etki eder (119). Kopolimerlerin hidrofobik kısmı polimerin ilaç partikülüne adsorpsiyon ve difüzyonuna itici güç oluşturur. Polimerlerin yüksek hidrofobisiteleri daha hızlı difüzyon, güçlü adsorpsiyon, desorpsiyon için daha fazla zaman sağlar. Hidrofilik

polimerler (PVP gibi) zayıf çözünürlükteki ilaçlar için amfifilik polimerlere ve yüzey etkin maddelere göre daha zayıf stabilizanlardır. Çünkü hidrofobik ilaçlara adsorbe olmak için termodinamik itici güçten yoksundurlar (120). Yüzey etkin maddeler daha küçük moleküller olup polimerler ile karşılaştırıldıklarında partikül yüzeyinde hızlı difüzyon ve adsorpsiyon özelliğine sahiptir. Bu nedenle yüzey etkin maddeler amfifilik polimerler gibi yüzeyler arası gerilimi düşürebilir ve nanopartiküllerin ıslanabilirliğini artırır (120). İyonik polimerler ve yüzey etkin maddeler partikül yüzeyinde adsorbe olarak elektrostatik itici kuvvet ile yüksek enerji engeli oluştururlar ve sonuç olarak iyi bir stabilizasyon sağlanır. Örneğin SDS partiküllere hidrokarbon kuyruklar ile bağlanır ve anyonik sülfat grubu dışarda kalır.

Nanokristal hazırlama ve stabilizasyonunda polimer-yüzey etkin madde, polimer-polimer kombinasyonu sinerjistik etki için sıklıkla kullanılmaktadır. Griseofulvin'in öğütme yöntemi ile hazırlanan nanosüspansiyonlarında polimer ve yüzey etkin madde kombinasyonunda bu stabilizanların ayrı ayrı kullanılması ile daha iyi partikül büyüklüğü dağılımı ve daha küçük partiküller elde edilmiştir (121). Formülasyonlara stabilizanlar 1:20 oranından 20:1 (stabilizan: etkin madde, a:a) oranına kadar eklenebilmektedir (112).

Kimyasal olarak stabil olmayan ilaçlar için nanosüspansiyonlar in vitro ve in vivo olarak iyi bir kimyasal stabilite sağlar. Bu ilaçların suya, hidrojen iyonlarına, oksijen ve vücuttaki çeşitli enzimlere duyarlı fonksiyonel gruplar içermeleri nedeniyle molekülün degradasyonu kolaydır (49). Bu kimyasal bileşiklerin nanosüspansiyon olarak formüle edilmesi degradasyonun azaltılması ve kimyasal stabilitesinin artırılması için bir uygun bir yoldur (117, 122).

2.3.3. Nanosüspansiyonların Katı Şekle (Nanokristal) Dönüştürülmesi

İlaçların farklı teknikler ile nanonizasyonu sonucu nanosüspansiyon elde edilir. Ancak bu farmasötik şeklin pediatri ve geriatri gibi özel kullanım dışında doğrudan kullanımı yaygın değildir. Birçok durumda kuru dozaj şekilleri özellikle oral kullanım için tercih edilmektedir. Bu nedenle nanosüspansiyonlar kristal (nanokristal) veya amorf katı (nanomorf) şekillere dönüştürülür. Bu amaçla püskürterek kurutma, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), pelletleme, granülasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır (85). En sık kullanılan yöntemler ise püskürterek kurutma ve

liyofilizasyon işlemidir. Eğer kurutma işlemi uygun yapılmaz ise nanokristaller güçlü agregatlar oluşturabilir ve çözünme ile tekrar disperse olmayabilirler. Bu nedenle nanokristallerin yararları azalabilir ve inaktif olabilirler (85, 112, 123, 124). Kurutma işlemi boyunca evaporasyon veya sublimasyon ile su uzaklaştırılır ve nanokristaller etrafındaki stabilizan zincirlerinin hareketi dehidrasyon veya kısmi kristalizasyon nedeniyle azalır. Stabilizanlarla sterik itmenin durması ve polimer zincirlerinin partiküllere adsorbe olmasına bağlı olarak birbirlerine dolaşırlar, partikül ayrımı engellenir ve agregasyon olur. Etkin maddenin özellikleri, dispersiyon ortamı, stabilizanlar nanokristallerin yeniden disperse olmasını etkileyen faktörlerdir (123, 125).

Püskürterek kurutma kolay ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Bu nedenle endüstriyel üretim için uygundur. Bu yöntem yüksek basınçlı homojenizasyon ile üretilmiş nanosüspansiyonlar ve suda çözünebilir matriks polimerler (PVP, PVA), şekerler (sükroz), şeker alkoller (mannitol ve sorbitol) içindeki çözeltilere uygulanmaktadır. İlaç yükleme kapasitesi yüzey etkin madde konsantrasyonuna göre değişmektedir. Nanokristallerin matriks içinde sabit kalması bu yöntemin avantajıdır. Böylece fiziksel temasları engellenmiş agregasyon ve Ostwald olgunlaşması minimize edilmiştir (85).

Suyun uzaklaştırılmasında kullanılan bir diğer yöntem dondurarak kurutma yöntemidir. Bu yöntem buz kristallerinin çekirdeklenme ve yayılması (dondurma) ve daha sonra süblimasyon işleminden oluşmaktadır. Dondurarak kurutma işlemi sırasında sıcaklık gradyanı oluşur ve en düşük sıcaklıkta çekirdeklenme başlar (126). Dondurarak kurutma daha kompleks ve pahalı bir yöntemdir. Ürün işlem parametrelerinden yüksek düzeyde etkilenebilir (85). Dondurarak kuruma işleminde düşük etkin madde konsantrasyonu ve hızlı dondurma tekrar dağılıbilirlik için yararlıdır (123). Dondurarak kurutma yönteminde genellikle agregat oluşumunu önlemek için kriyoprotektanlar eklenmektedir. Bunlar genellikle mannitol sükroz, laktoz gibi suda çözünebilir şekerlerdir.

Aprepitant ile yapılan bir çalışmada iki farklı selülozik stabilizan (pharmacoat 603 (P 603) ve HPC-SSL) ve SDS kullanılarak partikül büyüklükleri (312 nm ve 395 nm olan) benzer nanokristaller yaş öğütme yöntemi ile hazırlanmış mannitol ve sükroz ilave edilerek kurutulmuştur ve oluşan aglomeratları yeniden dağılıbilirlik açısından

değerlendirilmiştir. P 603 ile hazırlanan formülasyondan ideale yakın yeniden dağılılabilirlik elde edilmiştir. HPC-SSL ile stabilize edilmiş olanlarda ise seyreltici madde belirgin bir etki göstermiştir. Taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri incelendiğinde dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma işlemleri değerlendirildiğinde püskürterek kurutma işleminin daha üstün olduğu ve işlem sonucunda daha küçük mikron boyutunda aglomeratlar oluştuğu görülmüştür (127).

2.3.4. Nanokristal Formülasyonlarının Uygulama Yolları

Nanokristal formülasyonları oral, parenteral, pulmoner, dermal, oftalmik yollarla uygulanabildiği gibi hedeflendirilmiş ilaç olarak da kullanımı vardır.

Oral Uygulama Yolu

Bilindiği gibi oral yol kolay uygulanabilir, ucuz ve güvenli olması gibi nedenlerden dolayı en önemli ve ilk tercih edilen ilaç uygulama yoludur. Düşük çözünürlükteki ilaçlarda düşük veya değişken absorpsiyon, gecikmiş etki, açlık ve tokluk koşullarında değişen biyoyararlanım ve yüksek oral doz uygulaması gibi çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Düşük çözünürlükteki ilaçların nanokristallerinin hazırlanması ile bu sorunların çözülmesinde büyük üstünlükler sağlanmaktadır. Ayrıca bu gün ilaç pazarında yer alan nanokristal formülasyonlarının birçoğu oral uygulama içindir. İlaç nanokristalleri ilacın absorpsiyonunu iki şekilde artırmaya yardımcı olmaktadır; ilacın çözünürlük ve çözünmesi ile bağırsak duvarında mukoadhezyonu artırarak. Absorpsiyonda çözünmenin hız kısıtlayıcı basamak olduğu ilaçlarda, oral biyoyararlanım partikül büyüklüğünün fonksiyonu olarak tanımlanabilir.

Daha küçük partiküller ile daha yüksek C_{maks} ve orantısal olarak artmış EAA elde edildiği, Jinno ve ark. (24) düşük çözünürlükteki silastazol ile yaptığı çalışmada partikül büyüklüğü ve çözünme hızı arasındaki ilişki ve in vivo etkileri açıkça gösterilmiştir. Nanokristal formülasyonları ilacın EAA ve C_{maks} 'nı artırırken, t_{maks} 'ı düşürmektedir (128). Piyasadaki danazol mikrosüspansiyonu ile (200 mg, 10 μ m) ile danazol nanosüspansiyonu karşılaştırıldığında (200 mg, 169 nm) mutlak biyoyararlanım %5,1'den %82,3'e yükselmiş, t_{maks} düşerken C_{maks} değeri 15 kat artmıştır (129). Yine oral olarak uygulanan nitredipinin ve fenofibratin nanokristal formülasyonlarının hazırlanması sonucu C_{maks} ve EAA değerleri artmıştır (107, 130).

Nanokristallerin ilaç absorpsiyonunda bir diğer etkisi ise gastrointestinal sistem (GİS) mukozasına mukoadezyonu olup oral biyoyararlanımı olumlu yönde etkilemesidir. GİS'deki yapışkanlıkları sayesinde yüksek konsantrasyon gradyanı ve GİS'de temas ve kalış süresinin uzaması sağlanmaktadır. Nanopartiküllerin mukozaya yapışması; partiküllerin ve mukus yüzeyleri arasındaki elektrostatik çekim kuvvetlerinden kaynaklı elektrostatik teori, partiküller ve mukus arasındaki hidrojen ve *Van der Waals* bağlarından kaynaklı adsorpsiyon teorisi, difüzyon teorisi ve nanopartiküllerin düzensiz mukus içinde alıkonmasıyla açıklanan tutunma teorisi gibi mekanizmalar ile açıklanabilmektedir. Nanokristallerin mukoadezyonlarından faylanmak üzere araştırmacılar tarafından nanokristal ilaçların yüzeyleri katyonik polimerler ile değiştirilerek veya nanokristallerin mukoadezif polimer içine hapsedilerek mukozaya ile nanokristaller arasındaki yapışkanlık artırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca mukozaya yapışan polimerler sayesinde ilacın degradasyonu da önlenabilir (128). Buparvakon'un oral uygulamasına olanak verecek nanosüspansiyonunun mukoadezif hidrojel olarak hazırlanarak mukozadaki tutunması artırılmış ve daha stabil formülasyonları hazırlanmıştır (51, 131).

Nanokristallerin oral uygulamadaki bir diğer üstünlüğü ise hızlı etki başlangıcı sağlamasıdır. Naproksenin nanosüspansiyon halinde hazırlanması sonucu etkinin daha hızlı başladığı ve mide iritasyonunun azaldığı gösterilmiştir (92).

Nanokristal formülasyonları ile açlık ve tokluk koşullarının biyoeşdeğer olmama sorunu giderilmektedir. Az çözünen ilaçlar yemeklerle birlikte alındığında mide sıvı hacminin artması, mide boşalmanın yavaşlaması, safra salgısının artması, mide pH'sının artması (asidik ilaçlar için), kan akımının artması gibi nedenlerden dolayı ilacın GİS'de çözünmesi artmakta ve biyoyararlanımı artmaktadır (24). Nanokristal formülasyonları ile partikül büyüklüğü küçültülerek çözünme hızı açlık koşullarında da artırılarak açlık ve tokluk koşulları arasındaki biyoyararlanım farkı en aza indirilmektedir. Köpeklerde silastazolün nanokristal formülasyonları ile mikronize süspansiyonu karşılaştırılmış ve açlık tokluk koşullarındaki EAA, C_{maks} , t_{maks} değerleri arasındaki fark azalmıştır (24). Yine köpeklerde Emend®'in etkin maddesi olan aprepitantın 2 mg/kg dozda nanokristal dispersiyonlarında yiyecek etkisi ortadan kaldırılmıştır (132).

Absorpsiyon penceresi GİS'in üst bölgeleri olan ilaçların hızlı çözünmesi ile bu ilaçların absorpsiyon bölgesinde gözlenen çözünme sorunlarında yararlı bir yaklaşımdır. Aprepitant etkin maddesinin absorpsiyon penceresi GİS'in üst bölgeleridir (132). Bölgesel absorpsiyon çalışmaları fenofibrat için de benzer sonuçları vermiştir. Nanosüspansiyon olarak formüle edilen fenofibrat doğrudan proksimal ve distal bağırsağa verildiğinde oral nanosüspansiyona göre relatif biyoyararlanımı %100'dür. Ancak fenofibrat süspansiyonu kolona verildiğinde relatif biyoyararlanım %32'dir. Nanoboyutlardaki fenofibrat absorpsiyon bölgesi olan intestinal kanalın üst kısımlarında hızla çözünmektedir. Mikronize fenofibrat ise, çok yavaş çözündüğü için absorpsiyon penceresini kaçırdığından yeterli miktarda absorbe olamamaktadır (133).

Parenteral Uygulama Yolu

Düşük çözünürlükteki ilaçların parenteral yol ile alınabilmesi için çözünme teknolojilerinin kullanılması gerekmektedir. Bu ilaçların en azından enjeksiyon hacminde (1-10 mL) veya infüzyon hacimlerinde çözünmüş şekilde alınmaları gerekmektedir. Bir çok durumda parenteral enjeksiyon; hızlı etki, hedeflenmiş etki, ilk geçiş etkisinde kaçınma gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedirler. Bu yol ile ilaç alımına ait bazı sakıncalar da mevcuttur. Örneğin ürün steril olmalı, toksik etki alerjik etki gibi biyolojik sorunlara neden olmamalıdır. İntravenöz enjeksiyon için 5 µm'den daha büyük partiküller sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Çünkü kapiller damarların en küçüğü 5 µm olup daha büyük partiküller kapiller blokaj veya emboliye neden olabilir. Bu nedenle mikron altında partiküllerin üretimi parenteral yol için önemlidir (49).

Geleneksel olarak zayıf çözünürlükteki ilaçların çözünürlük sorunları yardımcı çözücü, yüzey etkin madde, lipozomlar veya siklodekstrinler gibi yöntemlerle giderilmeye çalışılmaktadır. Ancak çoğu zaman toksik etki veya yüksek hacimde çözücü ihtiyacı gibi durumlar söz konusu olmaktadır (85). Enjeksiyonluk preparatların çözünürlük sorununu çözmek için kullanılan Cremophor® EL ile anaflaktik şok, siklodekstrinler ile nefrotoksisite karşılaşılan yan etkilere örnek olarak verilebilir (134, 135). Nanosüspansiyonlar yalnızca ilaç ve az miktarda stabilizan veya intravenöz uygulama için kabul edilmiş yüzey etkin madde içerirler. Nanosüspansiyonlar içerisinde çözünmüş ilaç bulunduran formülasyonlara göre bazı üstünlüklere sahiptir.

Düşük çözünürlükteki ilaçların uygulamayı takiben birlikte çökme riski vardır. Bu risk dayanıklı nanosüspansiyonlar ile ortadan kaldırılabilir. Enjeksiyonlardaki yüksek miktardaki çözücüler yan etkilere neden olabilir. Nanosüspansiyonlarda ise en düşük miktarda ve güvenli iyi tolere edilebilir stabilizanlar kullanılmaktadır. Diğer enjeksiyonluk preparatlara göre nanosüspansiyonlar düşük viskozitede yüksek konsantrasyonlu sistemlerdir. Nanosüspansiyonların viskozitesi ilaç konsantrasyonuna ve taşıyıcının içeriğine bağlıdır (110). Nanosüspansiyonlar parenteral yol için oldukça güvenli ve enjekte edilebilir ürünlerdir. Örneğin Taksol ve paklitaksel nanosüspansiyonu karşılaştırıldığında daha yüksek LD₅₀ (100 mg/kg) elde edilmiş ve alerjik reaksiyon gözlenmemiştir (136). Sporanox® IV isimli itrakanazol içeren ürün 10 mg/kg dozda belirgin akut toksisite gösterir ve sıçanlara bolus olarak verildiğinde LD₅₀ değeri 40 mg/kg'dan düşüktür. İtrakanazol nanosüspansiyonu ise 320 mg/kg'a kadar herhangi bir mortalite olmadan verilebilmiştir (134, 137). Nimodipinin nanosüspansiyonu piyasada bulunan etanollü çözeltisi ile karşılaştırıldığında daha iyi tolere edilebilir olduğu ve sıçanlarda daha az iritasyon ve flebit riski gösterilmiştir (138). Sterilite enjeksiyonluk preparatlar için önemli bir gerekliliktir. Steril nanosüspansiyonlar steril üretim veya steril filtrasyon ile mümkün olmaktadır (139, 140). Ayrıca nanosüspansiyonlar halinde veya liyofilize toz halinde sunulabilirler (110). 2009'da ilk parenteral nanosüspansiyon piyasaya verilmiştir. Paliperidon palmitat içeren ürün *NanoCrystal*® teknolojisi ile hazırlanmış kullanıma hazır şırıngadır. Yüksek ilaç yükleme ve düşük viskoziteye sahip olan ürün sayesinde düşük enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon bölgesinde daha az ağrı oluşturmasıyla hasta uyuncu sağlanmıştır (110).

Dermal ve Mukozal Uygulama Yolu

Nanokristaller membranlardan penetrasyon, artırılmış permeasyon ve biyoadhezyon gibi özellikleri artırır. Düşük çözünürlükteki antioksidanlar apigenin, ve hesperidin deri koruma ve yaşlanma karşıtı olarak nanosüspansiyonlarda kullanılmaktadır (141, 142). Nanosüspansiyonlar kolayca su bazlı dermal kremler ve yağ/su losyonlarıyla kullanılabilir. İlk ürün Rutin 2007 yılında piyasaya çıkmıştır. Nanokristaller zayıf çözünürlükteki etkin maddenin su fazı içindeki çözünürlüğünü artırır, buna bağlı olarak formülasyon ile deri arasında konsantrasyon

gradyanı oluşur ve mikronize tozlara göre penetrasyon artar (142). Aynı prensip ile farmasötik dermal formülasyonlar üretilebilmektedir. Diklofenak sodyumun dermal kullanımı için geliştirilen nanosüspansiyonunda deriden geçirgenlik hızının, *Yucatan micropig* (YMP) ile test edildiğinde kontrole göre 3,8 kat arttığı gösterilmiştir (143). Lidokain bazın kombine teknolojiler ile nanokristalleri hazırlanarak uzatılmış salım sağlayan formülasyonları hazırlanmıştır (144). Meloksikamın asit-baz nötralizasyon bazlı çöktürme yöntemi ile hazırlanan nanokristallerinde kristal yapısı artmış ve in vitro ve in vivo penetrasyon artmıştır (145).

Oküler Uygulama Yolu

Düşük çözünürlükteki ilaçların oküler salımı için süspansiyonlar ve merhemler geliştirilmiştir. Her iki dozaj şekli relatif yüksek doz, etki yerinde uzun süre kalış gibi üstünlüklere sahiptir. Gerçek performanslarında ise lakrimal sıvılardaki çözünürlük sınırlayıcı faktördür. Lakrimal sıvılarda intrinsik çözünürlüğü düşük ilaçların etki bölgesindeki konsantrasyonu da düşüktür. Ancak bu ilaçlar nanoboyutlu kristaller olarak hazırlandığında doygunluk çözünürlüğü artar. Nanokristallerin adeziv özellikleriyle ilacın lakrimal sıvılardan uzaklaştırılması azaldığı gibi uzatılmış salıma da yardımcı olur. Flubiprofen ve ibuprofenin polimerik (Eudragit RS 100 ve Eudragit RL 100) nanopartikül süspansiyonları piyasa preparatlarına göre daha iyi in vivo performans göstermiş ve 24 saat boyunca salım sağlanabilmiştir (146, 147).

Pulmoner Uygulama Yolu

Nanosüspansiyonlar düşük çözünürlükteki ilaçların pulmoner yol ile alımı için önem arz etmektedir. Bu ilaçların bazıları mikropartikül şeklinde aerosol içinde verilerek pulmoner uygulama için nebulize edilebilirler. Ancak mikropartiküllerin ağız ve farenkste birikmesi, akciğerlerdeki siliaların hareketiyle ilacın klerensi gibi nedenlerle ilaç kaybı yaşanmakta ve etki bölgesindeki ilaç konsantrasyonu düşük olmaktadır. Bu sorunları çözmek için nanosüspansiyonlar hazırlanmaktadır (49). Nanokristaller mikronize kristallere göre daha yüksek çözünme hızı gösterirler. Aerosol damlacıkları akciğerde biriktiğinde akciğer yüzeyine daha fazla dağılacak, özellikle yüzey etkin maddelerle stabilize edilen nanokristaller çok daha iyi dağılacaktır. Müller ve ark. (148) tarafından budesonidin nanosüspansiyonu

hazırlanmıştır. Pari Boy nebulizatör ile nebulizasyonu sonunda partikül büyüklüğü dağılımı değişmemiştir. Flutikazon nanosüspansiyonları pulmoner aerosol ile farelere verilmiş ve doz-bağımlı birikme gösterilmiştir. Sonuçlar tekrar edilebilir bulunmuştur (149).

Hedeflendirilmiş İlaç Salımı

İlaçların özgül bölgelere nanopartiküllerle hedeflendirilmesi terapötik ve ekonomik nedenlerden dolayı sürekli artmaktadır. Nanosüspansiyonlar yüzey özellikleri ve iyi in vivo davranışları nedeniyle bu alanda kullanılabilirler (21). Nanokristallerin ölçek büyötmeye kolay olanak vermeleri nedeniyle ticari olarak üretilebilirler. Çeşitli yüzey kaplamaları kullanarak gizlenmiş nanosüspansiyon mühendisliği aktif ve pasif hedeflendirme için ilaç hedeflendirmenin geleceğidir. Kayser ve ark. (131), tarafından bupravakon'un yüzeyi modifiye nanosüspansiyonları hazırlanarak kristosporidiyum parvuma hedeflendirilmiştir. Çıplak ve kaplı nevirapin nanosüspansiyonları kullanılarak HIV viral depolarına hedeflendirme yapılmıştır (150).

2.3.5. Nanokristal Formülasyonlarının İn Vivo Performansı

İlaç absorpsiyonu doğrudan çözünürlük ve permeabilite ile ilgili olduğu gibi dolaylı olarak molekülün lipofilik olmaması ile ilgilidir. İlacın çözünmesini mide bağırsak kanalından emilimi takip etmektedir. Çözünmüş madde konsantrasyondaki artış nedeni ile permeasyonun artması yanında formülasyonda yer alan stabilizanlar epitel doku hücreleri ile etkileşime girerek permeabiliteyi artırmaktadır(151).

Li ve ark., ilaçların fizikokimyasal özelliklerinin oral biyoyararlanıma etkisini araştırmıştır. Yaptıkları çalışmada beş farklı etkin madde ve bunların nanokristalleri aynı stabilizan ve yöntem ile hazırlanmıştır (poloksamer 188 ile yüksek basınçlı homojenizatörde). Partikül büyüklüğü tüm ilaçlarda yaklaşık 430 ± 30 nm ölçölmüştür. Sıçanlarda yapılan çalışmada EAA değerleri mikrosüspansiyonlara göre 1,4-1,7 kat daha yüksek hesaplanmıştır. Erime noktası, log P ve polar yüzey alanının ilaç absorpsiyonunu etkilediği belirtilmiştir. Düşük erime noktası, log P değeri yaklaşık 5 ve polar yüzey alanı değeri 50 ile 60 arasında olan ilaçların, aynı boyuttaki

nanokristallere göre daha yüksek absorpsiyona sahip olduğu sonucuna varılmıştır (151, 152).

Kumar ve ark. (153) tarafından 2 dakika öğütülerek (750 nm) ve 75 dakika öğütülerek hazırlanan (280 nm) itrakanazol nanokristallerinde yapılan bir çalışmada C_{maks} ve EAA_{0-24} değerlerinde sırasıyla 2,8 ve 20 katlık bir artış görülmüştür.

Oral olarak alınan ve pulmoner olarak uygulamak üzere hazırlanan nanokristal kurkumine ait farmakokinetik parametrelerin karşılaştırıldığı çalışmada plazma konsantrasyonunun pulmoner yolda daha yüksek olduğu ve t_{maks} 'a daha kısa sürede ulaşıldığı rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular çözünürlük artışına bağlanmaktadır. Pulmoner uygulamadan altı saat sonra akciğerlerde diğer dokulara göre ilaç konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur; akciğer (824,27 µg/g), karaciğer (3,06 µg/g), böbrek (6,10 µg/g), kalp (4,23 µg/g), dalak (13,77 µg/g) ve beyin (0,53 µg/g). Sıçanlarda yapılan biyodağılım çalışmasında pulmoner yolla alınan nanokristal kurkuminin akciğerlerde diğer dokulara göre konsantrasyon artışı ile sistemik toksisiteyi azalttığı ve terapötik etkiyi artırdığı gösterilmiştir (154). Nanokristal hazırlamada kullanılan stabilizanların bazıları (E vitamini TPGS (D-alfa-tokoperil-polietilen glikol 1000 süksinat), poloksamerler, polisorbitatlar) ayrıca P-gp inhibitörleridir. TPGS içindeki PEG zincirleri (200 ve 6000 Da) inhibitör aktiviteyi etkileyebilmektedir ve en iyi inhibisyon 1.100-1.500 Da uzunluğuna sahip PEG zincirlerinde gözlenmiştir. Bazı durumlarda ilaç nanokristalleri hücreler tarafından içeri alınabilir. Bu durum kanser hücrelerine hedeflendirme amacı ile hazırlanan formülasyonlarda istenen bir durum olabileceği gibi öngörülme-yen farmakokinetik profilin oluşması gibi durumlarda ise istenmeyen bir durum olarak karşımıza çıkabilmektedir. Hücre içine alma hücre tipleri ve hücreler arası fagositotik / endositotik potansiyeli ve nanokristallerin boyutu, morfolojisi, stabilizan türü ve yükü gibi özelliklerine göre değişebilir (155, 156).

TPGS ile stabilize edilmiş paklitaksel nanokristallerinin P-gp'nin H460 kanseri hücrelerine aşırı ekspresyonuna bağlı ilaç direncini tersine çevirme kabiliyeti Gao ve ark. (157) tarafından değerlendirilmiştir. TPGS'nin stabilizan olarak kullanıldığı paklitaksel nanokristallerinde çalışılan hücrelerin ilaç direncini etkin bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Ancak terapötik etki, dirençli tümörlerde P-gp gibi çoklu ilaç rezistansı (MDR) ilişkili proteinlerin aşırı ekspresyonu ile sınırlandırılmaktadır. Bu

durum nano boyutlu maddelerin endositoz ile hücreye alınabileceğini göstermektedir. Fakat hücresel sitoplazma içindeki çözünmesiyle birlikte P-gp efflux sistemi ile dışarı tekrar pompalanabilir (156). Bu nedenle nanopartiküllerin endositozu ile P-gp aktivitesinin aynı anda düşürülmesi TPGS kaplı paklitaksel nanokristallerinde olduğu gibi terapötik etkiyi artırılabilir (157). Ancak bu durum serbest paklitaksel molekülleri ile TPGS çözeltisinin aynı anda verilmesi ile gerçekleşmezken TPGS kaplı nanokristaller olarak verildiğinde gerçekleşmektedir (158).

Liversidge ve Cundy (129) gonadotropin inhibitörü olan danazolun mutlak biyoyararlanımını mikrosüspansiyon halinde (200 mg, 10 μ m) $5,1 \pm 1,9$ tespit ederken, nanosüspansiyon (200 mg, 169 nm) halinde ise 16 kat daha yüksek biyoyararlanım $82,3 \pm 10,1$ tespit etmişlerdir. Ayrıca C_{maks} ve t_{maks} değerleri de 15 kat artmıştır. Nanosüspansiyon Amfoterisin B formülasyonunun oral uygulanmasını takiben sıçanlarda karaciğerdeki parazit sayısı büyük oranda azalmıştır, mikronize amfoterisinde ise iyileştirici etki gözlenmemiştir (159). Ayrıca nanokristal formülasyonlarının düşük çözünürlükteki ilaçların etkisini hızlı başlatmalarından bahsetmek mümkündür. Analjezik bir ilaç olan naproksenin nanosüspansiyonunda t_{maks} 'a 8 dakikada ulaşılırken öğütülmemiş naproksen uygulaması sonucu t_{maks} 33 dakikaya uzamaktadır (92). Repamid, lutein, bikalutamid gibi düşük çözünürlükte birçok ilaçta benzer sonuçlar elde edilmektedir (160-162). Simvastatin ve nitrendipin gibi birçok etkin maddenin nanokristallerinde de biyoyararlanım performansında artış gözlenmiştir. Nitrendipinde EAA'nın ticari preparata göre 10 kat arttığı saptanmıştır (107, 163, 164). Vitamin E TPGS nanosüspansiyonları uygulanan köpeklerde EAA ve C_{maks} değerlerinde önemli derecede artış gözlenmiştir. Partikül büyüklüğü 300 nm'den küçük nanokristal içeren nanosüspansiyonlarda 750 nm'den küçük nanokristallere göre plazma konsantrasyonundaki değişkenliğin daha düşük olduğu ortaya konmuştur (165).

Düşük çözünürlükteki birçok ilaçta açlık ve tokluk koşullarında biyoyararlanımda değişkenlikler ortaya çıkmaktadır. Nanokristal formülasyonlarında açlık koşullarında da artmış yüzey alanına bağlı olarak çözünme hızı hızlıdır. Böylelikle açlık ve tokluk absorpsiyonunda çözünürlük kaynaklı farklılıklar elimine edilmiş olur. Silastazolün köpeklerdeki açlık ve tokluk koşullarındaki farmakokinetik parametrelerdeki farklılık oranı düşük bulunmuştur (24). Fenofibrat etkin maddesinin

nanopartikül formülasyonlarında da plazma pik seviyesinin ve diğer farmakokinetik parametrelerin yiyecek etkisine uğramadığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (166).

2.4. İlaçların Membranlardan Geçiş Mekanizmaları

Oral yolla ilaç uygulanması güvenilirlik, ucuz olması ve hasta uyuncu sebebiyle en çok tercih edilen yoldur. Ancak oral olarak alınan ilaçların bağırsaklarda yeterli çözünürlük ve geçirgenliğe sahip olması gerekmektedir. Bağırsaklardan emilim oral biyoyararlanım için büyük bir engel teşkil etmektedir. İlaç geliştirme çalışmaları sırasında birçok denemenin başarısız olması sonucu ilaç keşfi çalışmalarında birçok şirket erken dönemde farmakokinetik ve toksisite değerlendirmesi yapmayı amaçlamaktadır. Zaman kısıtlaması ve çok sayıda kimyasal ve tarama testleri nedeniyle ilaçların biyolojik aktiviteleri ve biyofarmasötik özelliklerinin (çözünürlük, geçirgenlik/absorpsiyon, stabilite), farmakokinetik özelliklerinin in vitro biyolojik testler ile kantitatif ve kalitatif olarak değerlendirilmesi önemli hale gelmiştir. Bu nedenle ilaç endüstrisinde geçirgenlik ve absorpsiyonun tayin edilmesi amacıyla yüksek tahmin edilebilirliği olan yüksek kapasitede, düşük maliyette yöntemler araştırılmaktadır (167). Geçirgenlik çalışmaları ile ilacın mide bağırsak sistemindeki absorpsiyon bölgesinin belirlenmesinin yanında, ilacın bağırsak duvarından geçiş etkinliği de tayin edilmektedir. Bu yöntemler fizikokimyasal yöntemler (lipofiliklik ($\log P/\log D$), absorpsiyon potansiyeli, immobilize yapay membran kromatografisi, paralel yapay membran geçirgenlik tayini), in vitro yöntemler (hayvan dokusu temelli yöntemler, hücre temelli yöntemler), in situ yöntemler, in vivo yöntemler'den oluşmaktadır (39). Bir etkin maddenin geçirgenlik derecesinin belirlenmesinde doğrudan ve dolaylı ölçüm yöntemleri kullanılır. FDA'nın ilgili kılavuzunda da geçirgenlik tayini için insanlarda mutlak biyoyararlanım çalışmaları veya kütle denge çalışmaları ile absorbe olan etkin madde miktarının belirlenmesi veya bağırsak perfüzyon çalışmaları (insan veya hayvanlarda in vitro epitel hücre kültürü modeli ve in situ sıçan perfüzyon modeli) ile yapılması önerilmektedir. Bağırsaktan etkin maddenin mide bağırsak sisteminden geçirgenliğini tayin etmek için aşağıda önerilen yöntemler kullanılmaktadır (40).

- İnsanda in vivo perfüzyon çalışmaları

- Hayvanlarda in vivo veya in situ bağırsak perfüzyon çalışmaları
- İnsan veya hayvanlardan alınmış bağırsak dokuları kullanılarak in vitro permeasyon çalışmaları
- Epitel kültür hücrelerinin tekli tabakasında in vitro permeasyon çalışmaları

Kullanılan hayvan temelli yöntemlerin zamanla sakıncaları ortaya çıkmıştır. İnsan kaynaklı olmamaları, karmaşık sistemler olması, birkaç deneme ile sınırlı olması, birkaç dakika veya birkaç saat içinde tamamlanma gerekliliği, ilacın segmentler arasındaki kademeli dağılımı gibi nedenler araştırmacıları basit ve tekrarlanabilir olması, aynı anda birçok deneme yapılabilmesi hem apikal hem bazolateralinden örnekleme yapılabilmesi gibi üstünlükleri nedeniyle hücre kültürlerine yöneltmiştir (168).

2.4.1. GIS’de İlaç Absorpsiyonu

Gastrointestinal kanalda ince bağırsakların ana görevlerinden birisi absorpsiyon işlemidir. İntestinal epitel dokusu; enterositler (absorptif hücreler), endokrin, ekzokrin, paneth hücreleri, M hücreleri, tuft ve cup hücrelerinin heterojen popülasyonundan oluşmaktadır. Enterositler absorptif hücreler arasında en çok görülen hücrelerdir. Sıkı bağlar ile ayrılmış apikal ve bazolateral membranlara polarize olmuşlardır (168). Enterositler arasında epitelin sıklığından sorumlu olan bu bağlar sıkı kavşaklar (tight junctions) olarak adlandırılır. Enterositler arasındaki sıkı kavşaklar ve bağırsak epitelinin lipofilik yapısı ağız yoluyla verilen ilaçların emilimine karşı fiziksel bir engel oluşturur (169). Enterositler tarafından eksprese edilen aminopeptidazlar (aminopeptidaz N, P ve W), dipeptidil peptidaz IV, sitokrom P450 süperaillesinin izoenzimleri, esterazlar, fenol sülfotransferazlar ve UDP glukuroniltransferazlar gibi ilaç metabolize edici enzimler ise biyokimyasal bariyer oluşturur (170). İntestinal epitelden ilaç absorpsiyonunun büyük bir kısmı konsantrasyon gradyanı yönünde pasif difüzyonla gerçekleşebilir. Pasif difüzyon ise transselüler yol (enterositlerin hücre membranlarından) veya paraselüler yol (enterositler arasındaki sıkı kavşaklardan) ile gerçekleşir (167). Lipofilik bileşikler luminal sıvıdan intestinal epitelin membranına hızla dağılabilir ve temel olarak transselüler yol ile taşınırlar. Hidrofilik ilaçlar ve peptidler hücre membranlarına az

dağılırlar daha çok pararselüler yol ile taşınırlar (169). Pasif difüzyondan başka bazı besin maddeleri, vitaminler ve yapısal analogları intestinal epitelde yer alan özgül transporter/taşıyıcılar (*carrier*) ile taşınırlar (170-173). Mukozal hücrelerin sitoplazmasına giren bazı maddeler apikal eksorpsiyon (*efflux*) (taşıyıcı aracılı eksorpsiyon) olarak bilinen bir işlem ile tekrar intestinal lümene atılır. Apikal ilaç eksorpsiyonunu MDR ve çoklu ilaç rezistans ilişkili protein (MRP) olmak üzere iki taşıyıcı aile tarafından düzenlenir. MDR1 geni tarafından kodlanan P-gp apikal eksorpsiyon taşıyıcılarının en çok çalışılan üyesidir ve birçok ilacın absorpsiyonunu kısıtladığı gösterilmiştir (173). Bazı makromoleküller veziküler taşıma ile taşınır. Proteolitik enzimlerin membran veziküllerinde varlığı ve düşük taşıma kapasiteleri nedeniyle bu yol ile ilaç taşınması sınırlıdır (173, 174).

2.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre Kültürü Terminolojisindeki Tanımlar

Hücre kültüründe kullanılan bazı terimler ve tanımları aşağıda verilmiştir (175, 176).

Primer kültürler: Bozulmamış veya ayrılmış haldeki dokulardan veya organ parçalarından elde edilir. Kültürler subkültür edilene (pasajlanana kadar) kadar primer kültür olarak isimlendirilir. Subkültür edildikten sonra hücre hattı olarak isimlendirilir. İlk subkültür edilen ürün ikincil kültür olarak isimlendirilir.

Pasajlama (subkültür): Hücrelerin yeni bir kültür kabına transfer edilerek hücre popülasyonunun çoğaltılması ile kültürlerin sayısı artırılır.

Hücre hattı (Cell line): İlk pasajlama primer kültürden oluşturulan hücre topluluğudur. Primer kültürden kaynaklanan subkültürü oluşturan hücre topluluğudur. Bu toplulukların özellikleri belirlenirken sınırlı yaşam süresi olan veya sürekli (sınırsız büyüme potansiyeline sahip) hücre hatlarından bahsedilir. Hücre hatlarında homojenlikten bahsedilmez ve kültürün karakterini yansıtmaz.

Hücre Soyu: Subkültür edilen spesifik ekspresyon özellikleri olan, fonksiyonel karakterleri belirlenmiş hücre toplulukları için kullanılır.

Klonal Kültür: Tek bir hücreden geliştirilerek kültüre edilmiş hücre topluluğudur. Tek bir hücrenin mitozu ile geliştirildiğinden ikiz hücrelerden oluşur. Bir süre sonra bu hücrelerde de bir dereceye kadar heterojenite görülebilir.

Tutunma bağımlı ya da yüzey bağımlı hücreler: Yaşayabilmek, çoğalabilmek, farklılaşarak fonksiyonel özelliklerini yerine getirebilmek için bir yüzeye tutunma ihtiyacında olan hücrelerdir.

Konfluens (Confluency): Tutundukları yüzeyin tamamının hücre ile kaplanmasını ifade eder.

Hücre Kültürü Çalışmalarının Üstünlükleri ve Sakıncaları

Hücre kültürünün kullanımındaki avantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir (177).

- Çevre koşulları açısından, iki temel üstünlük sağlarlar.
Fizikokimyasal koşulların kontrolü (pH, sıcaklık, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit) ve fizyolojik koşulların kontrolü
- Karakterizasyon ve örneklerin homojenitesi
Doku örnekleri genellikle heterojendir. Bir veya iki pasajlama sonrası hücre hatları homojen hale gelir.
- Ekonomiklik
- Kültürlerin özellikleri tanımlanmış bir şekilde alınarak doğrudan kullanılabilir.
Hayvan deneylerindeki yasal ve etik sorunlar ile karşılaşmaz. In vivo enjeksiyonlardaki gibi ekstraksiyon veya diğer dokulara dağılım ile ilaç kaybı olmaz. Birçok değişken ile çok tekrarlı daha ucuz çalışmalar yapılabilir.
Hücre kültürlerinin sakıncalarını ise şu şekilde sıralayabiliriz (177).
- Deneyim gerektiriyor olması, aseptik koşullarda çalışılması gerekliliği
- Büyük miktarlarda üretilmemeleri
- Yeniden farklılaşma ve seleksiyon
- Herhangi bir sebepten farklılaşma sonucu hücrelerin elde edildiği dokunun fonksiyonel hücreleri ile ilişkilendirilememesi
- Stabilitate sorunları (hücre hatlarının stabil olmayan anaploid kromozomal bileşiminden kaynaklanan stabilite sorunları)

Caco-2 Hücre Hattı

Bağırsaklarından emilim modeli için insan epitel Caco- 2 hücre tek tabakaları ilk kez 1980'lerde kullanılmıştır ve o zamandan beri insan bağırsaklarından ilaç

emiliminin tahmin edilmesi ve ilaç transportunun mekanistik çalışmalarında kullanılan standart bir yöntem haline gelmiştir (168). Caco- 2 hücre tekli-tabakası geçirgenlik deneyleri için güvenilir, kolaydır ve az miktardaki maddeler ile gerçekleştirilen bir yöntemdir. Aslen insan kolon adenokarsinoma hücresinden izole edilen Caco-2 hücreleri, kültürde spontan enterositik farklılaşmaya uğrayarak ince bağırsaktaki epitel hücrelerine benzer (178). Hücrelerin büyüyerek birleştiğinde Caco-2 tek tabakasında hücre polaritesi ve sıkı bağları kurulur ve insan ince bağırsak duvarındaki birçok aktif transport sistemi eksprese edilir. Bu sistemler safra asitleri, aminoasitler ve şekerler için taşıyıcıları içerirler (179). MDR1 geni tarafından kodlanan P-gp ve MRPs Caco-2 hücreleri tek tabakalarında eksprese edilir ve bazolateralden apikal yöne doğru substrat ilaçların geçişini etkiler (180, 181).

Referans maddelerin Caco-2 hücre tek tabakalarındaki görünür geçirgenlik katsayıları ölçülerek in vivo absorpsiyon ile bir korelasyon olduğu gösterilir. Bu olumlu özelliklerinin bir sonucu olarak, Caco-2 hücre tek tabakaları ilaçların bağırsaklardan geçirgenliği ve taşınmasının değerlendirilmesinde in vitro standart bir model haline gelmiştir. Caco-2 hücreleri apikal ve bazolateral bölmelerden oluşan ve yarı-geçirgen polikarbonat insert yüzeylerine ekilirler. Bu iki bölme hücre tek tabakası ve yarı geçirgen yüzey ile birbirinden ayrılır.

Bu apikal ve bazolateral yüzeyler sırasıyla GİS'in luminal ve kan/mezenterik lenf bölümlerini temsil etmektedir. Caco-2 hücre deneylerinde genellikle 6, 12, 24 kuyucuklu kaplar kullanılmaktadır. Taşıyıcı proteinlerin ve sıkı bağların oluşması için genellikle 21 gün boyunca büyütülürler. Caco-2 hücrelerinde geçirgenlik çalışmaları yapılırken kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra her iki bölmeye 37 °C'de 25 mM HEPES (hidroksietil-piperazinetan-sülfonik asit tamponu, pH 7,4) eklenir. Tek tabakaların bütünlüğünü değerlendirme için genellikle transepitelyal elektrik direnci (TEER) ölçülür. Genellikle TEER> 300 $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ olması halinde yeterli yüzey filmi bütünlüğünü gösterdiği kabul edilmektedir. Test ilacı bilinen konsantrasyonda apikal kompartmana eklenerek bazolateral kompartmana geçiş hızı geçirgenlik katsayısı (P_{app} , cm/sn) tayin edilerek değerlendirilir (Eşitlik 2.4). (182).

$$P_{\text{app}} = dC/dt \cdot 1/(A \cdot C_0) \quad (2.4.)$$

dC/dt = İlaç permeasyon oranı (g/s), A = İnsertlerin yüzey alanı (cell monolayer) (cm^2)

C_0 = Apikal bölgedeki başlangıç konsantrasyonu (g/mL)

Caco-2 Hücrelerinin Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Hücre bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biri TEER ölçümüdür. TEER ölçümü volt-ohmmetre kullanılarak insertin üst ve alt kısımlarına elektrot yerleştirilerek yapılır (173). Caco-2 hücre tek tabakalarında TEER değeri kültür zamanı ile tipik olarak artar, 10-15 g.ün bazı kimi araştırmacılara göre ise 21-24 günden sonra maksimuma ulaşır. TEER değerleri, transwell insertlerin yüzey alanına, ekilen hücre sayısına, filtreye, kültür koşullarına ve pasaj sayısına bağlıdır ve 152-2412 ohm.cm² arasında olduğu bildirilmiştir (183). İnsan ileumunun TEER değeri 40-50 ohm.cm² civarında olup Caco-2 hücre tek tabakalarından daha düşüktür (184).

2.5. Çalışmada Kullanılan Etkin Madde RXB'ye Ait Bilgiler

Uzun yıllar boyunca oral antikoagülan olarak sadece VKA kullanılmıştır (31, 32). Ancak, etkili olmalarına rağmen yavaş etki başlangıcı ve dengesine sahip olması, birçok ilaç ve besin ile etkileşmesi ve öngörülemeyen farmakodinamik yanıt oluşturabilmesi sebebiyle doz ayarlaması ve düzenli olarak koagülasyon izlenmesi gerekmektedir. Antikoagülan ilaçların bu kısıtlamalarını aşmak üzere son yıllarda özellikle tek bir pıhtılaşma faktörünü (örneğin faktör Xa veya trombin) doğrudan hedef alan oral antikoagülanlar geliştirilmiştir. Faktör Xa, kan pıhtılaşmasında merkezi bir rol oynar ve hem iç hem dış pıhtılaşma yollarında etkinleştirilir. Faktör Xa; protrombini, protrombinaz kompleksi ile doğrudan trombine dönüştürür (33). Trombin ile fibrin pıhtı oluşumu trombosit aktivasyonuna neden olur. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar faktör Xa ve trombinin antikoagülan etki için uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Doğrudan faktör Xa inhibitörleri ve doğrudan trombin inhibitörleri, yapılan klinik çalışmalarda tromboembolik endikasyonların birçoğunda VKA ve düşük molekül ağırlıklı heparinler gibi konvansiyonel antikoagülanlar ile karşılaştırıldığında benzer veya daha iyi etkinlik ve güvenlik profili göstermişlerdir. VKA'lardaki durumun aksine, doğrudan oral antikoagülanlarla tedavide tahmin edilebilir farmakokinetik ve farmakodinamik profil elde edilirken daha az ilaç-ilaç etkileşimi görülür ve sürekli olarak koagülasyon izlenmesine gerek duyulmaz (31, 32). Bu bileşiklerin bazıları (RXB, apiksaban, dabigatran eteksilat) spesifik tromboembolik hastalıklarda

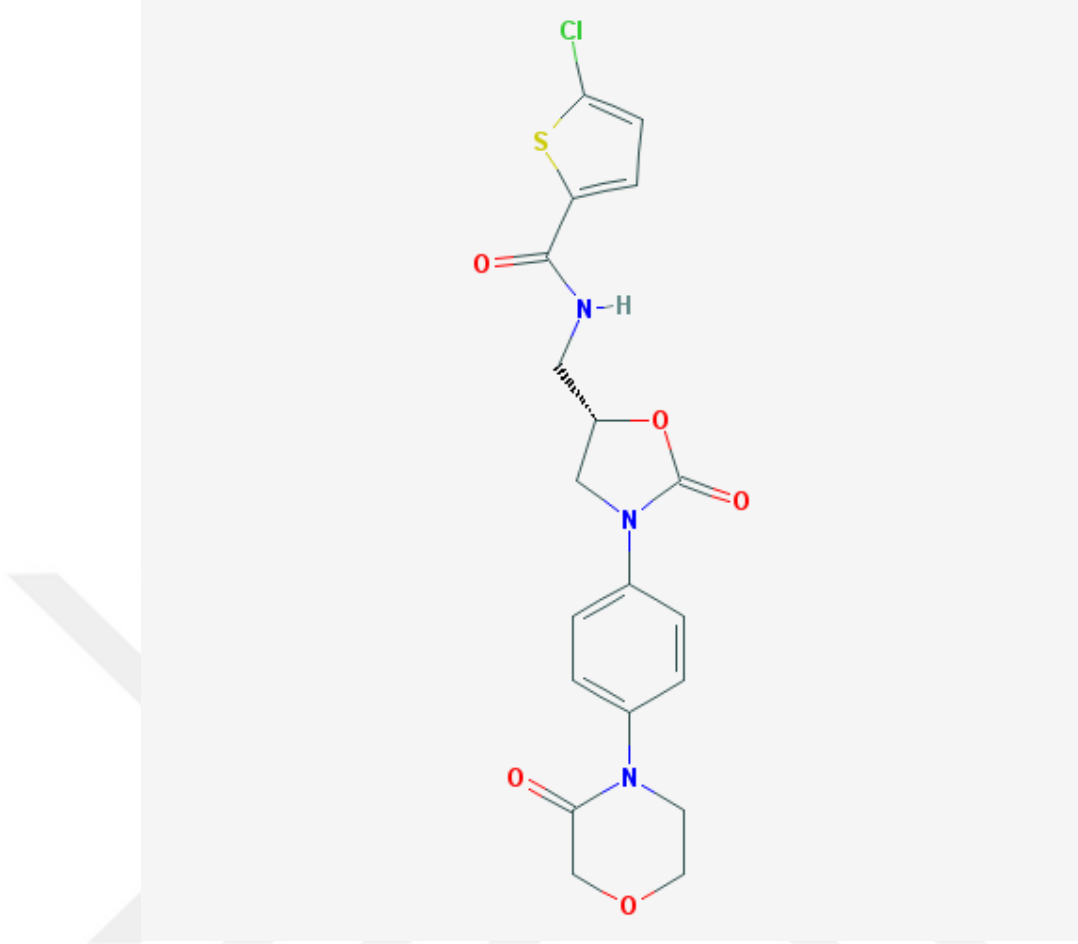
kullanılmak üzere faz III çalışmalarının sonuçlarına dayanarak ruhsatlandırılmıştır. Bunlardan RXB kalça ve diz protezi ameliyatı geçiren erişkinlerde VTE önlemek üzere 2008 yılında ruhsatlandırılmış bir moleküldür. Aynı zamanda inme ve yetişkinlerde valvüler olmayan atrial fibrilasyon ile sistemik embolinin önlenmesi için, (DVT), (PE) ve tekrarlayan DVT ve PE'nin önlenmesinde de endikedir (19, 185). Buna ek olarak kardiyak belirteçleri yükselmiş akut koroner sendrom (AKS) ile aterotrombotik olayların önlenmesinde erişkinlerde aspirin ile, klopidoğrel veya tiklopin ile birlikte veya ayrı kullanılması Avrupa Birliği'nde onaylanmıştır (186).

2.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan etkin madde RXB antikoagülan bir ilaç olup ilk oral doğrudan faktör Xa inhibitörüdür. RXB bir stereojenik merkezli saf (S) enantiyomeri olan sentetik küçük bir moleküldür. Kimyasal adı;

5-kloro-N-(((5S)-2-okso-3-[4-(3-okso-4-moholinil)fenil]-1,3oksazolidin-5-yl)metil)-2-tiyopenekarboksamid'dir. Molekül ağırlığı 435.89 g/mol olup moleküler formülü $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$ 'dir (187). Kimyasal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

RXB'nin polimorf I, polimorf II ve polimorf III olmak üzere polimorfik formları vardır. Polimorf II amorf forma sahip olup polimorf I'e göre daha yüksek çözünürlüğe sahiptir (188).



Şekil 2.3. RXB'nin kimyasal yapısı (189).

RXB kokusuz, non-higroskopik, katı sarımsı beyaz tozdur. Suda (7 mg/L), 0.1 ve 0,01 M hidroklorik asitte, pH 3-9 aralığında, toluen, 2-propanol ve n-heptan'da çözünmez. Etanol, metanol, ve etil asetatda çok az çözünür. Aseton, asetonitril, diklorometan ve makrogol 400'de (polietilen glikol) az çözünür. Dimetil formamit, N-metilpirolidon ve dimetilsülfoksitte (87 mg/mL 25 C°) çözünür (19, 190). RXB non-iyonize nötral bir moleküldür ve çözünürlüğü pH'ya bağlı değildir. Krisztina ve ark. (191) yaptığı bir çalışmada sudaki intrinsik çözünürlüğü $10 \pm 0,8$ µg/mL olarak bulunmuştur. RXB'nin farklı pH'lardaki intrinsik çözünürlükleri incelendiğinde pH 1,2: 10 µg/mL; pH 5,0: 11,1 µg/mL; pH 6,5: 9,9 µg/mL ve denge çözünürlük değerleri pH 1,2: 18 µg/mL; pH 5,0: 9,4 µg/mL; pH 6,5: 9,1 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar da çözünürlüğünün pH bağımsız olduğunu göstermektedir.

RXB BSS Sınıf II'de yer alan düşük çözünürlük ve yüksek geçirgenliğe sahip bir maddedir (187). Erime derecesine ilişkin literatürde 228-229 °C, 230 °C

(modifikasyon I), 203°C (modifikasyon II), 127°C (modifikasyon III) değerleri verilmektedir (19). pK_a (kuvvetli asidik) değeri 13,36 ve pK_b (kuvvetli bazik) değeri 1,6 'dır (192).

2.5.2. Miktar Tayini

Literatür taraması, RXB'nin analizi için birkaç yöntemin kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu yöntemler, görünür spektrofotometre (193-195) ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) (196-201) HPLC (202), yüksek performanslı sıvı kromatografi - tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) (203, 204) TLC – dansitometrisi (204), Katı-faz ekstraksiyon-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*Solid-Phase Extraction*–HPLC; (205), ters faz ultra performanslı sıvı kromatografisi (RP-UPLC) (206), anti- faktör Xa kromojenik tayin (207) ve protrombin zamanı tayini (208) gibi yöntemlerden oluşmaktadır. RXB'nin plazmadan tayininde LC/MS/MS, anti- faktör Xa kromojenik tayin ve protrombin süresi tayini yöntemleri yöntemi kullanılmıştır.

Iqbal ve ark. (209) tarafından RXB'nin insan plazmasından tayini ve validasyonunda UHPLC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Asetonitril;10 mM amonyum formatın izokratik karışımının mobil faz olarak kullanıldığı yöntemde 0,3 mL/dakika akış hızında RXB'nin ayrımı gerçekleştirilmiştir. RXB'nin tayininde pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılmıştır. Prekürsör ürün iyon geçişi m/z 436→144,87 olarak tespit edilmiştir. Plazma proteinlerinin (100 µL) iç standart (50µg/mL) içeren 600 µL metanol/0,1 N HCL(90:10,h:h) ile çöktürüldüğü bir diğer çalışmada RXB'nin insan plazmasından tayininde UPLC kullanılmıştır. Miktar tayininde MRM (çoklu reaksiyon izleme, multiple reaction monitoring) kullanılan yöntemde iyon geçişi m/z 436,1→144,9'dir. Voltaj enerjisi 40 V, çarpışma enerjisi 25 V olarak belirlenmiştir. Simetrik pikler, iyi bir ayırım ve kısa kromatografik çalışma süresi elde edebilmek için % 0,1 formik asit ve 0,07 g amonyum asetat içeren su ve % 0,1 formik asit metanol içeren asetonitril mobil faz olarak kullanılmıştır. Retansiyon zamanı 2,15 dakika ve miktar tayini sınırı 2,5 ng/mL olarak tespit edilmiştir (203).

Plazma proteinlerinin iç standart içeren metanol ile çöktürüldüğü bir diğer yöntemde ise RXB'nin insan plazmasında HPLC-MS/MS ile tayini gerçekleştirilmiştir. 0,5-500 µg/L konsantrasyon aralığında günler arası kesinlik

$\leq 7,4$ ve günler arası doğruluk % 96,3-102,9 ölçülmüştür. SRM (Seçici reaksiyon izleme, *Selectif reaction monitoring*) kullanılan yöntemde çarpışma hızı 36eV, m/z 436,1→144,9, kalibrasyon aralığı 0,5 µg/L-500 µg/L'dir. Mobil faz 0,01 mol/L amonyum asetat tamponu ve pH 3,0'a ayarlamak üzere % 0,1 formik asit içeren asetronitril içermektedir (210). Sıçan, köpek ve insan plazmasında RXB ve metabolitlerinin analiz edildiği çalışmada LC/MS, bazı metabolitleri için HPLC kullanılmıştır. Kromatografik kolon olarak Agilent Zorbax SB-C18 column (30 mmx2.1mm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak 10 mM amonyum format (pH 4) ve asetronitril kullanılmıştır. Metabolitlerden bir kısmı ESI negatif mod bir kısmı ise ESI pozitif mod'da analiz edilmiştir (211).

Zhang ve ark. (212) tarafından RXB'nin miktar tayinine yönelik olarak sıçanlarda yapılan çalışmada UPLC-MS/MS sistemi ve Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm 9 50 mm, 1,7 µL) kolon kullanılarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak % 0,1 formik asit içeren asetronitril kullanılmış ve akış hızı 0,4 mL/dakikadır. Prekürsor ürün iyon geçişi m/z 436,1 →145,1 olup MRM modda pozitif ESI kullanılmıştır. Yöntem 1 ng/mL-200 ng/mL aralığında valide edilmiştir.

2.5.3. Stabilité

Etkin maddenin stabilitesi 25°C / % 60 bağıl nemde (RH) 12 ay ve 40°C / % 75 RH'de 6 ay boyunca incelenmiştir. Ürün serbest bırakma için, çözelti görünümü (madde, renk), polimorfizm, partikül büyüklüğü, enantiyomerik saflık, organik kirlilikler, nem içeriği testleri yapılarak aktif maddenin kararlılığı gösterilmiştir. Ek kararlılık çalışmalarında termal ve hidrolitik stres koşullarında stabil olduğu gösterilmiştir. ICH (Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı) Q1B kriterlerine göre yapılan fotostabilite çalışmaları katı halde ışığın etkisi olmadığını göstermiştir (213). Abdallah ve ark. (204)'nın yaptığı bir çalışmada da oksidasyon, fotodegradasyon ve termal ayrışmaya karşı stabil bulunmuştur. Öte yandan, RXB baz ve asit ile katalize edilen hidrolizde kararsız bulunmuştur.

2.5.4. Farmakolojik Özellikleri

Kullanım Amacı ve Doz

- Alt ekstremitelerde majör ortopedik cerrahi işleme uğramış erişkin hastalarda (elektif total kalça protezinde 5 haftaya kadar, elektif total diz protezinde en fazla iki hafta) VTE'nin önlenmesi
- Non-valvüler atriyal fibrilasyon olan ve inme için en az bir ilave risk faktörü olan hastalarda inme ve sistemik embolinin önlenmesi
- DVT ve PE tedavisi ve tekrarlayan DVT ve PE'nin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.
- 10 mg, 15 mg, 20 mg dozlarda piyasada bulunmaktadır (214).

Elektif kalça ve diz cerrahisinde venöz tromboz profilaksisinde ameliyattan 6 saat sonra günlük 10 mg doz, nonvalvular atriyal fibrilasyon olan hastalarda inme ve sistemik emboliyi önlemek üzere günlük 20 mg doz kullanılmaktadır (215, 216). DVT olan ve submasif hastalarda başlangıçta üç hafta boyunca 15 mg daha sonra günlük 20 mg tedavide kullanılmaktadır (217, 218).

Etki Mekanizması

RXB oral biyoyararlanımı düşük dozlarda yüksek olan oldukça seçici doğrudan etkili bir faktör Xa inhibitörüdür (35). Faktör X'in, faktör Xa'ya intrensik ve ekstrinsik yollarla aktivasyonu, kan koagülasyon basamaklarında merkezi rol oynar. Faktör Xa, protrombini protrombinaz kompleksi aracılığıyla doğrudan trombine dönüştürerek fibrin pıhtı oluşumuna ve trombin ile trombositlerin aktivasyonuna neden olur. In vitro kinetik çalışmalarda RXB ile insan faktör Xa inhibisyonu yarışmalı olup [inhibisyon sabiti (K_i) $0,4 \pm 0,02$ nM] diğer serin proteazlardan 10.000 kat daha seçicidir. RXB protrombinaz aktivitesini [inhibitör konsantrasyonu % 50 (IC_{50}) $2,1 \pm 0,4$ nM] ve pıhtı ilişkili faktör Xa aktivitesini (IC_{50} 75 nM) kuvvetli bir şekilde inhibe eder. İnsan vücudunda RXB vücut içi faktör Xa aktivitesini konsantrasyona bağımlı (IC_{50} 21 ± 1 nM) bir şekilde inhibe eder (214).

Farmakokinetik Özellikleri

İlk klinik geliştirme sürecinde, RXB'nin farmakokinetik profilinin sağlıklı bireylerde güvenilir ve tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir. RXB 10 mg dozda hızla absorbe olur (% 80-100) ve maksimum plazma konsantrasyonuna 2-4 saatte ulaşır. 1,25-80 mg tek doz aralığında ve çoklu dozlarda (30 mg üstünde günde 2 doz) 2-4 saatte C_{maks} 'a ulaşır (219, 220). Sağlıklı gönüllülerde t_{maks} 3 saat olarak bulunmuştur. Plazma yarı ömrü 5 mg dozda 7 saat, 30 mg dozda ise 9,2 saat olarak bulunmuştur (219). RXB lipofilik bir maddedir. Yiyecekler ile birlikte alındığında plazma pik konsantrasyonuna ulaşma süresi 2,5 saatten (açlık koşullarında) 4 saate çıkar, ve yarı ömrü çok az da olsa kısalır (221). Çoklu dozda uygulama sonrasında herhangi bir birikme olmaz. Sağlıklı gönüllülerde yapılan faz I çalışmalarında 10 mg dozda açlık ve tokluk koşullarında biyoyararlanımı tamdır. 10 mg dozda yiyecek ile alınmasının EAA ve C_{maks} değerlerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Ancak 20 mg dozda açlık koşullarında biyoyararlanım % 66 olarak bulunmuştur. 20 mg doz gıdalarla ile birlikte verildiğinde EAA'da % 39 'luk bir artış gözlenerek absorpsiyonun tama yaklaştığı tespit edilmiştir. Tokluk koşullarında 10 mg, 15 mg ve 20 mg'da doz orantısallığı sağlanır. Ek olarak yiyecek türüne (yüksek yağlı veya yüksek karbonhidratlı besinler) göre RXB'nin farmakokinetiğinde değişim olmaz. Bütün 20 mg tablet ve öğütülmüş suda süspansiyon edilmiş tablete ait EAA ve C_{maks} verileri benzerdir. Nazogastrik tüp ile uygulama sonrasında sıvı besin alımında da benzer EAA elde edilmiş ancak C_{maks} değeri % 18 azalmıştır (31). Klinik öncesi hayvan çalışmalarında RXB'nin tahmin edilebilir farmakokinetik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. RXB hızlı absorplanır ve orta veya yüksek mutlak biyoyararlanıma sahiptir. Biyoyararlanım sıçanlarda (% 57-66) ve köpeklerde (% 60-86)'dır. Sıçanlarda 1,0-10,0 mg/kg ve köpeklerde 0,3-3 mg/kg doz aralığında küçük varyasyonlarla birlikte doz orantısaldır (222). RXB'nin sağlık gönüllülerde yapılan faz I çalışmalarında 10 mg dozda açlık ve tokluk koşullarında biyoyararlanımı tamdır. Ancak 20 mg dozda açlık koşullarında orantısallığı gözlenmemiştir. Bu durum açlık koşullarında ilacın biyoyararlanımında hız kısıtlayıcı basamak olan çözünme hızının düşük olmasına bağlanmaktadır. Tavşanlara oral yoldan 0,3 mg/kg, 3 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda RXB verilmesi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde 0,3 mg/kg ve 3 mg/kg dozlarda ortalama plazma kan düzeyi doz ile orantılı olarak artarken 10 mg dozda doz orantısallığından daha az

artış göstermiştir. Protrombin zamanının uzamasının plazma konsantrasyonu ile orantılı olduğu gösterilmiştir (8). Tokluk koşullarında 10 mg, 15 mg, 20 mg dozlarda doz orantısallığına ulaşılmıştır (223-225). Tüm ve kırılmış 20 mg tabletin tokluk koşullarında EAA'nı ve C_{maks} 'ı benzerken, kırılmış tablet suda süspande edilip sıvı gıdalarla ve nazogastrik tüp ile verildiğinde EAA aynı iken C_{maks} azalmıştır (13). RXB ile sağlıklı gönüllülerde yapılmış çalışmalarda yüksek dozlarda doz orantısallığının olmayışı ayrıca biyoyararlanımına yiyecek etkisinin olması dikkat çekmektedir. Biyoyararlanımının yüksek dozlarda tamamlanmama nedeni ise çözünme sorunudur (10,14, 226, 227).

Zhang ve ark. (212) tarafından RXB, apiksaban ve endoksabanın farmakokinetik parametrelerini test etmek üzere erkek Sprague-Dawley sıçanı ile yapılan bir çalışmada sıçanların besin alımı 12 saat önce kesilmiş ancak sıvı kısıtlaması yapılmamıştır. Oral olarak 2 mg/kg RXB uygulamasını takiben deney hayvanlarının kuyruk veninden 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ve 24 saatlerde 0,3 mL kan örneği heparinize tüplere alınmış 4000 g de 68 dakika santrifüj edilerek plazması ayrılmış ve analiz edilene kadar -20 C° de muhafaza edilmiştir. Analiz edilmeden önce asetronitril eklenerek 13.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek plazma proteinlerinden ayrılarak analiz edilmiştir. Plazma yarılanma ömrü $t_{1/2}$ (saat) $1,64 \pm 0,29$, C_{maks} (ng/mL) $109,70 \pm 16,95$, t_{maks} (saat) $4,10 \pm 1,10$, EAA_{0-t} (ng/m.Lsaat) $535,52 \pm 41,02$, $EAA_{0-\infty}$ (ng/mL.saat) $544,26 \pm 44,61$ olarak tespit edilmiştir.

Proteinlere Bağlanma ve Dağılım

Sıçanlarda, RXB dokulara ve organlara heterojen dağılmıştır. Kan beyin engelini tamamiyle geçemez. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, [^{14}C] RXB'nin (ve işaretli metabolitleri) orta derecede plasentaya geçtiği (EAA oranı fetus / maternal kan yaklaşık 0,2), anne sütüne yaklaşık % 2 oranında geçtiği gösterilmiştir. İnsanlarda, plazma proteinlerine yüksek oranda geri dönüşümlü olarak bağlanır (yaklaşık % 92-95 in vitro). Serum albümini temel bağlanma proteinidir. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlandığı için diyaliz olması beklenmektedir. Kararlı durumda dağılım hacmi 50 L (0,62 L/kg) olarak tayin edilmiştir (214).

Metabolizma ve Eliminasyon

Değişmemiş ilacın renal eliminasyonu ve ilacın metabolik degradasyonu olmak üzere RXB 2 farklı yoldan elimine edilir. İlacın üçte biri (% 36) idrarla değişmemiş ilaç olarak atılır. % 30'u aktif renal sekresyon ve % 6'sı glomerüler filtrasyon yoluyla idrarla elimine edilir. RXB efflux taşıyıcılarından P-gp ve meme kanseri rezistans proteini (BCRP) (ABCG2 tarafından kodlanan) substratıdır (228, 229). In vitro ve in vivo ilaç etkileşim çalışmaları RXB'nin aktif renal sekresyonunda P-gp ve BCRP taşıyıcılarının etkili olduğunu göstermektedir. İlacın üçte ikisi ise metabolik degradasyona uğrar. RXB sitokrom P450 enzimleri tarafından (CYP 3A4/5, CYP2J2) ve CYP-bağımsız mekanizmalarca metabolize edilir. Dolaşımda değişmemiş RXB hakim olup aktif metabolitleri yoktur. Terminal yarı ömrü sağlıklı genç gönüllülerde 5-9 saat, daha yaşlı bireylerde 11-13 saattir. İntravenöz uygulamadan sonra sistemik klerens % 30-40 birey içi değişkenlikle 10 L/h (0,14 L/h/kg) dır. Dağılıma hacmi kararlı durumda 50 L'dir. Sağlıklı genç gönüllülerde 15 mg oral dozda doğrusal farmakokinetiğe yakın bir profil gösterir, $t_{1/2}$ 7-11 saattir. Yaşlı gönüllülerde 50 mg doza kadar $t_{1/2}$ 11-13 saattir. RXB CYP450 izoformunu inhibe etmez ya da indüklemeyebilir. CYP3A4 ve CYP2J2 substratı olup, bu enzimler tarafından CYP bağımsız mekanizmalar yoluyla metabolize edilir. RXB çift yolaklı eliminasyona sahiptir, ilacın üçte ikisi karaciğerde metabolize olur. Yarıları böbreklerden yarıları safra yoluyla vücuttan atılır. Üçte biri böbreklerden değişmemiş ilaç olarak atılır. Dolaşımda aktif veya önemli bir metaboliti bulunmaz (185).

İlaç Etkileşimi

Yapılan araştırmalarda asetil salisilik asit, naproksen ve ranitidinin RXB'nin farmakokinetik ve farmakodinamiği üzerine etkisi olmadığını gösterilmiştir. Doğrudan pıhtılaşma üzerine etkisi olan naproksen gibi analjezikler RXB ile verildiğinde kanama riski artabilir. CYP3A4 veya P-gp indükleyicileri ile eş zamanlı tedavi RXB'nin plazma konsantrasyonunda artışa yol açar. Ketokonazol ve ritonavir ile birlikte kullanımı kontraindikedir. Rifampisin ve St.John's wort (sarı kantaron) gibi indükleyiciler plazma seviyesinde azalmaya neden olabilir (214).

2.6. Farmakokinetik Sonuçların Doz Orantısallığının Değerlendirilmesi

İlaç geliştirmedeki amaçlardan biri de, doz ve doz rejiminin ayarlanmasını kolaylaştırmak için doğrusal farmakokinetik özelliklere sahip yeni bir ilaç geliştirmektir. Doğrusal farmakokinetik "doz ve zaman için normalleştirilmiş herhangi bir konsantrasyon-zaman profilinin üst üste çakışmasını ifade etmektedir (230). Dolayısıyla, doğrusal farmakokinetik için gerekli şartlardan biri doz orantısallığı olup doz orantısallığının değerlendirilmesi yeni bir ilacın klinik gelişimi sırasında yapılan temel farmakokinetik bir analizdir. Herhangi bir zamanda verilen ilacın (genellikle plazmada) konsantrasyonu uygulanan ilacın dozu ile orantılıysa, bu ilacın doz orantısallığı olduğu söylenir. Doz iki katına çıkarsa (veya üç katına veya yarıya indirilirse) konsantrasyon da aynı şekilde değişecektir. Matematiksel olarak, belirli bir zaman noktasındaki doz orantılılığı herhangi bir doz için sıfıra eşit veya daha yüksektir (231).

Farmasötik ilaç geliştirme sürecinde ilaçların farmakokinetik verilerinin verilen doz aralığında doğrusal olup olmadıklarının değerlendirilmesi önemli bir noktadır. Bütün dozlar için tüm farmakokinetik profillerin elde edilmesi mümkün değildir, belirli bir doz aralığında ilacın doz orantısallık özellik göstermesi yeterli olmaktadır. Doz orantısallığı durumunda doz ve konsantrasyon arasındaki ilişki Eşitlik 2.5'deki gibi ifade edilir.

$$C = \alpha \cdot \text{doz} \quad (2.5.)$$

C : Konsantrasyon
 α : Regresyon sabiti

Konsantrasyon doza göre normalize edildiğinde Eşitlik 2.5.'den Eşitlik 2.6. elde edilir. Doz normalize edilmiş konsantrasyonların bu sabiti eşit olduğunda bu konsantrasyonların doz orantısallığından söz edilmektedir (231).

$$C/\text{doz} = \alpha \quad (2.6.)$$

Ham konsantrasyonlar yerine genellikle farmakokinetik değişkenler kullanılmaktadır. İlaçlarda doğrusallık ilacın dağılımını ifade eden tüm farmakokinetik değişkenler ile ilgilidir. Genellikle doğrusal farmakokinetik için ham C_{maks} , $EAA_{0-\infty}$ 'nın doz ile orantısallık olarak değişiminin ölçülmesi yeterli olmaktadır.

$$EAA=\alpha \cdot \text{doz} \quad (2.7.)$$

Doz doğrusallığı doğrusal farmakokinetik ile karıştırmamalıdır. Doz doğrusallığı doz orantısallığından daha zayıf bir koşuldur. Aşağıdaki konsantrasyona karşı doz arasındaki basit doğrusal regresyon ile tanımlanır (Eşitlik 2.8.) (231).

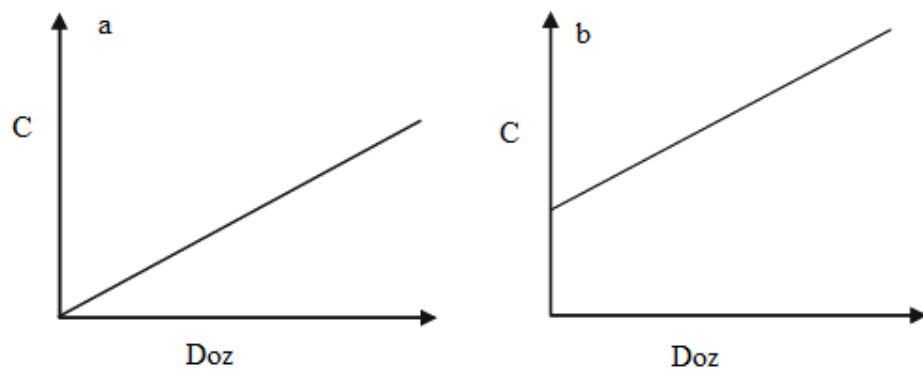
$$C=\alpha_0 + \alpha \text{doz} \quad (2.8.)$$

α_0 : İntersept

α : Regresyon sabiti

Burada α 0'dan büyük orantısallık sabitidir. Eğer α_0 "0" ise Eşitlik 2.8.'den Eşitlik 2.5. elde edilmektedir. Doz orantısallığında doz "0" ise ilaç maruziyeti olmaz. İntersept değeri α_0 , 0'dan farklı bir değer aldığı anda doz doğrusallığından söz edilebilir ancak doz orantısallığı yoktur (231, 232).

Tipik olarak endojen bileşikler için hiçbir doz uygulanmasa da maruz kalma sıfırdan büyük olabilmektedir. Doz doğrusallığının değerlendirmesinin çoğu ilaç adayı molekül için pratik olarak öneminin az olması bu nedenledir. Doz orantısallığı ve doz doğrusallığı durumunda doz ve konsantrasyon arasındaki ilişki Şekil 2.4.'de gösterilmiştir (231).



Şekil 2.4. Doz orantısallığı (a) ve doz doğrusallığı (b) durumunda konsantrasyon (C) ve doz arasındaki ilişki $\alpha > 0$.

Doz orantısallığının olmaması (doğrusal olmayan farmakokinetiği) birçok mekanizmaya bağlı olabilir, fakat tipik olarak metabolize enzimler veya taşıyıcılar gibi sistemdeki bazı bileşenlerin doygunluğundan kaynaklanmaktadır. Ludden (230) doğrusallığın olmamasını, doğrusal olmayan emilim, doğrusal olmayan dağılım veya doğrusal olmayan eliminasyona bağlı olarak sınıflandırmaktadır. Doğrusal olmayan absorpsiyona bağlı doz orantısallığının olmama nedenleri arasında, taşıyıcı aracılı alımın doygunluğu, zayıf çözünürlük, formülasyondan yavaş salım ve presistemik metabolizmanın doygunluğu sayılabilir. Doğrusal olmayan dağılımın ortak mekanizmaları doyurulabilir protein bağlanması, alyuvar hücrelerine bağlanma ve doku dağılımını içerir. Eliminasyona bağlı doz orantısızlığı nedenleri ise metabolik enzimlerde doyurulabilir eliminasyon, taşıyıcılarda doyurulabilir renal eliminasyon ve otoindüksiyondur.

Doz orantısallığının olmamasının, güvenlik ve etkililik açısından etkileri olabilir. Doza bağımlı absorpsiyon gösteren ilaçlarda genellikle daha yüksek dozlarda daha az absorpsiyon gerçekleşmektedir. Bu durumda etkililik bir sorun haline gelir. Doyurabilir eliminasyon gösteren ilaçlarda yüksek dozlarda daha yüksek konsantrasyon ile karşı karşıya kalınmaktadır ve advers etki riski artmaktadır. Bir ilacın terapötik penceresi dar olduğunda, bu daha çok sorun oluşturabilir (231).

Doz doğrusallığı/orantısallığının değerlendirilmesi, önemli olan doz aralığında farmakokinetik verilerin sağlandığı ilacın keşfi sırasındaki tekli doz klinik çalışmaları ile başlar (231, 233).

Bu erken faz klinik geliştirme çalışmalarından maruziyet-cevap ilişkisini ve doz seçimini destekleyecek veriler elde edilmektedir.

Doz Doğrusallığı/Doz Orantısallığının Değerlendirilmesi

Doz orantısallığı, matematiksel açıdan ideal bir yaklaşımdır ve fizyolojik olarak karşılanması olanaksızdır. Örneğin, Eşitlik 2.5.'de denklem biyolojik bir düzenleme olmadan sınırsız dozda uygulanabilir. Buna ek olarak, bireyiçi ve bireyler arası değişkenlikler nedeniyle bir ilacın gerçek beklenen konsantrasyonları belirli doz aralığında ideal doz orantısallığı, tamamen doğru olarak kanıtlanamaz. Bu nedenle doz orantısallığının değerlendirilmesi test ve tahmin problemleri için istatistiksel bir sorun

haline gelir. İstatistiksel analizler, idealden sapmaları ölçmek ve klinik etkilerin türetilmesini sağlamak için, verilerin doz orantısallığı modeli ile ne derece uyumlu olduğunu analiz etmelidir. Klinik olarak yanıtlanması gereken soru doz orantısallığından sapmanın klinik olarak ne derecede önemli olduğudur. İlacın anlamlı doz penceresi içinde doz orantısallığından sapması, ilacın klinik özelliklerinden kaynaklı riskin üstesinden gelecek kadar büyük olması durumunda önemlidir (231) .

Tanımlayıcı Analizler

Tanımlayıcı analizler konsantrasyon ile ilgili parametreler için tanımlayıcı istatistikleri içermektedir (eksik gözlem sayısı, ortalama, standart sapma, minimum, ortanca, maksimum, geometrik ortalama, değişim katsayısı). Doza göre normalleştirilmiş parametreler ile tanımlayıcı istatistikleri tamamlanabilir. Grafikselsel olarak ham veya doz normalize edilmiş farmakokinetik parametreler gösterilebilir (231).

Doz orantısallığının değerlendirilmesi için literatürde birkaç yöntem mevcuttur (234-236). Bu yöntemler;

- Farmakokinetik parametreler ve doz arasında ağırlıklandırılmış basit doğrusal veya quadratik regresyon analizi
- Farmakokinetik verilerin doza bölünerek normalize edilerek varyansların analizi (ANOVA)
- Gough ve ark. tarafından geliştirilen güç modeli (power model)
- Eşdeğerlik kriteri

Farmakokinetik Parametreler ve Doz Arasında Ağırlıklandırılmış Basit Doğrusal veya Quadratik Regresyon Analizi

Basit doğrusal regresyon analizinde farmakokinetik bağımlı değişkenler EAA ve C_{maks} için quadratik polinomial denklemi aşağıdaki gibidir.

$$Y = \alpha + \beta_1(\text{doz}) + \beta_2(\text{doz})^2 + \epsilon \quad (2.9.)$$

H_0 hipotezi β_2 ve α sıfıra eşittir veya değildir şeklinde kurulur. Eğer parametreler sıfırdan anlamlı bir şekilde farklı ise orantısal olmayan dozdan bahsedilir. Eğer β_2 , 0'dan anlamlı bir şekilde farklı değilse basit regresyon kabul edilir

$$Y = \alpha + \beta(\text{doz}) + \varepsilon \quad (2.10.)$$

Yukarıdaki eşitlik kullanılarak α 'nın sıfırdan farklı olup olmadığı test edilir. Eğer alfa sıfıra eşitse eşitlik $Y = \beta \cdot \text{doz}$ eşitliği devreye girer ve doz orantısallık kabul edilir. Eğer alfa sıfıra eşit değilse doz doğrusallığı kabul edilir. Bu yöntemin temel eksikliği doz orantısallığının kantitatif ölçümünün olmamasıdır. Ek olarak quadratik terimler veya intersept önemli olduğu ve 0'a yakın olduğu zaman doz orantısallıktan ayrılmanın büyüklüğünü test edememektedir. Bu noktada güç modeli akla gelmektedir (235).

Farmakokinetik Verilerin Doza Bölünerek Normalize Edilerek Varyansların Analizi (ANOVA)

Varyansların analizi en popüler ikinci yöntemdir. Farmakokinetik verilerin doz normalize edilmesinin ardından (analizden önce bağımlı değişkenler (EAA , C_{maks}) doza bölünerek doğrusallaştırılır) dozlar arasındaki farkın test edilmesi için varyansların analizi yapılır. Bu genel bir test (F-testi gibi) ve/veya eşleştirilmiş karşılaştırmalar ile yapılabilir (doz normalize edilmiş geometrik ortalamaların oranları için güven aralıklarının gösterilmesi gibi), analiz cevabı doz ile orantısal ise aşağıdaki eşitlik ortaya çıkar.

$$\text{Farmakokinetik cevap/doz} = \mu + \alpha_j \quad (2.11.)$$

j:doz seviyesi

μ :ortalama

$\alpha(\text{alfa})$:tedavi etkisi

Farksızlık hipotezi $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \dots = 0$ şeklinde kurulur ve red edilmezse doz orantısallığı kabul edilir. Bu modelde dozların sırası dikkate alınmamaktadır ve test edilmeyen bir dozun cevabını tahmin etmek zordur (234-236).

Güç Modeli

Güç modelinde farmakokinetik cevap ile doz arasındaki ampirik ilişkiden yararlanılır. Logaritmik dönüşüm sonrası doğrusal ilişki elde edilir (Eşitlik 2.13.) (235-237).

$$Y = \alpha \cdot \text{doz}^\beta \quad (2.12.)$$

$$\log(Y) = \log(\alpha) + \beta \log(\text{doz}) \quad (2.13)$$

β eğim olup, doz ve Y arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermektedir. Eğer $\beta = 0$ ise cevap dozdan bağımsızdır. $\beta = 1$ ise doz orantısallığı kabul edilir. β 'nin 1'e eşit olup olmadığı test edilir. Bu yöntemin üstünlüğü genellikle sabit varyansla ilgili olağan varsayımlar kullanılması ve alternatif varyanslara ihtiyaç olmamasıdır (235).

Eşitlik Kriteri

Eşitlik kriteri yöntemi ise FDA ve EMA kılavuzlarında yer alan biyoeşdeğerlik esasına dayanmaktadır.

Smith ve ark. (235) doz orantısallığı gösteren geniş güven aralıkları verebilen basit regresyon analiz yöntemlerinin yetersizliğini eleştirmektedir. Önceden belirlenmiş doz normalize edilmiş ortalamaların oranı (r_{dnm}) için % 90 güven aralığı kriterini önermektedir. Önceden belirlenmiş r_{dnm} için $r^{\beta-1}$ olarak tahmin edilebilir r en yüksek dozun en düşük doza oranıdır ve metamatiksel olarak %90 güven aralığında r_{dnm} önceden belirlenmiş sınırlar ile karşılaştırılması β 'nin %90 güven aralığı limitlerinin karşılaştırılmasına eşittir.

En yüksek doz $Y(h)$ ve en düşük doz $Y(l)$ değerleri bağımsız değişkenlerdir. $Y(h)/Y(l) = h/l = r$ olup r maksimum doz oranı olarak adlandırılır. $Y(h)/Y(l)$ 'nin geometrik ortalamasının $r = \text{maksimum doz oranına}$ eşit olması halinde doz orantısallığı kabul edilir. Smith ve ark. bunun için biyoeşdeğerlik yaklaşımını önermektedir. Doz orantısallığının derecesinin tespit edilmesi istenen bir durumdur (21). Biyoeşdeğerlik yaklaşımı kullanılarak kullanıcı tarafından daha önce belirlenmiş alfa, teta 1 (en düşük limit), teta 2 (en yüksek limit) eşdeğerlik sınırları için r oranı uygun aralıkta ise doz orantısallık kabul edilebilir.

Risk alfa, teta1 ve teta 2 değerleri için kılavuzlarda öneri yoktur. Smith ve ark. (32) 0,10 alfa için teta 1 ve teta 2 için 0,8 ve 1,25 önermektedir. Eğim için kabul edilebilir güven aralığı sınırları; $1+(\ln 0,8)/\ln(\text{doz oranı}) < \text{eğim} < 1+(\ln 1,25)/\ln(\text{doz oranı})$ şeklindedir. Bu 0,8 ve 1,25 değerleri verilerin log dönüşümleri sonucu biyoeşdeğerlik için önerilen değerlerdir. Bu nedenle eğim için (1-alfa) % güven aralığı verilen güven aralıkları biyoeşdeğerlik sınırları içinde ise doz orantısallığı kabul edilir.

Hummel ve ark. (234) tarafından 2002-2006 yılları arasında doz orantısallığının değerlendirildiği Pubmed’de yayınlanmış 85 adet makale incelenmiştir. Doz orantısallığının değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemler doz normalize edilmiş veriler üzerinden ikişerli karşılaştırmalar ve güç modeli olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmaya ait özet bir tablo aşağıda verilmiştir. Tablo 2.6. incelendiğinde birçok araştırmacının güç modeli ve ikişerli dozlar halinde karşılaştırmalar yaparak doz orantısallığını değerlendirmeye çalıştığı sonucuna varılabilir.

Tablo 2.6. 2002-2006 yılları arası doz orantısallığının değerlendirildiği literatür sayıları.

Yöntem	N (yöntemi kullanan literatür sayısı)
Doz düzeltilmiş verilerin analizi	
• Sadece genel test	6
• Genel testi takiben ikişerli karşılaştırmalar	2
• İkişerli karşılaştırmalar	14
• Sadece tanımlayıcı istatistikler	7
Ağırlıklandırılmış basit doğrusal regresyon	2
Güç modeli	
• Güven aralıklarına dayalı yorumlama	6
• Eşitlik kriterine dayalı yorumlama	5
• Yukarıdaki 2 yöntemden hiçbiri	6
Eşitlik Kriteri	
• Sadece ikişerli karşılaştırma	2
• Güç modeli yaklaşımı	3
• Güç modeli ve ikişerli karşılaştırma	2
Herhangi bir istatistiksel karşılaştırma ve güven aralığı kullanılmayanlar	12

Kim ve ark.(238) karvedilolün 8 mg-128 mg doz aralığındaki doz orantısallığının değerlendirmiş, güç modeli ile güven aralıkları karşılaştırılmış, ardından doz ayarlanmış farmakokinetik veriler kullanılarak ANOVA modeli ile analiz etmiştir, ve sonuçta fark bulunamamıştır. Oral ve i.v yolla verilen 3 farklı dozdaki baklofenin doz orantısallığının test edildiği çalışmada ve salvianolik asitin köpeklerdeki farmakokinetik sonuçlarının gösterildiği çalışmada doz orantısallığı güç modeli ile değerlendirilmiştir (239, 240). Ganirelix'in artan dozları arasındaki orantısallığı değerlendirme için log dönüştürülmüş farmakokinetik veriler kullanılarak tek yönlü varyans analiz yapılmıştır (241). Oksikodonun hemen salım oral (IRO-A) tabletlerinde doz orantısallığı güven aralığı, regresyon analizi ve güç modeli yaklaşımları ile test edilmiştir. Güven aralığı yöntemi için doz normalize edilmiş doğal logaritmaya dönüştürülmüş farmakokinetik veriler kullanılmıştır. En küçük kareler ortalaması ve geometrik ortalamaları oranı için % 90 güven aralığı hesaplanmıştır. İkinci yöntemde ise doz normalize edilmiş farmakokinetik veriler kullanılarak doğrusal regresyon analizi yapılmış, % 95 güven aralığı ve p değeri ile birlikte eğim ve y-intersept değeri belirlenmiştir. Üçüncü olarak güç modelinde eğimin (β) % 90 güven aralığı ve $p < 0,05$ değeri belirlenmiştir. Güven aralığı yönteminde 5-10 mg ve 5-15 mg dozlarda doz orantısal bulunmuş. Doğrusal regresyon analizinde $p < 0,05$ bulunmuş ve güç modelinde ise C_{maks} 5-49 mg, EAA_{0-t} 5-42 mg, $EAA_{0-\infty}$ 5-68 mg dozlarda doz orantısal bulunmuştur.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalar sırasında aşağıdaki kimyasal maddeler kullanılmıştır.

2-Propanol	Sigma, Almanya
Amonyum Format	Sigma, ABD
Asetonitril	Sigma, ABD
Caco-2 hücre hattı	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
Dabigatran	Jiangxi Pharm.,Çin
D-Glikoz	Sigma, ABD
Dimetil Sülfoksit(DMSO), cell culture grade	Applichem GmbH, Almanya
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>),4.5 g/L glikoz, sodyum pirüvat, stabil glutamin içeren	Biochrom AG, Almanya
Fetal Bovin Serum (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Formik Asit	Sigma, ABD
HBSS (Hanks Dengeli Tuz Çözeltilisi)	Biochrom AG, Almanya
HPMC	Merck, Almanya
Mannitol	Merck, Almanya
Metanol	Sigma, ABD
Na-HEPES 10 Mm	Sigma, ABD
Penisilin / Streptomisin	Biochrom AG, Almanya
PEG	Sigma, ABD
Perklorik Asit	Sigma, ABD
PBS (Fosfat Tamponlu Salin) (pH 7,4, Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen	Biochrom AG, Almanya

Pluronic F 68	Sigma, ABD
Pluronic F 127	Sigma, ABD
Polivinil Pirolidon K-30	Basf, Almany
Pharmacoat 603	Basf, Almany
Rivaroksaban	Teva Pharmaceuticals, İsrail
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck, Almany
Tripan Mavisi (tripan blue)	Sigma, ABD
Tween 80	Sigma, ABD



3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Deneysel çalışmalar sırasında aşağıdaki aletler ve cihazlar kullanılmıştır.

Bilyeli Değirmen	Retsch PM 100, Almanya
Biyogüvenlik Kabini	Faster BHG 2004, Class 2, İtalya
Çözünme Hızı Cihazı	Sotax CH-4123, İsviçre
DSC	Perkin Elmer, ABD
Eclipse Plus C18 2,1x50 mm 1,8 μ LC/MS/MS için Kolon	Agilent, ABD
FT-IR	Bruker Vector 22, ABD
Hassas Terazı AX200	Schimidzu, Almanya
Hemasitometre	Marienfeld Haemacytometer
Hücre Kültürü İnsertleri, Transparan, por çapı 1 mm	Thincerts 12 well, Grenier Bio-one, Almanya
Inertsil ods-3 5 μ m 250x4,6 mm HPLC Kolonu	GL Science, Japonya
İnverted Mikroskop	Leica, Almanya
Karbondioksit İnkübatör	Sanyo, Japonya
Liyofilizatör	Heto Power Dry PL3000, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Heildolph, Almanya
Mikropipet (100 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l)	LLG ve İsolab
Partikül Büyüklüğü Tayin cihazı	Malvern nanosizer, İngiltere
Partikül Büyüklüğü Tayin cihazı	Malvern 2000s Mastersizer, İngiltere
pH- metre	Sartorius, Almanya

Rotavapor	IKA, Almanya
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-LC/MS/MS	Agilent, ABD
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-LC/MS/MS	Schimadzu, Japonya
Taramalı Elektron Mikroskopu	Jeol JSM-5600, Japonya
TEER Ölçüm Cihazı	Millipore ERS, Almanya
Ultra Turaks	IKA, Almanya
Ultrasonik Prob	Bandelin/ Sonopuls, Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	Advantage-Lab, İsviçre
UV Spektrofotmetre	Schimadzu, Japonya
X-Işını Difraktometresi	Rigaku, Japonya
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	Memmert, Almanya
Yüksek Basınçlı Homojenizatör	Microfluidics M 110P, Almanya
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-HPLC	Schimadzu, Japonya

3.2.Yöntemler

3.2.1. RXB ve Nanokristal Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

RXB ve nanokristal formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla ultraviyole (UV) spektrumları ile Fournier Transform Infra Red (FT-IR) spektrumu çekilmiş, ayrıca diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi (DSC), X-ışını kırınımı analizi (X-ray), taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analizi, partikül büyüklüğü analizi, çözünürlük ve çözünme deneyleri yapılmıştır.

UV Spektrumu

RXB'nin asetonitril:su (80:20, h:h) çözücü sisteminde çözündürülmesi ile elde edilen 500 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılarak 1x1 kuartz hücreler içinde UV spektrofotometrede (Schimadzu, Japonya) 200-400 nm dalga boyu aralığında taranarak maksimum pik verdiği dalga boyu saptanmıştır.

FT-IR Analizi

Toz halindeki RXB'nin ve nanokristal formülasyonlarının Bruker Vector 22 (ABD) FT-IR spektrofotometresi ile 650 – 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında FT-IR spektrumu çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analizi

RXB ve nanokristal formülasyonlarının DSC Analizi Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez laboratuvarlarında DSC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum panlar içine yerleştirilen örnek ile 10°C/dk hızda 40-250°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında RXB'nin DSC termogramları çekilmiştir.

X-Işını Kırınımı Analizleri

RXB etkin maddesinin ve nanokristallerinin X-ışını kırınımı analizi Rigaku X-ray Diffractometer (Japonya) cihazı kullanılarak 0.02°/ dk tarama hızında 2θ: 10-40° arasında taranarak gerçekleştirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

RXB etkin maddesinin ve hazırlanan nanokristal formülasyonlarının yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve şeklini incelemek amacıyla numuneler altınla kaplandıktan sonra SEM analizi yapılmıştır. Farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri alınmıştır.

RXB ve Nanokristal Formülasyonlarının Çözünürlük Tayini

RXB etkin maddesinin ve nanokristal formülasyonlarının çözünürlüğü, EMA'nın biyoeşdeğerlik çalışmalarının araştırılması ile ilgili kılavuzunda önerilen üç farklı pH'da (pH 1,2, 4.5, 6,8) (242), ve etkin maddenin ticari preparatının 15 ve 20 mg dozları için FDA tarafından yayınlanan klinik farmakoloji ve biyofarmasötik bilgileri ile ilgili raporunda önerilen çözünme ortamında (% 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponu) tayin edilmiştir (243). Etkin maddenin çözünürlüğü 80 devir/dk hızda, 37±0,5°C sıcaklıkta yatay çalkalayıcıda (Memmert, Almanya) 1 saat ve 24 saat boyunca bekletilerek, nanokristal formülasyonlarının çözünürlüğü ise 24 saat boyunca bekletilerek saptanmıştır.

3.2.2. RXB ve Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünmenin Tayini

RXB etkin maddesinin ve nanokristal formülasyonlarının çözünme hızını tayin etmek amacı ile 20 mg toz RXB ve 20 mg RXB içeren nanokristal formülasyonları tartılmıştır. Sotax çözünme hızı tayin cihazı (CH-4123, İsviçre) ile in vitro çözünme değerleri tayin edilmiştir. Çözünme ortamı olarak; RXB'nin ticari preparatı Xarelto® Film Tablet'in FDA tarafından 2011 yılında yayınlanan raporunda 15 mg ve 20 mg dozlar için çözünme ortamı olarak önerilen ve sink koşulları sağlanması nedeniyle % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Ayrıca aynı çözünme koşulları

FDA tarafından RXB 20 mg tablet için önerilen in vitro çözünme koşullarıdır. Çözünme deneyleri aşağıdaki koşullarda her bir seri için 6 birim üzerinden gerçekleştirilmiştir. Çözünme ortamından (900 mL) 5., 15., 30., 45., 60. (2014 yılında FDA tarafında önerilen örnek alma süresi 45 dk olduğu için bu tarihten sonraki çalışmalarda 60 dk.'da örnek alınmamıştır) dakikalarda 5'er mL örnek alınmış ve eksilen miktar 37 °C'deki çözünme ortamı ile tamamlanmıştır.

Çözünme Ortamı ve Koşulları:

- USP Aparey 2 (Pedal Yöntemi)
- 75 rpm
- 900 mL pH 4,5 Asetat tamponu+% 0,4 SDS
- $37 \pm 0,5$ °C

Çözünen RXB miktarı HPLC yöntemi ile 249 nm'de UV dedektör kullanılarak analiz edilmiştir. HPLC analizlerinde akış hızı 1,2 mL/dk, mobil faz asetonitril (ACN):su (55:45), enjeksiyon hacmi 5 µL, ve sıcaklık 40°C olacak şekilde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda % çözünen RXB değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Çözünme profillerinin benzerliğini incelemek amacıyla f_2 benzerlik faktörü değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

RXB partikül büyüklüğü tayini 10 mg RXB'nin 10 mL'lik balon jojelerde saf su ile dispersiyonu hazırlandıktan sonra Malvern Mastersizer Hydro 2000S kullanılarak yapılmıştır. Çalışmalar sırasında hazırlanan nanosüspansiyon halindeki nanokristal formülasyonlarının ve liyofilize edildikten sonra elde edilen toz nanokristal formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile, zeta potansiyeli ise partiküllerin elektroforetik hareketliliği esasına göre (Malvern Zeta Sizer, İngiltere) ölçülmüştür. Tüm ölçümlerde iç faz RXB'nin refraktif indeksi 1,63, dış faz suyun ise 1,33 olarak alınmıştır. Ölçümler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4. Stabilité Çalışmaları

Etkin maddenin 25 ± 2 °C ve 60 ± 5 bağıl nem ortamında 12 ay süre ile üç farklı seride stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 12 aylık süre boyunca 3'er aylık

periyotlarda 3 farklı seriye ait görünüş, renk, koku, partikül büyüklüğü parametreleri değerlendirilmiştir. Morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 6 ay sonunda SEM analizleri yapılmıştır. Etkin maddenin partikül büyüklüğü analiz edilmiş ve $d(0.5)$ değerleri için dönemler arası varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Etkin maddenin başlangıçtaki ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\% 60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 6. ay sonunda ve etkin madde liyofilize edildikten (72 saat, -55°C ve 0.01 mmHg) sonra X-ışını kırınımı difraktogramları incelenmiştir. Stabilité çalışmaları kapsamında başlangıç ve her üç aylık dönem için in vitro çözünme deneyleri Bölüm 3.2.2.'de belirtilen koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çözünme profillerinin benzerliğini incelemek amacıyla f_2 benzerlik faktörü değerleri hesaplanmıştır.

Nanokristal formülasyonlarının stabilitelerini değerlendirmek amacıyla hazırlanan nanokristal formülasyonları 12 ay boyunca 25°C $\% 60 \pm 5$ bağıl nem ve 6 ay boyunca 40°C $\% 75 \pm 5$ bağıl nem ortamında saklanmıştır. Stabilité çalışmaları sonunda formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülmüş ve formülasyonlardaki $\%$ çözünen RXB miktarı tespit edilmiştir.

3.2.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Stabilizanların Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışmalar

Bu çalışmada RXB nanokristali hazırlamak amacıyla yukarıdan aşağı (top-down), aşağıdan yukarı (bottom-up) yöntemler ve bu yöntemlerin kombinasyonları kullanılmıştır. Bottom-up yöntemi çöktürme teknikleri, top-down yöntemi ise değirmen ve yüksek basınçlı homojenizasyon tekniklerinden oluşmaktadır. Bu yöntemler aşağıda listelenmiştir.

- Değirmende öğütme -Bilyeli Değirmen (BD)
- Yüksek basınçlı homojenizasyon (YH)
- Ultrasonik prob ile nanokristal hazırlama (UP)
- Ultra turaks ile nanokristal hazırlama (UT)
- Birlikte çöktürme (BÇ)

teknikleri kullanılmıştır.

Elde edilen nanosüspansiyonlar dondurarak kurutma yöntemi ile katı hale dönüştürülmüştür.

Bu çalışmada RXB nanokristal formülasyonu hazırlamak amacıyla stabilizan olarak SDS, P 127, Pluronic P 75 (P 75), Poloksamer 188 (P 188) ve HPMC 60 cps ve 3 cps (Pharmacoat 603, P 603), PVP K-30 kullanılmıştır. Öncelikle farklı stabilizanlar kullanılarak aynı yöntemler ile formülasyonlar hazırlanmış ve en iyi partikül büyüklüğü elde edilen stabilizan seçilmiştir. Daha sonra ise en iyi yöntem kombinasyonu belirlenmiştir.

Farklı Stabilizanlar Kullanılarak Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB nanokristal formülasyonu hazırlamak amacıyla stabilizan olarak SDS, P 127 ve HPMC 60 cps ile ultra turaks, ultrasonik prob, bilyeli değirmen yöntemleri ile nanokristal formülasyonları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

SDS ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

SDS stabilizan olarak kullanılarak 1-UT, 1-UP ve 1-BD nanokristal formülasyonlarını hazırlamak üzere her bir formülasyon için RXB ve SDS 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde oranı % 0,4 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak 25 mL hacime distile su ile tamamlanmıştır, homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar UT kullanılarak 3 dakika 11.000 rpm’de, UP kullanılarak %42-43 güçte 3 dakika süreyle karıştırılarak ve BD kullanılarak 10 dk 300 rpm’de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dk öğütülerek üç farklı nanosüspansiyon elde edilmiştir. Hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası her bir formülasyon suda disperse edilerek partikül büyüklükleri yeniden ölçülmüştür.

P 127 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

P 127 stabilizan olarak kullanılarak 2-UT, 2-UP ve 2-BD nanokristal formülasyonlarını hazırlamak üzere her bir formülasyon için RXB ve P 127 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0,4 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 25 mL’ye tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde

edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar UT kullanılarak 3 dakika 11.000 rpm'de, UP kullanılarak % 42-43 güçte 3 dakika süreyle karıştırılarak, BD'de 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dk öğütülerek üç farklı nanosüspansiyon elde edilmiştir. Hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası her bir formülasyon suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

HPMC 60 cps ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

HPMC 60 cps stabilizan olarak kullanılarak 3-UT, 3-UP ve 3-BD nanokristal formülasyonlarını hazırlamak üzere her bir formülasyon için RXB ve HPMC 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0,4 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır, homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon UT kullanılarak 3 dakika 11.000 rpm'de, UP kullanılarak % 42-43 güçte 3 dakika süreyle karıştırılarak ve BD kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dk öğütülerek nanosüspansiyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası her bir formülasyon suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

Tween 80 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB ve Tween 80 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0,4 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır ve homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon BD kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dk öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

P 75 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB ve P 75 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0,4 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır ve homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon bilyeli değirmen kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dk öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

P 603 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB ve P 603 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır ve homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon BD kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 30 dakika öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

P 188 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB ve P 188 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0,5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır ve homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 3 saat manyetik karıştırıcıda ve 1dk UT'da karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon BD kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutlarda 100 g agat bilye kullanılarak 30 dakika öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

PVP K-30 ile Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

RXB ve PVP K-30 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0.5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır, homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 3 saat manyetik karıştırıcıda ve 1 dk UT'da karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon BD kullanılarak 300 rpm'de 10 mm boyutta 30 g agat bilye kullanılarak 30 dakika öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

BD Yöntemi ve İki Farklı Stabilizan Kullanılarak Formülasyon Hazırlanması

Nanokristal formülasyonu hazırlamak amacıyla RXB, P 127 ve PVP K-30 1:1:1 (a/a/a) oranında ve etkin madde % 0,5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Önce stabilizanlar distile suda çözündürüldükten sonra RXB çözeltiye yavaş yavaş karıştırılarak eklenmiştir ve distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 90 dk aralıklarla 4,5 saat boyunca BD'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye ile öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri yeniden ölçülmüştür.

Çöktürme Yöntemi ile Hazırlanan Nanokristal Formülasyonları

1-BÇ formülasyonunda 250 mg RXB ve 250 mg P 127 metanolde çözündürüldükten sonra çözücü uzaklaştırılmıştır. 2-BÇ formülasyonunda ise RXB 25:75:25 aseton:asetonitril:metanol çözücü sisteminde çözündürülmüştür. P 188 ve P 603 100 mL distile suda çözünmüş ve RXB çözeltisine yavaş yavaş karıştırılarak eklenerek RXB'nin çökmesi sağlanmıştır. Organik çözücüler rotavaporda uzaklaştırılmıştır. Ortamdaki suyu uzaklaştırmak için süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon

sonrasında suda disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

Birden Fazla Nanokristal Hazırlama Yönteminin Kombinasyonu ile Hazırlanan Formülasyonların Değerlendirilmesi

RXB nanokristal formülasyonları yukarıda belirtilen yöntemlerin 2'li 3'lü kombinasyonları kullanılarak bir veya birden fazla stabilizan ilavesi ile hazırlanmıştır. Kullanılan nanokristal hazırlama yöntemlerinin kombinasyonu Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Nanokristal hazırlamada kullanılan yöntem kombinasyonları.

Kombinasyon No	YH	BD	UT	UP	BÇ
1	+	+			
2	+				+
3		+	+		
4		+		+	
5		+			+
6			+		+
7				+	+
8	+	+			+
9	+		+	+	

BD ve UP Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

Her bir formülasyonda P 127'nin 25 mL'deki çözeltisine RXB yavaş yavaş eklenerek homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. BD ve UP kullanılarak hazırlanan ilk nanokristal formülasyonlarında, RXB:stabilizan oranı 1:1 ve etkin madde konsantrasyonu %1 olacak şekilde önce BD'de 10 mm 50 g agat bilye kullanılarak öğütülmüş daha sonra UP ile homojenize edilmiştir. İkinci formülasyonda ise etkin madde oranı artırılarak önce UP ile homojenize edildikten sonra BD'de öğütülmüştür. Hazırlanan süspansiyon

hacim olarak 2'ye bölünmüş ve RXB:P 127:mannitol (MN) oranı 2:1:1 olacak şekilde dondurmadan hemen önce kriyoprotektan ajan olarak MN eklenmiştir. Üçüncü formülasyonda ise etkin madde oranı % 3'e çıkarılmış ve 2. bir stabilizan ilavesi yapılarak BD'deki öğütme ve dönüş hızı artırılmıştır. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası suda disperse edilmiş ve partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri yeniden ölçülmüştür.

BD ve UT Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

Aşağıda BD ve UT kullanılarak hazırlanan 7 farklı formülasyona ilişkin hazırlama bilgileri sunulmuştur.

1-UT+BD formülasyonunda RXB ve SDS 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde %0,4 (a/h), konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak 25 mL hacime distile su ile tamamlanmıştır ve homojen bir süspansiyon elde edebilmek için 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon UT ile 3 dk 13.000 rpm karıştırıldıktan sonra BD'de 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 10 dakika öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür. 2-UT+BD, 3-UT+BD ve 4-UT+BD numaralı formülasyonlarda % 0,5 (a:h) konsantrasyonda etkin madde içerecek şekilde P 188, P 127+P 603 ve PVP K-30 ile RXB stabilizan oranı 2:1 olacak şekilde distile suda disperse edilerek manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmış, UT ile 1 dk 11.000 rpm'de homojenize edilmiş ve 10 mm boyutta 100 g agat bilye ile bilyeli değirmende 30 dk öğütülmüştür. Elde edilen süspansiyon dondurulduktan sonra liyofilizatörde 72 saat boyunca -55°C' de kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğünü ölçmek üzere suda disperse edilmiş ve partikül büyüklüğü yeniden ölçülmüştür.

5-UT+BD, 6-UT+BD ve 7-UT+BD numaralı formülasyonlarda ise RXB ve stabilizan oranı sabit tutularak UT karıştırma süresi ve hızı, bilyeli değirmende ise BD artırılmıştır. Öncelikle P 603, P603+P127, P127'nin sudaki çözeltisi hazırlanmış ve etkin maddenin sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlara dondurulmadan hemen önce RXB:MN oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde MN eklenmiş ve liyofilize edilmiştir. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg)

kurutulmuştur, daha sonra tekrar suda disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

BD ve BÇ Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

RXB ve P 127 1:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde balon jojeye alınarak 25 mL metanol içinde manyetik karıştırıcı ve 25°C'de ultrasonik su banyosunda etkin madde tamamen çözünene kadar bekletilmiştir. Daha sonra 40°C alçak basınçta metanol uçurulmuştur. Distile suda disperse edilerek BD 300 rpm'de 30 dk 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak öğütüldükten sonra partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür. Süspansiyonlar dondurularak liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulduktan sonra ve suda tekrar disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri tekrar ölçülmüştür.

BD ve YH Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

1-BD+YH formülasyonu RXB ve P 127 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 1(a/h), konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Öncelikle P 127'nin distile sudaki çözeltisi hazırlanmış, etkin maddenin distile sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon önce 30 dk boyunca 10 mm boyutta 100 g agat bilye ile 300 rpm'de öğütülmüştür. Daha sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de sırasıyla 30, 40, 50 ve 60 döngü yapılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlara dondurulmadan hemen önce RXB:MN oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde MN eklenmiş ve liyofilize edilmiştir. Süspansiyonlar dondurulduktan sonra liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulmuştur ve suda tekrar disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

BÇ ve YH Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

RXB aseton:asetonitril:metanol (25:75:25; h:h:h) çözücü sisteminin içinde çözündürülmüştür. P 188 ve P 603 100 mL saf sudaki çözeltisi, ve %0,25'lik MN çözeltisi RXB'nin aseton:asetonitril:metanol (25:75:25; h:h:h) karışımındaki çözeltisine yavaş yavaş karıştırılarak eklenerek RXB'nin çökmesi sağlanmıştır.

Organik çözücüler rotavaporda uzaklaştırılmış ve ortamdaki suyu uzaklaştırmak için liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrasında distile suda disperse edilerek YH'da 1.500 bar'da 20.000 psi'de sırasıyla 5, 10, 15, 20 ve 30 döngü yapılmıştır. Süspansiyonlar dondurularak liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulduktan sonra partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

UT ve YH Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

UT ve YH yöntemleri ile hazırlanan formülasyonlara ait hazırlama bilgileri sunulmuştur.

1-UT+YH formülasyonunda RXB ve P 127 1:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 0.5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde öncelikle P 127'nin distile sudaki çözeltisi hazırlanmış, etkin maddenin sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 3 dk 13.000 rpm'de UT ile karıştırıldıktan sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de sırasıyla 5, 10, 15, 20 döngü yapılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlara dondurulmadan hemen önce RXB:MN oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde MN eklenmiş ve liyofilize edilmiştir.

2-UT+YH, 3-UT+YH, 4-UT+YH, 5-UT+YH formülasyonlarında RXB ve stabilizanlar 2:1 (a/a) oranında ve etkin madde % 1 (a/h) ve %0,5 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde öncelikle stabilizanların sudaki çözeltisi hazırlanarak etkin maddenin sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 3 dk 13.000 rpm'de UT ile karıştırıldıktan sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de "(2-UT+YH (10, 20, 30, 40, 45, 55, 60 döngü), 3-UT+YH (30 döngü), 4-UT+YH (10, 20, 30, 40, 50, 60 döngü), 5-UT+YH (40 döngü))" homojenize edilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlara dondurulmadan hemen önce RXB:MN oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde MN eklenmiş ve liyofilize edilmiştir. Süspansiyonlar dondurularak liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0,01 mmHg) kurutulduktan sonra suda tekrar disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

UP ve YH Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

1-UP+YH formülasyonunda RXB ve SDS, PVP K-30 oranı 1:1:0,5 (a/a/a) ve etkin madde % 1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde öncelikle PVP K-30 ve SDS ile

MN'nin saf sudaki çözeltisi hazırlanmış ve etkin maddenin sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 5 dk % 42-43 UP ile karıştırıldıktan sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de 30 döngü yapılmış ve liyofilize edilmiştir. Süspansiyonlar dondurularak liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulduktan sonra suda tekrar disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

UP, YH ve BD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

1-UP+YH+BD formülasyonunda RXB ve SDS, PVP K-30 oranı 1:1:0,5 (a/a/a) ve etkin madde % 1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde öncelikle PVP K-30, SDS ve MN'nin sudaki çözeltisi hazırlanmış ve etkin maddenin saf sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenerek manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 5 dk % 42-43 UP ile karıştırıldıktan sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de 30 döngü boyunca homojenize edilmiştir. Daha sonra BD'de 300 rpm'de 30 dk boyunca 10 mm boyutta 50 g agat bilye ile öğütülmüştür. Süspansiyonlar dondurularak liyofilizatörde (72 saat, -55 °C ve 0.01 mmHg) kurutulduktan sonra suda tekrar disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür.

UT, YH ve BD Yöntemi Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlar

1-UT+YH+BD formülasyonunda RXB, P 127 ve PVP K-30 2:1:0,5 (a/a/a) oranında ve etkin madde % 1 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde öncelikle stabilizanların saf sudaki çözeltisi hazırlanarak etkin maddenin sudaki dispersiyonuna karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 30 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyon 3 dk 13.000 rpm'de UT ile karıştırıldıktan sonra YH'de 1.500 bar'da 20.000 psi'de 50 döngü boyunca homojenize edilmiştir. Daha sonra BD'de 90 dk süreyle 300 rpm'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak öğütülmüştür.

2-UT+YH+BD formülasyonunda RXB stabilizan oranı 1:1:0,5 (a:a:a) olacak şekilde P 188 ve PVP K-30 suda çözündürülmüştür. RXB suda disperse edilmiştir. Stabilizan çözeltisi yavaş yavaş karıştırılarak RXB'nin sudaki dispersiyonuna eklenmiştir. Hazırlanan süspansiyon UT'da 3dk 13.000 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra YH'de 20.000 psi'de 50 döngü olacak şekilde homojenize edilmiş ve 150 dk boyunca BD'de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak öğütülmüştür.

3-UT+BD+YH formülasyonunda RXB stabilizan oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde P 603 distile suda çözündürülmüştür. RXB % 1,6 (a:h) konsantrasyonda suda disperse edilmiştir. Stabilizan çözeltisi yavaş yavaş karıştırılarak RXB'nin sudaki dispersiyonuna eklenmiştir. Hazırlanan süspansiyon önce UT'da 3dk 13.000 rpm'de karıştırılmıştır. BD'de 3 saat boyunca 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak öğütüldükten sonra YH'de 20.000 psi'de 50 döngü olacak şekilde homojenize edilmiştir.

4-UT+YH+BD formülasyonunda RXB stabilizan oranı 2:1:1 (a:a:a) olacak şekilde P 127 ve PVP K-30 distile suda çözündürülmüştür. RXB % 0,5 (a:h) konsantrasyonda olacak şekilde suda disperse edilmiştir. Stabilizan çözeltisi yavaş yavaş karıştırılarak RXB'nin sudaki dispersiyonuna eklenmiştir. Hazırlanan süspansiyon önce UT'da 3dk 13.000 rpm'de karıştırılmıştır. 25 mL olarak hazırlanan süspansiyon su ile 50 mL'ye tamamlanarak 1 dk 13.000 rpm'de UT ile karıştırılmıştır. YH'de 60 döngü boyunca homojenize edilmiş ve daha sonra 3 saat boyunca BD 300 rpm'de 10 mm boyutta 100 g agat bilye kullanılarak öğütülmüştür. Hazırlanan süspansiyonlara dondurulmadan hemen önce RXB:MN oranı 2:1 (a:a) olacak şekilde MN eklenmiş ve tekrar suda disperse edilerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür

3.2.6. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonun Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Yapılan ön denemeler sonucunda geçirgenlik çalışmaları için UT, BD, YH yöntemlerinin kombinasyonu ile nanokristal hazırlanmasına karar verilmiştir.

RXB etkin maddesinin farklı stabilizanlar, yüzey etkin maddeler ve yöntem kombinasyonları ile nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Ön denemeler sonucunda farklı stabilizanlar ile nanokristal formülasyonları hazırlanmış ve en küçük partikül büyüklüğü P 127, P 603 ve PVP K-30 kombinasyonu ile elde edilmiştir. Bu nedenle P 127, P 603 ve PVP K-30 kullanılarak yeni nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Her bir formülasyon %1 (a/h) oranında etkin madde içermektedir. RXB: P127 oranı 2:1 oranında sabit tutulmuştur. Formülasyona P 603 ve PVP K-30 ilave edilmiştir. % 0.5 (a/h) konsantrasyondaki stabilizan çözeltisi %1 (a/h) RXB dispersiyonuna eklenerek 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Her bir

formülasyonda öncelikle UT ile 3 dk 13.000 rpm’de ön homojenizasyon işlemi yapılmıştır. Nanokristal formülasyonları BD’de 300 rpm’de 10 mm boyutta 50 g agat bilye kullanılarak 3 saat boyunca öğütülmüştür. Her bir formülasyon YH’de 20.000 psi 1.500 barda 60 döngü yapılarak yüksek basınçta homojenizasyona tabi tutulmuştur. Homojenizasyon sırasında sıcaklık buz banyosu kullanılarak kontrol edilmiştir. Hazırlanan formülasyonlara dondurarak kurutmadan hemen önce % 1 oranında MN eklenerek 72 saat boyunca -55 °C’de liyofilize edilmiştir.

Aynı formülasyon bileşenleri kullanılarak aynı koşullar altında formülasyonlar önce BD öğütme ve ardından YH yöntemi kullanılarak, daha sonra önce YH yöntemi ardından BD yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çalışma sonucunda hangi yöntemin önce uygulanacağına karar verilmiştir. Partikül büyüklüğü UT+BD+YH kombinasyonunda daha küçük bulunduğu için P 127+ 603 ve P 127+PVP K-30 içerecek şekilde tüm koşullar sabit tutularak ve BD’de öğütme süresi 4 saat uygulanarak nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların, DSC analizi, X-ışını kırınımı analizi, FT-IR, SEM ile karakterizasyonu yapılmıştır. Her bir formülasyonun çözünürlük ve çözünme testleri yapılmıştır.

3.2.7. RXB’nin HPLC ile ACN: Su (80:20, h:h) ve % 0,4 SDS İçeren pH 4,5 Fosfat Tamponu İçindeki İn Vitro Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

Deneyisel çalışmalarda kullanılacak model ilaç RXB’nin miktar tayininde kullanılabilecek en uygun analitik yöntemi geliştirmek için literatürde yer alan bilgiler ve etkin maddenin maksimum pik verdiği dalga boyu dikkate alınarak denemeler yapılmıştır (199). UV spektrofotometrede etkin maddenin metanol ve ACN içindeki HPLC kromatogramı tayin edilmiş ve her iki ortamda maksimum absorbans verdiği dalga boyu 249 nm olarak belirlenmiştir. Ön çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında RXB’nin miktar tayininde aşağıda verilen kromatografik koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Cihaz: HPLC Shimadzu (Japonya)

Kolon: GL Sciences Inerstil ODS-3 5 μ (5 μ m; 4,6 mm x 250 mm)

Mobil faz: ACN : Su (55:45, h:h)

Akış hızı: 1,2 mL/dk

Dalga boyu: 249 nm

Enjeksiyon Hacmi: 5 µL

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

Yukarıda verilen kromatografik koşullar çözünürlük ve in vitro çözünme hızı çalışmalarından elde edilen numunelerdeki etkin madde miktarının tayininde ve analitik yöntem validasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Analitik yöntemin validasyonu çalışmalarında aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir.

- Özgüllük
- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara kesinlik
 - Tekrar elde edilebilirlik
- Saptama sınırı
- Miktar tayini sınırı
- Stabilite
- Sağlamlık

Özgüllük

Bir yöntemin özgüllüğü örnek içinde bulunabilecek maddelerin (safsızlık, parçalanma, bozunma ürünleri) varlığında, analiti doğru bir şekilde ölçme yeteneğinin derecesini gösterir (244). Analitik yöntemin etkin maddeye özgünlüğünü göstermek amacı ile aynı dalga boyu aralığında RXB etkin maddesinin, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ve çözünme ortamının ayrı ayrı HPLC kromatogramları tayin edilerek karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

Bir analitik yöntemde çalışılan aralıkta doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı değerlendirilmelidir (244). Bu amaçla RXB'nin 80 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerin % 0.4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponu ve 80:20 (ACN:Su, h:h) ile seyreltilmesiyle 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 40 µg/mL

konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı yanıt olarak kabul edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak RXB'nin kalibrasyon doğruları çizilmiştir, ve regresyon analizi yapılarak determinasyon katsayısı (R^2), y-eksenini kesme değeri (intersept), ve regresyon doğrusunun eğimi hesaplanmıştır. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre doğrusallık değerlendirmesi yapılmıştır.

Doğruluk

Doğruluk, deneysel verilerin gerçek verilere olan yakınlığının ölçütüdür. Doğruluk, % ortalama bağıl hata (OBH) olarak ifade edilmiştir (244). Doğruluğun değerlendirilmesi amacıyla 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda 6 farklı seri ölçülmüştür. Değerlendirme OBH'nın $\pm$ % 2'den küçük olmasına göre yapılmıştır.

$$\% \text{OBH} = (A-B) / B \times 100$$

3.1.

Eşitlikte, A: Tayin edilen konsantrasyon ve B: Gerçek konsantrasyon olarak verilmiştir

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen numuneden alınan çoklu örneklerden elde edilen bir dizi ölçüm sonuçlarının yakınlığı ile değerlendirilmektedir (244). Kesinlik üç düzeyde değerlendirilmektedir: tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

- **Tekrar Edilebilirlik**

Tekrar edilebilirlik kısa bir zaman aralığında aynı koşullar altındaki kesinliği ifade etmektedir. Tekrar edilebilirlik aynı zamanda örnek-içi kesinlik olarak da bilinmektedir. Tekrar edilebilirlik için belirlenen aralıkta en az 9 ölçüm (örn:3 konsantrasyon/3 tekrar) veya test konsantrasyonunun % 100'ünde en az altı ölçüm önerilmektedir (244). Etkin maddenin miktar tayini yöntemi validasyonu için aynı gün içinde 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda 6 tekrarlı ölçüm yapılmıştır.

- **Ara Kesinlik**

Ara kesinlik parametresinin ne ölçüde test edileceği, yöntemin kullanılmasının amaçlandığı koşullara dayanmaktadır. Rastgele seçilen değişikliklerin analitik yöntemin kesinliği üzerindeki etkileri saptanmalıdır. Bu değişikliklere farklı günler, farklı analistler, farklı ekipmanlar örnek verilebilir (244). RXB için geliştirilen yöntemin ara kesinliğinin saptanması için, günler arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Bu amaçla 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda RXB içeren çözeltiler 3 farklı gün içinde hazırlanarak ölçülmüştür.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik farklı laboratuvarları değerlendirmek ve bir yöntemin standardizasyonu durumunda, örneğin, farmakopelere yöntemin dahil edilmesi durumunda önem taşımaktadır. Deneyler arası kesinliğin saptanmasında kullanılmaktadır (244). Bu amaçla 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda 6 farklı çözelti aynı gün içinde iki farklı araştırma laboratuvarı koşullarında hazırlanarak analiz edilmiştir.

Duyarlılık

Duyarlılık, bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup saptayabilme sınırı (*limit of detection*; LOD) ve kantitatif olarak tayin edebileceği (*limit of quantitation*; LOQ) en küçük konsantrasyon değeri ile ifade edilir. LOD, değeri sinyal: gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyondur. LOQ ise sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyondur (244).

Stabilite

RXB'nin analiz süresi boyunca çözelti içindeki stabilitesini göstermek amacıyla 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra, 12 saat, 24 saat sonunda ve 24 saat boyunca +4°C'de bekletilen standart çözeltiler içindeki etkin madde miktarları tayin edilmiştir. Analiz sonuçlarını değerlendirmek üzere ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Sağlamlık

Sağlamlık, laboratuvarlardan kaynaklanan bazı küçük sapmaların ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisini inceler. Bu çalışmanın yapılabilmesi için ön-araştırma çalışmaları, analiz ön aşaması, temizleme ve analiz faktörlerini seçmek gerekir. Bu faktörler; örnek içeriği, üretim tarihi farklı kimyasallar, pH, ekstraksiyon süresi, sıcaklık, basınç, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi faktörlerdir. Faktörler tanımlandıktan sonra, faktör üzerinde biraz değişiklik uygulanır. Sonuçları önemli ölçüde etkileyen faktörlerin yöntem protokolünde açık bir şekilde tanımlanması gerekmektedir. Yöntem parametrelerinde işlem sırasında ufak değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise yöntem o kadar sağlamdır (244). RXB'nin miktar tayini yönteminin sağlamlığını test etmek amacı ile akış hızı değiştirilmiştir. 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 40 µg/mL konsantrasyonlardaki 1 seri standart çözelti hazırlanmış ve 1,2mL/dk ve 1,18mL/dk akış hızında konsantrasyona karşı pik alanları HPLC'de ölçülmüştür.

3.2.8. HBSS içinde RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirme ve Validasyonu

RXB'nin geçirgenlik çalışmalarından elde edilecek örneklerin analizleri Agilent Tech 1290 6460 Triple Quadrupole LC/MS/MS (ABD) sisteminde yapılmıştır. Sistem; Agilent ESI-MS'e bağlı bir pompa, autosampler ve kontrollü sıcaklık sağlayan kolon fırınından oluşmaktadır. Analitik ayırma RXB'nin % 0,1 formik asit içeren su:ACN 10 mM amonyum format içeren su:ACN karışımı ve % 0,1 formik asit ve 10 mM içeren su:ACN karışımı isokratik karışımını kullanılarak Zorbax Eclipse Plus rapid resolution HT C18, 2,1 x50mm,1,8µm, 600 bar kolonundan geçirilerek sağlanmıştır. Stok çözelti için 10 mg RXB tartılmış ve 30 dk manyetik karıştırıcıda ve 1 saat ultrasonik su banyosunda tutularak asetonitrilde çözülmüş hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılacak model ilaç RXB'nin geçirgenlik çalışmaları sonunda HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) içinde miktar tayininde kullanılabilecek optimum bir analitik yöntem geliştirmek için RXB'nin yapısını açıklamak için öncelikle kütle spektrumu (MS) çalışmalarına tabi tutulmuştur ve literatürde yer alan bilgiler dikkate alınarak denemeler yapılmıştır. RXB'nin pozitif ve negatif ESI modunda RXB kütle spektrumunda en fazla iyonlaştığı m/z tespit edilmiş ve iyonlar parçalanmaya çalışılmıştır. Ön çalışmalardan elde edilen bulguların

ışığında RXB'nin miktar tayininde aşağıda verilen kromatografik koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Cihaz: Agilent 1290 6490 Triple Quadrupole LC/MS/MS

Kolon: Zorbax Eclipse Plus rapid resolution HT C18,(2,1mm x50mm,1,8µm)

Mobil faz: 10 mM amonyum format ve %0,1 formik asit içeren su:ACN

Akış hızı: 0,35 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi: 5 µL

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

Yukarıda verilen kromatografik koşullar geçirgenlik çalışmalarından elde edilen numunelerdeki etkin madde miktarının tayininde ve analitik yöntem validasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Analitik yöntemin validasyonu çalışmalarında aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir.

- Özgüllük
- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara kesinlik
 - Tekrar elde edilebilirlik
- Stabilite
- Saptama sınırı
- Miktar tayini sınırı
- Sistem uygunluk

Özgüllük

Analitik yöntemin etkin maddeye özgüllüğünü göstermek amacı ile aynı dalga boyunda RXB etkin maddesinin ve ACN ait kromatogramları tayin edilerek karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

Bu amaçla RXB'nin ACN içinde 100 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerin ACN ile seyreltilmesiyle 2,5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra standart çözeltiler 50:50 (h:h) oranında metanol:su:perklorik asit (50:33:17, v:v:v) karışımı ile seyreltilmiştir. Seyreltme sonucunda konsantrasyonları 1,25, 5, 12,5, 25, 50, 125, 250 ng/mL olacak şekilde standart çözeltiler elde edilmiştir. Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanlarının regresyon analizi yapılarak determinasyon katsayısı, y-eksenini kesme değeri (intersept), ve regresyon doğrusunun eğimi hesaplanmıştır. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Doğruluk

Doğruluğun değerlendirilmesi amacıyla 1,25, 25 ve 250 ng/mL, konsantrasyonlarda 6 farklı seri tayini yapılmıştır. Değerlendirme OBH hesaplanarak yapılmıştır.

Kesinlik

Kesinlik üç düzeyde değerlendirilmiştir; tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

- **Tekrar Edilebilirlik**

Etkin maddenin miktar tayini yöntemi validasyonu için aynı gün içinde 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlarda 6 tekrarlı ölçüm yapılmıştır.

- **Ara Kesinlik**

RXB için geliştirilen yöntemin ara kesinliğinin saptanması için, günler arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Bu amaçla 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlarda RXB içeren çözeltiler 3 farklı gün içinde hazırlanarak ölçülmüştür.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik için 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlarda 6 farklı çözelti aynı gün içinde iki farklı analist tarafından hazırlanarak analiz edilmiştir.

Stabilite

RXB'nin analiz süresi boyunca çözelti içindeki stabilitesini göstermek amacıyla 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra, 3 saat, 12 saat sonunda standart çözeltiler içindeki etkin madde miktarları tayin edilmiştir. Analiz sonuçlarını değerlendirmek üzere ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

Sistem Uygunluk

Geliştirilen analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri LC/MS/MS dedektör sistemine 1,25 mg/ml RXB çözeltisi enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltinin sisteme enjeksiyonundan sonra standart enjeksiyonun % varyasyon katsayısı, teorik plaka sayısı, simetri faktörü, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü cihaza hesaplatılmıştır.

3.2.9. Tavşan Plazmasında RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu

RXB'nin plazmadan analizine yönelik olarak literatürde yer alan insan ve hayvan plazmasından tayininde LC/MS/MS yöntemi kullanılmıştır. LC/MS/MS ile miktar tayininde kalibrasyon doğrusu için 100 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden bilinen konsantrasyonlarda kalibrasyon serisi hazırlanmıştır. Bu amaçla ilaç içermeyen boş plazma üzerine bilinen konsantrasyonda RXB içeren stok çözeltiden ilave edilerek 2,5-1000 ng/mL aralığında % 0,1 formik asit içeren ACN:Su (50:50;h:h) çözeltisi ile seyreltmeler yapılarak seriler hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiye konsantrasyonu 100 ng/mL olacak şekilde iç standart olarak hazırlanan dabigatran etakilat çözeltisi eklenmiştir. Plazma proteinlerinin çöktürülmesi aşamasında 40 µL plazma üzerine 160 µL metanol ilave edilerek çöktürüleceği için aynı işlem kalibrasyon serilerine de uygulanmıştır,

çözeltiler 15 sn vorteklenmiştir. Daha sonra örnekler 30 dk süre ile 13.500 rpm'de santrifüj edilerek plazma proteinleri çöktürülmüştür. Temiz bir vial içine 20 µL perklorik asit çözeltisi eklenerek üzerine 80 µL süpernatant ilave edilerek vortekslenmiş ve analiz edilmiştir. RXB'nin in vivo biyoyararlanım çalışmalarından elde edilecek örneklerin analizleri LC/MS/MS kullanılarak yapılmıştır. Sistem ESI-MS'e bağlı bir pompa, otomatik örnek alıcı ve kontrollü sıcaklık sağlayan kolon fırınından oluşmaktadır. RXB pozitif ve negatif ESI modunda RXB kütle spektrumunda en fazla iyonlaştığı m/z tespit edilmiş ve iyonlar parçalanmaya çalışılmıştır. Nebulize gaz akış hızı 8 L/dk, çözünme hattı sıcaklığı 250 °C, Isı bloğu sıcaklığı 400 °C ve kurutma faz akış hızı 15 L/dakika olacak şekilde parçalama gerçekleştirilmiştir. Ön çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında RXB'nin miktar tayininde aşağıda verilen kromatografik koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir. Mobil faz olarak Tablo 3.2.'de verilen akış gradiyenti kullanılmıştır.

Cihaz: Shimadzu LC/MS/MS

Kolon: Zorbax Eclipse Plus rapid resolution HT C18, (2,1mm x50mm,1,8µm)

Mobil faz: %0,1 Formik asit içeren ACN:10mM Amonyum Format içeren su (20:80)

Akış Hızı:0,35 mL/dk

Enjeksiyon hacmi:5µL

Sıcaklık:40 °C

Tablo 3.2. Plazmadan RXB tayini yöntemine ilişkin mobil faza ait akış gradiyenti.

Zaman(dk)	10mM amonyum format içeren Su (%)
0,01	20
3	40
4	20
7	Analiz sonu

Analitik yöntemin validasyonu çalışmalarında EMA tarafından yayınlanan kılavuzlar dikkate alınarak aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir (245, 246).

Doğrusallık

Doğrusallığı test etmek üzere RXB'nin 100 µg/mL'lik stok çözeltisinden hazırlanan 10 µg/mL ve 1 µg/mL 'lik çözeltilerden hareket ederek 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarda kalibrasyon serisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon noktalarına aynı konsantrasyonda 100 µg/mL iç standart eklenmesinden sonra analiz edilmiştir. RXB/dabigatran pik alanlarının oranı hesaplanarak doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. Regresyon analizi yapılarak kalibrasyon doğrusu elde edilmiş ve determinasyon katsayısı, y-eksenini kesme değeri (intersept) ve regresyon doğrusunun eğimi hesaplanmıştır. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Doğruluk

Yöntemin doğruluğunu test etmek üzere bilinen konsantrasyondaki RXB analiz sonucunda elde edilen konsantrasyona yakınlığı % OBH hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Gün içi ve günler arası kesinliği değerlendirmek üzere tekrar edilebilirlik ve ara kesinlik olmak üzere iki düzeyde kesinlik değerlendirilmiştir. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer, standart sapma ve % varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

- **Tekrar Edilebilirlik**

Etkin maddenin miktar tayini yöntemi validasyonu için aynı gün içinde 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL konsantrasyonlarda 5 tekrarlı ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir.

- **Ara Kesinlik**

RXB için geliştirilen yöntemin ara kesinliğinin saptanması için, günler arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Bu amaçla 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL RXB içeren çözeltiler 3 farklı gün içinde hazırlanarak ölçülmüştür.

Özgüllük

Analitik yöntemin etkin maddeye özgüllüğünü göstermek amacı ile metanol ve ACN ile hazırlanan boş plazma ve 1000 ng/mL RXB içeren plazmaya ait kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

Duyarlılık

RXB in vivo miktar tayini için tayin edilebilirlik alt sınırı, en küçük kalibrasyon noktası olan 2,5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Geliştirilen formülasyonlar hücre kültüründe test edilmiştir. Caco-2 hücre hattı kullanılarak inceleme yapılmıştır. Deneylerde Caco-2 hücreleri 37 °C’de % 5 karbondioksit içeren atmosferde inkübe edilmiştir. Deneylerde 21 pasaj sayısı aralığına sahip ATCC-HTB-37 kolon adenokarsinoma Caco-2 hücreleri kullanılmıştır.

Caco-2 hücreleri için % 10 (h/h) fetal sığır serumu (fetal bovin serum, FBS) ve 50 ünite/mL penisilin, 50 µg/mL streptomisin içerecek şekilde hazırlanan 3,7 g/L sodyum piruvat (NaHCO₃) ve 4,5 g/L D-glikoz içeren DMEM ortamı (complete medium, tam kültür ortamı) kullanılmıştır.

Caco-2 Hücrelerinin Çözülmesi

Caco-2 hücreleri -180 °C azot tankından alınarak kuru buza konulmuştur. Kültür ortamı su banyosunda 37 °C’ye getirilmiştir. Dondurulmuş Caco-2 içeren vialin 37°C su banyosunda biraz sıvılaşması beklenmiştir. Laminar akış altında tüpteki kültür ortamı üzerine Caco-2 içeren vial tek seferde hızlıca boşaltılmıştır. 1000 rpm’de 3 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan kısım (supernatant) atılmıştır. Çöken hücreler taze kültür ortamında tekrar süspande edilip 25 cm² hücre kültür kaplarına (flask)

aktarılmıştır. Caco-2 hücreleri 37 °C’de nemli hava - % 5 karbondioksit içeren atmosferde inkübe edilmiştir. Ortam gün aşırı değiştirilmiş ve yaklaşık 1 hafta sonra bir hücre kültür kabında hücre sıklığı % 90 olunca (konfluent) tripsinize edilerek başka hücre kültür kaplarına bölünerek pasajlanmıştır.

Pasajlama

1:10 seyreltilmiş tripsin-EDTA çözeltisi kullanılmıştır (Tripsin % 0,005, EDTA % 0,002 a/h). Hücre kültür kaplarındaki kültür ortamı atılmış ve pH 7,4’e tamponlanmış fosfat tamponu (PBS; phosphate buffered saline) ile bir kez yıkanmıştır. Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde tutulmuştur. Bir santrifüj tüpüne ortam eklenmiş üzerine tripsin-hücre karışımı aktarılmıştır. 2.000 rpm’de 3 dk santrifüjlendikten sonra tüpün üstünde kalan kısmı bir seferde boşaltılmıştır. Alta kalan hücreler ortam ile tekrar süspande edilmiş bu süspansiyon yeni kültür kaplarına alınarak inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır

Tripan Mavisi İle Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonu steril ependorfa alınıp tripan mavisi ile 2 kat seyreltilmiştir. Hemasitometreye alınarak mikroskopla sayım yapılmış ve mL’deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

Caco-2 Hücrelerinin İnsertlere Aktarılması

21 pasajdan sonra hücre süspansiyonları insertlere yerleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında Caco-2 hücreleri 12 kuyucuklu plakalardaki insertlere (ThinCert TM, 12 well, 1,0 m por çapı) tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra 6×10^4 hücre / insert olacak şekilde ekilmiştir. Apikale 0,5 mL ve bazolaterale 1 mL ortam eklenmiştir. Plakalar 37 °C’de % 5 karbondioksit içeren nemli ortamda inkübe edilmiştir. Ortam gün aşırı değiştirilmiş, geçiş çalışmaları 23 gün sonra hücre tek tabakası konfluent olunca gerçekleştirilmiştir.

Caco-2 Tek Tabaka Hücre Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Hücre tek tabakasının bütünlüğü TEER ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Caco-2 hücre tek tabakalarının TEER Millicell–ERS epitel voltmetre ile ölçülmüştür.

Kültürdeki membran potansiyelini ve epitel hücrelerin rezistansını güvenilir bir biçimde ölçen Millicell–ERS, kalitatif olarak hücre tek tabaka bütünlüğünü ve kantitatif olarak hücre konfluansını ölçer. TEER değerleri Eşitlik 3.2. yardımıyla hesaplanmıştır.

$$TEER_{\text{hücre tektabakası}} = (R_{\text{örnek}} - R_{\text{boş}}) \times A \quad 3.2.$$

$R_{\text{örnek}}$:ölçülen rezistans, $R_{\text{boş}}$:hücre içermeyen kontrol insertlerin rezistansı, A :hücre kültürü insertinin yüzey alanı (cm^2)

Caco-2'den Geçiş Çalışmaları

Çalışmaya başlamadan önce apikal ve bazolateral alanlar 25 mM D-Glikoz ve 10 mM HEPES içeren HBSS ortamı ile muamele edilmiştir. 30 dakikalık ön inkübasyondan sonra ortamın tamamı atılmıştır. Hazırlanan örneklerden (80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda RXB çözeltisi, en fazla % 2 DMSO içerecek şekilde hazırlanmıştır.) ($n=6$) 500 μL apikale eklenmiş, 1000 μL HBSS bazolateral kısma konulmuş, 37 °C'de 50-60 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. İki saat sonra bazolateralden 1000 μL örnek alınmıştır. 0,45 μm filtrelerden süzülerek LC/MS-MS'de analiz edilmiş ve geçirgenlik katsayıları (P_{app} , cm/s) Eşitlik 3.3. yardımı ile hesaplanmıştır.

$$P_{\text{app}} = dC/dt.1/(AC_0) \quad 3.3.$$

dC/dt :İlaç permeasyon oranı (g/s), A : İnsertlerin yüzey alanı (cell monolayer) (cm^2)
 C_0 : apikal bölgedeki başlangıç konsantrasyonu (g/mL)

3.2.11. İn Vivo Biyoyararlanım Çalışması

İn vivo Çalışmalarda Kullanılan Nanokristal Formülasyonunun Hazırlanması

In vivo çalışmalara in vitro çalışmalardan elde edilen verilerde en iyi in vitro performansı gösteren formülasyon ile devam edilmiştir. Formülasyonda stabilizan olarak P 127 ve P 603 kullanılmıştır. RXB:P 127:P 603 (2:1:1,a:a:a) olacak şekilde nanokristal formülasyonu hazırlanmıştır. Bu amaçla 750 mg RXB, 375 mg P 127 ve

375 mg P 603 tartılmıştır. P 127 ve P 603 25 ml saf suda çözündürüldükten sonra 50 mL saf sudaki RXB dispersiyonuna manyetik karıştırıcıda 900 rpm’de karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiştir. 1.500 rpm de 30 dakika daha karıştırıldıktan sonra 3 dk 13.000 rpm’de UT ile karıştırılmıştır. Daha sonra 240 dakika boyunca 300 rpm’de 10 mm boyutta 100 g agat bilye kullanılarak bilyeli değirmende öğütülmüştür. Son olarak YH’de 60 döngü olacak şekilde 1.500 bar 20.000 psi’de homojenize edilmiştir. Partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür Her bir uygulamadan önce partikül büyüklüğü, PDI ve ZP ölçümleri tekrarlanmıştır.

Nanokristal Formülasyonunun Deney Hayvanlarına Uygulanması ve Örnek Toplama

İn vivo çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen in vivo çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 05.11.2015 tarih ve 2015-84 sayılı etik kurul izni ile yapılmıştır (Bkz. Ek 1). İn vivo çalışmada 2,3-3,7 kg aralığında ağırlığı olan herhangi bir hastalık belirtisi olmayan 6 adet Yeni Zelanda Tavşanı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanların çalışmaya başlamadan önce ağırlıkları tartılmış ve kayıt edilmiştir (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Deney hayvanları olarak kullanılan tavşanların ağırlık değişim tablosu.

Tavşan No	Cinsiyet	Ağırlık (gram)		
		1. uygulama	2. uygulama	3.uygulama
1	Erkek	3075	2937	2724
2	Erkek	2350	2320	2289
4	Erkek	3030	2925	2842
5	Erkek	3070	3065	3087
6	Erkek	2790	2745	2713
7	Erkek	3630	3280	3298

Çalışma tavşanlarda, tek doz, açık etiketli, randomize, çapraz geçişli olarak düzenlenmiştir. Erişkin erkek Yeni Zelanda tavşanları (2300-3700 g) Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğüne bağlı Serum Üretim Çiftliği’nden alınarak H.Ü. Deney

Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiştir. Tavşanların her biri ayrı kafeslerde sınırsız yem ve su erişimi ile 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü altında barındırılarak ve 2 hafta boyunca yeni ortamlarına alışmaları sağlanmıştır. Deney gününden 12 saat önce tavşanların yem erişimi kısıtlanarak mide içeriğinin boşaltması sağlanmıştır ancak yeterli su almalarına izin verilmiştir. Ardından deneye alınacak 6 adet tavşan, deney bankosu üzerinde oturur pozisyonda sabit kalmalarını sağlayan sabitleyicilere alınmıştır.

Çalışma üç periyotlu olarak tasarlanmıştır, her bir tavşana 3mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg dozlarda RXB nanosüspansiyonu oral gastrik gavaj yoluyla verilmiştir. Nanosüspansiyonlar 40:60 h/h oranında su: PEG karışımı içinde verilmiştir. Tavşanlara formülasyonların gastrik gavaj ile uygulanmasından sonra 10 mL de su verilmiştir. Formülasyonların verilmesinin hemen ardından kan örneği toplanmıştır. İlaç uygulamasını takip eden 1. dk / 10. dk / 15. dk / 30. dk / 45. dk / 1. sa / 2. sa / 4. sa / 6. sa / 8. sa /12. sa/24.sa dilimlerinde her seferinde yaklaşık 0.5 mL olmak üzere tavşanların marjinal kulak veninden kan örneği alınmıştır. Kan örnekleri heparinize edilmiş i.v kanül veya kelebek set yardımıyla alınarak yine heparinize edilmiş tüp içine alınmıştır. Alınan kanlar beklemeksizin 4540 rpm 1800g'de 10 dk santrifüjlenerek plazmalarından ayrılmış ve analiz zamanına kadar -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmada çapraz tasarım uygulanarak her tavşanın her etkene maruz kalması sağlanmıştır. Her bir formülasyon RXB'nin vücuttan arınma süresi göz önünde bulundurularak bir haftalık arınma süreçleri ile ($t_{1/2}$: 4-6 sa) ile uygulanmıştır. Çalışmada takip edilen deney planı Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Tavşanlara uygulanan formülasyonlar.

Tavşan No*	1.Uygulama	2.Uygulama	3. Uygulama
1	3 mg	10 mg	15 mg
2	10 mg	15 mg	3 mg
4	15 mg	3 mg	10 mg
5	3 mg	15 mg	10 mg
6	10 mg	3 mg	15 mg
7	15 mg	10 mg	3 mg

*3 numaralı tavşan oral gavaj ile ilaç uygulaması sırasında ex olduğu için çalışmadan çıkarılmıştır.

Farmakokinetik Verilerin Doz Orantısallığının Değerlendirilmesi

RXB'nin farmakokinetik verilerinin 3 mg, 10 mg ve 15 mg doz aralığındaki doz orantısallığı sırasıyla güç modeli (power model), farmakokinetik parametrelerin varyans analizi (ANOVA), basit doğrusal regresyon analizi ve eşdeğerlik kriteri yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Güç modeli için log dönüştürülmüş farmakokinetik parametreler ile (EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$, C_{maks}) log dönüştürülmüş doz arasındaki doğrusal ilişki incelenmiştir. Doz orantısallığı sabiti beta ve % 90 güven aralığı sınırlarında en düşük ve en yüksek limit 0,8 ve 1,25 için $1+(\ln 0,8)/\ln(\text{doz oranı}) < \text{eğim} < 1+\ln(1,25)/\ln(\text{doz oranı})$ oranı hesaplanarak ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra veriler tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmış ve ikili gruplar halinde varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizinde doz ayarlanmış farmakokinetik veriler kullanılmıştır. Burada H_0 hipotezi farmakokinetik cevap/doz = r oranlarının birbirinden farksız olduğu yönünde kurulmuştur ve ANOVA tablosu elde edilmiştir. Regresyon analizi yönteminde ise doz normalize edilmiş veriler en küçük kareler yöntemi ile analiz edilmiş ve intersept değerinin "0" dan farksız olup olmadığı % 95 güven aralığında test edilmiştir. Son olarak ise eşdeğerlik kriteri yöntemi kullanılarak 3 mg-10 mg, 10 mg-15 mg, 3 mg -15 mg dozlar için farmakokinetik parametrelerin % 90 güven aralığında belirlenen sınırlar içinde (% 80-125) eşdeğer olup olmadığı test edilmiştir.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bütün veriler Ortalama $\pm$ standart sapma olarak tablolanmıştır. İn vitro çözünme deneyi sonuçları f_2 benzerlik faktörü hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar Freidman testi ile 0,05 olasılık düzeyinde karşılaştırılmıştır. Plazma konsantrasyon zaman profilleri Microsoft Office Excel'de farmakokinetik ve farmakodinamik veri analizi için bir eklenti program olan *PK SOLVER 2,0* kullanılarak analiz edilmiştir. EAA trapezoidal kural kullanılarak hesaplanmıştır. Doz orantısallığının değerlendirilmesi için basit doğrusal regresyon analizi, tek yönlü varyans analizi, güç modeli ve % 90 güven aralığında eşdeğerlik kriteri yöntemleri kullanılmıştır. Doz orantısallığın için analizler Microsoft Office Excel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemliliği elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p > \alpha$; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p < \alpha$; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre

değerlendirilmiştir. Analitik yöntem için ise validasyon ölçütlerinin değerlendirilmesinde varyasyon katsayısı (VK) değerleri, doğruluk ölçütü için ortalama bağıl hata değerleri hesaplanmıştır. Sağlamlık ölçütü *Wilcoxon* eşleştirilmiş iki örnek testi ile test edilmiştir.

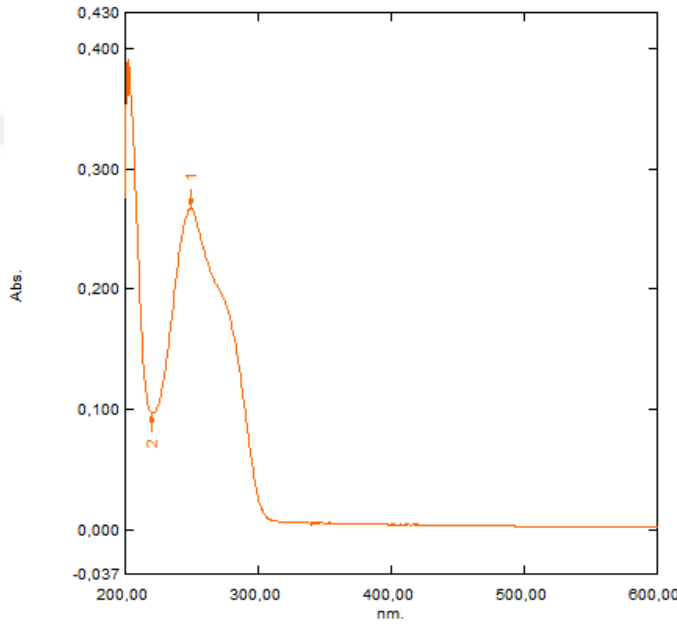


4.BULGULAR

4.1. RXB'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.1.1. UV Spektrumu

RXB'nin UV spektrumu incelendiğinde maksimum pik verdiği dalga boyu 249 nm olarak saptanmış (Şekil 4.1.) ve literatürde yer alan veriler ile uyumlu bulunmuştur.

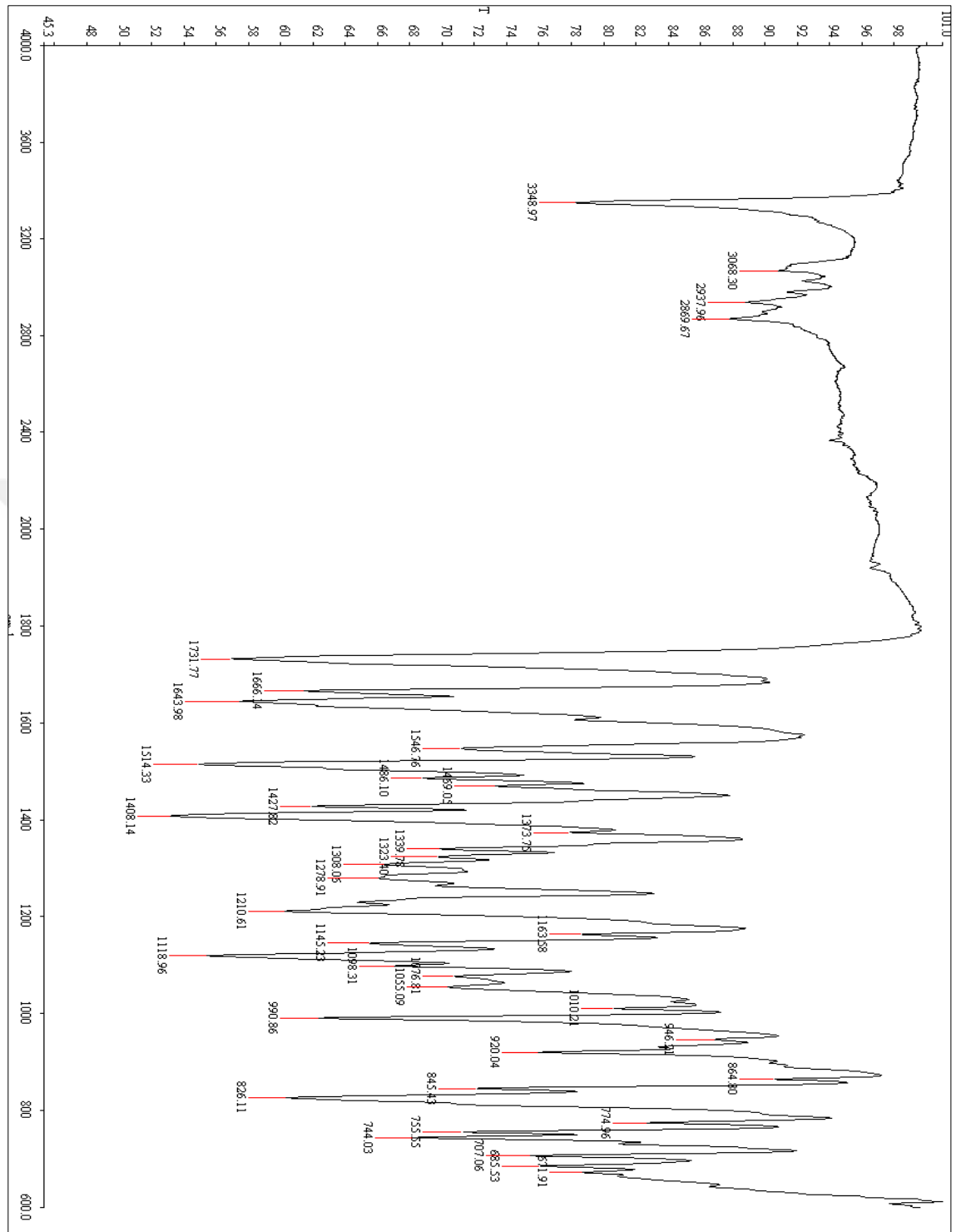


Şekil 4.1. RXB'nin ACN:su (80:20, h:h) içindeki çözeltisine ait UV spektrumu.

Çalışmalarımız sırasında kullanılacak olan tüm analitik yöntem ve validasyon çalışmaları 249 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. IR Spektrumu

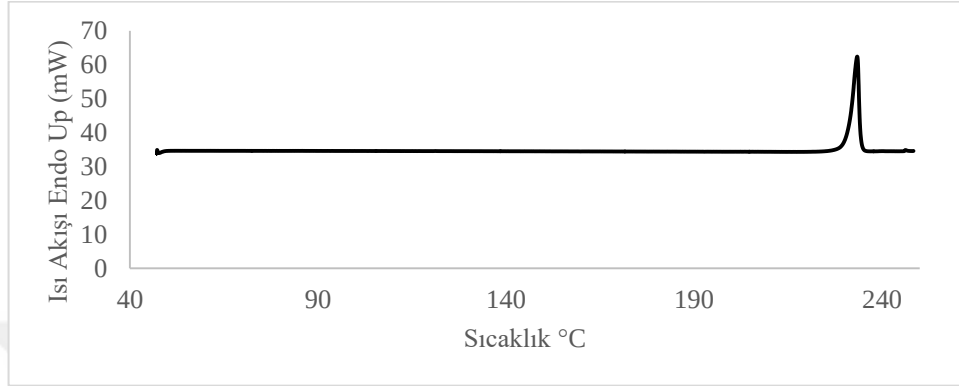
Elde edilen spektrum (Şekil 4.2.) literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında RXB'a ait fonksiyonel gruplara ait piklerin varlığı görülmüştür (247).



Şekil 4.2. RXB'a ait IR spektrumu.

4.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi

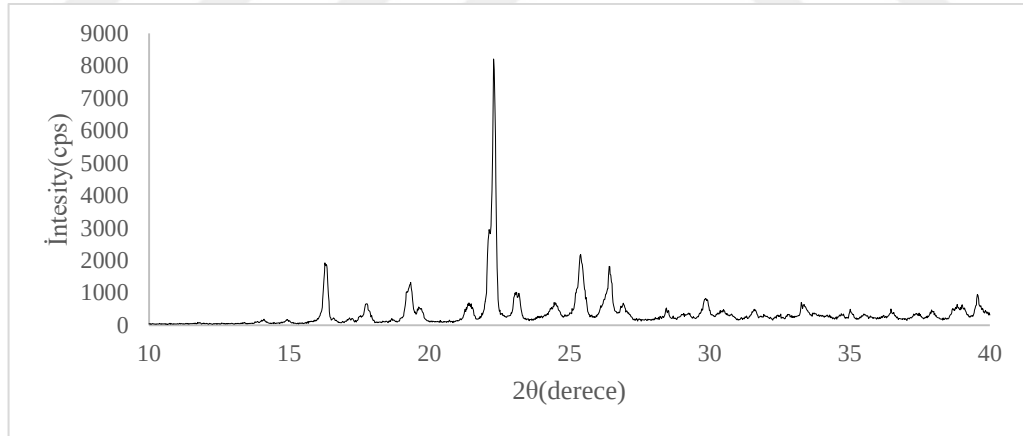
Alüminyum panlar içine yerleştirilen örnek ile 10°C/dk hızda 40-250°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında RXB'nin DSC termogramları incelendiğinde RXB'nin erime derecesi 233,5°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. RXB'a ait DSC Termogramı.

4.1.4. X-Işını Kırınımı Analizi

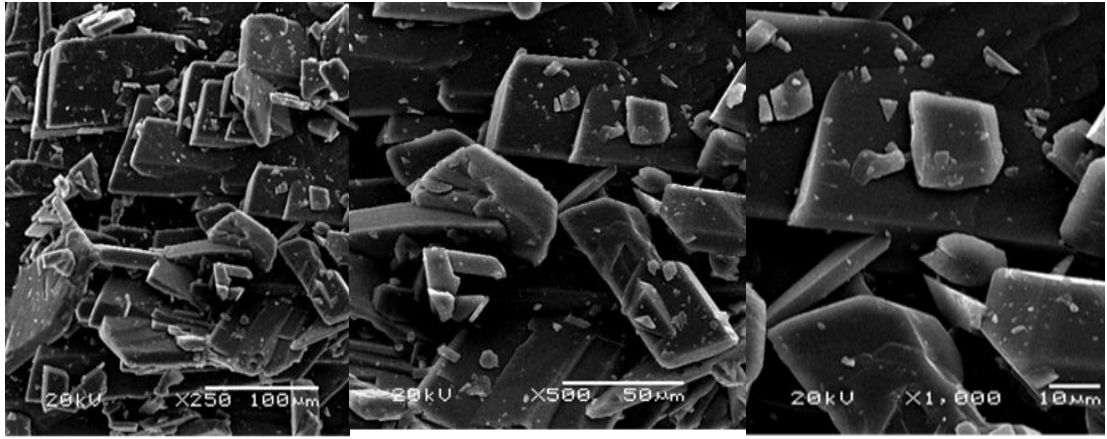
X-ışını kırınımı difraktogramında piklerin gözlenmesi RXB'nin kristal yapıda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4.).



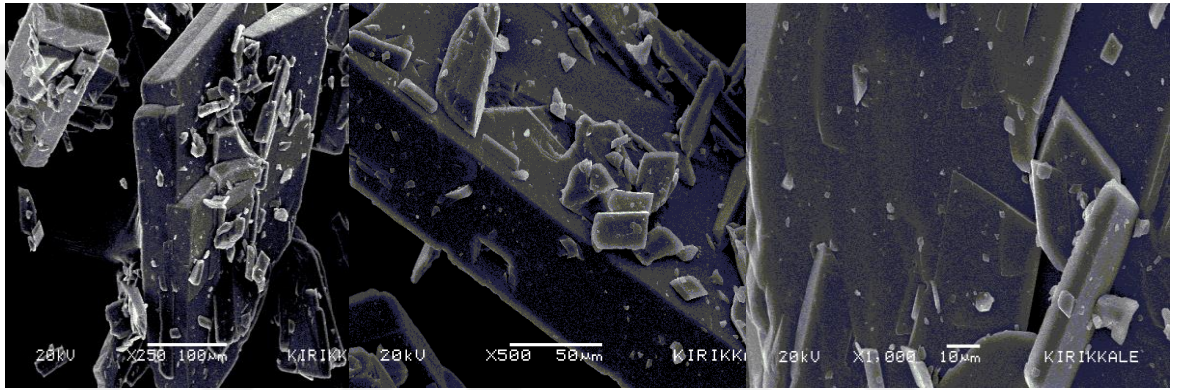
Şekil 4.4. RXB'a ait X- ışını kırınımı difraktogramı.

4.1.5. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Farklı büyütme oranlarında (x250, x500, x1000) kristal yapıda RXB partikülleri gözlenmiştir. Ayrıca düzensiz kübik şekilde partiküllere de rastlanmıştır (Şekil 4.5.). SEM görüntüleri incelendiğinde 10 µm ve 100 µm aralığında partiküllerin varlığı dikkat çekmektedir.



t=0 zaman



t=6 ay

Şekil 4.5. RXB'nin başlangıç (t=0), ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\% 60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay sonundaki SEM görüntüleri (x250, x500, x1000).

4.1.6. Çözünürlük Tayini

RXB etkin maddesinin çözünürlüğü, üç farklı pH'da (pH 1,2, 4,5, 6,8) ve $\% 0,4$ SDS içeren pH 4,5 tamponunda (10, 243) tayin edilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

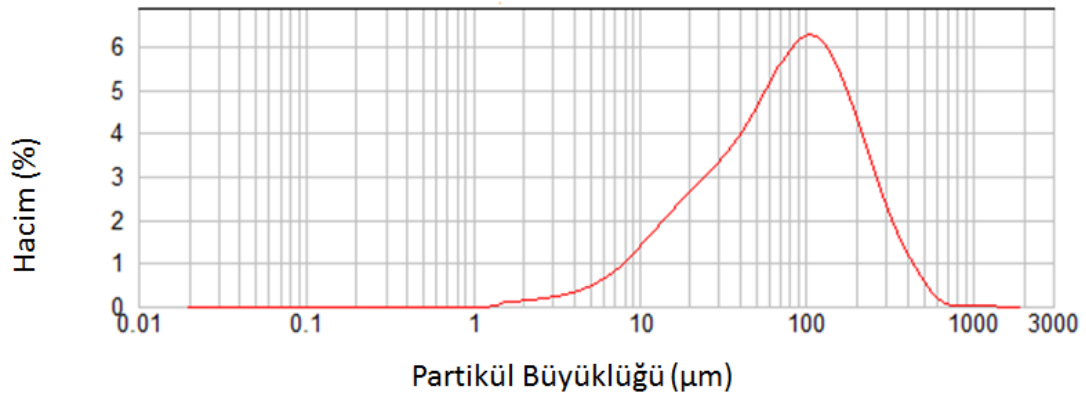
Tablo 4.1. RXB'nin farklı ortamlarda çözünürlük değerleri.

Çözünürlük Ortamı	Çözünürlük (µg/mL)	
	1. saat	24. saat
pH 1,2	8,11 ± 0,64	8,75 ± 0,08
pH 4,5	7,55 ± 0,07	9,41 ± 0,63
pH 6,8	4,82 ± 0,02	6,55 ± 0,44
pH 4,5+%0,4 SDS	15,84 ± 0,08	64,79±0,14

(Ortalama ± SS; n= 3) SS; standart sapma

4.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü Tayini

RXB'nin ortalama partikül büyüklüğü d(0,1) için 14,769±179 µm, d(0,5) için 77,245±1794 µm ve d(0,9) için 235,929±15,531 µm olarak bulunmuştur (Şekil 4.6.).

**Şekil 4.6.** RXB'nin partikül büyüklüğü dağılımı (n=20).

4.3. RXB'nin Stabilité Çalışmaları

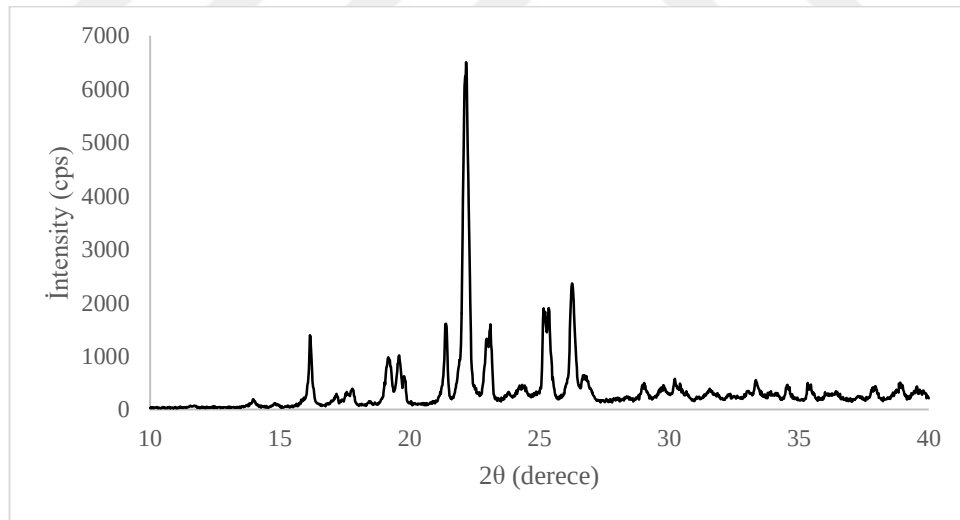
Stabilité çalışmalarında 25±2°C ve % 60±5 bağıl nem ortamında ilk 12 aylık süre boyunca 3'er aylık süreler için 3 farklı seriye ait görünüş, renk, koku değişimi gözlenmemiştir. RXB'nin 6. ay sonundaki morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla SEM analizleri yapılmış x250, x500, x1000 büyütme oranlarındaki görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir. RXB'nin 25±2°C ve % 60±5 bağıl nem ortamında 12 ay sonunda tayin edilen partikül büyüklüğü değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. RXB'nin $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 12 ay sonundaki partikül büyüklüğü.

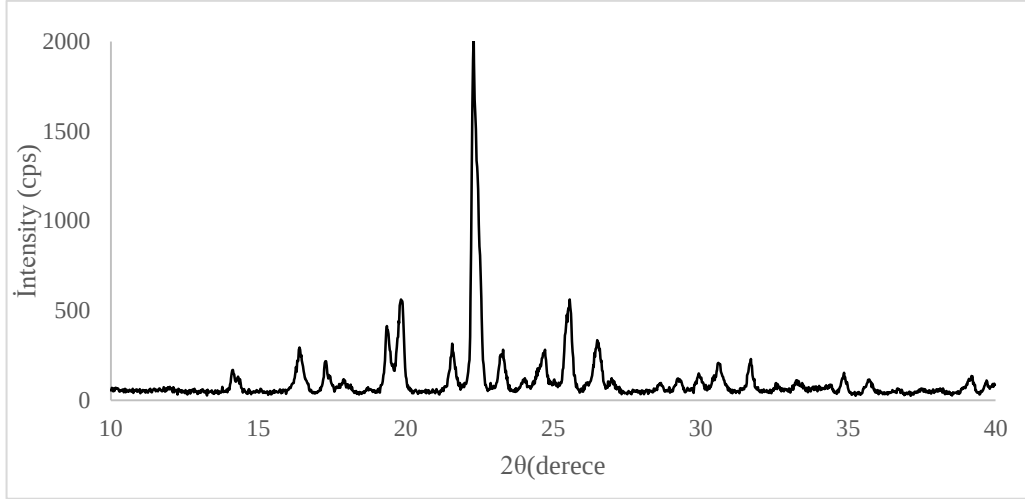
	Partikül Büyüklüğü (μm)		
	d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)
RXB	$14,77 \pm 0,02$	$77,25 \pm 1,79$	$235,93 \pm 151,21$
3. ay	$16,35 \pm 1,85$	$76,68 \pm 14,08$	$274,90 \pm 22,48$
6. ay	$19,26 \pm 0,13$	$69,68 \pm 1,38$	$188,45 \pm 14,93$
9.ay	$14,35 \pm 3,56$	$73,22 \pm 21,92$	$203,83 \pm 67,15$
12.ay	$15,15 \pm 4,44$	$78,84 \pm 26,00$	$212,82 \pm 77,12$
%VK	12,41	4,89	15,07

(Ortalama $\pm$ SS; n= 3) SS; standart sapma

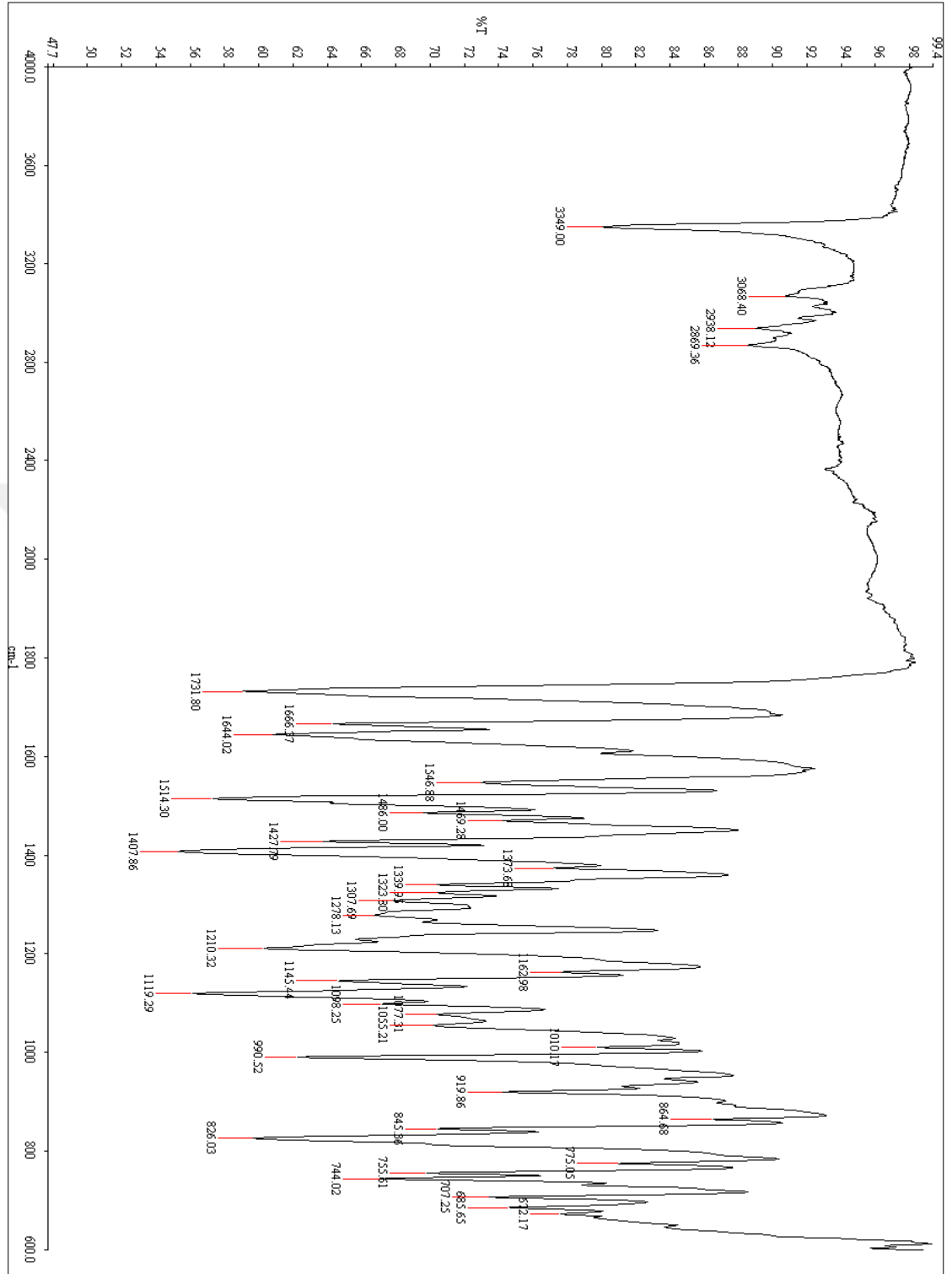
RXB liyofilizasyon sonrası ve 6 ay sonundaki X-ışını kırınımı difraktogramları Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. RXB'nin $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\% 60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 6. ay sonundaki IR spektrumu Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.7. RXB'nin liyofilizasyon sonrası X-ışını kırınımı difraktogramı.

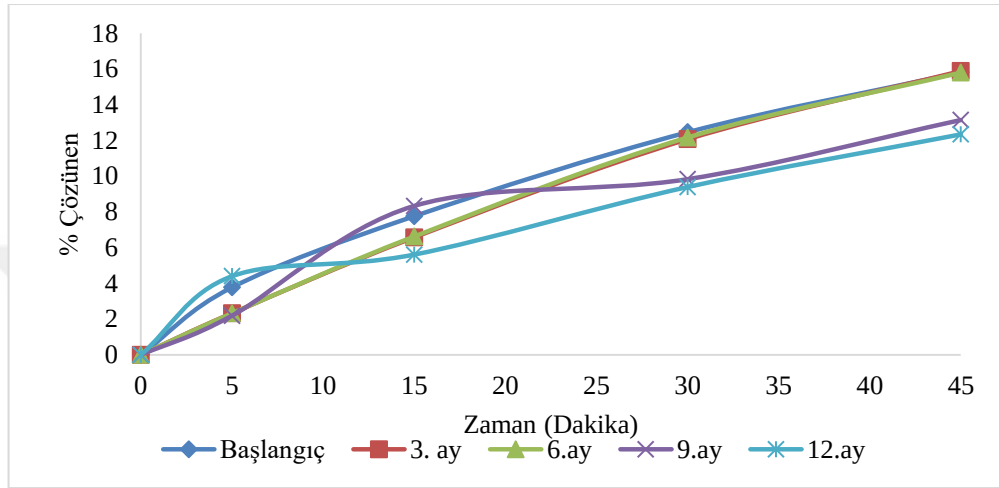


Şekil 4.8. RXB'nin 25 ± 2 °C ve $\% 60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 6. ay sonundaki X-ışını kırınımı difraktogramı.



Şekil 4.9. RXB'nin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve % 60 ± 5 bağıl nem ortamında 6. ay sonundaki IR spektrumu.

Stabilite çalışmaları kapsamında başlangıç ve her üç aylık dönem için in vitro çözünme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda % çözünen RXB değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. RXB etkin maddesinin çözünmesine ait sonuçlar f_2 benzerlik testi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.3.). Tayin edilen çözünme profilleri Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.10. RXB'nin başlangıç ve 25°C±2 °C, % 60±5 bağıl nem ortamında pH 4,5 asetat tamponu+% 0,4 SDS ortamındaki in vitro çözünme profilleri.

Tablo 4.3. RXB'nin çözünme profilleri için tayin edilen f_2 benzerlik faktörü değerleri.

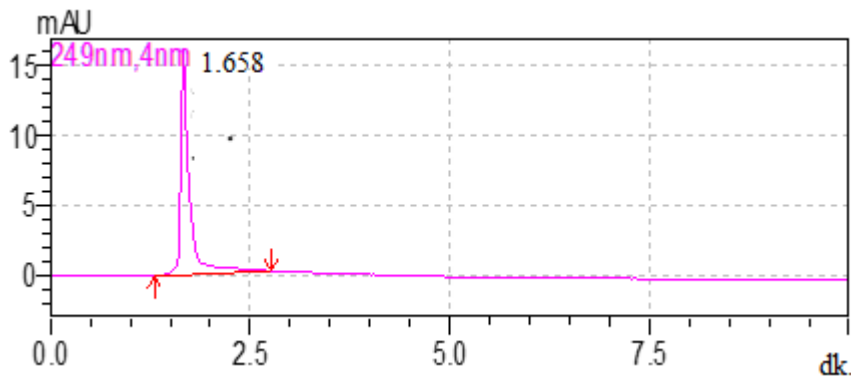
Karşılaştırma yapılan dönemler	f_2
Başlangıç (0) ve 3. ay	91
Başlangıç (0) ve 6. ay	91
Başlangıç (0) ve 9. ay	85
Başlangıç (0) ve 12. ay	81

4.4. RXB'nin HPLC ile ACN: Su (80:20, h:h) ve % 0,4 SDS İçeren pH 4,5 Fosfat Tamponu İçindeki Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

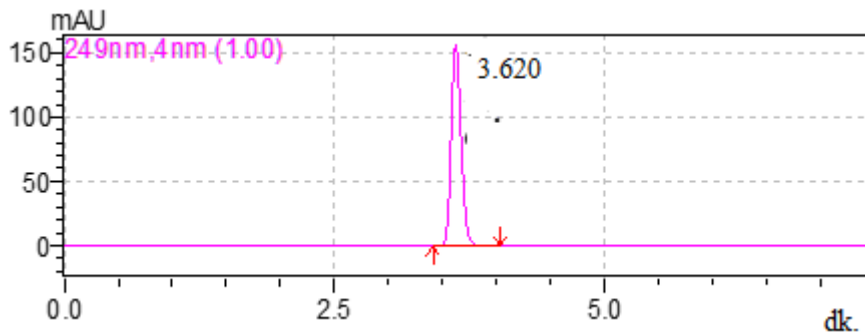
Etkin maddenin metanol ve ACN içindeki HPLC kromatogramı tayin edilmiş ve her iki ortamda maksimum absorbans verdiği dalga boyu 249 nm olarak belirlenmiştir. Ön çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında RXB'nin miktar tayini ve validasyonu Bölüm 3.2.7'de verilen kromatografik koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Özgüllük

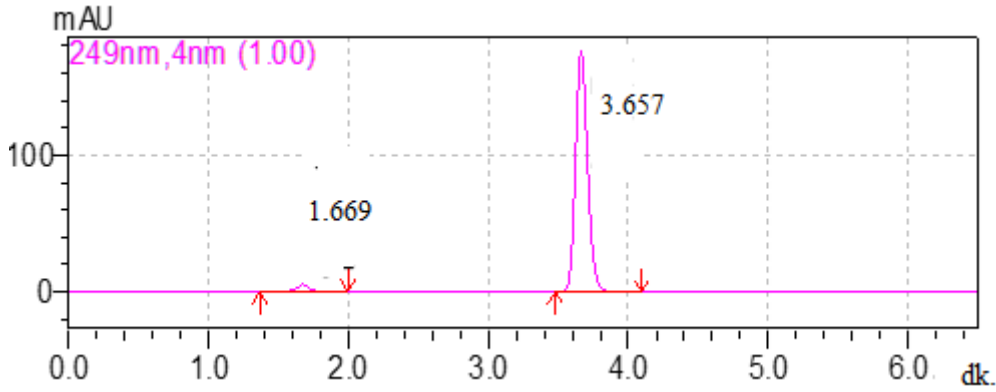
Analitik yöntemin etkin maddeye özgüllüğünü göstermek amacı ile aynı dalga boyu aralığında RXB etkin maddesinin, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ve çözünme ortamının ayrı ayrı HPLC kromatogramları karşılaştırıldığında çözünme ortamlarının ve yardımcı maddelerin RXB'nin alıkonma zamanında (yaklaşık 3,6 dakika) pik vererek girişim yapmadıkları gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar geliştirilen analitik yöntemin özgül olduğunu göstermektedir. (Şekil 4.11.- 4.13.)



Şekil 4.11. SDS içeren (% 0,4 a/h) pH 4,5 asetat tamponuna formülasyon çalışmalarında kullanılan stabilizanların (P 603, P 127) % 0,4 (a:h) konsantrasyondaki çözeltisinin eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı (mobil faz: ACN:su (55:45,h:h); dalga boyu: 249 nm; alıkonma zamanı: 1,658 dk).



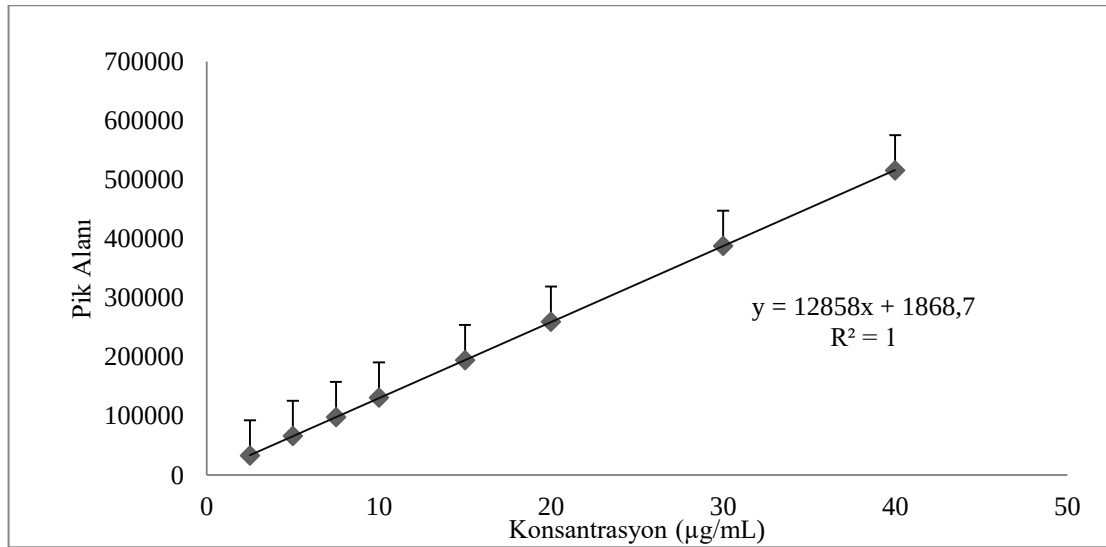
Şekil 4.12. ACN:su (80:20, h:h) çözücü sisteminde 80 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan RXB'nin enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı (mobil faz: ACN:su (55:45,h:h); dalga boyu: 249 nm; alıkonma zamanı: 3,620dk).



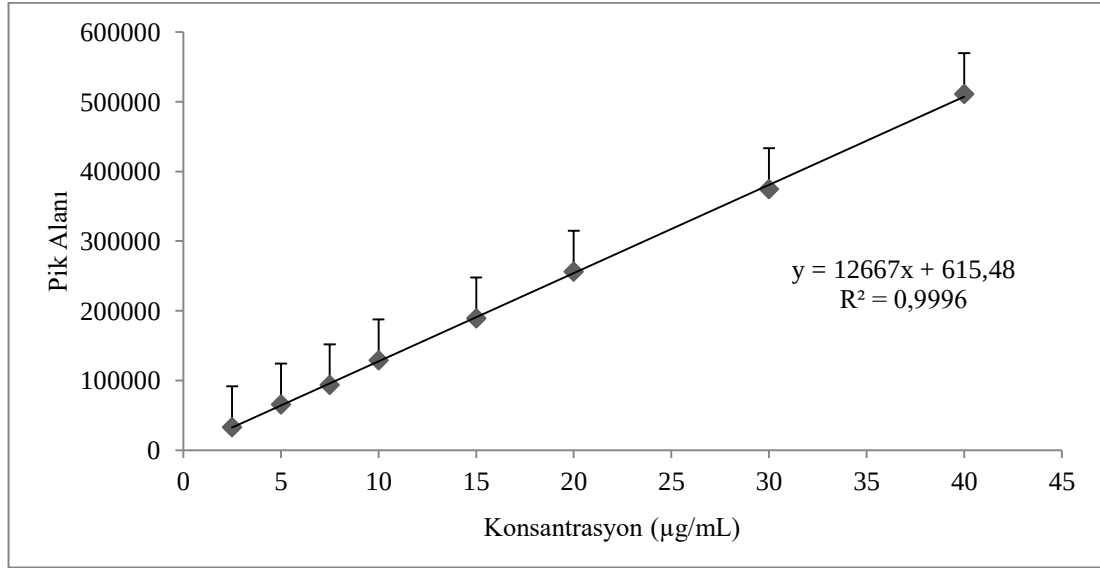
Şekil 4.13. SDS içeren (% 0,4 a/h) pH 4,5 asetat tamponuna RXB (80 µg/mL) ilave edildikten sonra elde edilen HPLC kromatogramı (mobil faz: ACN:su (55:45,h:h); dalga boyu: 249 nm; alıkonma zamanı: 3,657dk).

4.4.2. Doğrusallık

SDS (% 0,4) içeren pH 4,5 asetat tamponu ve 80:20 (ACN:Su, h:h) ortamında 2,5-40 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan RXB çözeltileri için elde edilen kalibrasyon doğrularının determinasyon katsayıları 1'e yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar RXB için pik alanları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir. RXB'nin kalibrasyon doğruları Şekil 4.14. ve 4.15.'de, doğrusallık bulguları ise Tablo 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.14. RXB'nin % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponundaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama ± Standart Hata (SH); n=6).



Şekil 4.15. RXB'nin ACN:Su (80:20, h:h) çözücü ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama $\pm$ SH; n=6).

Tablo 4.4. RXB'ye ait doğrusallık bulguları.

Parametre	% 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponu	ACN:Su (80:20, h:h)
Doğru denklemi	$y=12858x+1868,7$	$y=12667x+615,48$
Determinasyon katsayısı (R^2)	1	0,9996
Eğimin standart hatası	18,98	97,58
Kesişimin standart hatası	386,36	1985,62
Doğrusallık aralığı (µg/mL)	2,5-40	2,5-40
Nokta sayısı	8	8
LOD (µg/mL)	0,17	0,85
LOQ (µg/mL)	0,51	2,5

4.4.3. Doğruluk

RXB tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan % VK % 2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.5. RXB'nin ACN:Su (80:20,h:h) içindeki doğruluk sonuçları.

Eklenen Konsantrasyon			Tayin edilen			%OBH		
(µg/mL)			Konsantrasyon (µg/mL)					
5	20	40	5,125	19,919	39,783	2,50	-0,41	-0,54
			4,988	19,923	39,970	-0,24	-0,39	-0,08
			5,070	20,526	40,868	1,40	2,63	2,17
			5,058	20,895	41,000	1,16	4,48	2,50
			4,967	20,402	40,339	-0,65	2,01	0,85
			4,988	20,408	40,396	-0,24	2,04	0,99
Ortalama			5,033	20,345	40,393	0,65	1,73	0,98
SS			0,061	0,375	0,479			
VK (%)			1,218	1,842	1,186			

(Ortalama± (SS); n=6). VK; Varyasyon katsayısı, % OBH; Ortalama Bağlı Hata [= % OBH= (A-B)/ B x100 A;Tayin edilen konsantrasyon B; Gerçek konsantrasyon

Tablo 4.6. RXB'nin % 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponundaki doğruluk sonuçları.

Eklenen Konsantrasyon			Tayin edilen			%OBH		
(µg/mL)			Konsantrasyon (µg/mL)					
5	20	40	4,943	19,743	39,903	-1,14	-1,29	-0,24
			5,007	19,869	40,344	0,15	-0,65	0,86
			5,010	20,073	39,931	0,21	0,37	-0,17
			5,000	20,261	40,054	-0,01	1,31	0,13
			5,054	20,323	39,996	1,07	1,62	-0,01
			4,947	19,961	39,474	-1,06	-0,19	-1,32
Ortalama			4,993	20,038	39,950	-0,13	0,19	-0,12
SS			0,042	0,226	0,282			
VK (%)			0,842	1,126	0,706			

(Ortalama± SS; n=6). VK; Varyasyon katsayısı, % OBH; Ortalama Bağlı Hata [= % OBH= (A-B)/ B x100 A;Tayin edilen konsantrasyon B; Gerçek konsantrasyon

4.4.4. Kesinlik

Kesinlik üç düzeyde değerlendirilmiştir; tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer SS ve % VK değerleri hesaplanmıştır.

- **Tekrar Edilebilirlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.7.'de verilmiştir.

- **Ara Kesinlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin ara kesinliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.8.'de verilmiştir.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin tekrar elde edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.7. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait tekrar edilebilirlik sonuçları.

			pH 4,5 asetat tamponu + % 0,4 SDS			ACN:Su (80:20,h:h)		
Eklenen Konsantrasyon (µg/mL)			Tayin Edilen Konsantrasyon (µg/mL)					
5	20	40	4,943	20,029	40,395	4,967	19,666	39,121
			4,939	20,006	40,340	4,972	19,576	39,381
			4,956	20,021	40,289	4,865	19,559	39,121
			4,928	20,027	40,275	4,910	19,620	39,068
			4,927	20,027	40,339	4,872	19,617	39,093
			4,920	20,012	40,309	4,893	20,413	38,984
Ortalama			4,936	20,020	40,324	4,913	19,742	39,128
SS			0,013	0,009	0,043	0,047	0,331	0,134
VK (%)			0,264	0,046	0,108	0,947	1,676	0,342

(Ortalama±SS; n=6).

Tablo 4.8. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait ara kesinlik sonuçları.

pH 4,5 asetat tamponu +% 0,4				ACN:Su (80:20, h:h)		
SDS						
Konsantrasyon (µg/mL)						
Gün	5	20	40	5	20	40
1	5,000	20,038	39,950	5,128	20,170	40,297
2	5,033	20,202	40,471	5,070	20,013	40,010
3	5,275	20,597	40,824	5,037	20,487	41,025
Ortalama	5,103	20,279	40,415	5,078	20,223	40,444
SS	0,150	0,287	0,440	0,046	0,242	0,523
VK (%)	2,942	1,416	1,088	0,910	1,195	1,294

(Ortalama±SS; n=3).

Tablo 4.9. RXB'nin miktar tayini yöntemlerine ait tekrar elde edilebilirlik sonuçları.

pH 4,5 asetat tamponu+% 0,4				ACN:Su(80:20,h:h)		
SDS						
Konsantrasyon (µg/mL)						
	5	20	40	5	20	40
1	5,094	20,551	40,966	5,125	19,919	39,783
2	5,061	20,650	40,758	4,988	19,923	39,970
3	4,997	20,588	40,810	5,070	20,526	40,868
4	5,027	20,645	40,807	5,058	20,895	41,000
5	5,031	20,573	40,813	4,967	20,402	40,339
6	4,990	20,577	40,792	4,988	20,408	40,396
Ortalama	5,033	20,597	40,824	5,033	20,345	40,393
SS	0,039	0,041	0,072	0,061	0,375	0,479
VK (%)	0,775	0,198	0,177	1,218	1,842	1,186

(Ortalama±SS; n=6).

4.4.5. Duyarlılık

Etkin maddenin tayininde kullanılan analitik yöntemin LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.4.'de, verilmiştir.

4.4.6. Stabilité

RXB'nin analiz süresi boyunca çözelti içindeki stabilitesini göstermek amacıyla 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra, 12 saat, 24 saat sonunda ve 24 saat boyunca +4°C'de tutulduktan sonra gerçekleştirilen miktar tayini değerleri Tablo 4.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.10. RXB'nin analiz süresince stabilite sonuçları.

% 0,4 SDS pH 4,5 asetat tamponu							
Konsantrasyon (µg/mL)	0. saat	12. saat	24.saat	24. saat (+4C°)	Ortalama	SS	VK (%)
5	5,461	5,266	5,174	5,230	5,283	0,108	2,042
20	21,498	20,479	20,494	20,609	20,770	0,423	2,039
40	42,832	42,597	42,777	41,294	42,375	0,630	1,488

ACN:Su (80:20,h:h)							
Konsantrasyon (µg/mL)	0. saat	12. saat	24.saat	24. saat (+4C°)	Ortalama	SS	VK (%)
10	10,490	10,468	10,464	10,165	10,397	0,134	1,293
20	20,650	20,636	20,580	20,553	20,605	0,040	0,192
40	40,758	40,835	40,841	40,614	40,762	0,091	0,224

(Ortalama±SS; n=3).

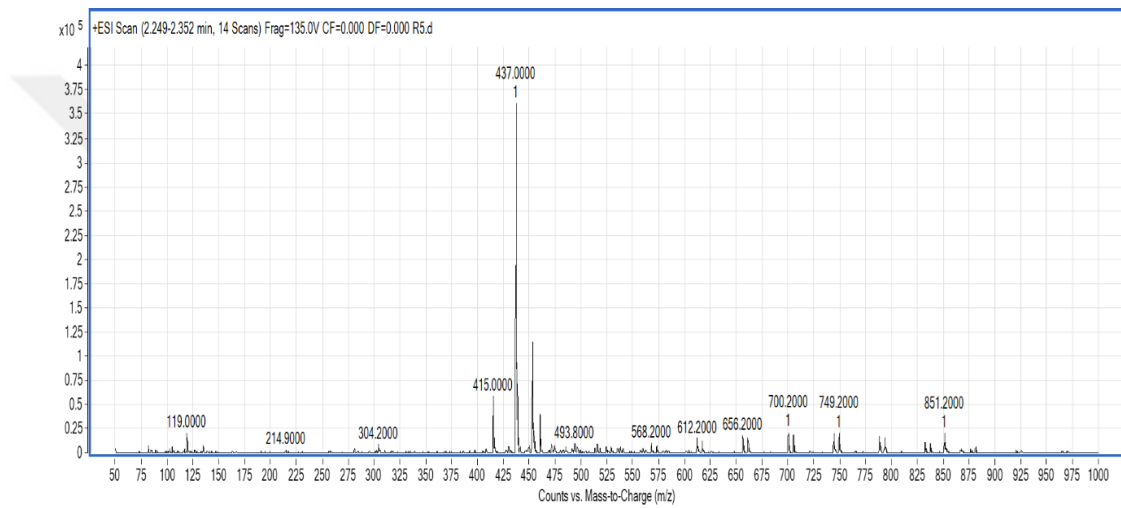
4.4.7. Sağlamlık

RXB'nin miktar tayini yönteminin sağlamlığını test etmek amacı ile akış hızı değiştirilmiştir. 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 40 µg/mL konsantrasyonlarda 1 seri standart çözelti hazırlanmış ve 1,2 mL/dk ve 1,18 mL/dk akış hızında konsantrasyona karşı pik alanları HPLC'de ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları arasında anlamlı fark olup olmadığı

Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile test edilmiş ve iki eş arasındaki farkın önemli olmadığı ($p > 0,05$) bulunmuştur.

4.5. HBSS’de RXB’nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini ve Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

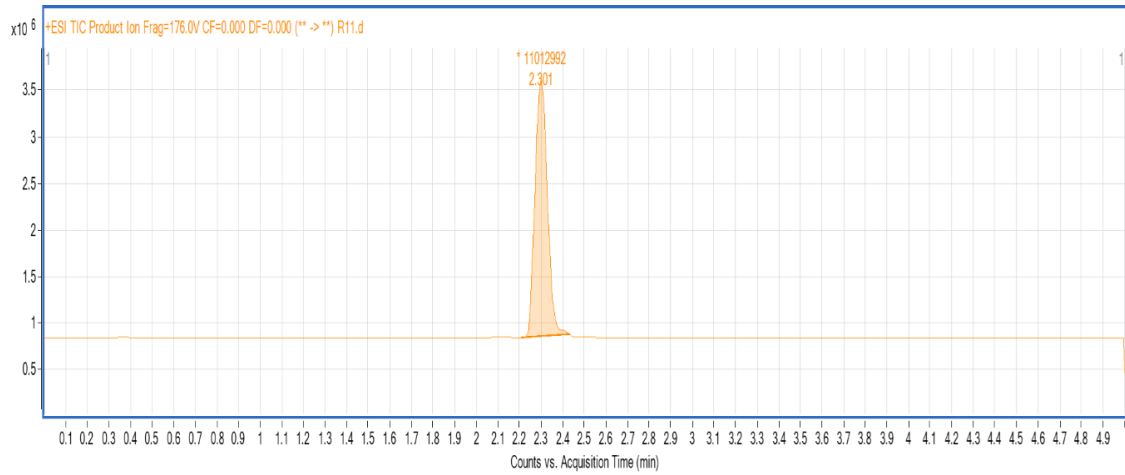
RXB’nin yapısını açıklamak için öncelikle kütle spektrumu çalışmalarına tabi tutulmuştur. Pozitif ESI modunda RXB kütle spektrumunda 437 m/z’de en fazla iyonlaşma görülmüştür (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Pozitif ESI altında RXB iyonlarının kütle spektrumu (437 m/z).

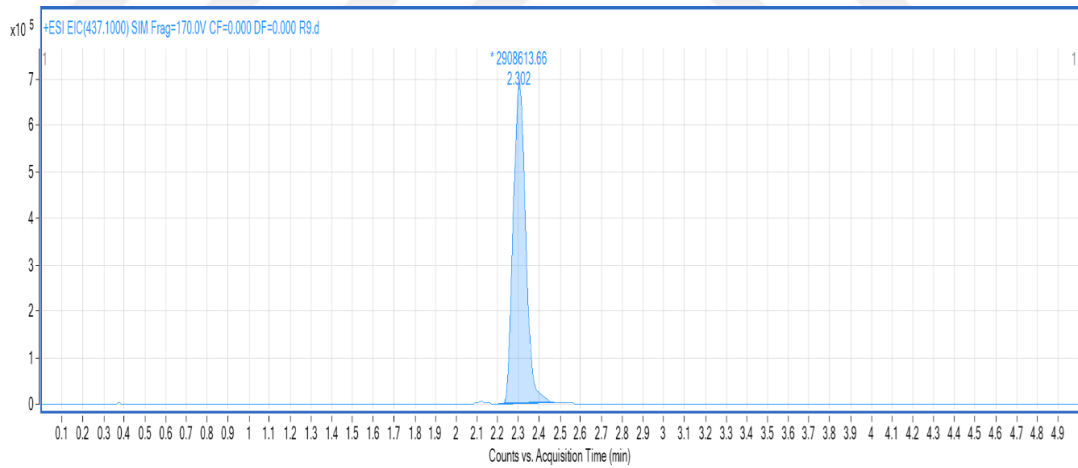
Literatürde RXB kütle spektrumunda 435,9, 436, 436,1 m/z’de iyonlaşma görülmüştür elde edilen veri literatür ile uyumlu bulunmuştur (210, 228, 248) .

RXB’nin 437 m/z için % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışımli hareketli fazdaki kromatogramları alınmıştır. Fregman voltaj taraması 0-200 V arasında yapılmış ve en yüksek sinyal 437 m/z için 176,0 V olarak belirlenmiştir. RXB piki 2,301 dakikada elde edilmiştir (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. RXB'nin pozitif ESI'da % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışıklı hareketli fazdaki kromatogramı.

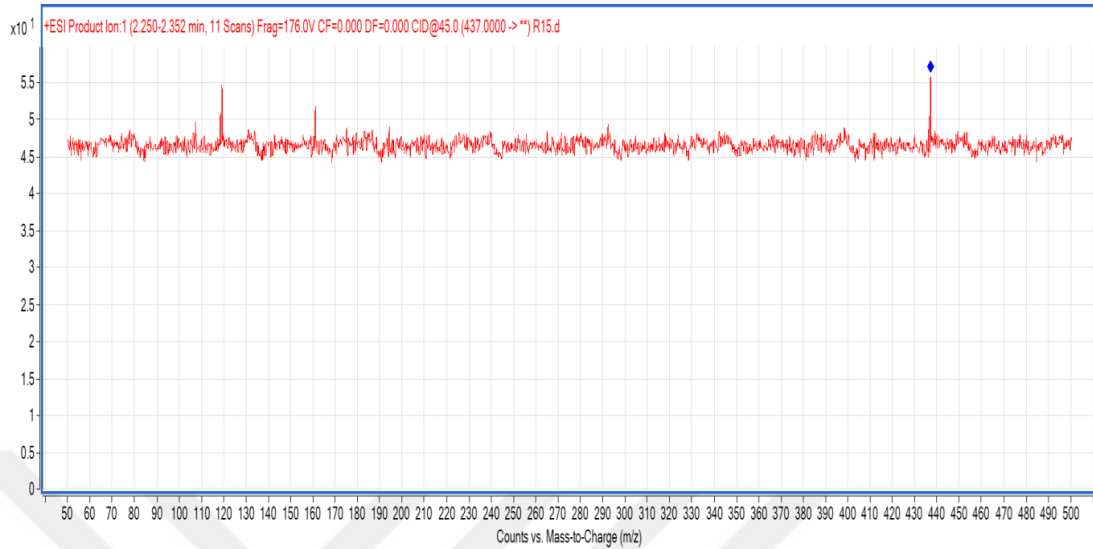
RXB'nin 10 µg/mL stok çözeltisinden hareket ile 100 ng/mL'lik çözeltisi hazırlanarak optimum fregmantasyon voltajında (176 V) 437,0 m/z için SIM (Tek iyon izleme, single iyon monitoring) kromatogramı alınmıştır ve 2,302 dk'da pik elde edilmiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. RXB'nin 437 m/z için 176 V fregman voltajında SIM kromotogramı.

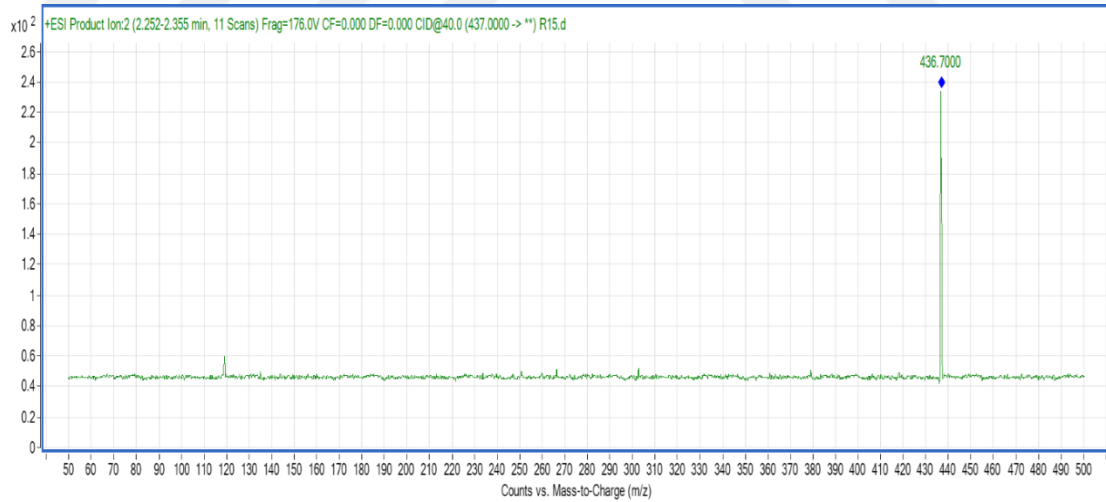
MS² denemeleri 176 V freg voltajı ile yönlendirilen 437 m/z çarpışma hücresinde (*collusion cell*) parçalanmaya çalışılmıştır. 0-50 değerleri arasında çarpışma enerjisi taranmış ve herhangi bir ürün iyonu elde edilememiştir. 45 enerjide

elde edilen MS² spektrumu Şekil 4.19.'da verilmiştir. Ana iyon 437 m/z parçalanarak azalmış ama herhangi bir ürün iyon oluşmamıştır.



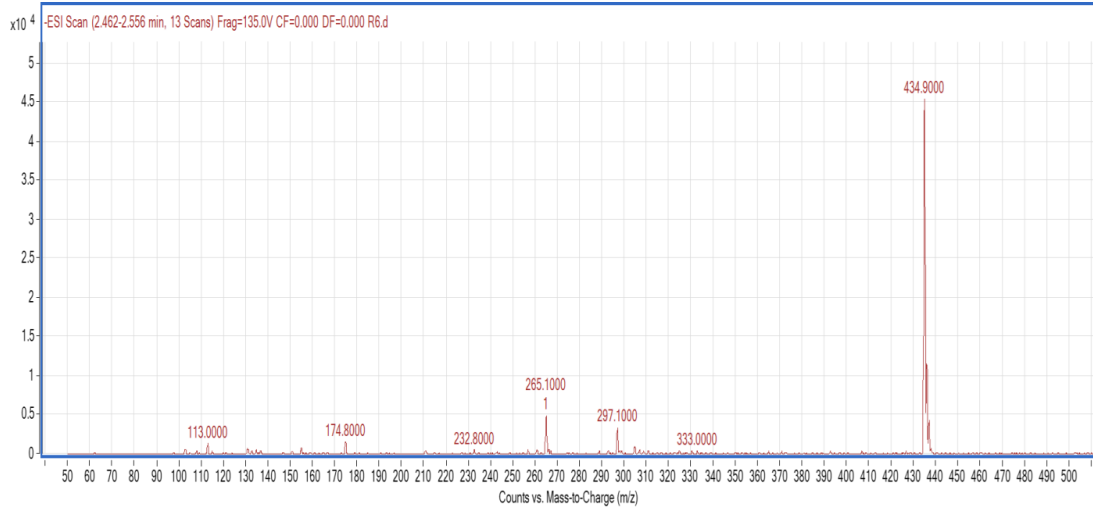
Şekil 4.19. RXB'nin 176 V freq voltajı ile kütle spektrumu.

40 enerjide elde edilen MS² spektrumunda ana iyonun 437 m/z'de düşük enerjide parçalanmamış hali Şekil 4.20.'de görülmektedir.



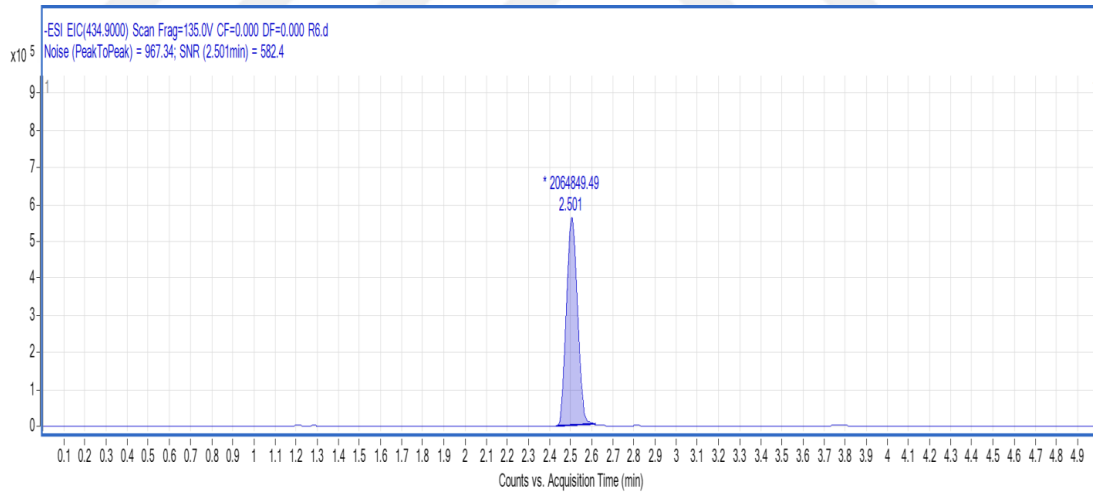
Şekil 4.20. RXB'nin 40 enerjide kütle spektrumu.

RXB'nin negatif ESI iyonlaşmada gözlenen MS spektrumunda ise RXB'nin ana iyon sinyali 434,9 m/z olarak bulunmuştur (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. RXB'nin negatif ESI modunda % 0,1 formik asit su ve % 0,1 formik asit ACN karışımı hareketli fazdaki kütle spektrumu.

Negatif ESI modunda 434,9 m/z % 0,1 formik asit su ve % 0,1 formik asit asetonitril karışımı hareketli fazdaki kromatogramı alınmış (Şekil 4.22.) ve S/N (sinyal/gürültü) oranı pozitif ESI'de elde edilen pikten küçük olduğu için pozitif ESI uygulamaya karar verilmiştir.

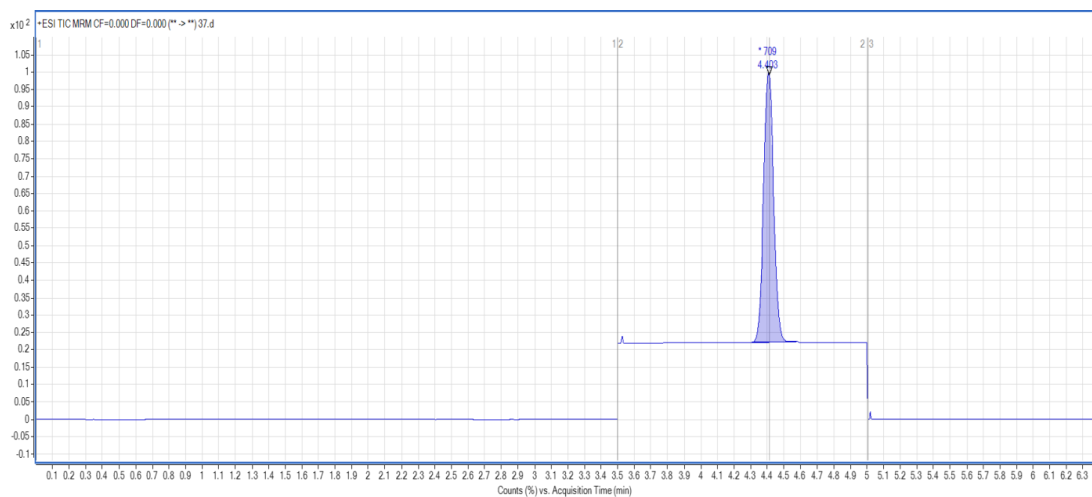


Şekil 4.22. RXB'nin negatif ESI'da % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.

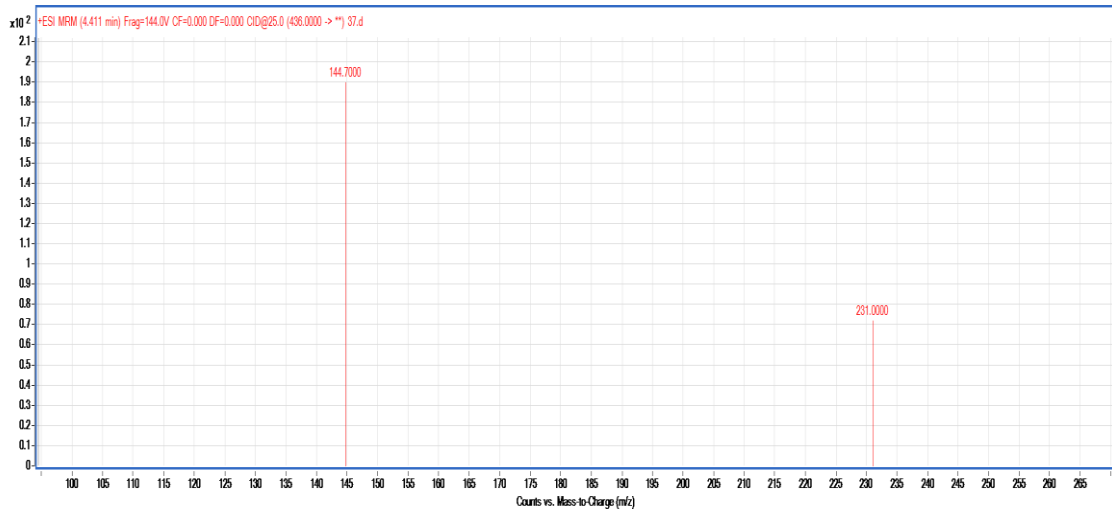
Ancak % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren ACN karışımında herhangi bir iyon parçalanması görülmediği için mobil faz değiştirilmiştir. Mobil faz olarak 10 mM amonyum format içeren su:ACN karışımı ve % 0,1 formik asit ve 10 mM Amonyum format içeren su:ACN karışımı kullanılarak yeniden denemeler yapılmıştır. RXB'nin 437 m/z için her iki hareketli fazda kromatogramı alınmıştır. Üç

farklı mobil faz ile yapılan denemeler sonucunda sinyal gürültü oranı en iyi çıkan ortam olan 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su:ACN karışımı mobil faz olarak belirlenmiştir. RXB'nin 4.4 dakikada piki elde edilmiş, ancak 0- 50 değerleri arasında çarpışma enerjisi taranmış ve herhangi bir ürün iyonu elde edilememiştir. Ancak MS² denemeleri 135 V freg voltajı ile yönlendirilen 435,9 m/z çarpışma hücresinde (collusion cell) parçalanmaya çalışılmıştır. Ana iyon 435,9 m/z parçalanmamış herhangi bir ürün iyon oluşmamıştır.

Piklerde kuyruklanma olduğu, düzgün pik elde edilemediği için standart çözeltiler metanol:su:perklorik asit (50:33:17, v:v:v) çözeltisi ile 1:1 oranında muamele edilerek yeniden kromatogramı alınmıştır. Fregman voltaj taraması 0-200 V arasında yapılmış ve en yüksek sinyal 436 m/z için 144 V olarak belirlenmiştir. MS² denemeleri 144 V freg voltajı ile yönlendirilen 436 m/z çarpışma hücresinde (collusion cell) parçalanmaya çalışılmıştır. 144,7 m/z ve 231,0 m/z'de parçalanma iyonları görülmüştür. Çalışmalarımıza mobil faz olarak 10mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su:ACN karışımı kullanılmasına, standartların ve numunelerin metanol:su:perklorik asit (50:33:17, v:v:v) çözeltisi ile seyretilmesine karar verilmiştir. RXB'a ait +ESI'daki % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımı hareketli fazdaki kromatogramı ve kütle spektrumu Şekil 4.23. ve 4.24.'de verilmiştir.



Şekil 4.23. RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.



Şekil 4.24. RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kütle spektrumu.

Ön çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında RXB'nin LC/MS/MS ile miktar tayininde aşağıda verilen kromatografik koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir.

HPLC: Agilent 1290 6460 Triple Quadrupole LC/MS/MS

Kolon: ZORBAX Eclipse plus C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,8µm)

Mobil faz: 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su:ACN(80:20,h:h)

Zaman (dk)	Su (v)	ACN(v)
0	80	20
6	60	40
7	80	20

Akış hızı: 0,35 mL/dk

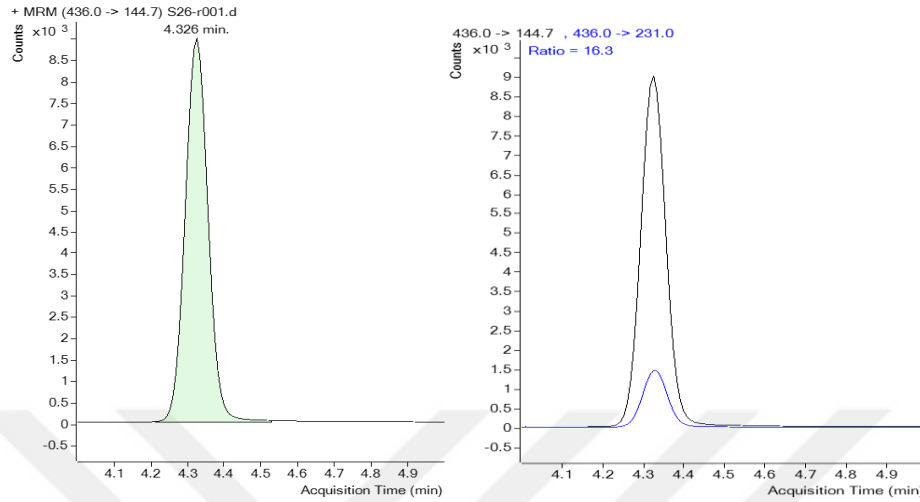
Enjeksiyon Hacmi: 5 µL

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

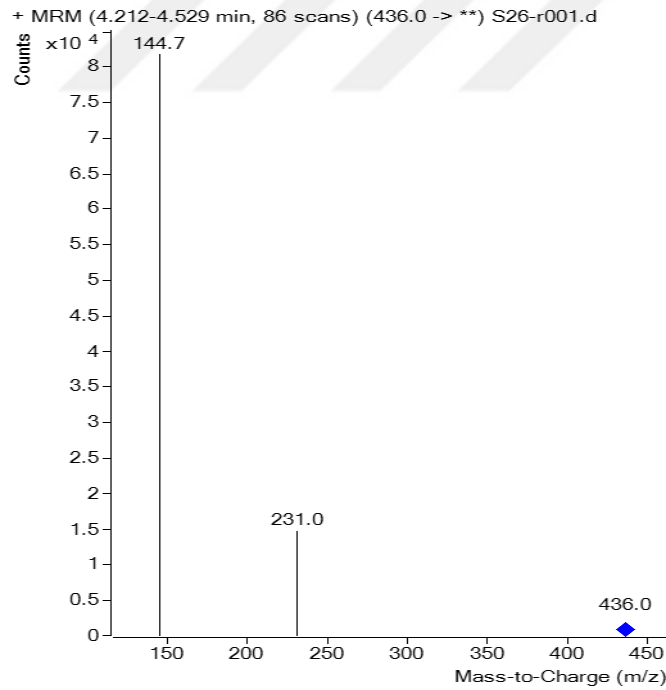
4.5.1. Özgüllük

Analitik yöntemin etkin maddeye özgüllüğünü göstermek amacı ile aynı dalga boyunda RXB etkin maddesinin ve ACN'e ait kromatogramları tayin edilerek karşılaştırılmıştır. LC/MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu karşılaştırıldığında çözünme ortamlarının ve RXB'nin pik vererek girişim

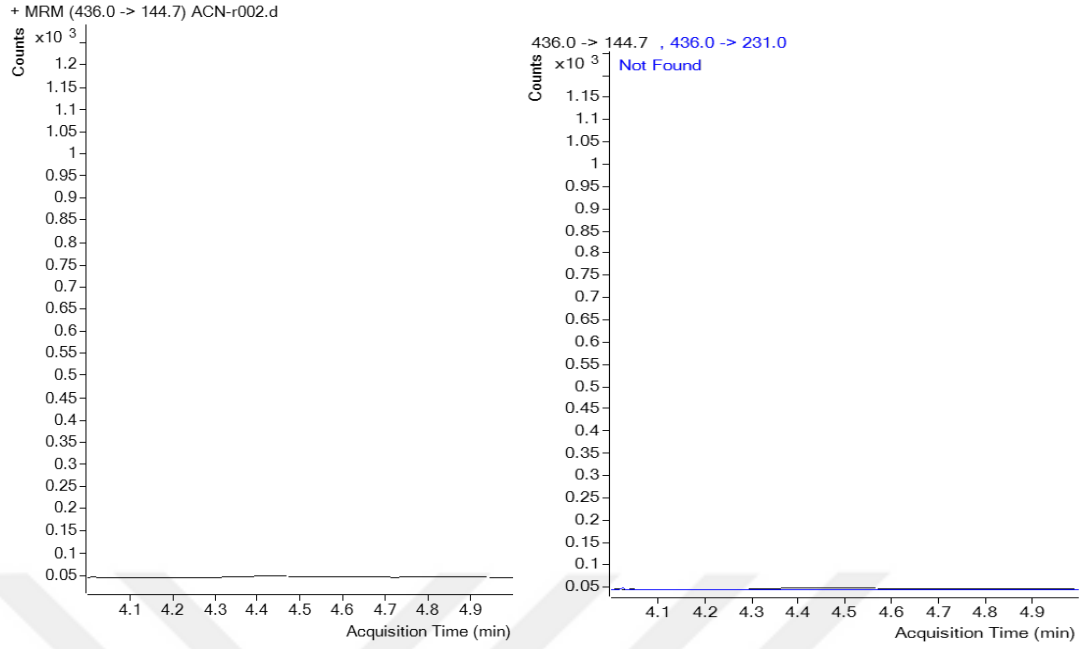
yapmadıkları gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar geliştirilen analitik yöntemin özgül olduğunu göstermektedir (Şekil 4.25.-4.28.).



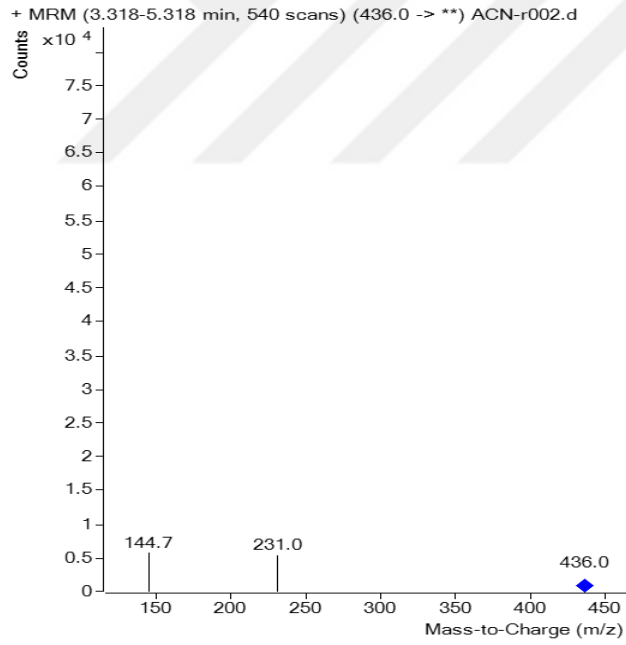
Şekil 4.25. RXB'nin +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.



Şekil 4.26. RXB'nin 144,7 m/z ve 231 m/z 'de kütle spektrumu.



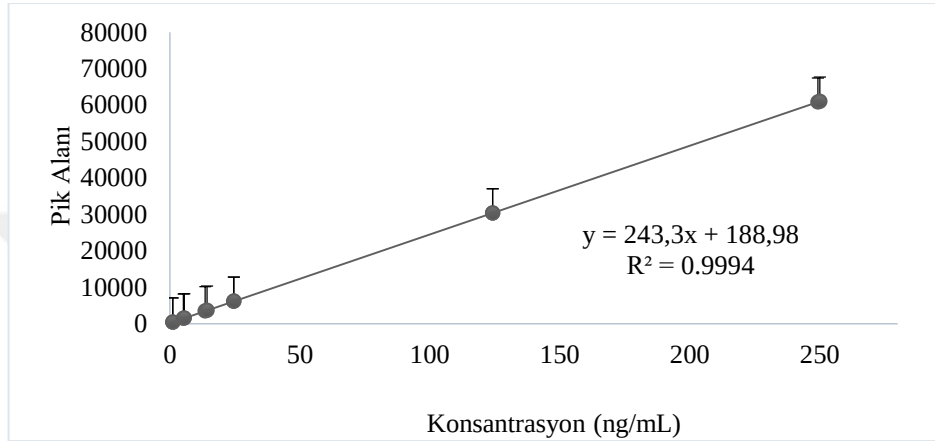
Şekil 4.27. ACN'in +ESI'da 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su ACN karışımı hareketli fazdaki kromatogramı.



Şekil 4.28. ACN'e ait 144,7 m/z ve 231 m/z 'de kütle spektrumu.

4.5.2. Doğrusallık

Konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen pik alanlarının regresyon analizi yapılarak determinasyon katsayısı, y-eksenini kesme değeri (intersept), ve regresyon doğrusunun eğimi hesaplanmıştır. RXB'nin kalibrasyon doğrusu Şekil 4.29.'da ve doğrusallık bulguları ise Tablo 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.29. RXB'nin 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren su asetonitril karışımı hareketli fazdaki kalibrasyon doğrusu (Ortalama $\pm$ SH; n=6).

Tablo 4.11. RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait doğrusallık bulguları.

Parametre	
Doğru denklemi	$y=243,3x+188,98$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9994
Eğimin standart hatası	$4,34 \times 10^{-14}$
Kesişimin standart hatası	$4,98 \times 10^{-12}$
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	1,25-250
Nokta sayısı	6
LOQ (ng/mL)	1,05

RXB için elde edilen kalibrasyon doğrusunun determinasyon katsayısı 1'e yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar RXB için çalışılan konsantrasyon aralığında pik alanları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

4.5.3. Doğruluk

RXB tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.12. de verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağıl hata değeri % 20'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.12. RXB'nin LC/MS/MS 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren Su:ACN (80:20,h:h) içindeki doğruluk sonuçları.

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)			Tayin edilen Konsantrasyon (ng/mL)			%OBH		
1,25	25	250	1,242	22,175	235,898	0,656	12.738	5.978
			1,226	21,892	234,338	1,920	14.197	6.684
			1,141	22,103	237,287	9,528	13.109	5.358
			1,183	25,296	242,546	5,643	-1.171	3.073
			1,350	24,662	239,961	-7,430	1.369	4.183
			1,202	24,652	243,156	3,987	1.410	2.815
Ortalama			1,224	23,464	238,864	2,384	6,942	4,682
SS			0,071	1,561	3,604			
VK (%)			5,807	6,655	1,509			

(Ortalama $\pm$ SS; n=6). VK; Varyasyon katsayısı, % OBH; Ortalama Bağıl Hata [= % OBH= (A-B)/ B x100 A;Tayin edilen konsantrasyon B; Gerçek konsantrasyon

4.5.4. Kesinlik

Kesinlik üç düzeyde değerlendirilmektedir: tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer SS ve % VK değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar en düşük konsantrasyon için % 20'den diğer konsantrasyonlar için % 2'den düşük bulunmuştur.

- Tekrar Edilebilirlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.13.'de verilmiştir.

Tablo 4.13. RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait tekrar edilebilirlik sonuçları.

Tekrar Sayısı	Konsantrasyon (ng/mL)		
	1,25	25	250
1	1,318	22,296	208,538
2	1,373	22,217	210,546
3	1,348	22,173	213,182
4	1,139	22,268	217,663
5	1,228	22,192	217,496
6	1,182	21,915	217,160
Ortalama	1,108	22,177	214,098
SS	0,095	0,136	3,949
VK(%)	8,613	0,615	1,845

(Ortalama±SS; n=6).

- Ara Kesinlik**

RXB için geliştirilen yöntemin ara kesinliğinin saptanması için, günler arası farklılıklar değerlendirilmiştir. RXB tayininde kullanılan analitik yönteminin ara kesinliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.14.'de verilmiştir.

Tablo 4.14. RXB'nin LC/MS/MS miktar tayini yöntemine ait ara kesinlik sonuçları.

Gün	Konsantrasyon (ng/mL)		
	1,25	25	250
1.Gün	1,245	22,057	291,543
2.Gün	1,282	21,721	284,704
3.Gün	1,270	22,177	298,514
Ortalama	1,266	21,985	291,587
SS	0,015	0,193	5,638
%VK	1,202	0,877	1,934

(Ortalama±SS; n=3).

- **Tekrar elde edilebilirlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin tekrar elde edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.15.'de verilmiştir.

Tablo 4.15. RXB'nin LC/MS/MS tayini yöntemine ait tekrar elde edilebilirlik sonuçları.

Tekrar Sayısı	Konsantrasyon (ng/mL)		
	1,25	25	250
1	1,265	24,870	233,414
2	1,203	24,582	233,900
3	1,245	24,558	241,888
Ortalama	1,238	24,670	236,401
SS	0,031	0,174	4,758
VK (%)	2,541	0,704	2,013

(Ortalama±SS; n=3)

4.5.5. Kararlılık

RXB'nin analiz süresi boyunca çözelti içindeki kararlılığını göstermek amacıyla 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra; 3 saat, 12 saat sonunda bekletilen standart çözeltiler içindeki etkin madde miktarlarına ait veriler Tablo 4.16.'da verilmiştir.

Tablo 4.16. RXB'nin LC/MS/MS ile miktar tayininde analiz süresince stabilite sonuçları.

Konsantrasyon (ng/mL)	Zaman (Saat)				SS	%VK
	0.saat	3.saat	12.saat	Ortalama		
1,25	1,245	1,285	1,183	1,238	0,051	4,154
25	24,870	24,558	22,229	23,886	1,444	6,044
250	241,888	233,900	217,440	231,076	12,466	5,395

(Ortalama±SS; n=3)

4.5.6. Sistem Uygunluk Testleri

Geliştirilen analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri için LC/MS/MS dedektör sistemine enjeksiyon sonucu elde edilen bulgular Tablo 4.17.'de verilmiştir. Elde edilen veriler sistem uygunluğunun sağlandığını göstermektedir.

Tablo 4.17. RXB'nin LC/MS/MS ile miktar tayininde sistem uygunluk parametreleri.

Parametre	Kabul Kriteri	Sonuçlar
Standart enjeksiyonun % VK	≤ 2	0,615
Teorik plaka Sayısı	$\geq 2,000$	9915
Simetri faktörü	≤ 2	1,20
Kapasite faktörü	$k' \geq 2$	14
Kuyruklanma faktörü	≤ 2	1

%VK: Varyasyon Katsayısı

4.6. Tavşan plazmasından RXB'nin LC/MS/MS ile Miktar Tayini Yöntemi Geliştirme ve Validasyonu

RXB'nin in vivo biyoyararlanım çalışmalarından elde edilecek örneklerin analizleri için Pozitif elektro sprey iyonlaştırma (+ESI) modunda RXB kütle spektrumunda 436 m/z'de en fazla iyonlaşma görülmüştür. RXB ve iç standarda ait prekürsör iyon ve çarpışma sonucu elde edilen ürünler Tablo 4.18.'de verilmiştir.

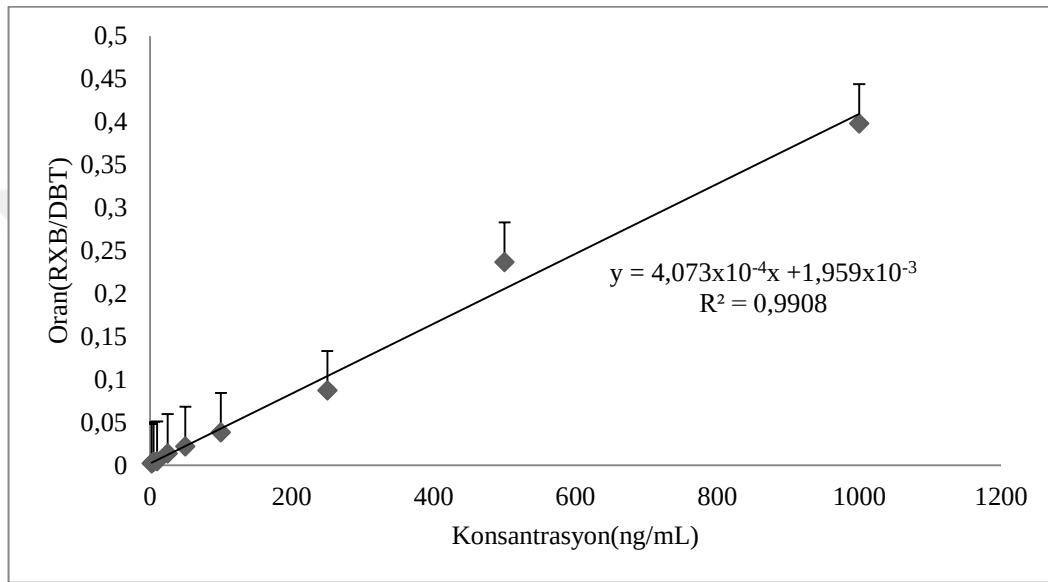
Tablo 4.18. RXB ve iç standartın iyonlaşma ürünlerine ilişkin bilgiler.

	Prekürsör	Ürün	Çarpışma enerjisi (eV)
RXB	436,0	145,0	-16,0
RXB	436,0	231,0	-37,0
IS	628,4	332,0	-34,0

Yöntemin validasyonuna yönelik doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, duyarlılık bulguları aşağıda verilmiştir.

4.6.1. Doğrusallık

Bölüm 3.2.9.'da belirtildiği şekilde RXB'nin 2,5-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltilerine ait pik alanları ile 100 µg/mL dabigatrana ait pik alanları oranlanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.30.). Regresyon analizi sonucu doğrunun determinasyon katsayısı $r^2=0,991$, eğimin ve kesim noktasının standart hatası Tablo 4.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. RXB'nin tavşan plazmasındaki kalibrasyon doğrusu (Ortalama±SH; n=3).

Tablo 4.19. RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait doğrusallık bulguları.

Parametre	Sonuç
Doğru denklemi	$y=4,073 \times 10^{-4}x + 1,959 \times 10^{-3}$
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,991
Eğimin standart hatası	$1,485 \times 10^{-5}$
Kesişimin standart hatası	$5,698 \times 10^{-3}$
Doğrusallık aralığı (ng/mL)	2,5-1.000
Nokta sayısı	9
LOQ (ng/mL)	2,5

RXB için elde edilen kalibrasyon doğrusunun determinasyon katsayısı 1'e yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar RXB için çalışılan konsantrasyon aralığında pik alanı oranları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

4.6.2. Doğruluk

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.20.'de verilmiştir. Her bir konsantrasyon için hesaplanan ortalama bağıl hata değeri % 15'den küçük bulunmuştur

Tablo 4.20. RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait doğruluk bulguları.

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)			Tayin Edilen Konsantrasyon (ng/mL)			%OBH		
			10	100	500			
10	100	500	9,28	107,41	497,87	-7,22	7.41	-0.43
			9,27	85,88	435,33	-7,31	-14.12	-12.93
			8,88	89,65	548,01	-11,25	-10.35	9.60
Ortalama			9.14	94.31	493,74	-8,59	-5,69	-1,25
SS			0.23	11.50	56,45			
VK (%)			2.52	12.19	11,43			

Ortalama±SS; n=3. VK; Varyasyon katsayısı, % OBH; Ortalama Bağıl Hata [= % OBH = (A-B)/ B x100
A; Tayin edilen konsantrasyon B; Gerçek konsantrasyon

4.6.3. Kesinlik

Kesinlik iki düzeyde değerlendirilmektedir: tekrar edilebilirlik ve ara kesinlik. Analitik yöntemin kesinliğini göstermek için ortalama değer, SS ve % VK değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar en düşük konsantrasyon için % 20'den diğer konsantrasyonlar için % 15'den düşük bulunmuştur.

- **Tekrar Edilebilirlik**

RXB'nin tayininde kullanılan analitik yönteminin tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla gün içi kesinlik değerlendirilmiş yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.21.'de verilmiştir.

Tablo 4.21. RXB'nin plazmadan LC/MS-MS yöntemiyle tayinine ilişkin tekrar edilebilirlik bulguları

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)			Tayin Edilen Konsantrasyon (ng/mL)		
			10	100	500
10	100	500	11,72	108,14	496,62
			17,68	97,33	501,14
			16,15	94,06	455,75
			17,70	102,74	484,93
			15,56	99,05	438,21
Ortalama			15,76	100,26	475,33
SS			2,45	5,40	27,26
VK(%)			15,53	5,39	5,74

(Ortalama±SS; n=5)

- **Ara Kesinlik**

RXB için geliştirilen yöntemin ara kesinliğinin saptanması için günler arası farklılıklar değerlendirilmiştir. RXB tayininde kullanılan analitik yönteminin ara kesinliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.22.'de verilmiştir.

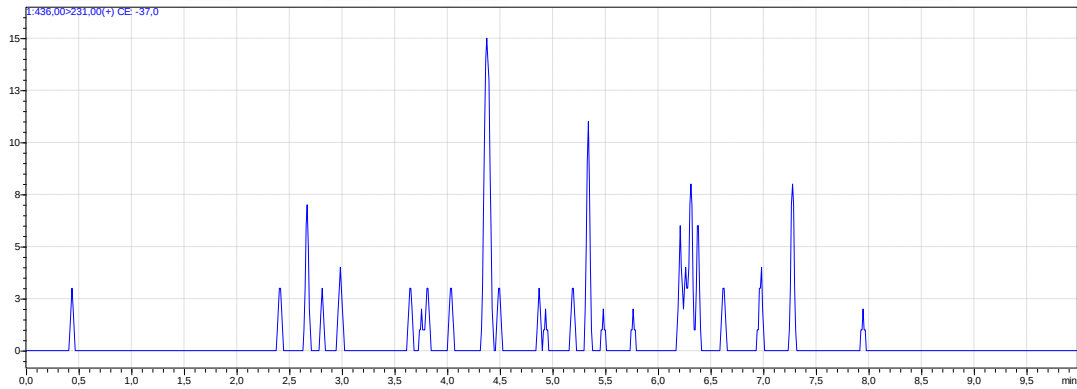
Tablo 4.22. RXB'nin plazmadan LC/MS/MS yöntemiyle tayinine ait ara kesinlik bulguları.

Eklenen Konsantrasyon (ng/mL)			Tayin Edilen Konsantrasyon (ng/mL)		
			10	100	500
			9,28	107,41	497,87
10	100	500	9,27	85,88	435,33
			8,88	89,65	548,01
Ortalama			9,14	94,31	493,74
SS			0,23	11,50	56,45
VK(%)			2,52	12,19	11,43

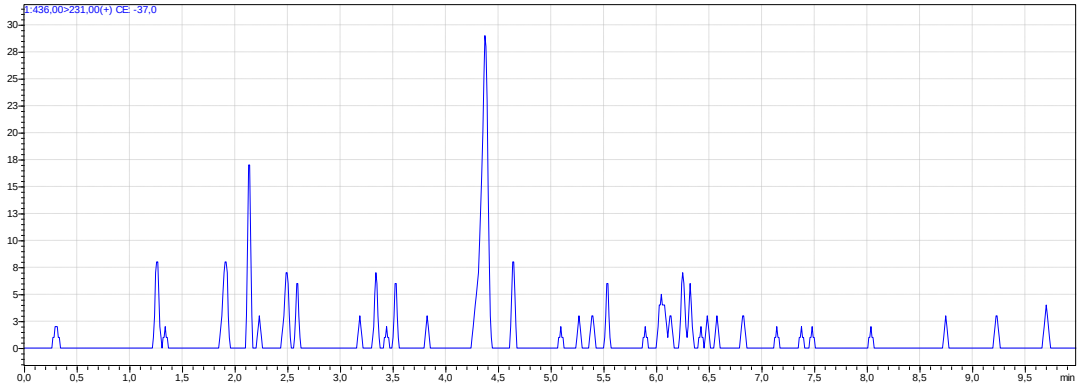
(Ortalama±SS; n=3)

4.6.4. Özgüllük

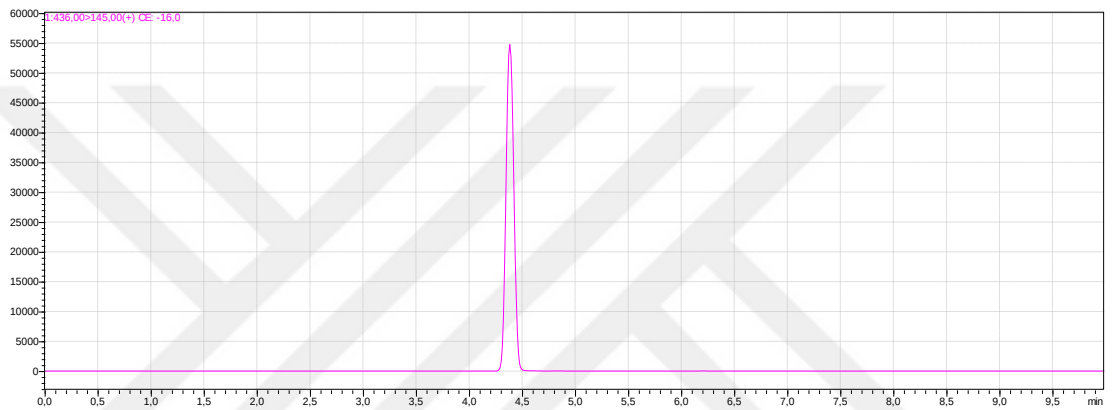
Boş plazma ve plazmaya RXB ilavesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 4.31., Şekil 4.32., Şekil 4.33. ve Şekil 4.34.'de verilmiş olup RXB'nin alıkonma zaman aralığında herhangi bir pik görülmemiştir.



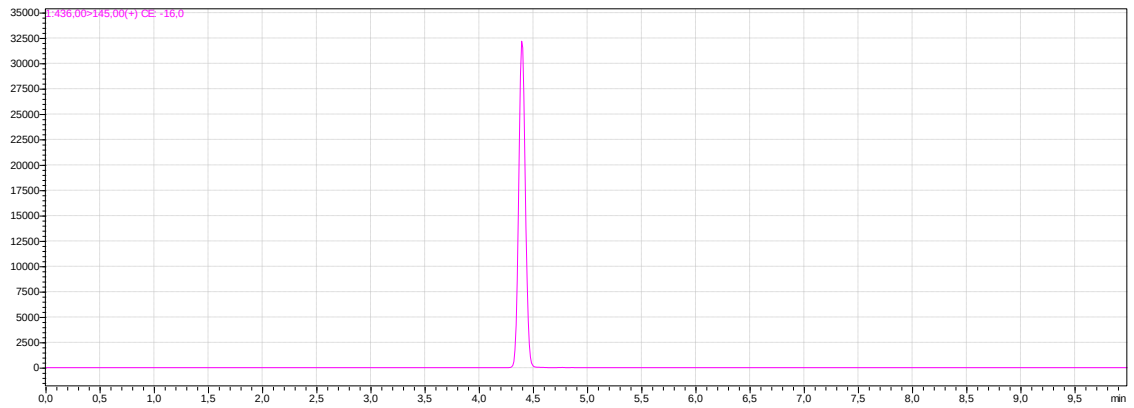
Şekil 4.31. Metanol içindeki boş plazmaya ait kromatogram.



Şekil 4.32. ACN içindeki boş plazmaya ait kromatogram.



Şekil 4.33. ACN içindeki 1000 ng/mL konsantrasyondaki RXB'ye ait kromatogram.



Şekil 4.34. Metanol içindeki 1000 ng/mL konsantrasyondaki RXB'ye ait kromatogram.

4.6.5. Duyarlılık

RXB'nin in vivo miktar tayini için tayin edilebilirlik alt sınırı olarak en küçük kalibrasyon noktası 2,5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

4.7. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Stabilizanların Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışma Sonuçları

4.7.1. Farklı Stabilizanlar Kullanılarak ve Tek Yöntem İle Hazırlanan Formülasyona İlişkin Sonuçlar

RXB ve SDS, P 127, HPMC 60 cps ile UT yöntemi, UP yöntemi ve BD yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin parametreler ve liyofilizasyon öncesi ve sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü değerleri Tablo 4.23.'de verilmiştir.

Tablo 4.23. SDS, P 127 ve HPMC ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin parametreler ve ortalama partikül büyüklüğü değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan (ST)	RXB:ST oranı (a:a)	Yöntem Parametreleri	PB (nm)	Liyofilizasyon Sonrası PB (nm)
1-UT	% 0,4	SDS	2:1	3 dk	1255 $\pm$ 84	2336 $\pm$ 287
1-UP	% 0,4	SDS	2:1	11.000 rpm		
				3 dk	1171 $\pm$ 72	2479 $\pm$ 25
				%42-43 güç		
1-BD	% 0,4	SDS	2:1	10 dk	659 $\pm$ 24	3778 $\pm$ 81
				300 rpm		
2-UT	% 0,4	P 127	2:1	3 dk	1716 $\pm$ 120	2021 $\pm$ 135
				11.000 rpm		
2-UP	% 0,4	P 127	2:1	3 dk	1456 $\pm$ 114	2575 $\pm$ 170
				%42-43 güç		
2-BD	% 0,4	P 127	2:1	10 dk	603 $\pm$ 9	1495 $\pm$ 117
				300 rpm		
3-UT	% 0,4	HPMC	2:1	3 dk	2989 $\pm$ 150	2606 $\pm$ 289
				11.000 rpm		
3-UP	% 0,4	HPMC	2:1	3dk	3391 $\pm$ 730	2864 $\pm$ 482
				%42-43 güç		
3-BD	% 0,4	HPMC	2:1	10 dk	3179 $\pm$ 64	1896 $\pm$ 180
				300 rpm		

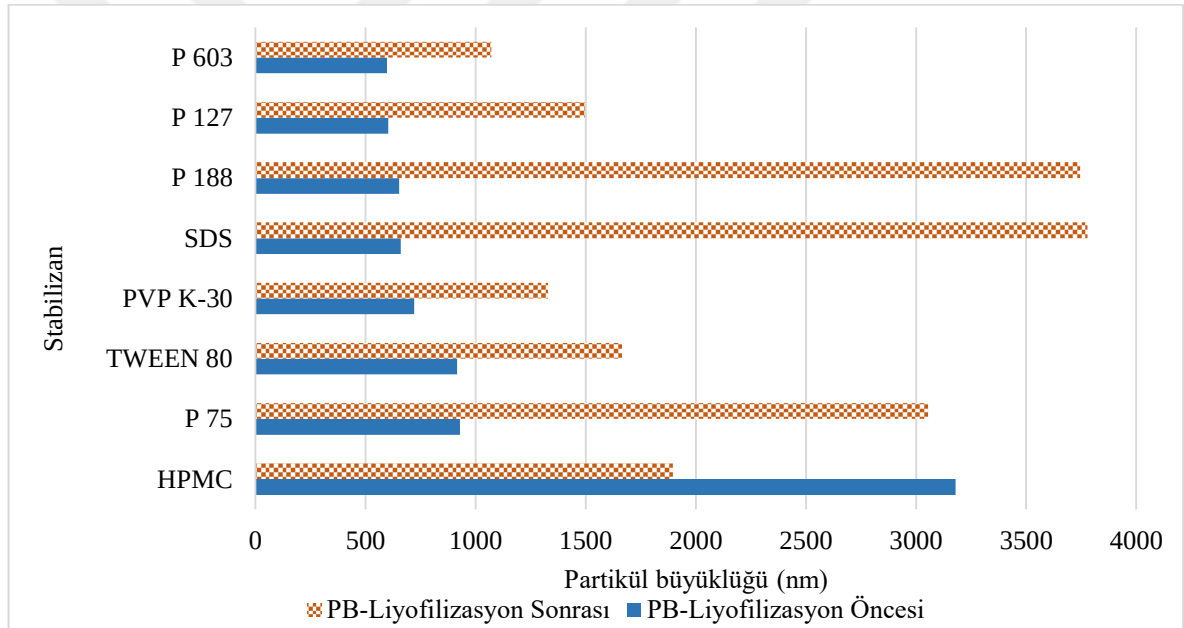
ST: Stabilizan, PB: Partikül büyüklüğü

RXB'nin tween 80, P 75, P 188, P 603 ve PVP K-30 ile BD'de hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin parametreler ve liyofilizasyon öncesi ve sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü değerleri Tablo 4.24. ve Şekil 4.35.'de verilmiştir.

Tablo 4.24. Bilyeli değirmen ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ait parametreler ve ortalama partikül büyüklüğü değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan (ST)	RXB:		PB (nm)	Liyofilizasyon Sonrası PB (nm)
			ST oranı (a:a)	Yöntem Parametreleri		
4-BD	% 0,4	Tween 80	2:1	10 dk 300 rpm	915 $\pm$ 54	1665 $\pm$ 13
5-BD	% 0,4	P 75	2:1	10 dk 300 rpm	929 $\pm$ 51	3054 $\pm$ 152
6-BD	% 1	P 603	2:1	30 dk 300 rpm	597 $\pm$ 18	1071 $\pm$ 46
2-UT+BD	% 0,5	P 188	2:1	30 dk 300 rpm	652 $\pm$ 13	3745 $\pm$ 101
3-UT+BD	% 0,5	PVP K-30	2:1	30 dk 300 rpm	720 $\pm$ 23	1329 $\pm$ 92

ST: Stabilizan, PB: Partikül büyüklüğü



Şekil 4.35. BD’de farklı stabilizanlar ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarının liyofilizasyon öncesi ve sonrası ortalama partikül büyüklükleri.

4.7.2. Çöktürme Yöntemi İle Hazırlanan Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar

BÇ yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri, liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.25. ve Tablo 4.26.’da verilmiştir.

Tablo 4.25. BÇ yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan (ST)	RXB:ST oranı (a:a)	Yöntem Parametreleri
1-BÇ	% 1	P 127	1:1	Metanol içinde çözündürme
2-BÇ	% 0,1	P603:P 188:MN	2:2:1:1	Aseton:ACN:Metanol (25:75:25,h:h:h) ve anti çözücü ilavesi

Tablo 4.26. BÇ yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları (Ortalama±SS: n=3).

Yöntem	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
1-BÇ	4341±503	7588±319	0,318±0,203	0,796±0,32	-0,02±0,09	**
2-BÇ	5043±833	2634±322	0,795±0,18	0,545±0,40	**	**

PB: Partikül Büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV), LS:Liyofilizasyon sonrası, ** Zeta potansiyel ölçülemezdir.

4.7.3. İki Farklı Stabilizan Kullanılarak BD Yöntemi İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar

P 127 ve PVP K-30'un stabilizan olarak kullanıldığı nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri, liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.27. ve Tablo 4.28.'de verilmiştir.

Tablo 4.27. İki farklı stabilizan ve BD yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan(ST)	RXB:ST oranı (a:a)	Yöntem Parametreleri
7-BD ₉₀	% 0,5	P 127:PVP K-30	1:1:1	90 dk 300 rpm
7-BD ₁₈₀	% 0,5	P 127:PVP K-30	1:1:1	180 dk 300 rpm
7-BD ₂₇₀	% 0,5	P 127:PVP K-30	1:1:1	270 dk 300 rpm

ST: Stabilizan

Tablo 4.28. BD yöntemi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
7-BD ₉₀	458 $\pm$ 14	472 $\pm$ 15	0,413 $\pm$ 0,03	0,482 $\pm$ 0,06	-17,7 $\pm$ 0,62	-16,9 $\pm$ 0,49
7-BD ₁₈₀	458 $\pm$ 14	897 $\pm$ 43	0,366 $\pm$ 0,03	0,366 $\pm$ 0,03	-15,3 $\pm$ 0,54	-23,3 $\pm$ 1,13
7-BD ₂₇₀	385 $\pm$ 27	1309 $\pm$ 183	0,324 $\pm$ 0,03	0,418 $\pm$ 0,35	-26,6 $\pm$ 1,24	-20,8 $\pm$ 0,446

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: (Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV), LS: Liyofilizasyon sonrası

4.7.4. Birden Fazla Nanokristal Hazırlama Yönteminin Kombinasyonu İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar

Her bir yöntem ile ayrı ayrı nanokristaller hazırlandıktan sonra her bir yöntemin birlikte kullanıldığı nanokristal formülasyonları denenmiştir. Kombine teknikler ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri, liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.29. ve Tablo 4.30.'da verilmiştir.

Tablo 4.29. İki hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan (ST)	RXB: ST (a:a)	Yöntem Parametreleri
1-BD+UP	% 1	P 127	1:1	30 dk 300 rpm+5 dk %42-43 güç
2-UP+BD	% 1	P 127	2:1	5 dk %42-43 güç+30 dk 300 rpm
3-UP+BD	% 3	P 127:SDS	3:1:0.5	5 dk %42-43 güç+75 dk 350 rpm
1-UT+BD	% 0,4	SDS	2:1	3 dk 13.000 rpm+10 dk 300 rpm
2-UT+BD	% 0,5	P 188	2:1	1 dk 11.000 rpm+30 dk 300 rpm
3-UT+BD	% 0,5	P 127: P 603	2:1:1	1 dk 11.000 rpm+30 dk 300 rpm
4-UT+BD	% 0,5	PVP K-30	2:1	1 dk 11.000 rpm+30 dk 300 rpm
5-UT+BD	% 1,6	P 603:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+180 dk 300 rpm
6-UT+BD	% 1	P 127:P 603: MN	2:1:1:1	3 dk 13.000 rpm+195 dk 300 rpm
7-UT+BD	% 1	P 127:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+195 dk 300 rpm
1-BÇ+BD	% 1	P 127	1:1:1	Metanol içinde çözündürme, çözücü uzaklaştırma + 30dk 300 rpm
1-BD+YH	% 1	P 127:MN	2:1	30 dk 300 rpm+20.000 psi'da 60 döngü
1-BÇ+YH	% 1	P 603:P 188: MN	2:2:1:1	Aseton:Asetonitril:Metanol (25:75:25, h:h:h)+ 20.000psi 30 döngü
1-UT+YH	% 0,5	P 127:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 20 döngü
2-UT+YH	% 1	P 603:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 65 döngü
3-UT+YH	% 0,5	PVP K-30:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 30 döngü
4-UT+YH	% 0,5	P 127:PVP K-30:MN	1:1:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 60 döngü
5-UT+YH	% 0,5	P 188:PVP K- 30:MN	2:2:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 40 döngü
6-UT+YH	% 1	P 603:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+20.000 psi 45 döngü
1-UP+YH	% 1	SDS:PVP K-30:MN	1:1:0.5	5 dk %42-43 güç+20.000 psi 30 döngü

Tablo 4.30. İki hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü, PDI ve ZP sonuçları (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
1-BD+UP	1089 $\pm$ 16	2989 $\pm$ 146	0,426 $\pm$ 0,56	0,738 $\pm$ 0,06	-0,51 $\pm$ 1,9	**
2-UP+BD	662 $\pm$ 14	a:1854 $\pm$ 148 b:2520 $\pm$ 69	0,435 $\pm$ 0,02	a:0,631 $\pm$ 0,61 b:0,209 $\pm$ 0,16	-2,11 $\pm$ 0,29	a:-2,11 $\pm$ 0,29 b:-1,3 $\pm$ 0,1
3-UP+BD	2100 $\pm$ 74	4880 $\pm$ 766	0,286 $\pm$ 0,02	1	-3,05 $\pm$ 1,23	**
1-UT+BD	929 $\pm$ 29	3179 $\pm$ 354	0,463 $\pm$ 0,14	1	**	**
2-UT+BD	652 $\pm$ 13	3745 $\pm$ 101	0,445 $\pm$ 0,02	0,541 $\pm$ 0,14	-1,45 $\pm$ 0,82	28,8 $\pm$ 0,55
3-UT+BD	628 $\pm$ 48	1093 $\pm$ 125	0,458 $\pm$ 0,02	0,610 $\pm$ 0,05	-3,36 $\pm$ 0,89	-19,8 $\pm$ 1,26
4-UT+BD	720 $\pm$ 23	1329 $\pm$ 92	0,446 $\pm$ 0,03	0,417 $\pm$ 0,15	-5,36 $\pm$ 1,09	-24 $\pm$ 0,51
5-UT+BD	785 $\pm$ 81	1468 $\pm$ 197	0,44 $\pm$ 0,05	0,553 $\pm$ 0,09	-16,3 $\pm$ 1,08	-10,9 $\pm$ 0,37
6-UT+BD	474 $\pm$ 6	755 $\pm$ 21	0,341 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,06	-7 $\pm$ 0,38	-11,8 $\pm$ 0,42
7-UT+BD	547 $\pm$ 4	1000 $\pm$ 69	0,445 $\pm$ 0,01	0,221 $\pm$ 0,13	-19,5 $\pm$ 0,48	-8,1 $\pm$ 0,68
1-BÇ+BD	639 $\pm$ 18	6493 $\pm$ 406	0,499 $\pm$ 0,042	0,409 $\pm$ 0,32	0,02 $\pm$ 0,51	**
1-BD+YH	1053 $\pm$ 12	1264 $\pm$ 99	0,24 $\pm$ 0,15	0,5 $\pm$ 0,11	-0,71 $\pm$ 0,16	-4,09 $\pm$ 0,18

Tablo 4.30. (Devam). İki hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü,PDI ve ZP sonuçları (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
1-BÇ+YH	1520 $\pm$ 50	1770 $\pm$ 103	0,274 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,09	-3,33 $\pm$ 0,24	-15,4 $\pm$ 0,47
1-UT+YH	1210 $\pm$ 18	1200 $\pm$ 16	0,144 $\pm$ 0,01	0,121 $\pm$ 0,11	-10,1 $\pm$ 0,84	-5,76 $\pm$ 0,51
2-UT+YH	854 $\pm$ 40	1134 $\pm$ 34	0,37 $\pm$ 0,04	0,441 $\pm$ 0,07	-17 $\pm$ 0,54	-20,6 $\pm$ 0,52
3-UT+YH	1510 $\pm$ 26	1752 $\pm$ 70	0,199 $\pm$ 0,04	0,464 $\pm$ 0,003	-21,5 $\pm$ 0,60	-7,21 $\pm$ 0,38
4-UT+YH	987 $\pm$ 28	2457 $\pm$ 278	0,123 $\pm$ 0,07	0,379 $\pm$ 0,05	-6,5 $\pm$ 0,34	-7,24 $\pm$ 0,53
5-UT+YH	2367 $\pm$ 162	**	0,25 $\pm$ 0,11	**	-22,6 $\pm$ 0,61	**
6-UT+YH	1185 $\pm$ 15	917 $\pm$ 40	0,245 $\pm$ 0,02	0,533 $\pm$ 0,08	-10,6 $\pm$ 0,41	-21,5 $\pm$ 0,77
1-UP+YH	1509 $\pm$ 27	1444 $\pm$ 103	0,258 $\pm$ 0,37	0,433 $\pm$ 0,14	-4,32 $\pm$ 0,85	-37,6 $\pm$ 2,29

PB: Partikül Büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV), LS:Liyofilizasyon sonrası ** Zeta potansiyel ölçülmemiştir.a:Mannitol eklenerek dondurulmuş süspansiyon b:Mannitol eklenmeden dondurulmuş süspansiyon.

Üç nanokristal hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin yöntem parametreleri, partikül büyüklüğü PDI ve ZP değerleri Tablo 4.31. ve 4.32.'de verilmiştir.

Tablo 4.31. Üç nanokristal hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin yöntem parametreleri.

Yöntem	RXB oranı	Stabilizan (ST)	RXB:ST oranı (a:a)	Yöntem Parametreleri
1-UP+YH+BD	% 1	SDS: PVP K-30: MN	1:1:0.5	5 dk % 42-43 güç+20.000 psi'da 30 döngü+300 rpm 30 dk
1-UT+YH+BD	% 1	P127: PVP K-30: MN	2:1:0.5:1	3dk 13.000 rpm+20.000 psi'da 50 döngü+90 dk 300 rpm
2-UT+YH+BD	% 1	P188: PVP K-30: MN	1:1:0.5:1	3 dk 13.000 rpm+20. 000 psi 50 döngü+150 dk 300 rpm
3-UT+BD+YH	% 1,6	P 603:MN	2:1:1	3 dk 13.000 rpm+ 180 dk 300 rpm+20.000 psi 50 döngü
4-UT+YH+BD	% 0,5	P127: PVP K-30 :MN	2:1:1:1	4dk 13.000 rpm+20.000 psi'de 60 döngü+ 180 dk 300 rpm

Tablo 4.32. Üç farklı nanokristal hazırlama yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ilişkin ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri (Ortalama±SS; n=3).

Yöntem	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
1-UP+YH+BD	828±63	1151±87	0,52±0,101	0,567±0,13	-28,7±0,76	-29,2±1,1
1-UT+YH+BD	577±17	890±24	0,36±0,08	0,533±0,04	-27,3±0,44	-21,4±0,79
2-UT+YH+BD	707±15	1658±73	0,351±0,03	0,265±0,25	-15,8±1,11	-24,4±0,29
3-UT+BD+YH	573±3	648±3	0,395±0,03	0,466±0,01	-8,72±1,48	-15,4±0,41
4-UT+YH+BD	386±10	1189±87	0,362±0,07	0,497±0,09	-30,4±0,62	-31,4±0,28

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV), LS: Liyofilizasyon sonrası

4.7.5. RXB'nin Partikül Büyüklüğü Dağılımında Meydana Gelen Değişim Üzerine Yöntem ve Stabilizan Etkisi

RXB'nin partikül boyutundaki değişikliğin nanokristal hazırlama yöntemlerine veya stabilizan varlığına bağlı olup olmadığını değerlendirmek için;

R-1: RXB'nin sudaki dispersiyonu liyofilize edildikten sonra partikül büyüklüğü ölçülmüştür.

R-2: RXB'nin 2:1 oranındaki P 127 ile hazırlanan sudaki dispersiyonu 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve liyofilize edilmiştir.

R-3: RXB'nin 2:1 oranındaki P 603 ile hazırlanan sudaki dispersiyonu 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve liyofilize edilmiştir

R-4: RXB'nin stabilizan eklemeksizin % 0,4 konsantrasyondaki sudaki dispersiyonu 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 30 dk boyunca 300 rpm'de BD'de öğütülmüş ve liyofilize edilmiştir.

R-5: RXB'nin 2:1 oranındaki pluronik P 603 ile hazırlanan sudaki dispersiyonu 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, BD'de öğütülmüş (300 rpm,30 dk) ve liyofilize edilmiştir.

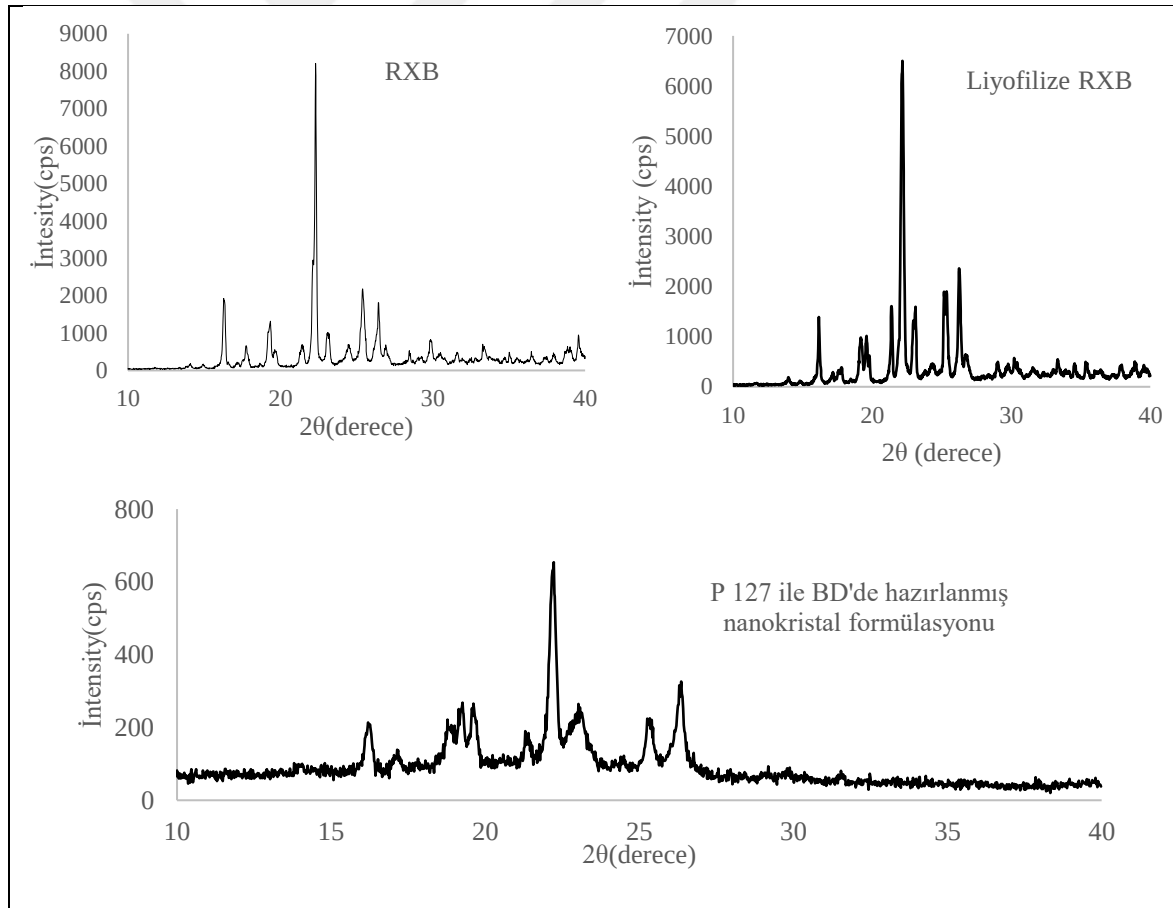
R-6: RXB'nin 2:1 oranındaki P 127 ile hazırlanan sudaki dispersiyonu 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, BD'de (300 rpm,10 dk) öğütülmüş ve liyofilize edilmiştir.

Liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası partikül büyüklükleri tayin edilerek ortalama değerler Tablo 4.33.'de verilmiştir.

RXB, liyofilize RXB, BD ile hazırlanmış formülasyona ait X-ışını kırınımı difraktogramları Şekil 4.36.'da verilmiştir.

Tablo 4.33. RXB'nin partikül büyüklüğüne yöntem ve stabilizan etkisi (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

	Liyofilizasyon öncesi (nm)	Liyofilizasyon Sonrası (nm)	Cihaz
R-1	77.245 $\pm$ 1,794	25.744 $\pm$ 4.225	Malvern Mastersizer
R-2	4292 $\pm$ 376	3457 $\pm$ 579	Malvern ZetaSizer
R-3	4450 $\pm$ 119	2797 $\pm$ 233	Malvern ZetaSizer
R-4	1785 $\pm$ 328	1824 $\pm$ 87	Malvern ZetaSizer
R-5	597 $\pm$ 18	1071 $\pm$ 46	Malvern ZetaSizer
R-6	603 $\pm$ 9	1495 $\pm$ 117	Malvern ZetaSizer



Şekil 4.36. RXB, liyofilize RXB, BD ile hazırlanmış formülasyona ilişkin X-ışını kırınımı difraktogramları.

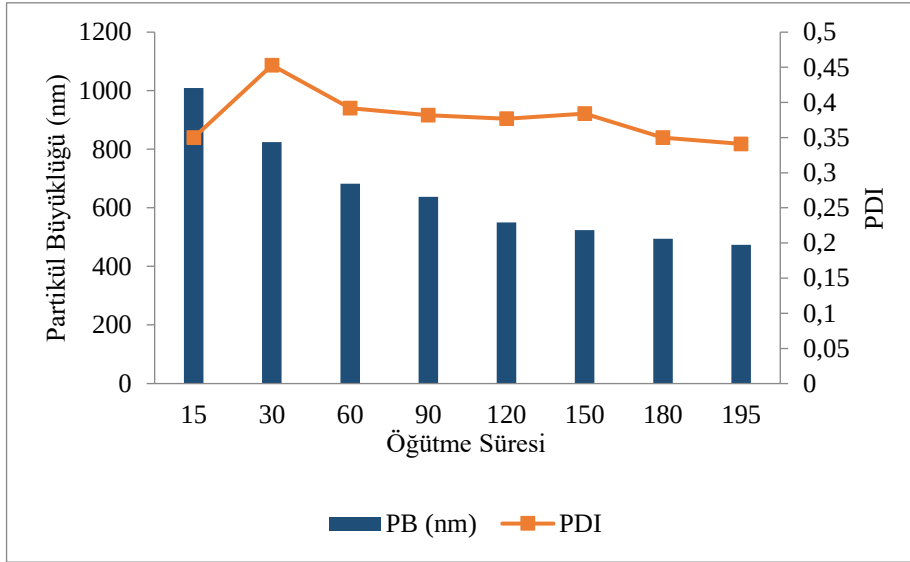
4.7.6. Partikül Büyüklüğü Dağılımına BD Öğütme Süresinin Etkisinin İncelenmesi

Partikül büyüklüğüne bilyeli değirmende öğütme süresinin etkisini incelemek amacıyla RXB:P127:P603 (2:1:1, a:a:a) oranında olacak şekilde hazırlanan süspansiyon 150 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra UT ile 3 dk 13.000 rpm’de homojenize edilmiş ve daha sonra 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 195 dakika süreyle bilyeli değirmende öğütülerek partikül büyüklüğü, PDI ve ZP ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 4.34.’de ve Şekil 4.37.’de verilmiştir.

Tablo 4.34. RXB nanosüspansiyonlarının farklı öğütme sürelerine bağlı olarak elde edilen ortalama PB, PDI ve ZP değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Öğütme Süresi (dk)	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
15	1009 $\pm$ 247	0,350 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,69
30	825 $\pm$ 85	0,453 $\pm$ 0,02	-0,018 $\pm$ -0,87
60	683 $\pm$ 10	0,392 $\pm$ 0,08	-1,64 $\pm$ 0,31
90	638 $\pm$ 15	0,382 $\pm$ 0,04	-2,18 $\pm$ 0,64
120	550 $\pm$ 11	0,377 $\pm$ 0,04	-5,19 $\pm$ 0,91
150	524 $\pm$ 5	0,384 $\pm$ 0,01	-7,33 $\pm$ 0,92
180	495 $\pm$ 12	0,350 $\pm$ 0,05	-5,95 $\pm$ 0,71
195	474 $\pm$ 6	0,341 $\pm$ 0,10	-7,0 $\pm$ 0,35

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV)



Şekil 4.37. RXB nanosüspansiyonlarının farklı öğütme sürelerine bağlı partikül büyüklüğü dağılımı ve PDI'leri.

Elde edilen sonuçlar öğütme süresinin artması ile birlikte partikül büyüklüğünün azaldığını, ve 150 dk sonra öğütme süresindeki artışın partikül büyüklüğünde daha az düşüş sağladığını göstermiştir. PDI'deki değişim ise partikül büyüklüğündeki değişime oranla daha az olmuştur (Bkz. Şekil 4.32).

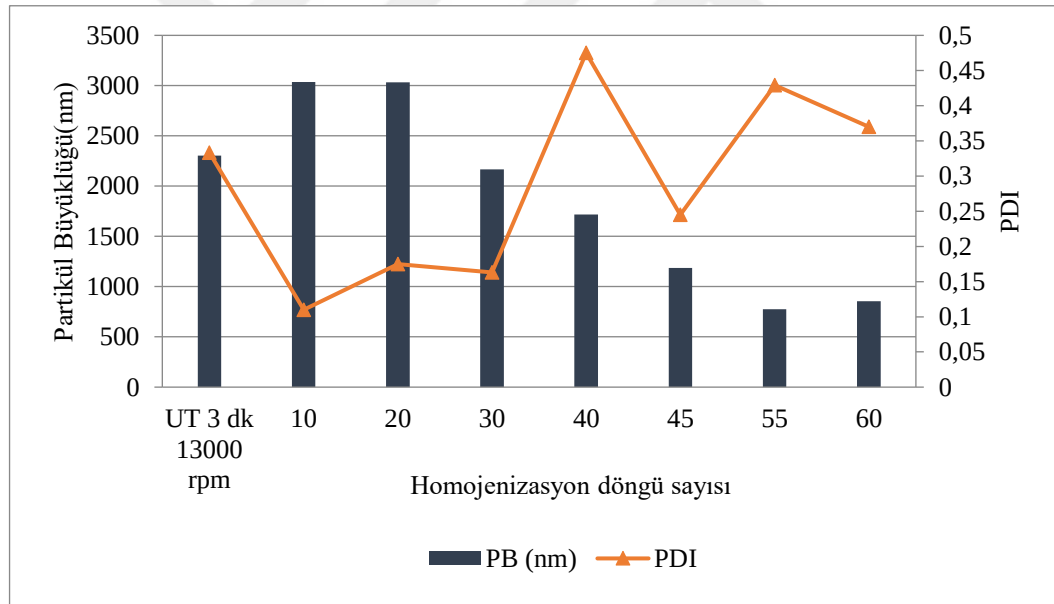
4.7.7. Partikül Büyüklüğü Dağılımına YH'de Yapılan Döngü Sayısının Etkisinin İncelenmesi

Partikül büyüklüğü üzerine YH'de yapılan döngü sayısının etkisini incelemek amacıyla RXB:P 603 (2:1, a:a:) oranında olacak şekilde süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra UT ile 3 dk 13.000 rpm'de homojenize edilmiş ve daha sonra 10, 20, 30, 40, 45, 55, 60 döngü sonunda nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri ölçülmüştür (Formülasyon 1:F1) ve sonuçlar Tablo 4.35. ve Şekil 4.38.'de verilmiştir. İkinci olarak RXB: P 127 ve PVP K-30 (1:1:1, a:a:a) oranında hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonunda da birden fazla döngü yapılmış (Formülasyon 2:F2) ve sonuçlar Tablo 4.36. ve Şekil 4.39.'da verilmiştir.

Tablo 4.35. YH’de yapılan döngü sayısının PB, PDI ve ZP değerleri üzerine etkisi-F1 (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Döngü Sayısı	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
UT 3 dk 13.000 rpm	2305 $\pm$ 144	0,333 $\pm$ 0,34	-16,1 $\pm$ 1,07
10	3037 $\pm$ 132	0,11 $\pm$ 0,01	3,34 $\pm$ -0,43
20	3033 $\pm$ 92	0,175 $\pm$ 0,08	-4,05 $\pm$ 0,43
30	2168 $\pm$ 11	0,163 $\pm$ 0,04	-3,69 $\pm$ 0,42
40	1718 $\pm$ 19	0,475 $\pm$ 0,12	-12,4 $\pm$ 0,92
45	1185 $\pm$ 15	0,245 $\pm$ 0,02	-10,6 $\pm$ 0,41
55	776 $\pm$ 49	0,429 $\pm$ 0,38	-0,284 $\pm$ 0,11
60	854 $\pm$ 40	0,370 $\pm$ 0,37	-17 $\pm$ 0,54

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV),

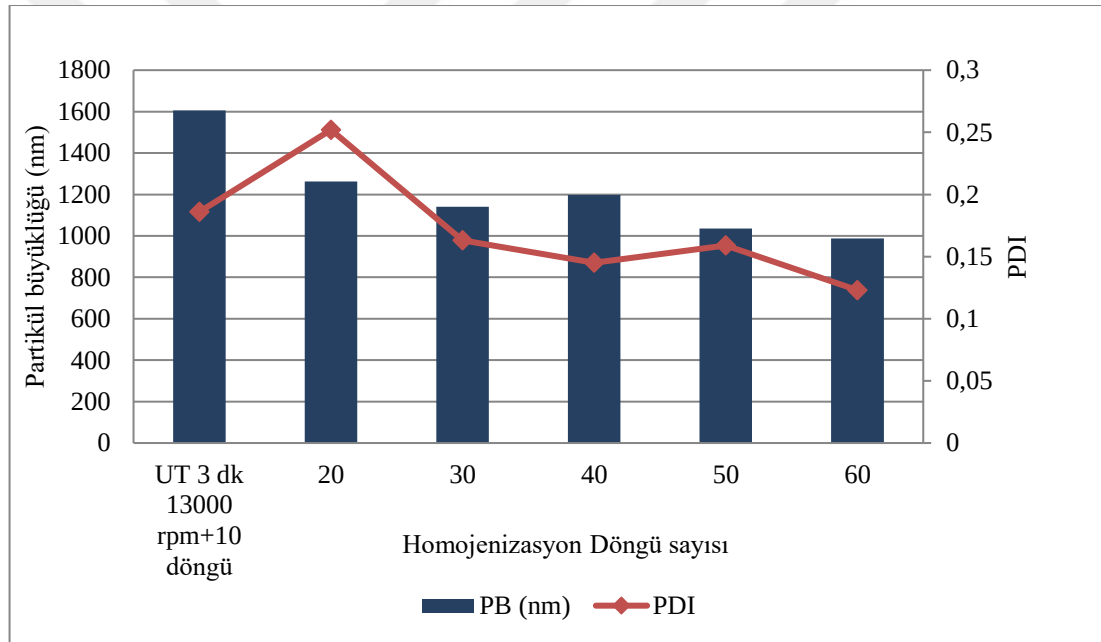


Şekil 4.38. YH’de yapılan döngü sayısının partikül büyüklüğü ve PDI üzerine etkisi-F1.

Tablo 4.36. YH’de yapılan döngü sayısının PB, PDI ve ZP değerleri üzerine etkisi - F2 (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Döngü Sayısı	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
UT 3 dk 13.000			
rpm+10 döngü	1605 $\pm$ 37	0,186 $\pm$ 0,04	-1,23 $\pm$ 0,25
20	1262 $\pm$ 20	0,252 $\pm$ 0,01	-15,2 $\pm$ 0,88
30	1141 $\pm$ 53	0,163 $\pm$ 0,04	-14,3 $\pm$ 0,42
40	1197 $\pm$ 5	0,145 $\pm$ 0,12	-13,6 $\pm$ 0,87
50	1035 $\pm$ 13	0,159 $\pm$ 0,02	-14,1 $\pm$ 0,51
60	987 $\pm$ 26	0,123 $\pm$ 0,07	-6,55 $\pm$ 0,34

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV),



Şekil 4.39. YH’de yapılan döngü sayısının partikül büyüklüğü ve PDI üzerine etkisi-F2

YH’deki döngü sayısının farklı stabilizanlar ile hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğünün 20 döngü ve 30 döngü arasında düştüğü görülmektedir. Her iki denemede ise 50 ve 60 döngü sonrasında 1000 nm’nin altında partikül boyutu elde edilmiştir.

4.7.8. Mannitol İlavesinin Partikül Büyüklüğüne Etkisinin İncelenmesi

Liyofilizasyon öncesinde formülasyona MN ilavesinin partikül büyüklüğüne etkisini incelemek amacıyla % 0,5 (a:h) P 603 ve % 1 (a:h) konsantrasyonda RXB içeren dispersiyon BD’de 30 dk süreyle 300 rpm’de öğütülmüştür. Hazırlanan süspansiyon hacim olarak ikiye bölünerek bir kısmına % 0,5 (a:h) konsantrasyonda MN çözeltisi ilave edilerek ve MN ilave etmeden liyofilize edilmiştir. Yöntem parametreleri, liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.37.’de verilmiştir.

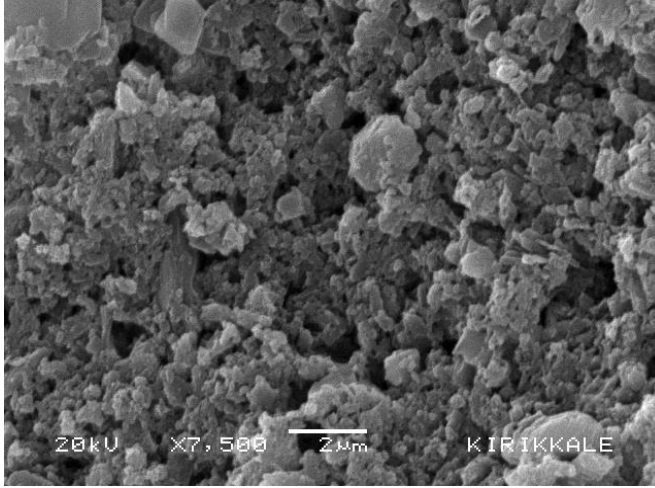
Tablo 4.37. Kriyoprotektan olarak MN ilavesinin partikül büyüklüğüne etkisi (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Yöntem	Nanosüspansiyon		Nanokristal			
	PB	PDI	MN (+) PB	MN (+) PDI	MN (-) PB	MN (-) PDI
BD-MN	597 $\pm$ 18	0,417 $\pm$ 0,02	768 $\pm$ 43	0,542 $\pm$ 0,14	1071 $\pm$ 46	0,567 $\pm$ 0,13
	ZP		ZP		ZP	
	0,159 $\pm$ 0,93		-6,92 $\pm$ 1,6		-1,25 $\pm$ 0,27	

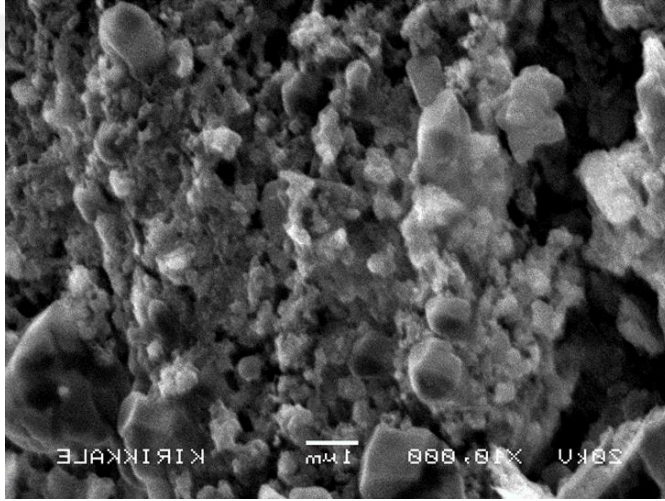
PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: Polidispersity indeks, ZP: Zeta potansiyel, MN:Mannitol

4.8. Nanokristal Ön Formülasyonlara Ait Karakterizasyon Sonuçları

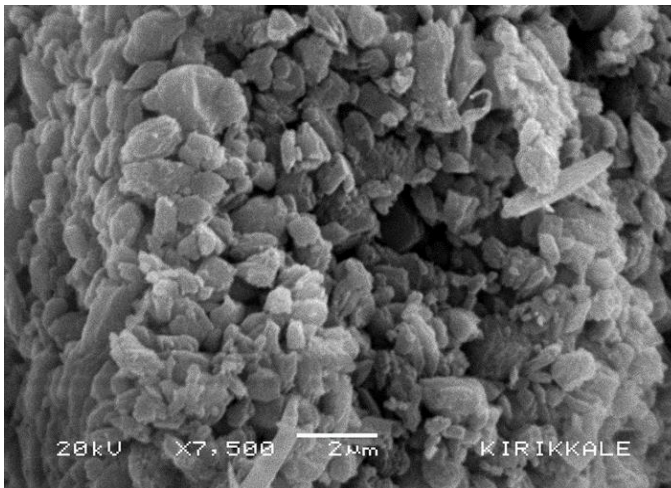
6-UT+BD, 1-UT+YH+BD, 3-UT+BD+YH formülasyonuna ait SEM görüntüleri, DSC termogramları, X-ışını difraktogramları Şekil 4.40.-4.42.’de verilmiştir.



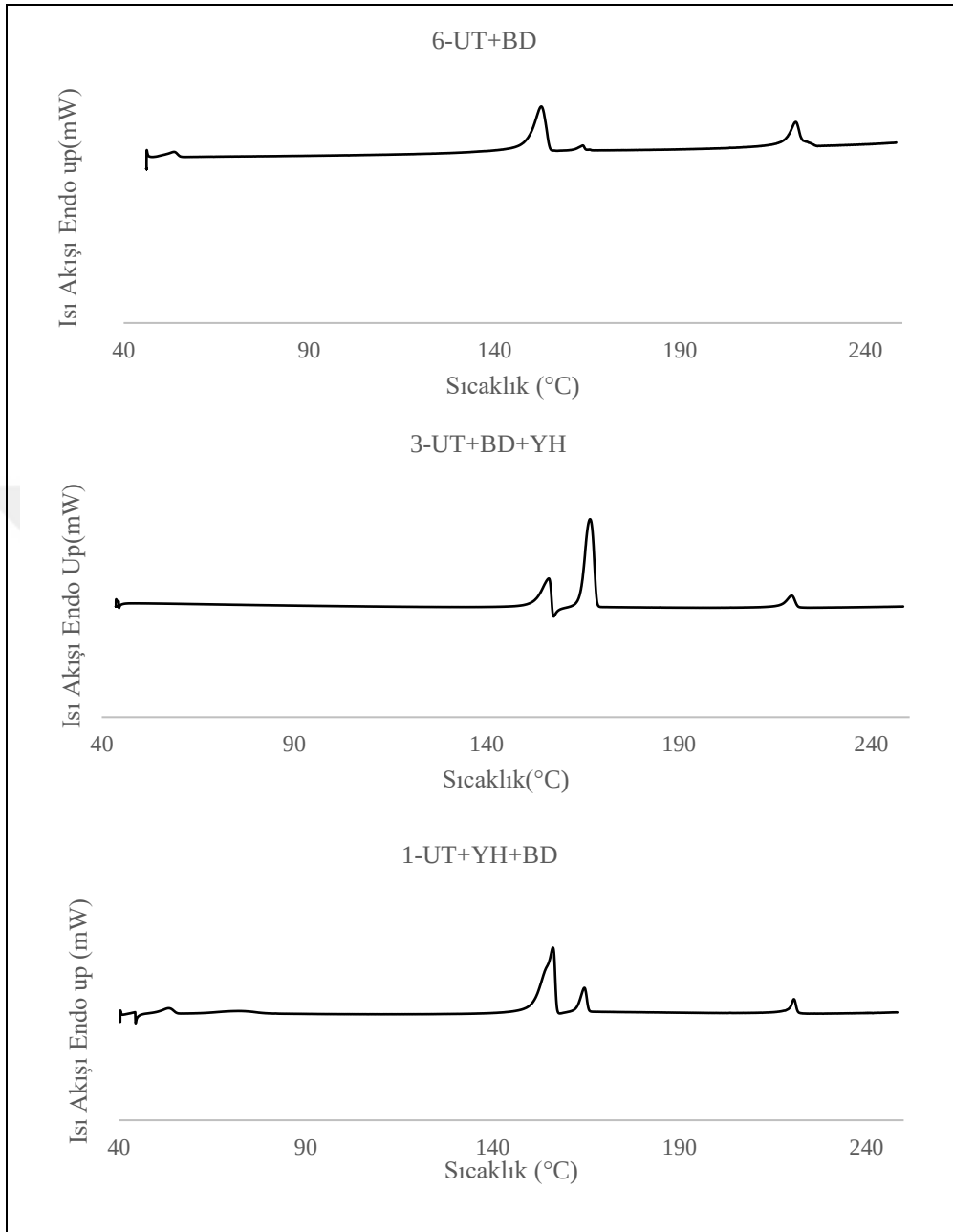
Şekil 4.40. 6-UT+BD formülasyonunun SEM görüntüsü.



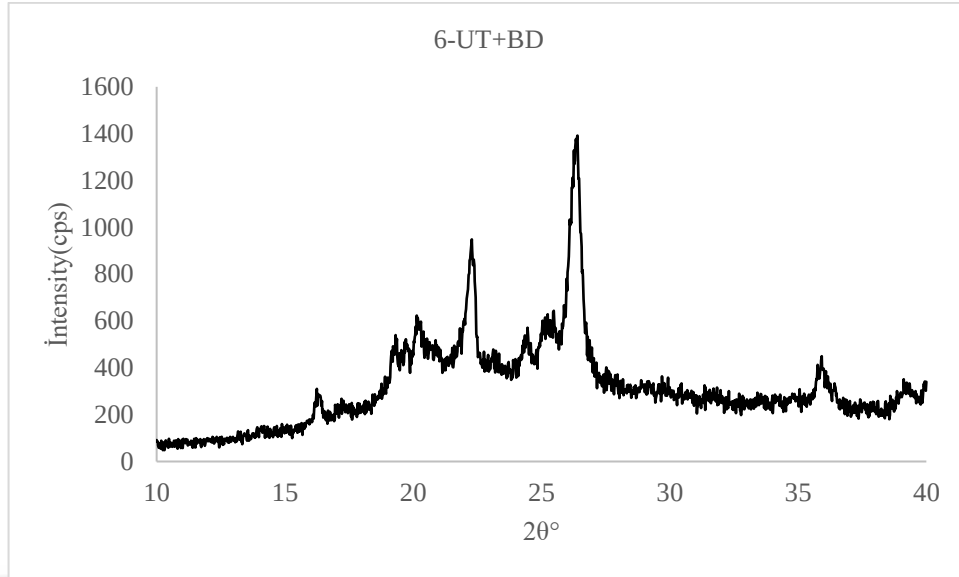
Şekil 4.41. 1-UT+YH+BD formülasyonunun SEM görüntüsü.



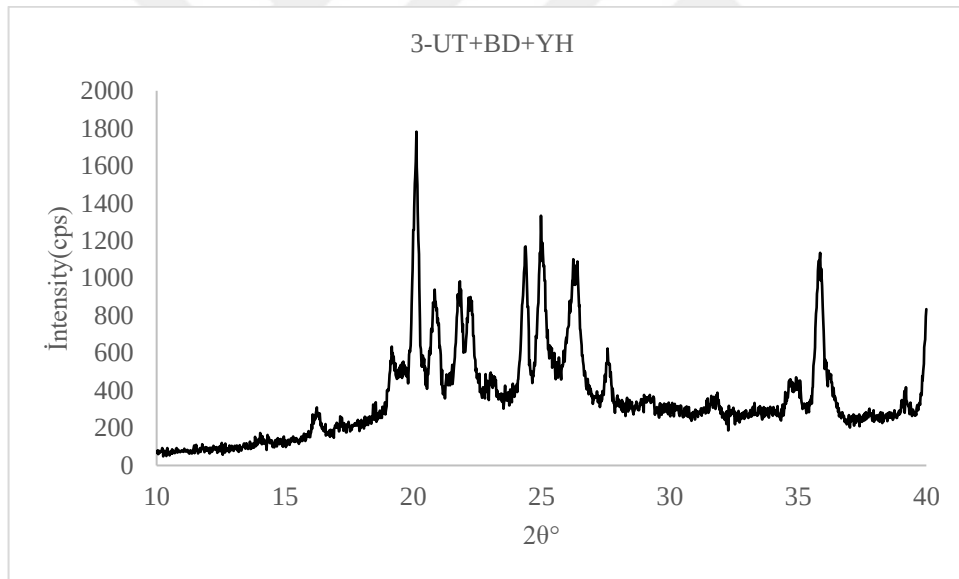
Şekil 4.42. 3-UT+BD+YH formülasyonunun SEM görüntüsü.



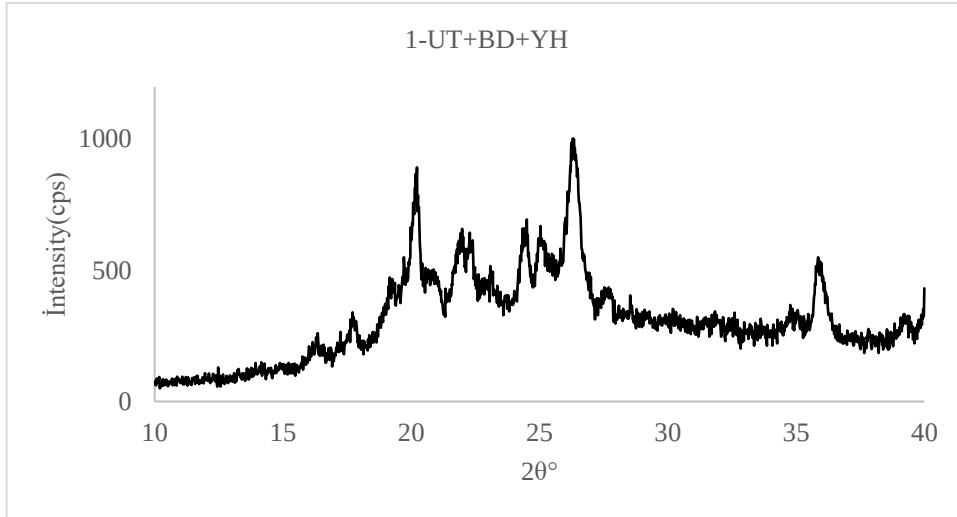
Şekil 4.43. 6-UT+BD, 3-UT+BD+YH, 1-UT+YH+BD, formülasyonlarının DSC termogramları.



Şekil 4.44. 6-UT+BD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



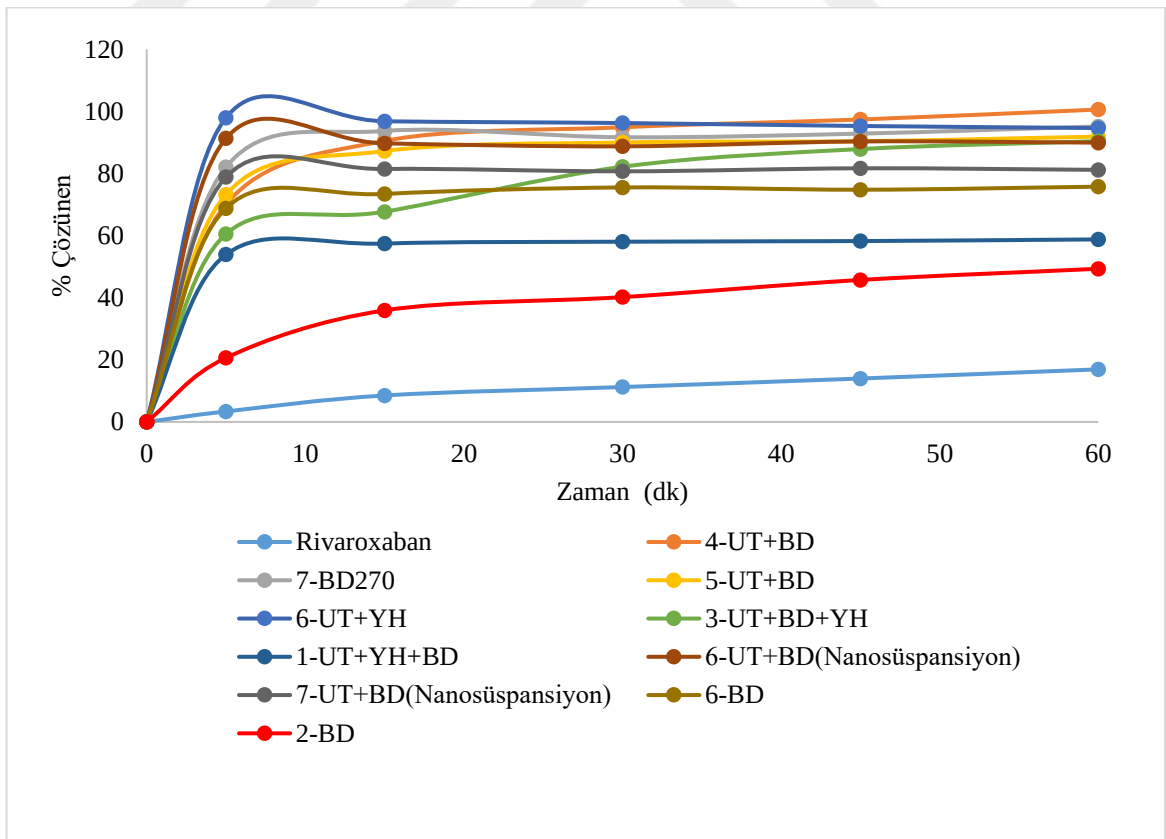
Şekil 4.45. 3-UT+BD+YH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



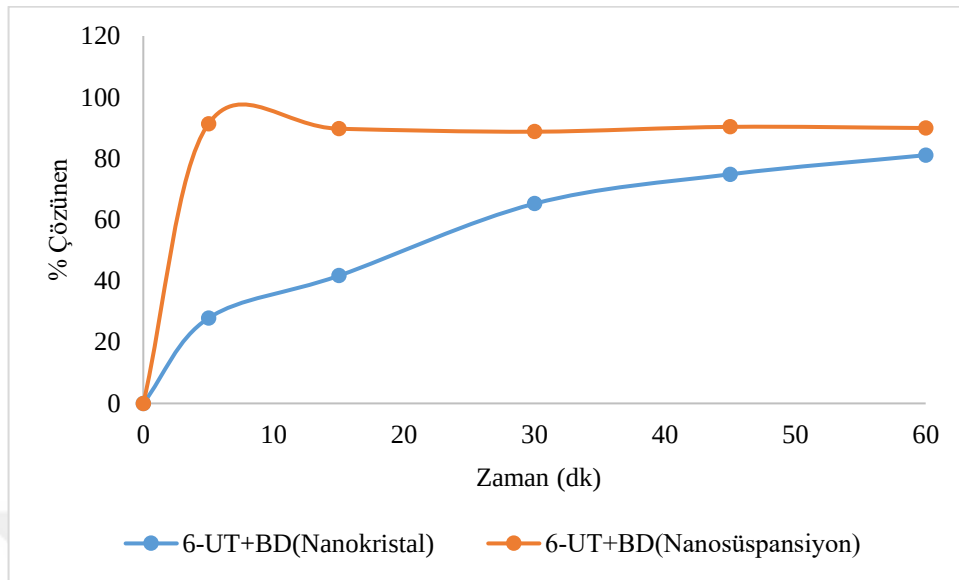
Şekil 4.46. 1-UT+BD+YH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.

4.9. Nanokristal Ön Formülasyonların İn vitro Çözünme Sonuçları

En iyi partikül büyüklüğü dağılımına sahip formülasyonların, in vitro çözünme değerleri tayin edilmiştir (Şekil 4.47., Şekil 4.48. Tablo 4.38.)



Şekil 4.47. Nanokristal ön formülasyonların in vitro çözünme profilleri.



Şekil 4.48. 6-UT+BD yöntemi ile hazırlanan formülasyonun liyofilizasyon öncesi (nanosüspansiyon) ve sonrası (nanokristal) in vitro çözünme profili.

Tablo 4.38. Nanokristal formülasyonlarından % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponundaki % çözünen RXB değerleri ve f_2 benzerlik faktörleri.

Formülasyon	Zaman(dk)	5	15	30	45	60
RXB	X	3,36	8,52	11,23	13,97	16,93
	% VK	3,58	5,37	3,37	4,21	3,83
4-UT+BD ($f_2:5$)	X	70,07	90,49	94,90	97,40	102,60
	% VK	0,25	0,88	0,43	0,25	3,31
7-BD270 ($f_2:5$)	X	82,10	93,70	91,68	92,84	95,16
	% VK	3,09	4,35	4,92	5,65	4,51
5-UT+BD ($f_2:6$)	X	73,22	87,23	89,99	90,39	91,88
	% VK	1,34	2,47	2,31	2,16	1,74
6-UT+YH ($f_2:2$)	X	97,95	96,82	96,25	95,30	94,63
	% VK	1,65	1,91	1,97	2,09	1,80
3-UT+BD+YH ($f_2:9$)	X	60,52	67,69	82,17	87,87	90,44
	% VK	1,39	1,35	1,18	0,93	0,84
1-UT+YH+BD ($f_2:17$)	X	53,91	57,43	58,04	58,24	58,78
	% VK	1,42	1,89	0,10	0,03	1,49
6-UT+BD(Nanosüspansiyon) ($f_2:5$)	X	91,31	89,71	88,74	90,33	89,94
	% VK	5,62	6,42	6,18	6,34	6,69
7-UT+BD(Nanosüspansiyon) ($f_2:8$)	X	78,84	81,45	80,70	81,68	81,18
	% VK	0,32	4,20	3,87	3,97	3,87
6-UT+BD(Nanokristal) ($f_2:15$)	X	27,85	49,64	65,24	74,83	81,07
	% VK	3,75	3,39	3,95	3,13	2,89
2-BD ($f_2:10$)	X	20,63	35,92	40,19	45,72	49,32
	% VK	0,72	4,58	0,59	0,28	0,51
6-BD ($f_2:28$)	X	68,83	73,41	75,51	74,78	75,76
	% VK	1,29	0,98	0,85	0,25	0,83

f_2 : Her bir formülasyona ait çözünme profilinin RXB'nin çözünme profili ile benzerlik faktörü

4.10. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü Analizi

Ön denemeler sonucunda geçirgenlik çalışmaları için kullanılacak formülasyonu belirlemek üzere UT, BD ve YH kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonlara ait yöntem parametreleri Tablo 4.39’da ve partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Şekil 4.49., Şekil 4.50. ve Tablo 4.40.’da sunulmuştur.

Tablo 4.39. Farklı yöntemlerin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonları.

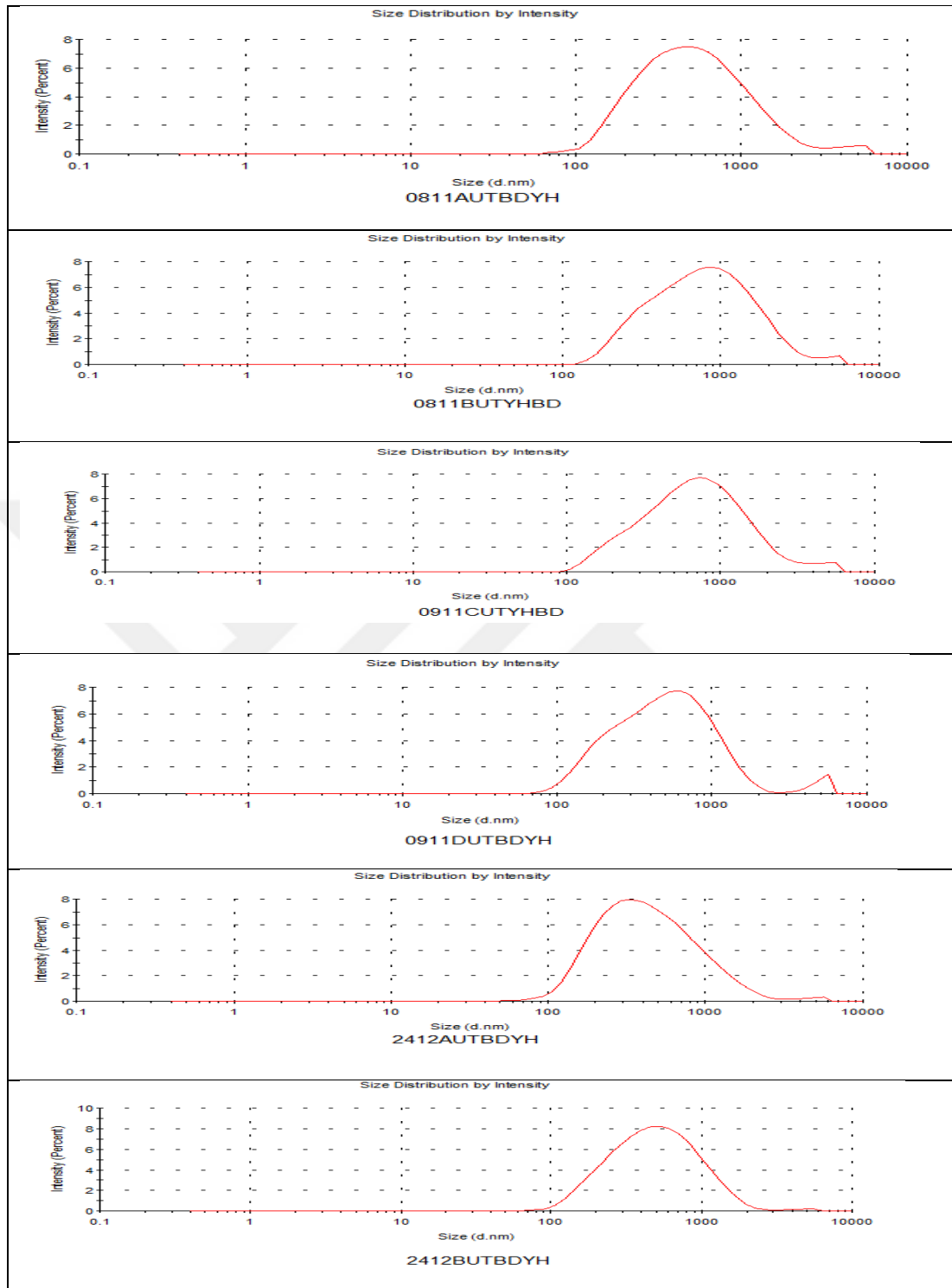
Formülasyon Kodu	Formülasyon İçeriği (a/h)	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama	4. Aşama
0811AUTBDYH	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3 dk	BD	YH	LF
	P603(%0,5)+MN(%1)	13.000 rpm	180 dk 300 rpm	60 Döngü 1.500 bar	-55 C° 72 sa
0811BUTYHBD	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3dk	YH	BD	LF
	P603(%0,5)+MN(%1)	13.000 rpm	60 Döngü 1.500 bar	180 dk 300 rpm	-55 C° 72 sa
0911CUTYHBD	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3dk	YH	BD	LF
	PVP K-30(%0,5)+	13.000 rpm	60 Döngü 1.500 bar	180 dk 300 rpm	-55 C° 72 sa
	MN(%1)				
0911DUTBDYH	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3 dk	BD	YH	LF
	PVPK-30 (%0,5)+	13.000 rpm	180 dk 300 rpm	60 Döngü 1.500 bar	-55 C° 72 sa
	MN(%1)				
2412AUTBDYH	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3 dk	BD	YH	LF
	PVPK-30 (%0,5)+	13.000 rpm	240 dk 300 rpm	60 Döngü 1.500 bar	-55 C° 72 sa
	MN(%1)				
2412BUTBDYH	RXB(%1)+P127(%0,5)+	UT 3 dk	BD	YH	LF
	P603(%0,5)+MN(%1)	13.000 rpm	240 dk 300 rpm	60 Döngü 1.500 bar	-55 C° 72 sa

RXB: rivaroksaban, P 127: Pluronic 127, P 603: Pharmacoat 603, PVPK-30: Polivinil Piroolidon K-30, MN: Mannitol, BD: Bilyeli Değirmen, YH: Yüksek Basıncılı Homojenizatör, UT: Ultra Turaks, LF: Liyofilizasyon

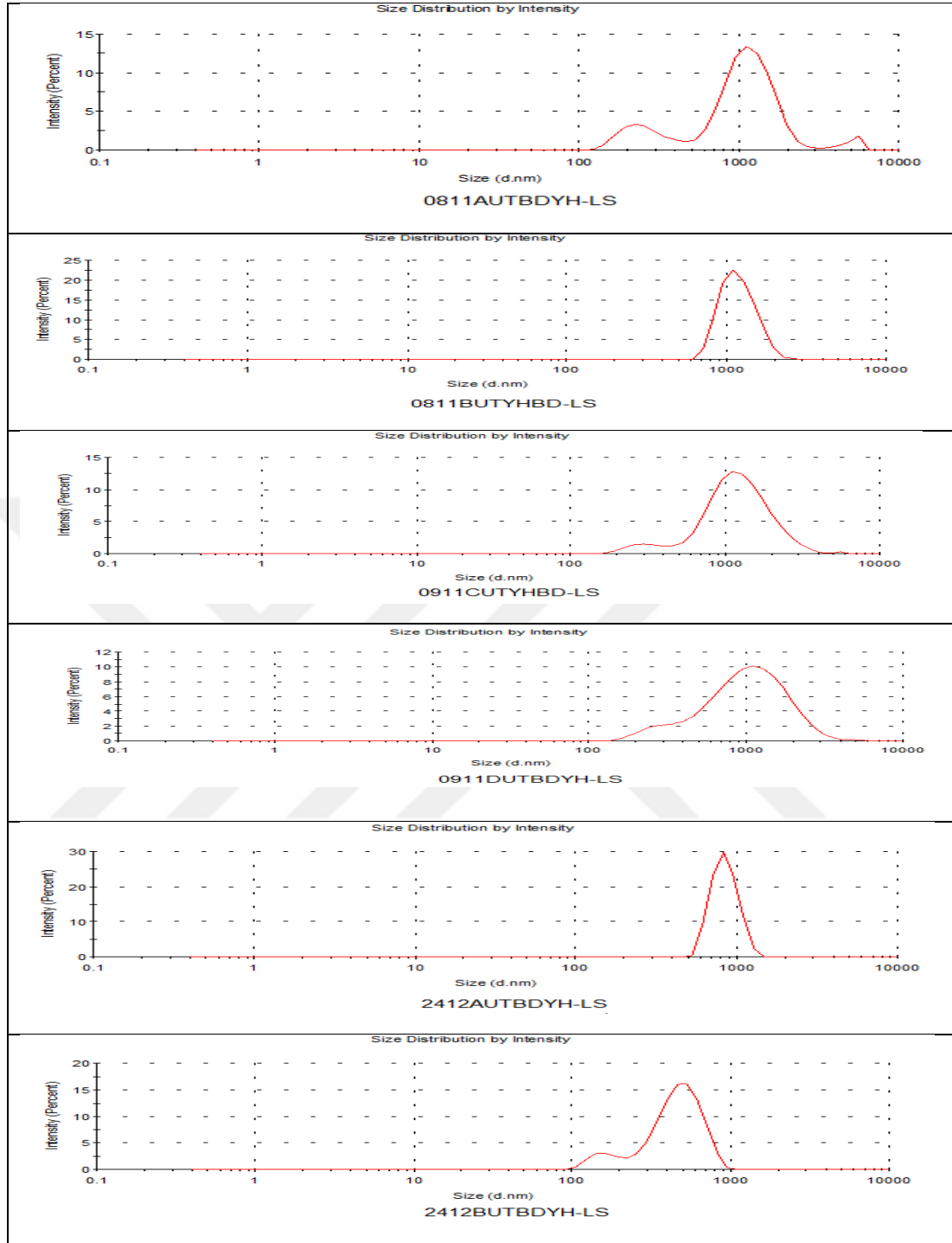
Tablo 4.40. RXB nanokristal formülasyonlarına ilişkin PB, PDI ve ZP değerleri (Ortalama $\pm$ SS; n=3).

Formülasyon	PB	PB-LS	PDI	PDI-LS	ZP	ZP -LS
0811AUTBDYH	412 $\pm$ 12	896 $\pm$ 113	0,325 $\pm$ 0,03	0,494 $\pm$ 0,11	-20,9 $\pm$ 1,96	-16,6 $\pm$ 0,58
0811BUTYHBD	618 $\pm$ 15	1447 $\pm$ 96	0,336 $\pm$ 0,09	0,215 $\pm$ 0,09	-18,9 $\pm$ 1,36	-17,9 $\pm$ 1,65
0911CUTYHBD	551 $\pm$ 106	1018 $\pm$ 128	0,346 $\pm$ 0,05	0,299 $\pm$ 0,09	-2,1 $\pm$ 0,89	-16,9 $\pm$ 1,46
0911DUTBDYH	417 $\pm$ 47	792 $\pm$ 27	0,375 $\pm$ 0,05	0,283 $\pm$ 0,05	-15,8 $\pm$ 7,31	-15,9 $\pm$ 1,03
2412AUTBDYH	348 $\pm$ 15	1167 $\pm$ 33	0,298 $\pm$ 0,02	0,442 $\pm$ 0,33	-8,08 $\pm$ 1,38	-23,4 $\pm$ 0,85
2412BUTBDYH	403 $\pm$ 11	606 $\pm$ 55	0,278 $\pm$ 0,02	0,499 $\pm$ 0,04	-24,7 $\pm$ 1,15	-23,6 $\pm$ 0,74

PB: Partikül büyüklüğü (nm), PDI: (Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel (mV), LS: Liyofilizasyon sonrası



Şekil 4.49. UT, BD, YH kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri.

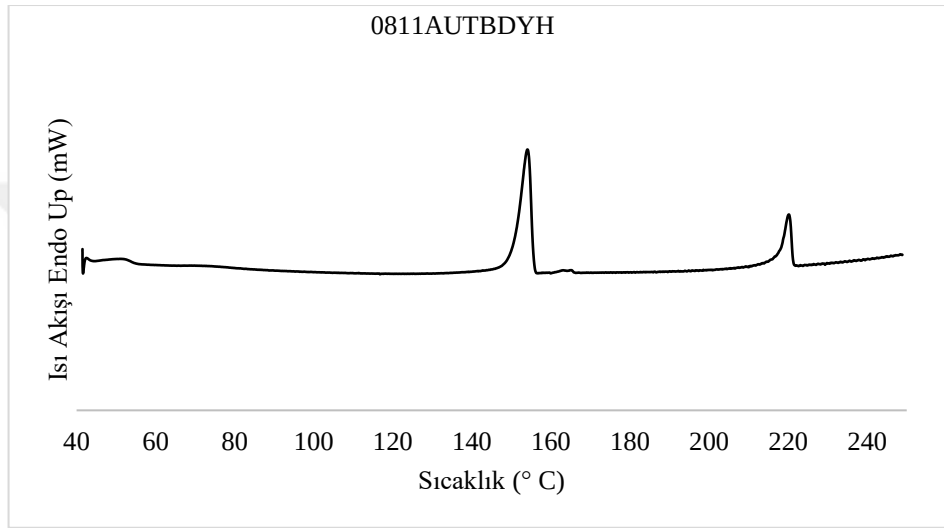


Şekil 4.50. UT, BD, YH kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonların liyofilizasyon sonrası büyüklüğü dağılımı grafikleri.

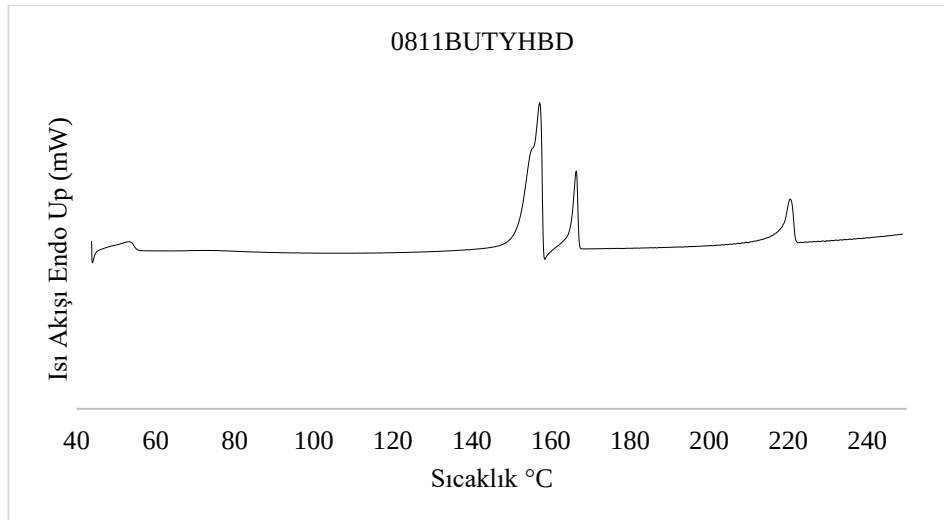
4.11. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.11.1. DSC Analizi

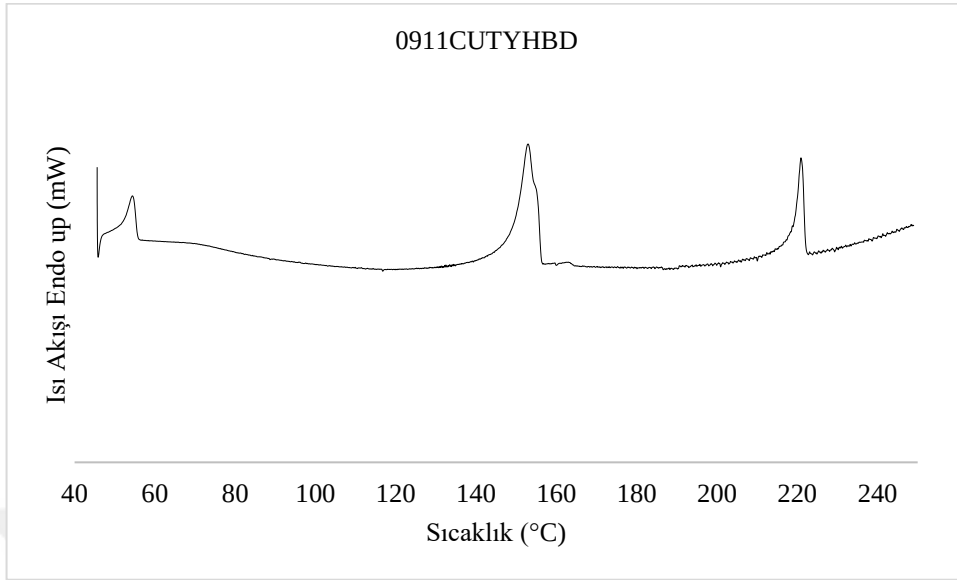
RXB'nin termal özelliklerinde ve kristal yapısında değişiklik olup olmadığını incelemek amacıyla DSC analizi yapılarak sonuçlar Şekil 4.51.-4.56.'da verilmiştir.



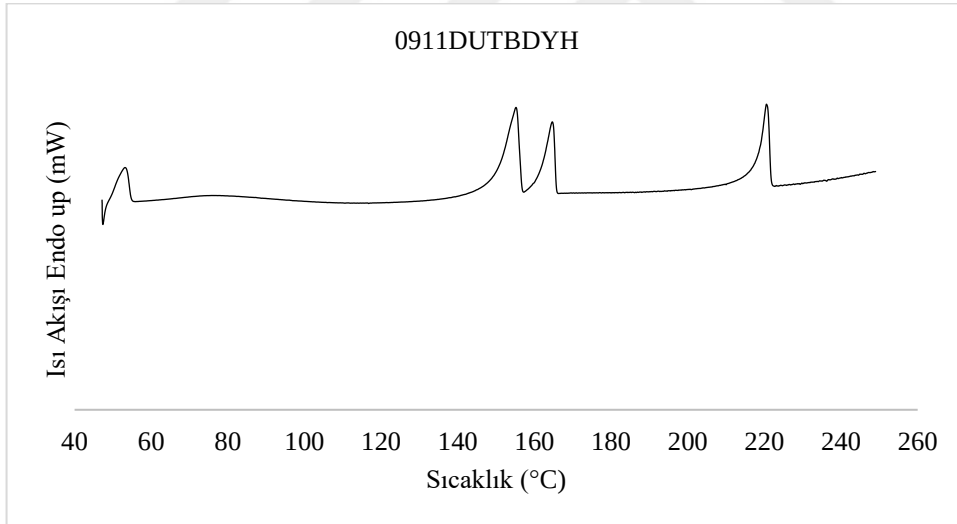
Şekil 4.51. 0811AUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı.



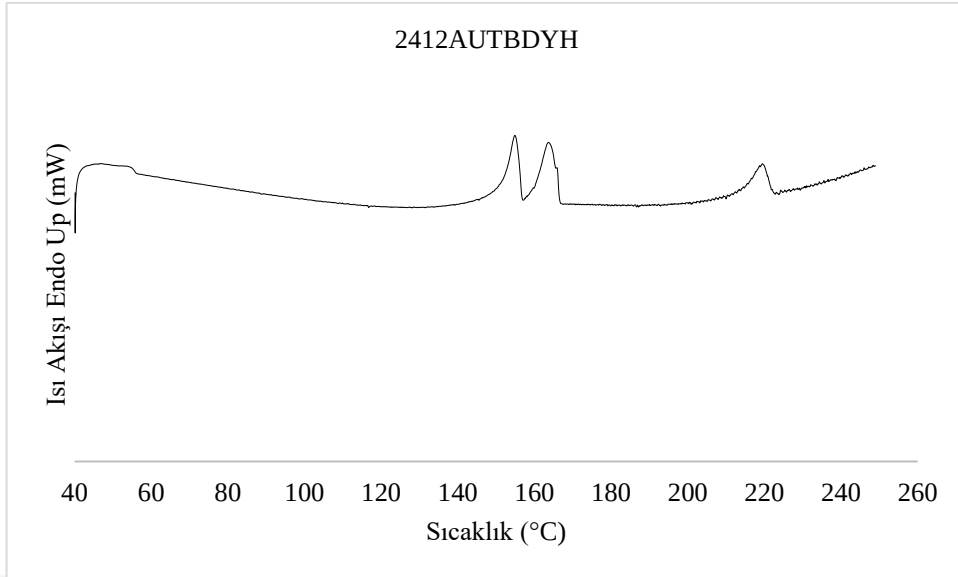
Şekil 4.52. 0811BUTYHBD formülasyonunun DSC termogramı.



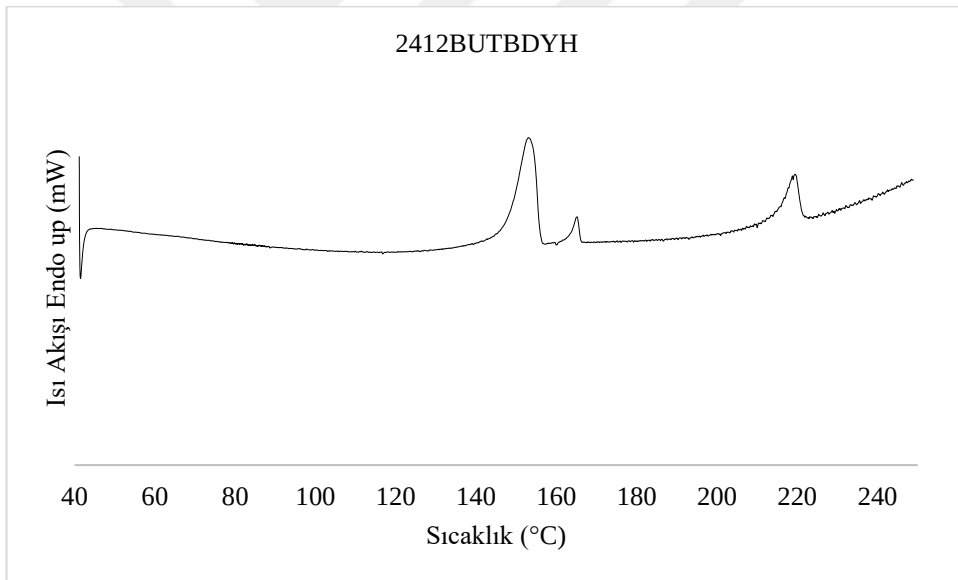
Şekil 4.53. 0911CUTYHBD formülasyonunun DSC termogramı.



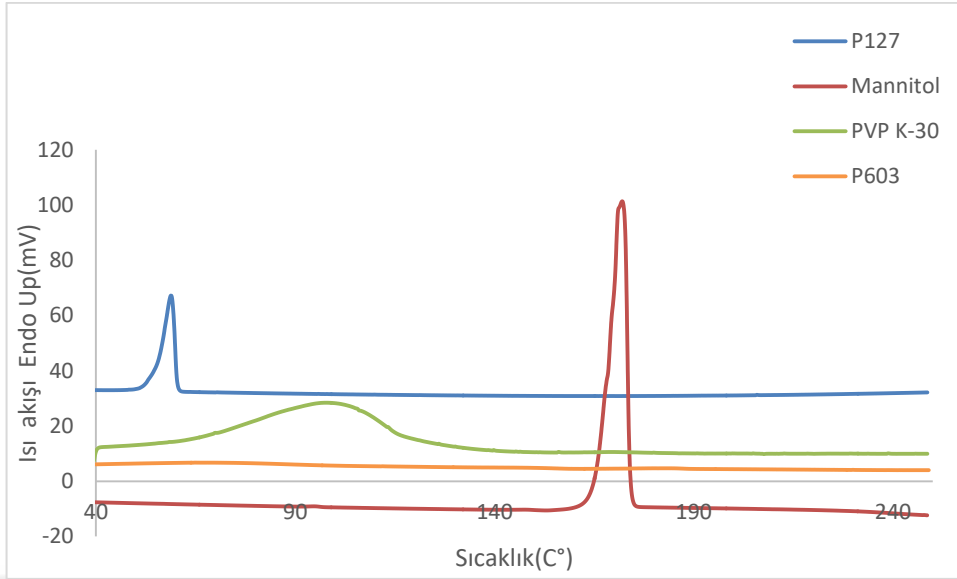
Şekil 4.54. 0911DUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı.



Şekil 4.55. 2412AUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı.



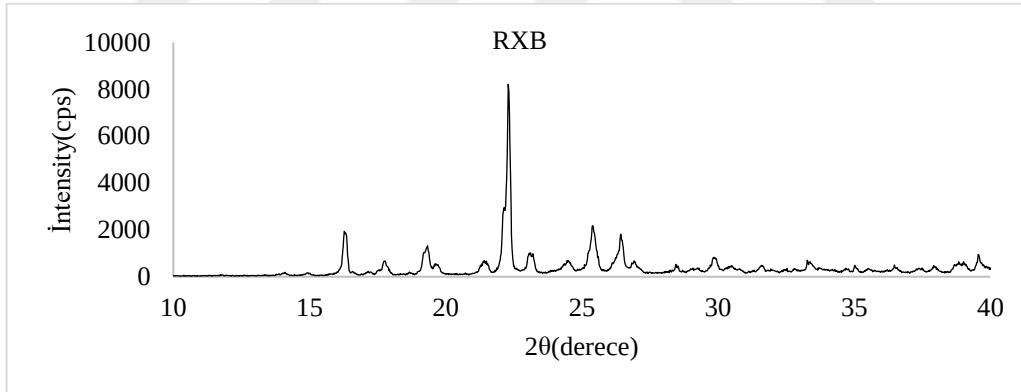
Şekil 4.56. 2412BUTBDYH formülasyonunun DSC termogramı.



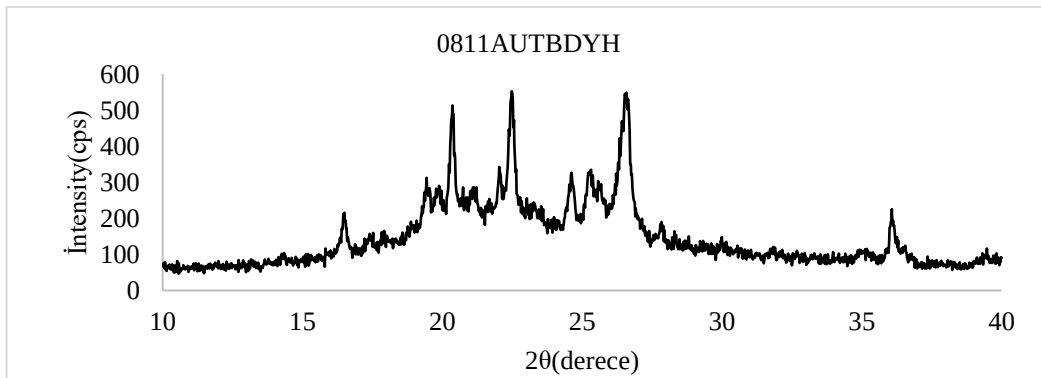
Şekil 4.57. Formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin DSC termogramı.

4.11.2. X-Işını Kırınımı Analizi

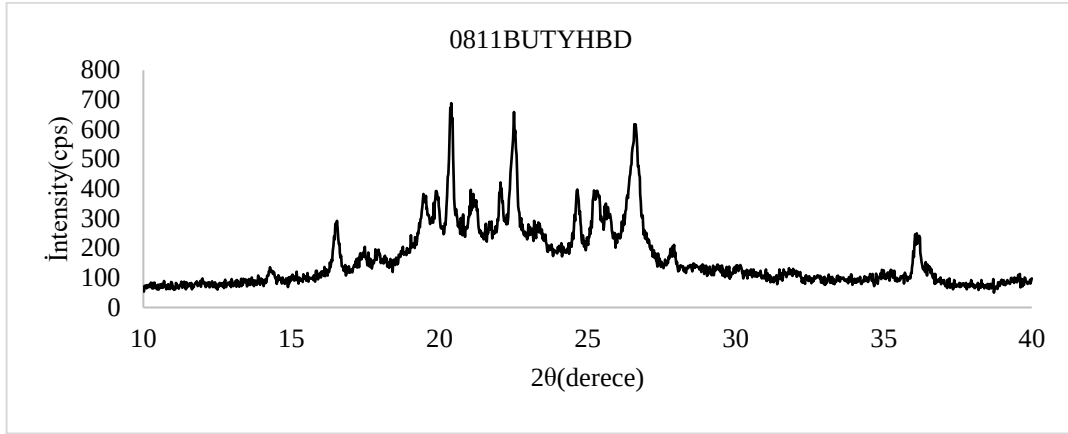
Etkin maddede ve nanokristal formülasyonlarına ilişkin X-ışını kırınımı difraktogramları Şekil 4.58.-4.65.'de verilmiştir.



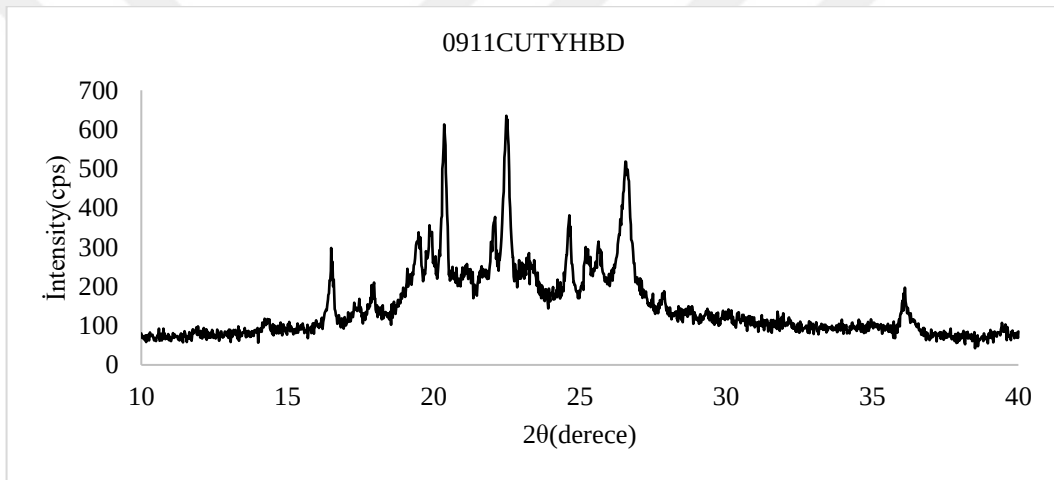
Şekil 4.58. RXB'nin X- ışını kırınımı difraktogramı.



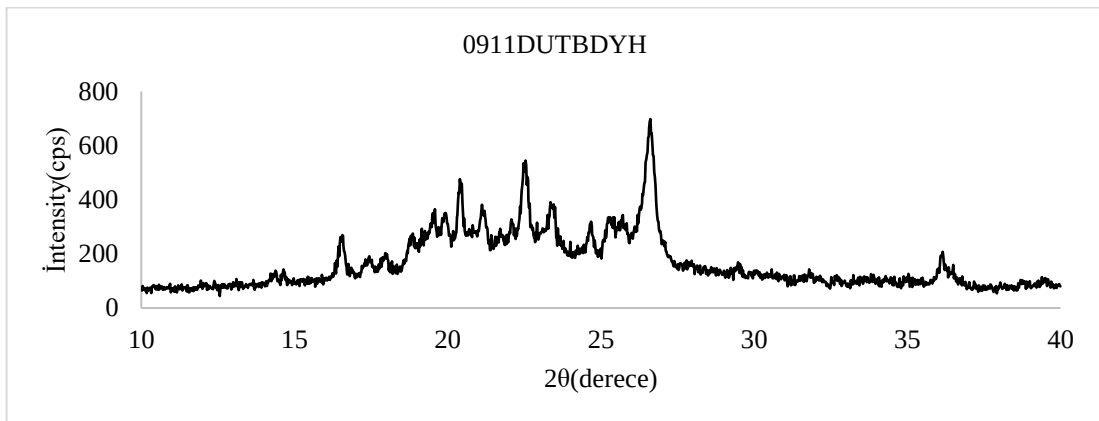
Şekil 4.59. 0811AUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



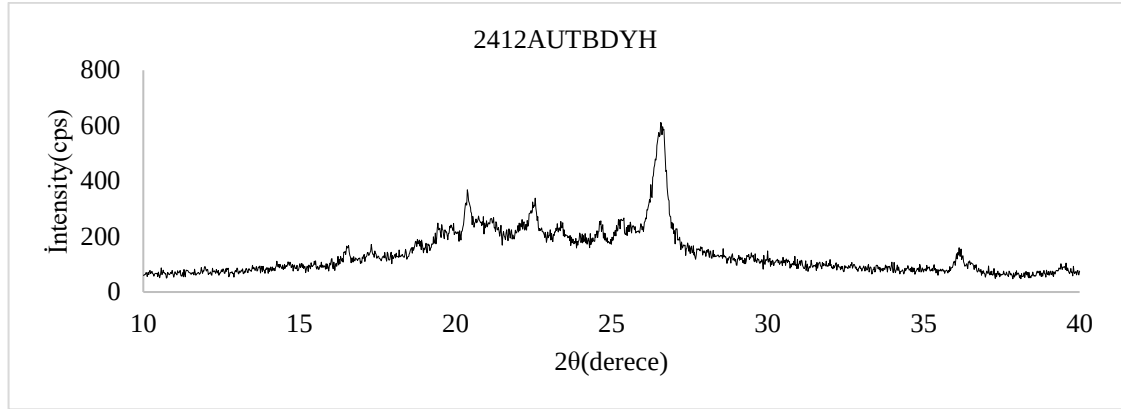
Şekil 4.60. 0811BUTYHBD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



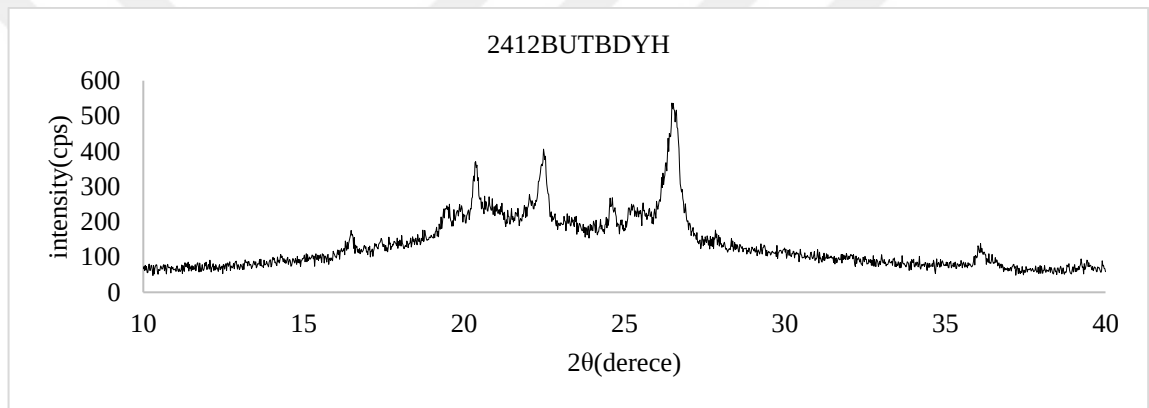
Şekil 4.61. 0911CUTYHBD formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



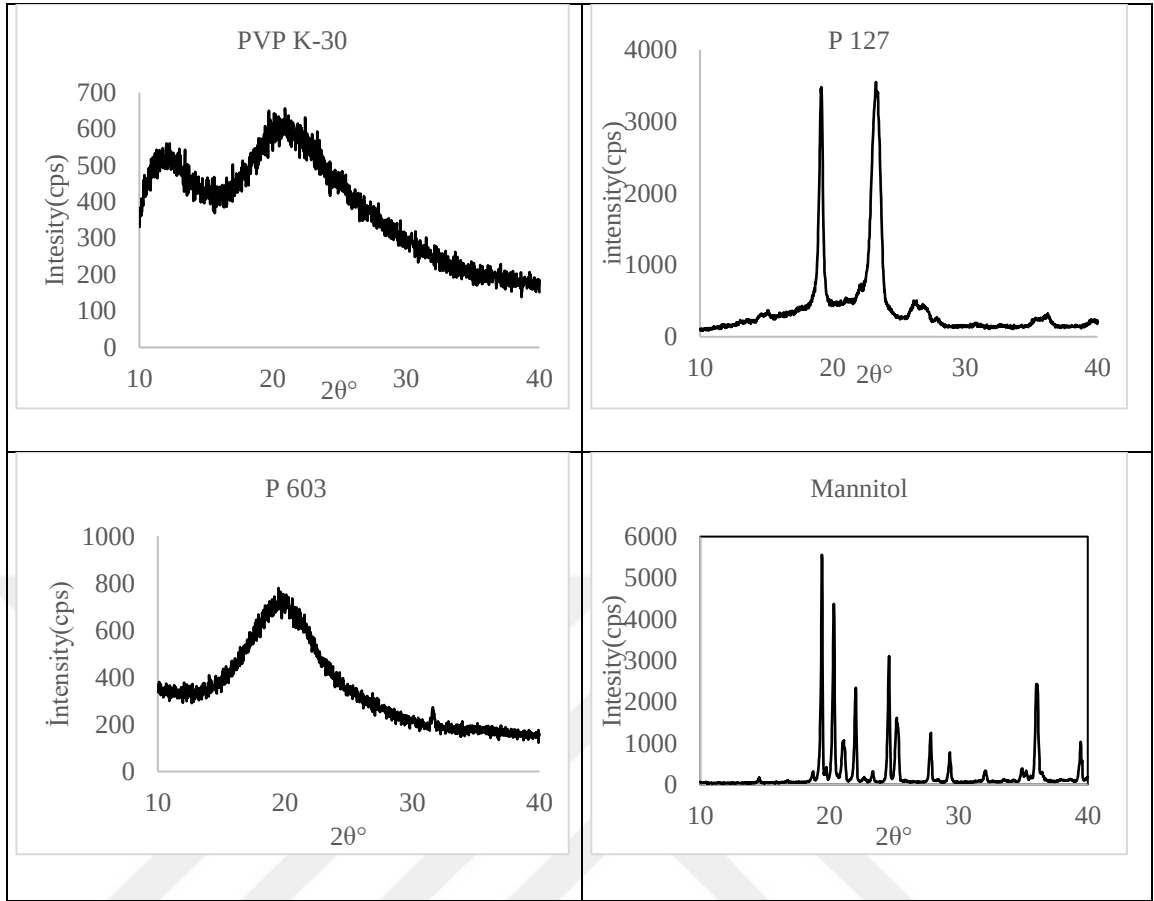
Şekil 4.62. 0911DUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



Şekil 4.63. 2412AUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



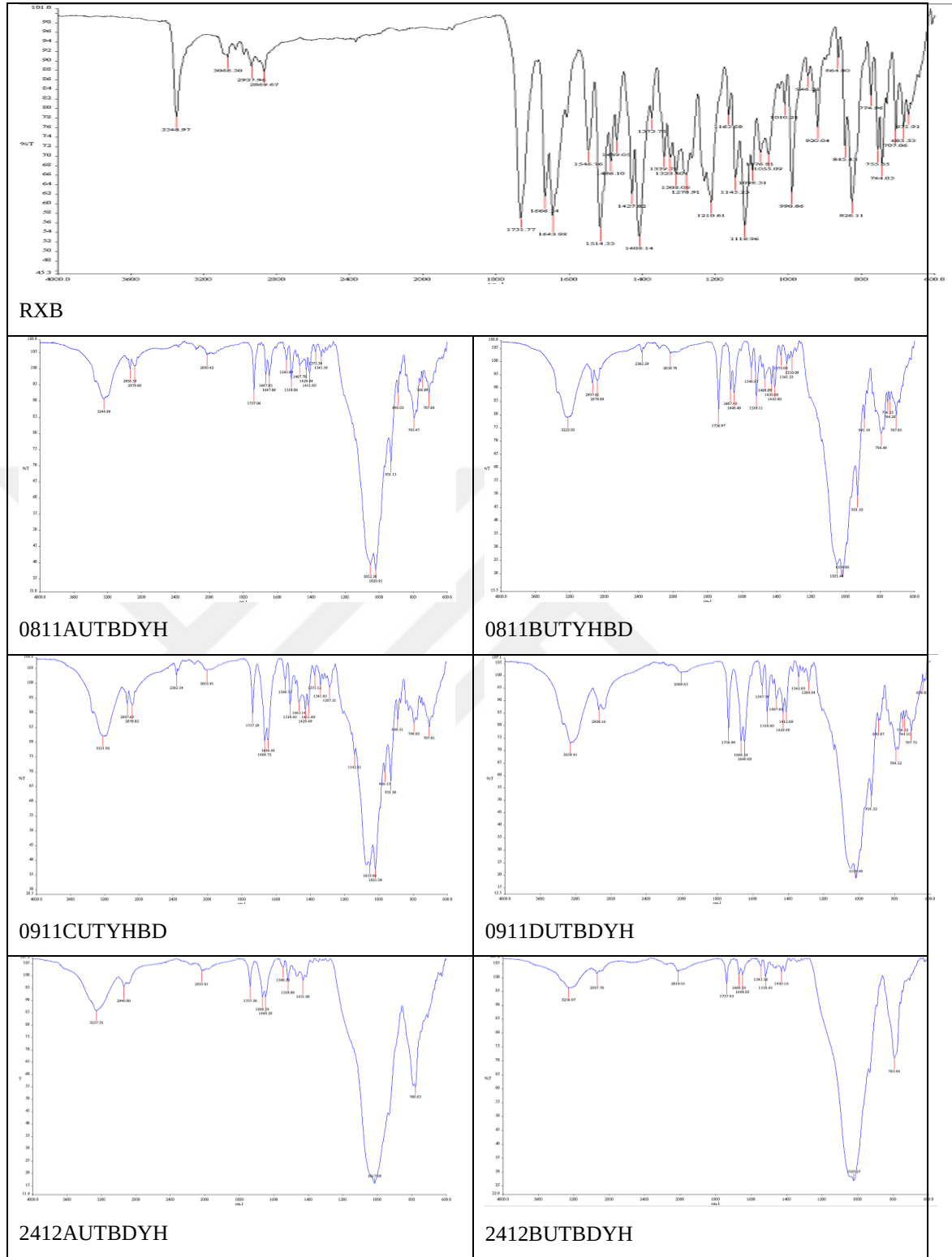
Şekil 4.64. 2412BUTBDYH formülasyonunun X-ışını kırınımı difraktogramı.



Şekil 4.65. Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelere ait X-ışını kırınımı difraktogramları.

4.11.3. IR Spektrumu

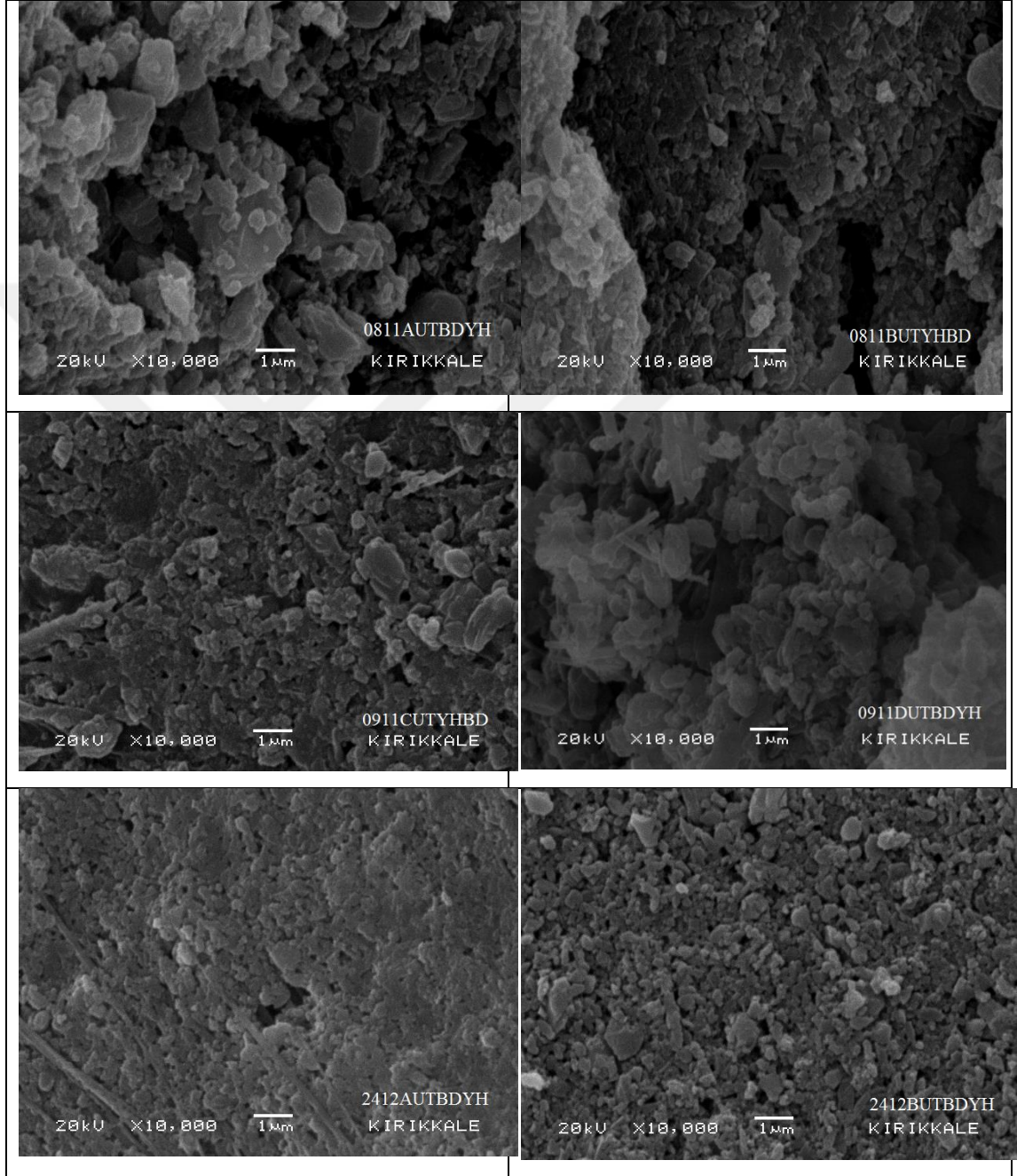
Etkin maddede ve nanokristal formülasyonlarına ilişkin IR spektrumları Şekil 4.66.'da verilmiştir.



Şekil 4.66. RXB ve 0811AUTBDYH, 0811BUTYHBD, 0911CUTYHBD, 0911DUTBDYH, 2412AUTBDYH, 2412BUTBDYH formülasyonlarının IR spektrumları.

4.11.4. SEM Analizi

RXB etkin maddesinin ve nanokristal formülasyonlarının yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve şeklini incelemek amacıyla yapılan SEM analizi sonuçları Şekil 4.67.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.67. Nanokristal formülasyonlarının SEM görüntüleri.

4.11.5. Çözünürlük Tayini

Farklı çözünürlük ortamları kullanılarak tayin edilen değerler Tablo 4.41’de verilmiştir.

Tablo 4.41. RXB nanokristal formülasyonlarının farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri ($\mu\text{g/mL}$) (Ortalama $\pm$ SS; n= 3).

Formülasyon Kodu	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 4,5
				% 0.4 SDS içeren
RXB	8,6 $\pm$ 0,1	9,4 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 0,4	64,8 $\pm$ 0,1
0811AUTBDYH	12,3 $\pm$ 0,1	11,7 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,3	69,1 $\pm$ 11,4
0811BUTYHBD	9,3 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 1,2	71,3 $\pm$ 4,1
0911CUTYHBD	8,6 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 4,3	6,9 $\pm$ 1,9	74,1 $\pm$ 13,2
0911DUTBDYH	8,8 $\pm$ 0,01	36,8 $\pm$ 3,7	6,8 $\pm$ 0,1	81,9 $\pm$ 3,2
2412AUTBDYH	9,8 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,1	73,8 $\pm$ 1,0
2412BUTBDYH	14,7 $\pm$ 0,1	14,2 $\pm$ 0,1	10,6 $\pm$ 0,1	78,2 $\pm$ 0,3

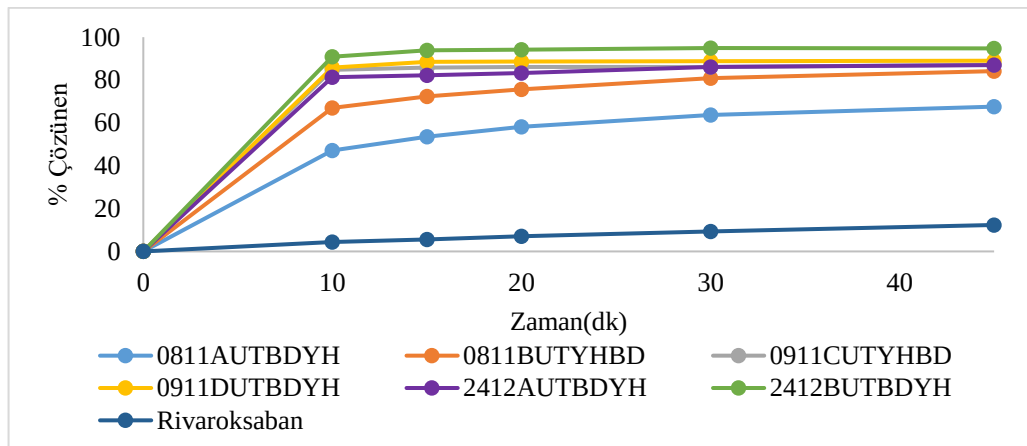
4.12. Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünme Testleri

RXB ve nanokristal formülasyonlarının in vitro çözünme testi sonuçları Tablo 4.42.’de ve çözünme profilleri Şekil 4.68.’de verilmiştir.

Tablo 4.42. RXB'nin ve RXB nanokristal formülasyonlarının in vitro çözünme testi sonuçları (% Çözünen, % VK); n=6).

Formülasyon							
Kodu	Zaman (dk)	10	15	20	30	45	
RXB	% çözünen	4,40	5,61	7,07	9,39	12,34	
	VK	0,94	0,25	0,87	0,23	0,59	
0811AUTBDYH	% çözünen	47,12	53,52	58,14	63,73	67,57	
	VK	2,50	1,91	1,21	1,30	1,20	
0811BUTYHBD	% çözünen	67,04	72,39	75,60	80,91	84,14	
	VK	0,96	1,08	0,94	0,83	0,80	
0911CUTYHBD	% çözünen	84,71	85,77	86,03	86,11	87,09	
	VK	1,30	0,83	1,70	1,16	1,04	
0911DUTBDYH	% çözünen	85,72	88,52	88,59	88,82	89,00	
	VK	1,87	2,16	2,79	1,64	1,69	
2412AUTBDYH	% çözünen	81,26	82,24	83,32	86,16	86,96	
	VK	1,07	0,45	0,30	2,02	0,19	
2412BUTBDYH	% çözünen	90,82	93,81	94,17	94,93	94,73	
	VK	1,89	1,58	1,13	0,75	1,11	

VK: Varyasyon katsayısı



Şekil 4.68. RXB'nin ve nanokristal formülasyonlarının % 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponunda in vitro çözünme profilleri.

4.13. RXB Nanokristal Formülasyonlarının Stabilité Çalışması

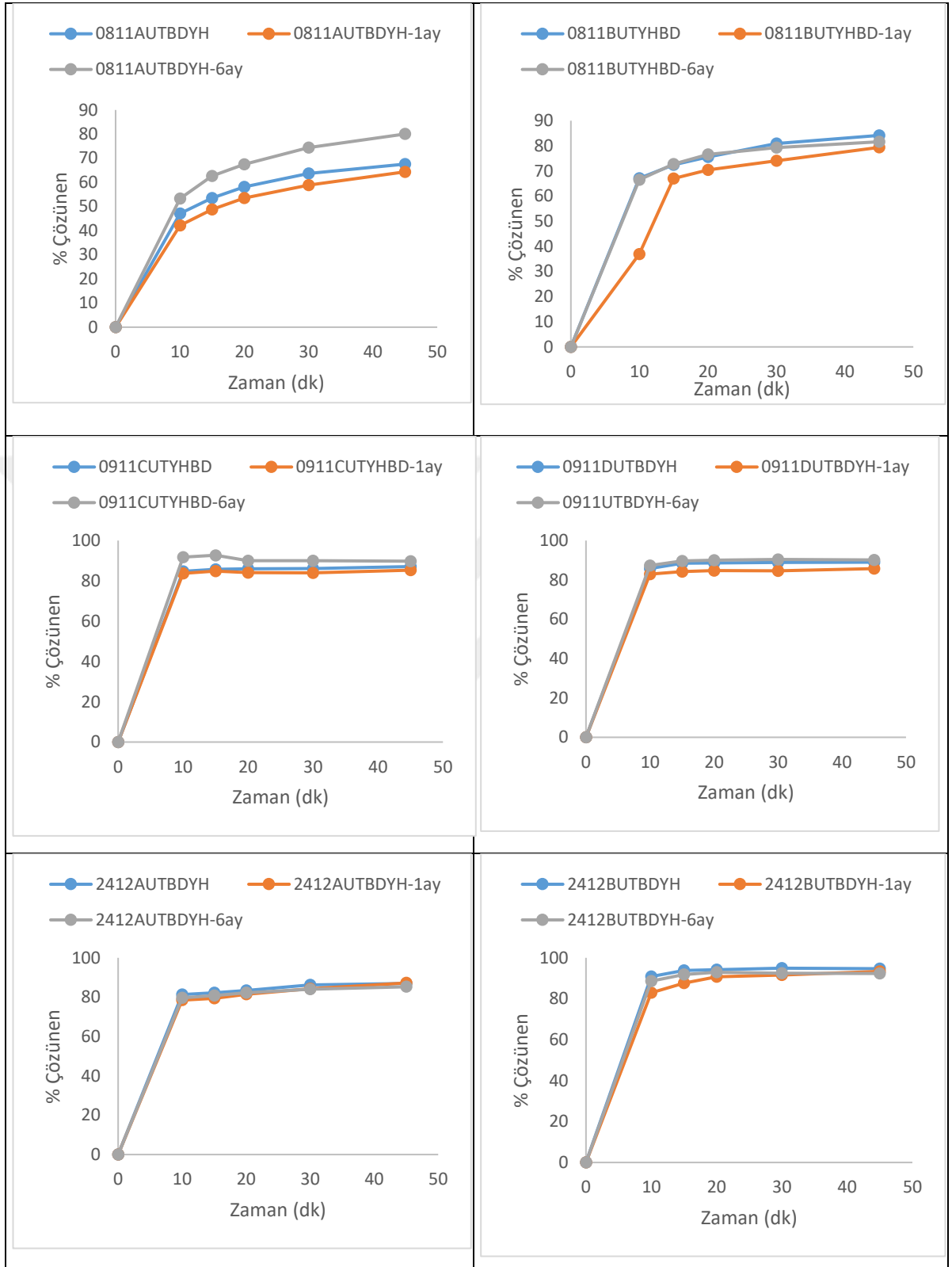
Hazırlanan nanokristal formülasyonları 25°C % 60±5 bağıl nem ve 40°C % 75±5 bağıl nem ortamında 12 ve 6 ay süre ile bekletildikten sonra formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli tekrar ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar partikül büyüklüğünün değiştiğini göstermektedir (Tablo 4.43). 40°C % 75±5’de saklanan formülasyonların in vitro çözünme testleri yapılarak başlangıçtaki in vitro çözünen miktarları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.69., Tablo 4.43.) ve benzerlik testi sonuçları Tablo 4.44.’de verilmiştir.

Tablo 4.43. RXB nanokristal formülasyonlarının stabilite çalışması sonuçları (Ortalama ± SS; n=3).

Formülasyon Kodu	Zaman	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	% RXB
0811AUTBDYH	0.gün	896±113	0,494±0,11	-16,6±0,58	86±0,18
% VK=15	25 °C 1 ay	1280±149	0,354±0,20	-19,1±0,44	85±15,45
	25 °C 3 ay	1143±52	0,358±0,08	-16,5±0,46	86±0,30
	25 °C 6 ay	1272±26	0,181±0,11	-16,96±0,41	87±0,36
	25 °C 9 ay	1179±68	0,421±0,06	-16,94±0,53	82±1,36
	25 °C 12 ay	1450±106	0,221±0,10	-16,86±0,53	81±0,70
% VK=22	40 °C 1ay	1176±37	0,630±0,04	-15,3±0,63	83±0,36
	40 °C 3 ay	1531±48	0,45±0,27	-16,46±0,50	86±0,08
	40 °C 6 ay	1423±32	0,157±0,16	-17,03±0,44	86±0,30
0811BUTYHBD	0.gün	1447±96	0,215±0,09	-17,9±1,65	104±0,18
% VK=8	25 °C 1 ay	1621±191	0,168±0,15	-17,5±0,83	96±3,65
	25 °C 3 ay	1455±63	0,299±0,12	-17,7±0,23	104±0,23
	25 °C 6 ay	1738±22	0,182±0,08	-0,32±0,14	104±0,11
	25 °C 9 ay	1478±27	0,119±0,13	-18,7±0,43	97±0,16
	25 °C 12 ay	1676±26	0,381±0,08	-10,16±0,46	97±0,05
% VK=10	40 °C 1ay	1507±113	0,810±0,08	-16,1±1,60	96±0,50
	40 °C 3 ay	1800±193	0,406±0,02	-16,1±0,27	104±0,10
	40 °C 6 ay	1576±243	0,229±0,01	-16,6±0,55	96±0,06

Tablo 4.43. (Devam). RXB nanokristal formülasyonlarının stabilite çalışması sonuçları (Ortalama $\pm$ SS; n=3)

Formülasyon Kodu	Zaman	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	% RXB
0911CUTYHBD % VK=11	0.gün	1018 $\pm$ 128	0,299 $\pm$ 0,09	-16,9 $\pm$ 1,46	97 $\pm$ 0,14
	25 °C 1 ay	1307 $\pm$ 70	0,527 $\pm$ 0,18	-22,2 $\pm$ 0,94	95 $\pm$ 1,00
	25 °C 3 ay	1174 $\pm$ 21	0,482 $\pm$ 0,05	-17,0 $\pm$ 0,44	97 $\pm$ 0,23
	25 °C 6 ay	1114 $\pm$ 75	0,549 $\pm$ 0,01	-17,4 $\pm$ 0,25	97 $\pm$ 0,09
	25 °C 9 ay	1391 $\pm$ 47	0,433 $\pm$ 0,10	-18,9 $\pm$ 0,31	93 $\pm$ 0,46
	25 °C 12 ay	1235 $\pm$ 40	0,463 $\pm$ 0,10	-17,30 $\pm$ 0,26	93 $\pm$ 0,16
	% VK=10	40 °C 1 ay	1261 $\pm$ 56	-18,4 $\pm$ 0,81	95 $\pm$ 0,24
		40 °C 3 ay	1238 $\pm$ 60	-17,2 $\pm$ 0,59	97 $\pm$ 0,15
		40 °C 6 ay	1115 $\pm$ 32	-19,4 $\pm$ 0,31	94 $\pm$ 0,52
0911DUTBDYH % VK=8	0.gün	792 $\pm$ 27	0,283 $\pm$ 0,05	-15,9 $\pm$ 1,03	104 $\pm$ 0,18
	25 °C 1 ay	919 $\pm$ 174	0,579 $\pm$ 0,08	-20,1 $\pm$ 0,69	91 $\pm$ 5,51
	25 °C 3 ay	773 $\pm$ 15	0,298 $\pm$ 0,01	-16,5 $\pm$ 0,36	104 $\pm$ 0,23
	25 °C 6 ay	796 $\pm$ 5	0,252 $\pm$ 0,03	-16,2 $\pm$ 0,34	104 $\pm$ 0,11
	25 °C 9 ay	846 $\pm$ 13	0,249 $\pm$ 0,07	-16,1 $\pm$ 0,35	92 $\pm$ 0,45
	25 °C 12 ay	947 $\pm$ 24	0,283 $\pm$ 0,02	-15,28 $\pm$ 0,2	92 $\pm$ 0,10
	% VK=17	40 °C 1ay	1227 $\pm$ 90	-17,2 $\pm$ 1,04	90 $\pm$ 0,12
		40 °C 3 ay	986 $\pm$ 8	-16,6 $\pm$ 0,67	95 $\pm$ 0,13
		40 °C 6 ay	992 $\pm$ 13	-16,6 $\pm$ 0,40	92 $\pm$ 0,45
2412AUTBDYH % VK=19	0.gün	1167 $\pm$ 33	0,442 $\pm$ 0,33	-23,4 $\pm$ 0,85	101 $\pm$ 0,14
	25 °C 1 ay	1317 $\pm$ 139	0,667 $\pm$ 0,11	-23,6 $\pm$ 1,39	100 $\pm$ 2,81
	25 °C 3 ay	1212 $\pm$ 22	0,460 $\pm$ 0,11	-19,7 $\pm$ 0,44	101 $\pm$ 0,33
	25 °C 6 ay	1228 $\pm$ 36	0,646 $\pm$ 0,11	-21,2 $\pm$ 0,48	101 $\pm$ 0,44
	25 °C 9 ay	1179 $\pm$ 80	0,502 $\pm$ 0,39	-21,7 $\pm$ 0,12	103 $\pm$ 0,10
	25 °C 12 ay	1839 $\pm$ 33	0,654 $\pm$ 0,31	-21,8 $\pm$ 0,3	103 $\pm$ 0,06
	% VK=11	40 °C 1ay	1242 $\pm$ 39	-18,9 $\pm$ 0,55	99 $\pm$ 0,54
		40 °C 3 ay	1455 $\pm$ 191	-20,3 $\pm$ 0,57	101 $\pm$ 0,06
		40 °C 6 ay	1128 $\pm$ 56	-19,6 $\pm$ 0,03	97 $\pm$ 0,79
2412BUTBDYH % VK=23	0.gün	606 $\pm$ 55	0,499 $\pm$ 0,04	-23,6 $\pm$ 0,74	105 $\pm$ 0,13
	25 °C 1 ay	1326 $\pm$ 169	0,716 $\pm$ 0,05	-24,7 $\pm$ 1,15	95 $\pm$ 2,66
	25 °C 3 ay	1300 $\pm$ 113	0,532 $\pm$ 0,07	-19,6 $\pm$ 0,49	104 $\pm$ 0,36
	25 °C 6 ay	1256 $\pm$ 92	0,205 $\pm$ 0,14	-19,08 $\pm$ 0,36	105 $\pm$ 0,06
	25 °C 9 ay	1156 $\pm$ 83	0,310 $\pm$ 0,23	-20,0 $\pm$ 0,28	97 $\pm$ 0,17
	25 °C 12 ay	1189 $\pm$ 104	0,619 $\pm$ 0,04	-20,7 $\pm$ 0,60	98 $\pm$ 1,50
	% VK=30	40 °C 1 ay	1199 $\pm$ 193	-20,1 $\pm$ 0,98	95 $\pm$ 0,42
		40 °C 3 ay	1185 $\pm$ 193	-20,0 $\pm$ 0,7	105 $\pm$ 0,09
		40 °C 6 ay	1364 $\pm$ 49	-20,6 $\pm$ 1,31	106 $\pm$ 0,36



Şekil 4.69. 40°C ve % 75 bağıl nem ortamında 1 ay ve 6 ay süreyle bekletilen formülasyonların t=0 zamanındaki çözünme profilleriyle karşılaştırılması.

Tablo 4.44. 40°C ve % 75 bağıl nem ortamında 1 ay ve 6 ay süreyle bekletilen formülasyonların t=0 zamanındaki f₂ benzerlik faktörleri.

Formülasyon Kodu	45 dk içinde % çözünen RXB			f ₂ (benzerlik faktörü)	
	t=0	1 ay	6 ay	t=0 ve 1 ay	t=0 ve 6 ay
0811AUTBDYH	67,57	64,36	80,03	67	50
0811BUTYHBD	84,14	79,38	81,61	42	88
0911CUTYHBD	87,09	85,31	89,81	86	64
0911DUTBDYH	89,00	85,74	90,15	71	64
2412AUTBDYH	86,96	87,19	85,26	81	86
2412BUTBDYH	94,73	93,35	92,28	65	81

4.14. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.14.1. Caco-2 Tek Tabaka Hücre Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Bu amaçla TEER değerleri ölçülmüştür. Transport çalışmalarında TEER < 400 ohm.cm² olan hücreler kullanılmamıştır.

4.14.2. Geçirgenlik Çalışmaları Sonuçları

Caco-2 ile yapılan geçirgenlik çalışmalarında geliştirilen tüm formülasyonlar için tayin edilen geçirgenlik katsayıları Tablo 4.45’de verilmiştir. Formülasyonların geçirgenlik katsayıları RXB etkin maddesinden yüksek bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 4.45. Toz RXB ve RXB nanokristal formülasyonlarına ait geçirgenlik katsayıları (Ortalama $\pm$ SS, n=6).

Formülasyon Kodu	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$)	Çözünme (%)	$P_{app}(10^{-5}\text{cm/sn})$
	pH 4,5 %0,4 SDS	pH 4,5 %0,4 SDS	
RXB	64,8 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 0,9
2412BUTBDYH	78,2 $\pm$ 0,3	94,7 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 0,6
0811BUTYHBD	69,1 $\pm$ 11,4	84,1 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 0,6
0911CUTYHBD	74,1 $\pm$ 13,2	87,1 $\pm$ 1,0	10,2 $\pm$ 0,2
0911DUTBDYH	81,9 $\pm$ 3,2	89,0 $\pm$ 1,7	11,6 $\pm$ 0,3

4.15. İn Vivo Oral Uygulamada Kullanılan Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Sonuçları

Hazırlanan nanokristal formülasyonu nanosüspansiyon olarak tavşanlara uygulanmıştır ve her bir uygulamadan önce ölçülen partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.46.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.46. Nanokristal formülasyonlarının PB, PDI ve ZP'lerine ilişkin değişim tablosu.

Uygulama	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
1.uygulama	445,52	0,43	-0,73
2.uygulama	454,00	0,38	-1,99
3.uygulama	454,12	0,36	-0,16
Ortalama	451,21	0,39	-0,96
SS	4,93	0,04	+0,94

PB: Partikül büyüklüğü, PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyel, SS: Standart sapma

4.16. İn Vivo Miktar Tayini Sonuçları

Hazırlanan nanokristal formülasyonunun her bir uygulamadan önce mL'deki etkin madde miktarı analiz edilmiştir (Tablo 4.47.). Her bir tavşana 3 mg/kg, 10 mg/kg ve 15 mg/kg RXB içerecek miktarda nanosüspansiyon oral gavaj ile uygulanmıştır.

Tablo 4.47. Uygulama öncesi nanosüspansiyonlardaki mL'deki RXB miktarları (n=6).

Uygulama	RXB miktarı (mg/mL)
1.uygulama	58,12
2.uygulama	60,26
3.uygulama	67,38
Ortalama	61,92
SS	4,84

4.17. Nanokristal Formülasyonlarının Oral Uygulanmasından Sonra Elde Edilen Farmakokinetik Bulgular

İn vivo çalışmalar Bölüm 3.2.11'de belirtildiği gibi 6 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarına 3mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg olacak şekilde oral gavaj yoluyla verilen RXB nanosüspansiyonlarının uygulanmasından sonra tayin edilen plazma konsantrasyonları Tablo 4.48., Tablo 4.49. ve Tablo 4.50.'da verilmiştir. EAA, C_{maks}, t_{maks} ve t_{1/2} değerleri Tablo 4.51., Tablo 4.52. ve Tablo 4.53.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.48. 3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri (ng/mL).

Kullanılan Deney Hayvanı Numarası								
Zaman (Saat)	T1	T2	T4	T5	T6	T7	Ortalama	SS
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.02	TE	TE	TE	3.61	TE	34.57	19.09	21.89
0.17	13.90	77.58	TE	68.36	344.44	175.75	136.01	130.31
0.33	131.30	464.38	35.88	242.61	851.20	289.21	335.76	291.48
0.50	319.92	309.21	239.20	234.88	1210.44	380.86	449.09	376.96
0.75	349.26	307.80	317.05	285.81	883.87	523.88	444.61	231.75
1.00	280.60	321.73	500.61	256.33	762.62	427.19	424.85	189.57
1.50	291.82	982.54	155.51	209.80	398.49	255.61	382.30	305.28
2.00	207.04	239.66	245.19	190.61	270.85	263.47	236.14	31.51
4.00	115.44	80.99	86.43	59.43	172.44	142.31	109.51	42.25
6.00	132.13	61.30	57.76	32.34	134.16	92.07	84.96	41.87
8.00	327.60	54.07	104.50	27.38	144.65	80.22	123.07	108.07
12.00	162.18	23.50	98.73	41.83	222.86	42.11	98.54	79.42
24.00	65.48	16.15	17.95	20.33	116.01	20.58	42.75	40.50

TE: Analiz sırasında tespit edilememiştir.

Tablo 4.49. 10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri (ng/mL).

Kullanılan Deney Hayvanı Numarası								
Zaman (Saat)	T1	T2	T4	T5	T6	T7	Ortalama	SS
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,02	TE	9,20	124,53	57,04	TE	TE	63,59	57,94
0,17	144,52	59,03	401,99	453,02	393,90	148,24	266,78	214,26
0,33	312,23	581,98	411,72	681,87	545,09	270,76	467,28	136,59
0,50	499,52	718,65	417,66	903,34	759,04	281,52	596,62	245,15
0,75	522,21	1145,93	946,99	853,34	990,77	386,22	807,58	149,42
1,00	350,39	663,21	866,79	384,59	986,86	152,84	567,45	242,07
1,50	405,45	705,50	534,73	418,20	418,35	118,91	433,52	144,50
2,00	374,43	376,65	475,67	324,22	459,32	128,14	356,41	76,91
4,00	320,68	206,40	270,48	124,42	208,01	96,74	204,45	73,21
6,00	184,68	125,11	156,83	153,23	63,08	22,26	117,53	17,37
8,00	107,74	148,70	210,72	97,96	76,26	17,39	109,80	56,47
12,00	173,60	121,88	241,40	197,29	68,13	99,28	150,27	60,44
24,00	95,35	79,21	202,79	110,71	59,82	85,23	105,52	64,22

TE: Analiz sırasında tespit edilememiştir.

Tablo 4.50. 15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen plazma RXB düzeyleri (ng/mL).

Zaman (Saat)	Kullanılan Deney Hayvanı Numarası							SS
	T1	T2	T4	T5	T6	T7	Ortalama	
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,02	118,41	5,02	14,65	TE	12,36	30,41	36,17	46,90
0,17	235,49	50,27	118,01	426,16	416,11	252,11	249,69	140,34
0,33	424,39	190,05	574,26	1159,73	573,66	1745,85	777,99	604,48
0,50	552,04	343,88	886,27	2790,91	951,46	3074,70	1433,21	1097,74
0,75	640,91	658,42	788,74	1419,46	933,09	2152,83	1098,91	635,94
1,00	851,09	579,55	1001,43	2048,91	893,10	2112,41	1247,75	593,62
1,50	487,61	579,04	956,35	1221,48	827,99	1769,96	973,74	508,76
2,00	354,70	416,33	874,74	1161,85	916,44	2542,91	1044,50	888,56
4,00	350,21	125,84	453,37	408,89	215,47	2152,51	617,71	843,97
6,00	186,01	76,62	221,99	459,37	166,64	794,33	317,49	287,46
8,00	175,62	76,75	138,35	223,48	149,53	440,67	200,73	141,41
12,00	380,17	155,30	186,14	401,41	153,59	559,55	306,02	179,08
24,00	103,53	89,18	160,62	175,97	62,84	170,81	127,16	46,60

TE: Analiz sırasında tespit edilememiştir.

Tablo 4.51. 3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.

Parametre	Birim	T1	T2	T4	T5	T6	T7	Ortalama	SS	%VK
Lambda _z	1/saat	0,09	0,08	0,12	0,11	0,08	0,08	0,09	0,02	16,20
t _{1/2}	saat	7,31	8,63	5,90	6,24	8,86	8,33	7,55	1,15	15,30
t _{maks}	saat	0,75	1,50	1,00	0,75	0,50	0,75	0,88	0,31	35,95
C _{maks}	ng/mL	349,26	982,54	500,61	285,81	1210,44	523,88	642,09	338,04	52,65
t _{lag}	saat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C _{son} /C _{maks}		0.19	0,02	0,04	0,07	0,10	0,04	0,07	0,06	76,36
EAA _{0-t}	ng/mL*saat	3856,19	1874,91	2209,48	1333,53	5022,33	2076,33	2728,80	1284,69	47,08
EAA _{0-∞}	ng/mL*saat	4546,50	2075,97	2362,24	1516,57	6504,99	2323,77	3221,67	1746,43	54,21
EAA _{0-t/0-∞}		0.85	0,90	0,94	0,88	0,77	0,89	0,87	0,05	5,93
MEAA _{0-∞}	ng/mL*saat ²	60162,48	16166,29	21926,53	15328,45	100704,96	21257,03	39257,62	31472,19	80,17
MRT _{0-∞}	saat	13,23	7,79	9,28	10,11	15,48	9,15	10,84	2,66	24,53
V _z /F	(mg)/(ng/mL)	0,0070	0,0180	0,0108	0,0178	0,0059	0,0155	0,0125	0,0049	39,30
Cl/F	(mg)/(ng/mL)/saat	0,0007	0,0014	0,0013	0,0020	0,0005	0,0013	0,0012	0,0005	42,43

Tablo 4.52. 10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.

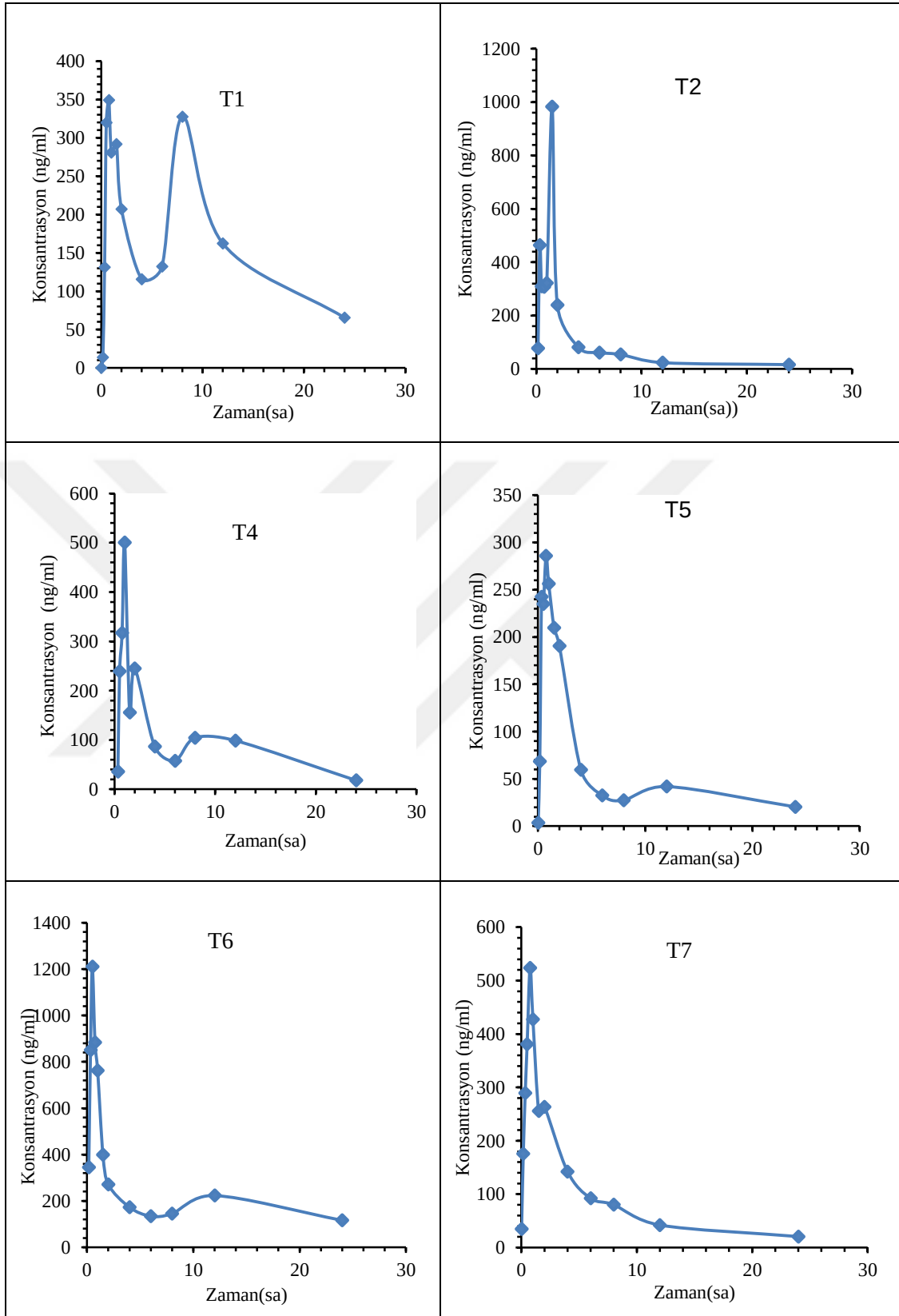
Parametre	Birim	T1	T2	T3	T5	T6	T7	Ortalama	SS	%VK
Lambda _z	1/saat	0,07	0,04	0,06	0,07	0,01	0,04	0,05	0,02	46,43
t _{1/2}	Saat	10,17	17,97	12,32	9,49	48,90	18,94	19,63	14,87	75,74
t _{maks}	Saat	0,75	0,75	0,75	0,50	0,75	0,75	0,71	0,10	14,41
C _{maks}	ng/mL	522,21	1145,93	946,99	903,34	990,77	386,22	815,91	295,03	36,16
t _{lag}	Saat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C _{son} /C _{maks}		0,18	0,07	0,21	0,12	0,06	0,22	0,14	0,07	49,13
EAA _{0-t}	ng/mL*saat	4407,75	4175,02	6288,15	4442,07	3390,67	2097,80	4133,58	1379,17	33,37
EAA _{0-∞}	ng/mL*saat	5807,32	6228,59	9892,04	5958,24	7610,90	4426,89	6654,00	1883,74	28,31
EAA _{0-t/0-∞}		0,76	0,67	0,64	0,75	0,45	0,47	0,62	0,13	21,54
MEAA _{0-∞}	ng/mL*saat ²	93439,06	134398,40	214189,74	98792,09	420557,99	143393,75	184128,51	123646,16	67,15
MRT _{0-∞}	saat	16,09	21,58	21,65	16,58	55,26	32,39	27,26	14,92	54,73
V _z /F	(mg)/(ng/mL)	0,0076	0,0125	0,0054	0,0069	0,0278	0,0185	0,0131	0,0087	65,99
Cl/F	(mg)/(ng/mL)/saat	0,0005	0,0005	0,0003	0,0005	0,0004	0,0007	0,0005	0,0001	26,31

Tablo 4.53. 15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen farmakokinetik değerler.

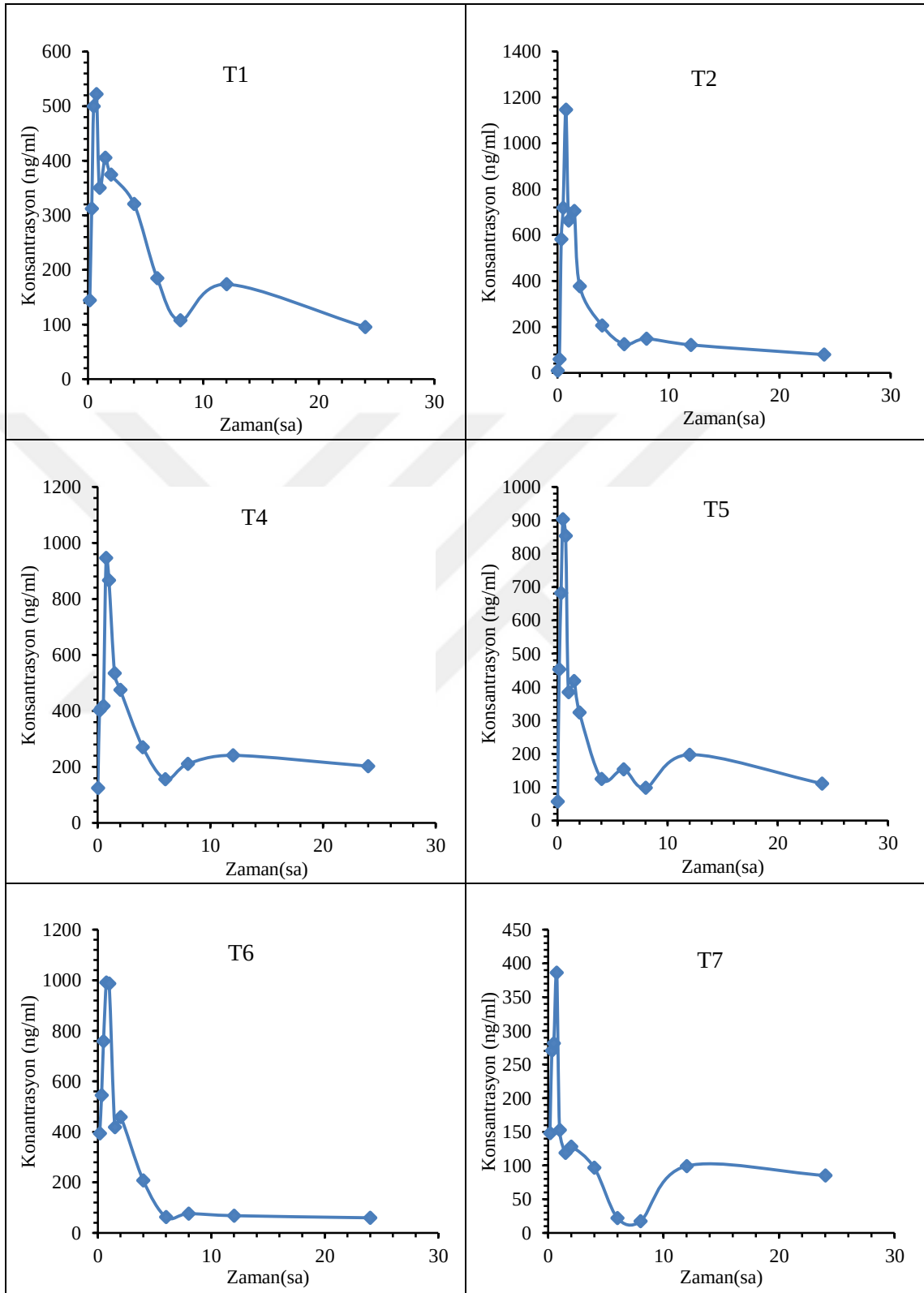
Parametre	Birim	T1	T2	T4	T5	T6	T7	Ortalama	SS	%VK
Lambda _z	1/saat	0,07	0,08	0,08	0,10	0,06	0,12	0,09	0,02	27,86
t _{1/2}	saat	10,59	8,57	8,42	6,67	12,16	5,75	8,69	2,38	27,42
t _{maks}	saat	1,00	0,75	1,00	0,50	0,50	0,50	0,71	0,25	34,70
C _{maks}	ng/mL	851,09	658,42	1001,43	2790,91	951,46	3074,70	1554,67	1077,68	69,32
t _{lag}	saat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C _{son} /C _{maks}		0.12	0,14	0,16	0,06	0,07	0,06	0,10	0,04	44,26
EAA _{0-t}	ng/mL*saat	6661,27	3716,14	6663,20	10706,08	5307,07	19084,90	8689,78	5595,10	64,39
EAA _{0-∞}	ng/mL*saat	8242,97	4818,89	8614,53	12399,45	6409,22	20502,88	10164,66	5668,32	55,77
EAA _{0-t/0-∞}		0.81	0,77	0,77	0,86	0,83	0,93	0,83	0,06	7,32
MEAA _{0-∞}	ng/mL*saat ²	124558,00	73484,05	124702,65	140180,58	80451,16	170748,79	119020,87	36736,03	30,87
MRT _{0-∞}	saat	15,11	15,25	14,48	11,31	12,55	8,33	12,84	2,70	21,03
V _z /F	(mg)/(ng/mL)	0,0056	0,0077	0,0042	0,0023	0,0082	0,0012	0,0049	0,0028	57,93
Cl/F	(mg)/(ng/mL)/saat	0,0004	0,0006	0,0003	0,0002	0,0005	0,0001	0,0004	0,0002	45,85

Tablo 4.54. RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra elde edilen ortalama farmakokinetik değerler.

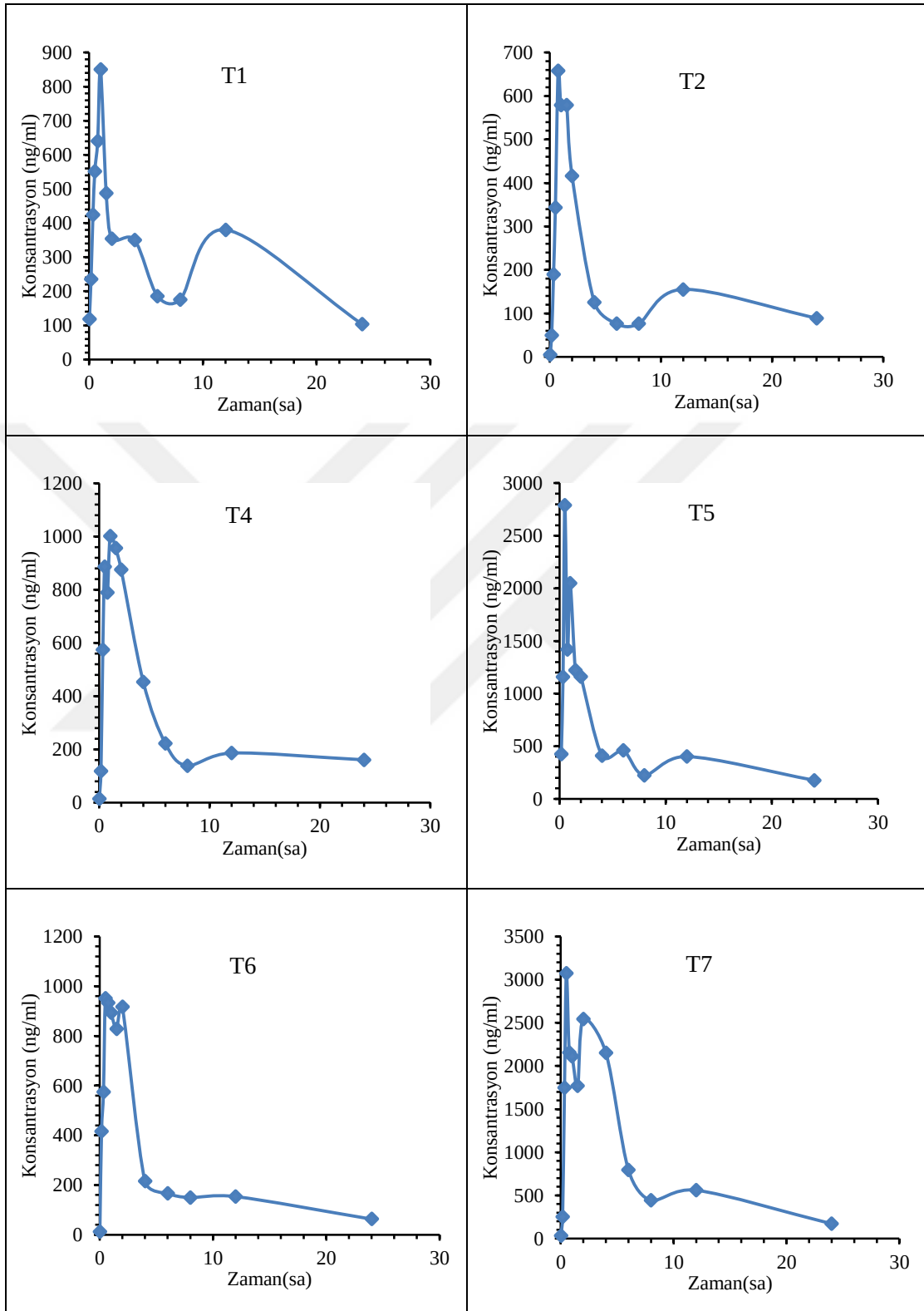
Parametre	Birim	3 mg/kg	SS	10 mg/kg	SS	15 mg/kg	SS
Lambda _z	1/saat	0,09	0,02	0,05	0,02	0,09	0,02
t _{1/2}	saat	7,55	1,15	19,63	14,87	8,69	2,38
t _{maks}	sa	0,88	0,31	0,71	0,10	0,71	0,25
C _{maks}	ng/mL	642,09	338,04	815,91	295,03	1554,67	1077,68
t _{lag}	sa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C _{son} /C _{maks}		0,07	0,06	0,14	0,07	0,10	0,04
EAA _{0-t}	ng/mL*sa	2728,80	1284,69	4133,58	1379,17	8689,78	5595,10
EAA _{0-∞}	ng/mL*sa	3221,67	1746,43	6654,00	1883,74	10164,66	5668,32
EAA _{0-t/0-∞}		0,87	0,05	0,62	0,13	0,83	0,06
MEAA _{0-∞}	ng/mL*sa ²	39257,62	31472,19	184128,51	123646,16	119020,87	36736,03
MRT _{0-∞}	Saat	10,84	2,66	27,26	14,92	12,84	2,70
V _z /F	(mg)/(ng/mL)	0,0125	0,0049	0,0131	0,0087	0,0049	0,0028
Cl/F	(mg)/(ng/mL)/sa	0,0012	0,0005	0,0005	0,0001	0,0004	0,0002



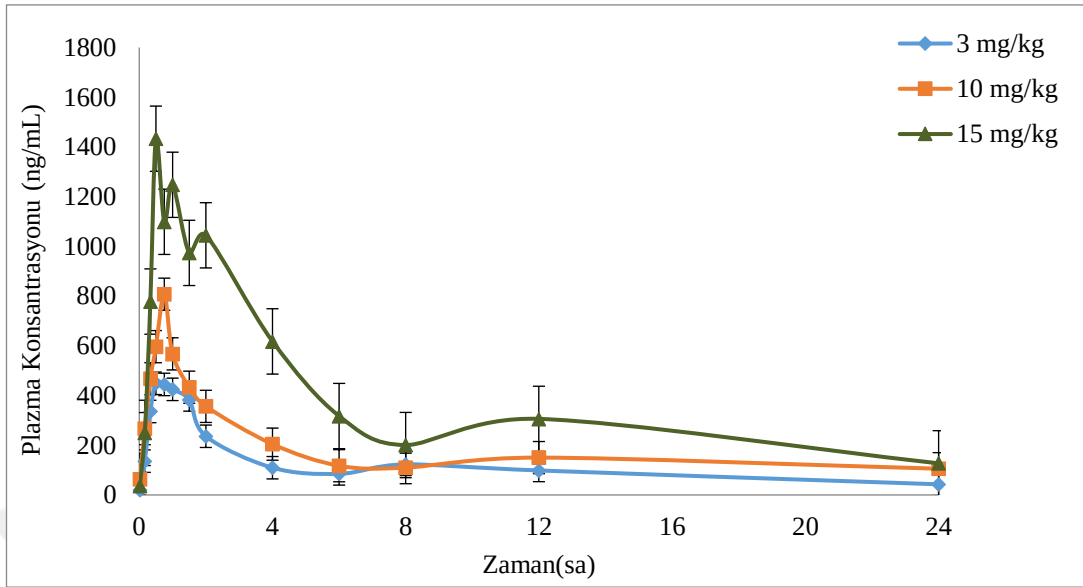
Şekil 4.70. 3 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri.



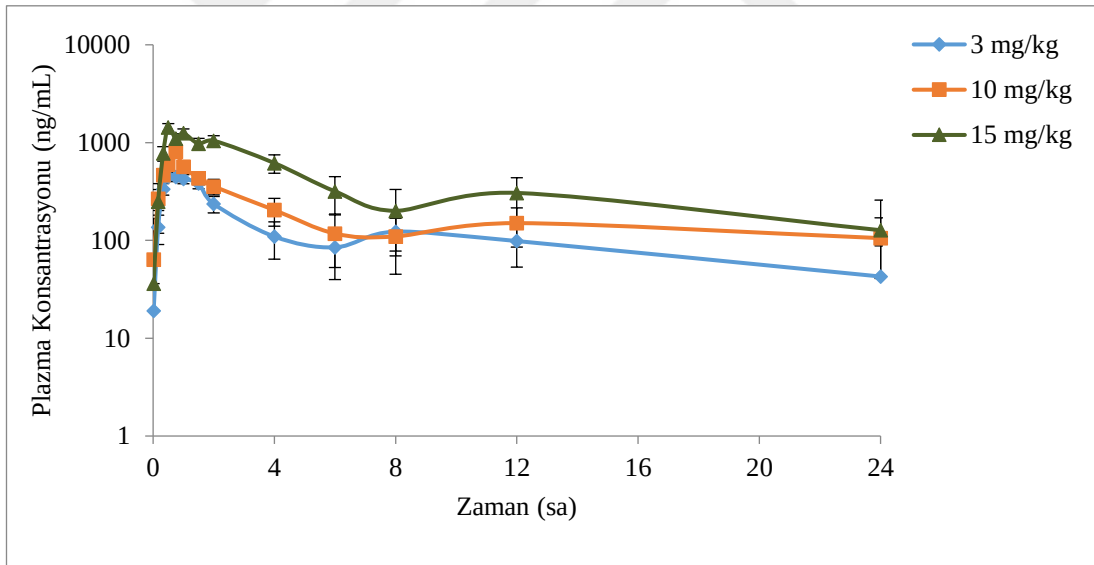
Şekil 4.71. 10 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri



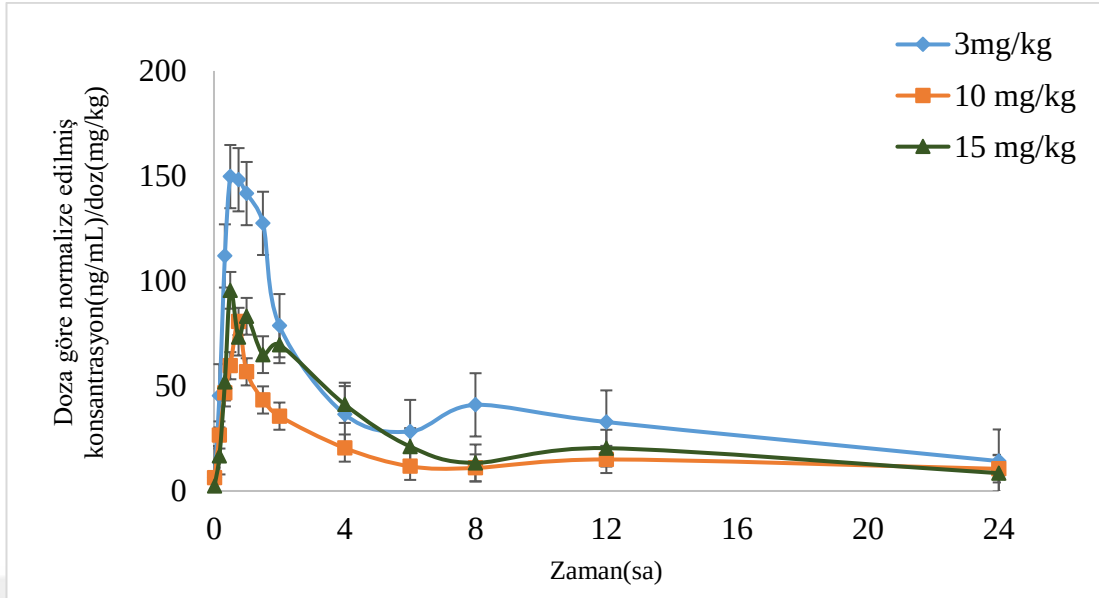
Şekil 4.72. 15 mg/kg doz RXB nanosüspansiyonu uygulamasından sonra her bir tavşandan elde edilen plazma konsantrasyon - zaman profilleri



Şekil 4.73. Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası ortalama plazma konsantrasyon - zaman profilleri (Ortalama $\pm$ SH, n=6).



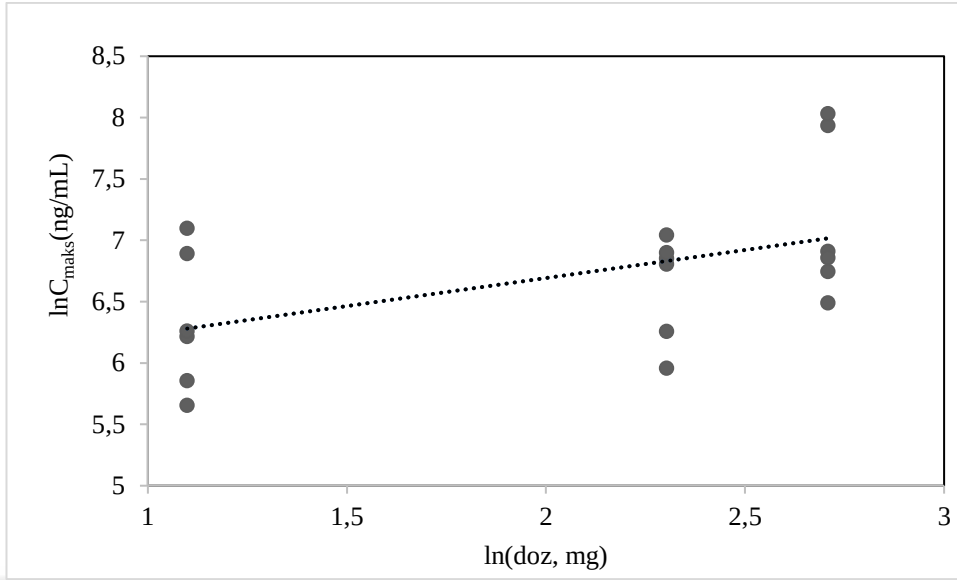
Şekil 4.74. Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası ortalama yarı logaritmik plazma konsantrasyon - zaman profilleri (Ortalama $\pm$ SH, n=6).



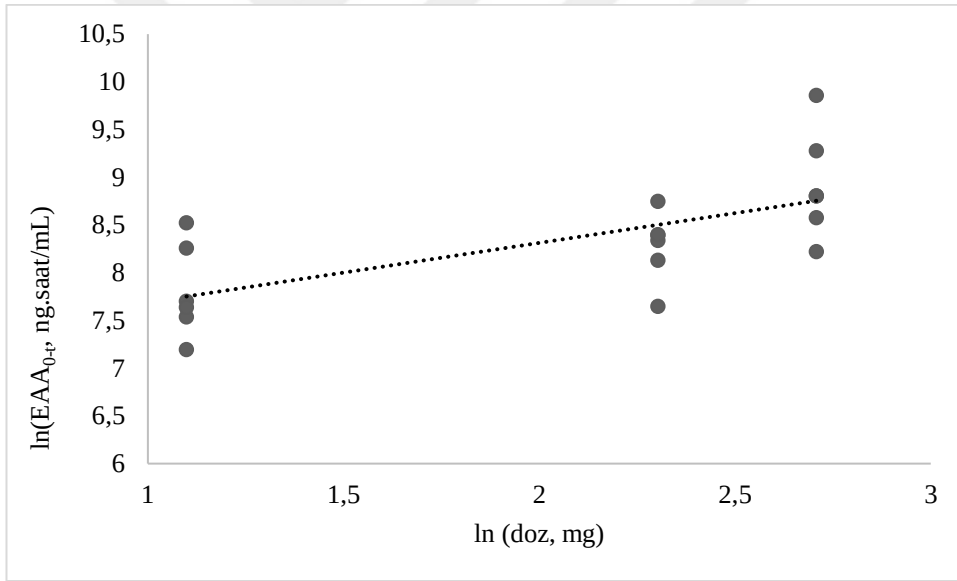
Şekil 4.75. Bütün tavşanlara ait 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg uygulama sonrası doza göre normalize edilmiş plazma konsantrasyon - zaman profilleri (Ortalama $\pm$ SH, n=6).

4.17. Doz Orantısallığı Sonuçları

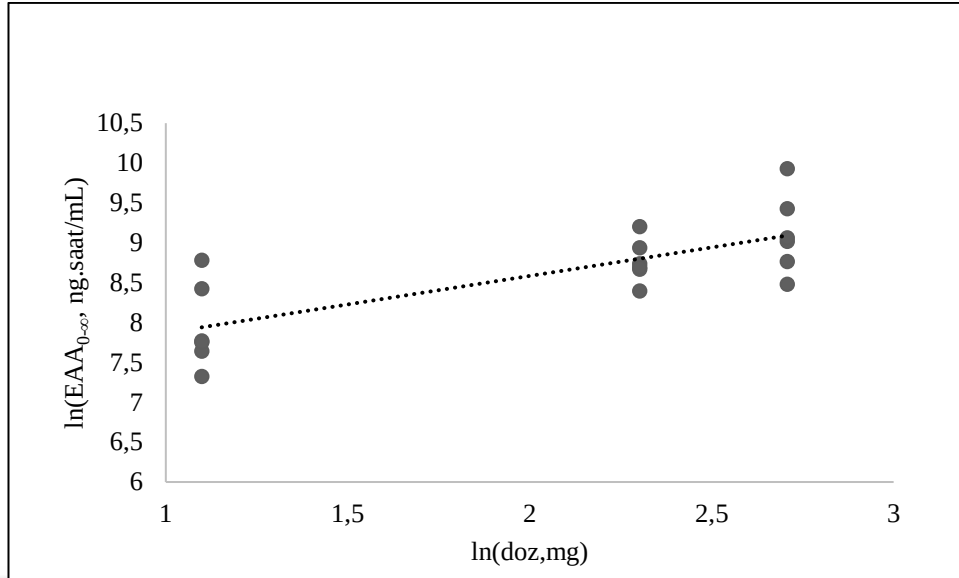
RXB nanosüspansiyonlarında C_{maks} , EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$ parametrelerine ait doz orantısallığı karşılaştırması; varyans analizi, güç modeli ve basit regrasyon analizi ve eşdeğerlik yöntemleri ile ayrı ayrı yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.55. - 4.59. ve Şekil 4.76. - 4.78.'de verilmiştir. Güç modeli kullanılarak doza karşı farmakokinetik cevap arasındaki ilişkiyi göstermek üzere çizilen eğrilerin eğimleri sırasıyla C_{maks} , EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$ için 0,4569, 0,7153 ve 0,6231 bulunmuştur. Her bir parametreye ait farmakokinetik cevaba karşılık gelen $\ln$ (doz) grafiği Şekil 4.76.-4.78.'de verilmiştir.



Şekil 4.76. 3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen C_{maks} değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)



Şekil 4.77. 3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen EAA_{0-t} değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)



Şekil 4.78. 3 mg-15 mg doz aralığında gözlemlenen ve tahmin edilen EAA_{0-∞} değerleri arasındaki ilişki (doğrusal log-log, güç modeli)

Tablo 4.55. RXB'nin doz orantısallığının güç modeli ile değerlendirilmesi.

Parametre	β(standart hata)	p -değeri	% 90 güven aralığı	R ²
C _{maks}	0,46(0,19)	0,031	0,12-0,79	0,26
EAA _{0-t}	0,62(0,17)	0,002	0,32-0,92	0,45
EAA _{0-∞}	0,72(0,15)	<0,001	0,45-0,98	0,58

Farmakokinetik verilere ait sonuçlar varyans analizi modeli ile de karşılaştırılmıştır. Öncelikle 3 farklı doza ait veriler karşılaştırılmış daha sonra ise 2'şerli gruplar halinde karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda Tablo 4.56.- 4.59.'da verilmiştir.

Tablo 4.56. RXB'nin doz normalize edilmiş doğal logaritması alınmış farmakokinetik verilerine ait varyans analizi özeti.

C_{maks}/doz	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,537	2	0,269	4,594	0,028	3,682
	Gruplar İçinde	0,877	15	0,058			
	Toplam	1,414	17				
EAA_{0-t}/doz	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,319	2	0,160	3,620	0,052	3,682
	Gruplar İçinde	0,662	15	0,044			
	Toplam	0,981	17				
EAA_{0-∞}/doz	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar Arasında	0,130	2	0,065	1,649	0,225	3,682
	Gruplar İçinde	0,592	15	0,039			
	Toplam	0,722	17				

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Tablodan elde edilen sonuçlara göre C_{maks} için tablo F değeri hesaplanan F değerinden küçük olduğu için H₀ farksızlık hipotezi red edilir p<0,05. C_{maks} için 3 mg, 10 mg ve 15 mg dozlarda doz orantısallığı sağlanamamıştır.

Tablo 4.57. C_{maks} için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.

	Varyans	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
3mg-10mg	Kaynağı						
	Gruplar	0,456	1	0,456	9,593	0,011	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,475	10	0,048			
	İçinde						
	Toplam	0,931	11				
10 mg-15 mg	Kaynağı						
	Gruplar	0,008	1	0,008	0,142	0,715	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,575	10	0,057			
	İçinde						
	Toplam	0,583	11				
3mg-15mg	Kaynağı						
	Gruplar	0,342	1	0,342	4,856	0,052	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,704	10	0,070			
	İçinde						
	Toplam	1,046	11				

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

3 mg - 10 mg doz da C_{maks} için $p < 0,05$ doz orantısallığı sağlanamamıştır. Ancak 10 mg-15 mg ve 3 mg-15 mg dozlar arasında $p > 0,05$ doz orantısallık vardır.

Tablo 4.58. EAA_{0-t} için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.

3mg-10 mg	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar	0,307	1	0,307	8,722	0,014	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,353	10	0,035			
	İçinde						
	Toplam	0,660	11				
10mg-15mg	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar	0,033	1	0,033	0,767	0,402	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,435	10	0,044			
	İçinde						
	Toplam	0,469	11				
3 mg-15 mg	Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
	Gruplar	0,138	1	0,138	2,580	0,139	4,965
	Arasında						
	Gruplar	0,536	10	0,054			
	İçinde						
	Toplam	0,674	11				

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

EAA_{0-t} için 3 mg-10 mg dozlar arasında doz orantısallığı tespit edilememiştir. 10 mg-15 mg ve 3 mg -15 mg dozlar arasında orantısallık vardır.

Tablo 4.59. EAA_{0-∞} için ikişerli gruplar halinde ANOVA tablosu.

3 mg-10 mg	Varyans	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
Kaynağı							
Gruplar	0,082	1	0,082	2,345	0,157	4,965	
Arasında							
Gruplar	0,348	10	0,035				
İçinde							
Toplam	0,429	11					
10 mg-15mg	Varyans	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
Kaynağı							
Gruplar	0,002	1	0,002	0,074	0,792	4,965	
Arasında							
Gruplar	0,314	10	0,031				
İçinde							
Toplam	0,316	11					
3 mg-15 mg	Varyans	KT	SD	KO	F	p-değeri	F ölçütü
Kaynağı							
Gruplar	0,111	1	0,111	2,132	0,175	4,965	
Arasında							
Gruplar	0,522	10	0,052				
İçinde							
Toplam	0,634	11					

KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, SD: Serbestlik derecesi

EAA_{0-∞} parametresi için 3 mg-10 mg, 10 mg-15 mg ve 3 mg-15 mg dozlar için $p > 0,05$ olduğu için farksızlık hipotezi kabul edilir ve dozlar arasında doz orantısallığı olduğu sonucuna varılır.

Doz orantısallığını test etmek üzere doz normalize edilmiş farmakokinetik verilerle basit doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. Eğime ait % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar Tablo 4.60.'da verilmiştir. EAA_{0-t} ve EAA_{0-∞} için doz orantısallığının sağlandığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 4.60. Doz normalize edilmiş ve logaritma dönüştürülmüş farmakokinetik verilere ilişkin basit doğrusal regresyon analizi sonuçları.

Parametre	% 95 Güven Aralığı	p değeri
C_{maks}	-0,049-0,002	0,034
EAA_{0-t}	-68,434-7,817	0,111
$EAA_{0-\infty}$	-78,970-9,675	0,117

Literatürde yer alan dördüncü bir yöntem olan eşdeğerlik yönteminde ise farmakokinetik parametrelerin geometrik ortalaması için %90 güven aralığı 3-10 mg, 10-15 mg ve 3-15 mg dozlar için hesaplanmıştır. %90 güven aralığı sonuçlarının %80-125 sınırlarında olması halinde doz orantısallığı kabul edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.61.'de verilmiştir.

Tablo 4.61. Doz normalize edilmiş ve doğal logaritması alınmış farmakokinetik verilere ilişkin % 90 güven aralığı sonuçları.

Parametre	Doz 1	Doz 2	% 90 Güven aralığı	% Grup içi VK
C_{maks}	3 mg	10 mg	72,79-159,69	29,546
	10 mg	15 mg	88,71-125,52	23,305
	3 mg	15 mg	78,14-118,39	31,592
EAA_{0-t}	3 mg	10 mg	81,38-139,07	27,705
	10 mg	15 mg	93,76-113,08	25,136
	3 mg	15 mg	83,85-110,01	20,804
$EAA_{0-\infty}$	3 mg	10 mg	75,34-134,17	19,853
	10 mg	15 mg	88,22-117,69	24,352
	3 mg	15 mg	91,23-110,98	17,107

$$\% VK = 100\sqrt{e^{s_{wr}^2} - 1}$$

EAA_{0-t} ve $EAA_{0-\infty}$ için 3 mg-15 mg dozlar arasında ve 10 mg-15mg dozlar arasında farmakokinetik parametreler için doz orantısallığı tespit edilmiştir.

5.TARTIŞMA

Antikoagölasyon tedavisinde kullanılan ilaçların subkütan kullanılmaları, sürekli izlenmeyi gerektirmeleri gibi sakıncalarına bağlı olarak tedavide oral yolla kullanılabilecek ilaçlara gereksinim duyulmasına neden olmuştur. Yeni geliştirilen ilaçlardan RXB'nin, düşük molekül ağırlıklı heparinler, VKA, trombolitiklere karşılık üstünlüklerinin olması, tedavide etkisinin bu ilaçlara göre daha düşük olmaması tedavinin yeni oral antikoagülanlara kaymasına neden olmuştur. Ancak yeni geliştirilen birçok ilaç etkin maddesi gibi RXB da çözünürlüğü düşük bir etkin maddedir.

EMA tarafından yayınlanan RXB etkin maddeli Xarelto® Tablete ait değerlendirme raporunda belirtildiği gibi suda çözünmeyen bir maddedir. İlk defa Amidon ve ark. (249) tarafından tanımlanan BSS'ye göre etkin maddeler sudaki çözünürlükleri ve barsak permeabilitelerine göre 4 sınıfa ayrılmaktadır. BSS sınıf II olarak tanımlanan düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliğindeki ilaçlarda çözünürlük ve çözünme biyoyararlanım üzerinde hız kısıtlayıcı basamaktır. Aynı raporda Xarelto® Tablet ile yapılan 1,25-80 mg dozlarda tek doz ve 5-30 mg dozlarda yapılan çoklu doz çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında açlık ve tokluk koşullarında EAA ve C_{maks} değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. EAA'da % 20, C_{maks} 'da % 40 oranında tokluk koşullarında artış görülmüştür. Bu etkinin 10 mg altındaki dozlarda görülmediği ifade edilmiştir.

Bütün bu bilgiler ışığında RXB'nin BSS sınıf II ilaç olması çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle yüksek dozlarda yiyecek etkisi göstermesi ve doz orantısallığının sağlanamaması sorunları bulunmaktadır. Bu çalışmada RXB etkin maddesinin yüksek dozlardaki açlık koşullarındaki biyoyararlanım sorununun çözülmesi ve farmakokinetik verilerde doz orantısallığının sağlanması amacıyla nanokristal formülasyonlarının hazırlanması ve in vitro-in vivo değerlendirmesinin yapılması hedeflenmiştir. İn vitro çalışmalar TÜBİTAK tarafından desteklenen 113S200 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. İn vivo çalışmalar ise Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen THD-2017-13071 nolu hızlı destek projesi kapsamında değerlendirilmiştir.

Son yıllarda keşfedilen birçok ilaç etkin maddesinde çözünürlük sorunları ile karşı karşıya gelindiğinden bu alanda yeni yöntemlerle çalışılmaktadır. Bu çalışmanın kapsamında öncelikle RXB etkin maddesinin nanokristal formülasyonu hazırlanarak partikül büyüklüğü, çözünürlük, çözünme profili gibi fizikokimyasal parametrelerin iyileştirildiği gösterilmiştir.

Literatürde yer alan bilgiler ışığında nanokristal teknolojisi ile hazırlanan formülasyonlar ile oral biyoyararlanım artar, hızlı etki oluşur, doz orantısallığı iyileştirilir, yüksek biyoyararlanımdan dolayı doz azaltmaya gidilebilir, suda çözünürlüğü az olan lipofilik ilaçlarda gözlenen açlık ve tokluk durumlarındaki biyoyararlanım farklılığı azaltılabilir, açlık tokluk koşullarındaki değişkenlik azaltılır (21, 60-62). Genellikle yan etkiler uygulanan ilaç miktarı ile orantılıdır, bu yüzden etkin maddelerin azalan miktarları ile hastalar için artırılmış güvenilirlik sağlanır (61, 62).

RXB nanokristal formülasyonlarının hazırlanması ve ilacın in vitro - in vivo performansı ve doz orantısallığı üzerine etkileri aşağıda değerlendirilmiştir.

5.1. RXB'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmalarımıza başlamadan önce, RXB'nin fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılarak etkin maddenin karakterizasyonu ve saflık kontrolü yapılmıştır. RXB'nin fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla ultraviyole (UV) spektrumları ile FT-IR spektrumu çekilmiş, ayrıca diferansiyel DSC analizi, X-ışını kırınımı analizi, SEM analizi, partikül büyüklüğü analizi ve çözünürlük çalışmaları yapılmıştır. RXB'nin UV spektrumu (Bkz.Şekil 4.1.) incelendiğinde maksimum pik verdiği dalga boyu asetonitril:su 80:20 (h:h) içinde 249 nm olarak saptanmıştır. Çelebier ve ark. (194, 205) yaptığı iki farklı çalışmada maksimum absorbans verdiği dalga boyu ACN:su karışımında 248 nm ve 249 nm bulunmuştur. Literatürde maksimum absorbans verdiği dalga boyu 0.1 M sodyum asetat:metanol 60/40 (h/h) mobil fazı içinde 247 nm, ACN:metanol:ortofoforik asit 90:80:2 (h:h:h) içinde 234 nm olarak saptanmıştır (196, 202). X-ışını difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını gösterir (Bkz. Şekil 4.4.). Amorf yapı varlığında ise, X-ışını difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir. RXB'nin kristal yapıda olduğu difraktogramda açık bir şekilde

görülmektedir (Bkz. Şekil 4.4.). Ayrıca RXB'nin US2013/0245017 A1 nolu patentte verilen X-ışını difraktogramı ile deneysel olarak elde edilen difraktogram karşılaştırıldığında benzer olduğu ve kristal yapıda olduğu görülmektedir (247). RXB etkin maddesinin IR spektrumunda literatürde 564, 686, 708, 746, 757, 830, 846, 920, 991, 1011, 1056, 1077, 1120, 1146, 1163, 1219, 1286, 1307, 1323, 1341, 1374, 1411, 1429, 1470, 1486, 1517, 1546, 1605, 1646, 1669, 1737, 2867, 2895, 2936, 2976, 3354 cm^{-1} 'de karakteristik pikler verdiği belirtilmektedir (250, 251). Çalışmamızda elde ettiğimiz RXB'a ilişkin IR spektrumu incelendiğinde karakteristik fonksiyonel gruplara ait piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.2.).

DSC termogramları incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.3.) RXB'nin erime derecesi 233.5°C olarak bulunmuştur. RXB kristalleri erime derecesi 230°C (modifikasyon I), 203°C (Modifikasyon II), geçiş noktası 127°C (Modifikasyon III) olan üç farklı polimorfa sahiptir. Termodinamik olarak polimorf II stabil polimorfdur (19). RXB'nin yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve şeklini incelemek amacıyla SEM görüntüleri incelenmiştir. Farklı büyütme oranlarında (x250, x500, x1000) kristal yapıda, düzensiz kübik şekilde partiküllere de rastlanmıştır (Bkz. Şekil 4.5.). SEM görüntülerinde partikül büyüklüğü 10 μm -100 μm ve daha büyük olan partiküller gözlemlenmiş olup Malvern Master sizer ile yapılan ölçümler bu veriyi desteklemiştir. RXB'nin partikül büyüklüğü $d(0,1)$ 14,769 $\pm$ 179 μm , $d(0,5)$ 77,245 $\pm$ 1794 μm $d(0,9)$ 235,929 $\pm$ 15,531 μm bulunmuştur ve homojen bir dağılım gösterdiği partikül büyüklüğü dağılımı grafiğinde görülmektedir (Bkz. Tablo 4.2. ve Şekil 4.6.)

RXB etkin maddesinin çözünürlüğü EMA'nın biyoeşdeğerlik çalışmalarının araştırılması ile ilgili kılavuzunda önerilen üç farklı pH'da (pH 1,2, 4,5, 6,8) (242), ve etkin maddenin ticari preparatının 15 ve 20 mg dozları için FDA tarafından yayınlanan klinik farmakoloji ve biyofarmasötik bilgileri ile ilgili raporunda önerilen çözünme ortamında (% 0,4 SDS içeren pH 4,5 tamponu) tayin edilmiştir (243) SDS içermeyen ortamlarda (pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8) 24 saat sonunda tayin edilen çözünürlük değerleri etkin maddenin çözünürlüğünün pH'dan bağımsız bir çözünürlük profiline sahip olduğunu göstermiştir. Ancak ortama % 0,4 oranında SDS ilave edildiğinde 24 saat sonunda etkin maddenin çözünürlüğünde yaklaşık 7 katlık bir artış gözlenmiştir (Bkz.Tablo 4.1.). FDA tarafından yayınlanan Xarelto® Tablete ait klinik farmakoloji ve biyofarmasötik derlemede ve literatürde de RXB'nin pH 1,0-6,8

aralığında çözünürlüğünün pH'dan bağımsız olduğu belirtilmiştir (10, 191). RXB'nin sudaki intrinsik çözünürlüğü ve pH 1,2 (*SGF, simulated gastric fluids*)'deki denge çözünürlüğü sırasıyla Krisztina ve ark. (191) yaptığı çalışmada 10 µg/mL, 11 µg/mL bulunmuştur. % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponundaki çözünürlük sonuçları (64 mg/mL) 15 ve 20 mg dozlarda sink koşulların sağlanabildiğini göstermektedir. Literatürde yine aynı ortamda RXB'nin çözünürlüğü 72 mg/900 mL bulunmuştur (10).

5.2. RXB Stabilite Çalışmaları

Etkin maddenin $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 12 ay süre ile üç farklı seride partikül büyüklüğü analiz edildiği d(0.1), d(0.5), d(0.9) değerleri için dönemler arası varyasyon katsayısı sırasıyla % 12,41, % 4,89 ,% 15,07 olarak bulunmuştur (Bkz.Tablo 4.2.). RXB etkin maddesinin 2008 yılında EMA tarafından yayınlanan değerlendirme raporunda termal koşullarda, ışık ve hidrolitik stres altında stabil olduğu rapor edilmiştir (213). Etkin maddenin görünüm, renk ve kokusunda herhangi bir değişiklik olmamıştır. RXB $t=0$ ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ bağıl nem ortamında 6 ay sonundaki RXB'a ilişkin SEM görüntüleri incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.5.) ilk baştaki gibi 10 µm-100µm aralığında kübik düzensiz partiküller görünmektedir. $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ 'de 6 ay sonunda IR spektrumları (Bkz. Şekil 4.9.) alınmış fonksiyonel gruplara ait pikler yine görülmüş olup RXB'nin kimyasal yapısı korunmuştur. Kristal yapının korunup korunmadığını test etmek amacı ile $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 5$ bağıl nemde 6 ay bekledikten sonra 72 saat boyunca -55°C ve 0.01 mmHg'da liyofilize edildikten sonra X-ışını kırınımı difraktogramı alınmıştır (Bkz. Şekil 4.7., Şekil 4.8.). RXB difraktogramlarında kristal yapıyı gösteren kırınımları olduğu görülmüştür. Kristal yapıya etkisi olmadığı için formülasyon çalışmalarında dondurarak kurutma yönteminin kurutma yöntemi olarak kullanılmıştır.

Stabilite çalışmaları süresince RXB'nin 20 mg dozda in vitro çözünme testleri yapılmıştır. In vitro çözünmede anlamlı bir değişiklik olmadığı f_2 benzerlik testi (≥ 50) ile gösterilmiştir (Bkz.Tablo 4.3.). RXB'nin çözünürlüğü çok düşük olduğu için 45 dakika sonunda çözünme tamamlanamamıştır (Bkz. Şekil 4.10.).

5.3. RXB'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Literatür taraması, RXB analizi için birkaç yöntemin kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu yöntemler, UV spektrofotometresi (194, 195), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) (196-202) yüksek performanslı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) (203, 204), TLC–dansitometrisi (204) katı-faz ekstraksiyon-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (205), UPLC ultra performanslı sıvı kromatografisi (206), anti- faktör Xa kromojenik tayin (207) ve protrombin zamanı tayini (208) gibi yöntemlerden oluşmaktadır. RXB'nin plazmadan tayininde LC/MS/MS, anti-faktör Xa kromojenik tayin ve protrombin süresi tayini yöntemleri kullanılmıştır.

RXB'nin in vitro miktar tayini için en çok kullanılan yöntem HPLC olmuştur. Bu çalışmada çözünürlük, çözünme ve miktar tayini deneylerinin analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. ACN: Su (80:20, h:h) ve %0.4 SDS içeren pH 4,5 fosfat tamponu ortamında miktar tayini ve validasyonu çalışmaları yapılmıştır. RXB maksimum pik verdiği 249 nm'de mobil faz ACN:su 55:45(h:h) sistemi olarak seçilmiştir. RXB'nin alıkonma zamanı 3,6 dk olarak bulunmuştur bu veri literatür verileri (3,37 dk) ile uyumlu bulunmuştur (199). Miktar tayin yönteminin validasyonu ICH Q2(R1) Analitik Prosedürlerinin Validasyon Kılavuzuna uygun olarak özgüllük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik) saptama sınırı, miktar tayini sınırı, sağlamlık gibi ölçütler ile değerlendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (244). Yöntemin özgüllüğünü test etmek için sisteme çözünme ortamı ve yardımcı maddeleri içeren çözelti enjekte edilmiş ve RXB pik verdiği zaman aralığında herhangi bir pik vermediği ve girişim yapmadığı, RXB piklerinin tam olarak ayrıldığı görülmüştür. RXB'nin 2,5-40 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen kalibrasyon doğrularının determinasyon katsayıları 1'e (1 ve 0,9996) yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar RXB için çalışılan konsantrasyon aralığında pik alanları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir. Yöntemin doğruluğu değerlendirildiğinde çalışılan üç farklı konsantrasyon için hesaplanan VK değerleri % 2'den küçük bulunmuştur. Analitik yöntemin kesinliği yukarıda da belirtildiği gibi 3 düzeyde gerçekleştirilmiş ve VK değerleri % 2'nin altında bulunmuştur. Ancak % 0,4 SDS içeren pH 4,5 asetat tamponu içinde ara kesinlik değerlendirmesinde en düşük konsantrasyon 5 µg/mL için ölçülen

3. numunenin konsantrasyonu 5,275 µg/mL olarak tespit edilmiş ve bu nedenle % VK 2,942 olarak hesaplanmıştır. Bu duruma, hazırlanan numunede tartım veya seyreltme hatasının neden olduğu düşünülmektedir. Yöntemin duyarlılığı için saptama sınırı ve tayin sınırı % 0,4 SDS içeren asetat tamponunda 0,17 µg/mL ve 0,51 µg/mL, ACN:su içinde ise 0,85 µg/mL ve 2,5 µg/mL olarak bulunmuştur. Kararlılık bulguları değerlendirildiğinde, 5, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra, 12 saat, 24 saat sonunda ve 24 saat boyunca +4 °C'de tutulduktan sonra numunelerin HPLC ile analizi sonucunda 5 µg/mL ve 20 µg/mL için % VK katsayıları % 2 den büyük olmasına rağmen (2,042, 2,039) elde edilen konsantrasyonlar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve değişimin anlamsız olduğu gösterilmiştir (p>0,05). Bu da RXB'nin analiz süresince dayanıklı kaldığını kanıtlamaktadır.

RXB hücre kültürü çalışmaları sonucu elde edilen verilerin analizi için LC/MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Negatif ESI (-ESI) modunda 434,9 m/z % 0,1 formik asit su ve % 0,1 formik asit asetonitril karışımı hareketli fazdaki kromatogramı alınmış ve S/N (sinyal/noise) oranı pozitif ESI'de elde edilen pikten küçük olduğu için pozitif ESI uygulamaya karar verilmiştir. Ancak % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımında herhangi bir iyon parçalanması görülmediği için mobil faz değiştirilmiştir. RXB'nin fizyolojik hücre tabakalarından geçirgenliği ve P-gp aracılıklı aktif transport süreçlerinin araştırıldığı bir çalışmada RXB'nin miktar tayini için LC/MS/MS yöntemi kullanılmıştır (228). Burada RXB kütle spektrumunda 435,9 m/z'de en yüksek sinyal bulunmuştur. Mobil faz olarak 10mM amonyum asetat içeren ACN:su kullanılmıştır (228). % 0,1 formik asit içeren ACN:su ortamında iyonlaşma olmadığı için çalışmamızda da mobil faza amonyum asetat eklenmesine karar verilmiştir.

10 mM Amonyum asetat içeren mobil faz kullanılarak yöntem tekrar denenmiştir. 2013 yılında Gschwind ve ark. (252)'nin yaptıkları çalışmada ise mobil faza 20 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit ilave edilerek geçirgenlik sonuçları LC/MS/MS ile tayin edilmiştir. Literatürden hareket ile ACN:su mobil fazına 10 mM amonyum asetat ve % 0,1 formik asit ilave edilerek RXB tayini için Fregman voltaj taraması 0-200 V arasında yapılmış ve en yüksek sinyal 436 m/z için 144 V olarak belirlenmiştir. MS² denemeleri 144 V freg voltajı ile yönlendirilen 436 m/z çarpışma

hücresinde (collision cell) parçalanmaya çalışılmıştır. 144,7 m/z ve 231 m/z' de parçalanma iyonları görülmüştür (Bkz. Şekil 4.24.) Literatürde RXB'nin kütle spektrumunda 435,9 m/z, 437 m/z en yüksek sinyal bulunmuş olup çalışmadaki verilerimiz ile uyumlu bulunmuştur (228, 229, 252). Yöntemin özgüllüğünü değerlendirmek için ACN ve standart çözeltinin kromatogramı ve kütle spektrumu alınmıştır. Asetonitrilde kromatogram görülmemiş etkin maddenin parçalandığı 144,7 m/z ve 231 m/z deki parçalanma piki yok denecek kadar az bulunmuş ve böylece yöntemin seçiciliği gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.25.-4.28.). Kalibrasyon doğrusunun determinasyon katsayısı 0,9994 bulunmuş ve 1,25-250 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusallığın sağlandığı gösterilmiştir. Doğruluk, kesinlik, miktar tayini sınırı, sistem uygunluk açısından yöntem değerlendirilmiştir. Doğruluk, kesinlik ve stabilite için hazırlanan 1,25, 25 ve 250 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerin analiz sonuçları incelendiğinde bazı numunelerde tespit edilen konsantrasyonlarda eklenen konsantrasyona göre % 5'den fazla sapma olduğu görülmüştür. Bu durumun sebebi stok çözelti hazırlama ve standart çözeltileri hazırlamada esnasında yapılan tartım ve pipetleme hatalarından kaynaklı olabilir. Ayrıca piklerde kuyruklanma olduğu, düzgün pik elde edilemediği için standart çözeltiler metanol:su:perklorik asit (50:33:17, v:v:v) çözeltisi ile 1:1 oranında muamele edilerek RXB tayini yapılmıştır. Konsantrasyonlarda sapmanın bir diğer nedeni metanol:su:perklorik asit çözeltisi ile yapılan muamele sonucu konsantrasyonun değişmesi ve stok çözeltiden bir dizi seyreltme yapılmış olmasına bağlanabilir.

RXB'nin tavşan plazmasından in vivo miktar tayini LC/MS/MS ile yapılmıştır. Korostelev ve ark. RXB'nin insan plazmasından tayininde pozitif elektronsprey iyonizasyon modu kullanmıştır. Çoklu reaksiyon görüntüleme (*multiple reaction monitoring*) ile m/z 436,1 → 144,9'da iyon geçişi olmuştur. Rohde ve ark. yaptığı çalışmada da aynı iyonizasyon geçişi görülmüştür (203, 210). Çalışmamızda RXB'nin aynı yöntem kullanılarak iyonlarına 436 m/z çarpışma hücresinde (*collision cell*) parçalanmaya çalışılmıştır. 145 m/z ve 231,0 m/z'de parçalanma iyonları görülmüştür, bu veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur. Rohde ve ark. (210) yaptığı çalışmada mobil faz olarak amonyum asetat ve formik asit içeren ACN çözeltisi, Korostelev ve ark. (203) yaptığı çalışmada ise % 0,1 formik asit ve amonyum format

içeren su (% 90) ve % 0,1 formik asit içeren ACN (% 10) gradiyent elüsyonu kullanılmıştır. Zhang ve ark. (212) ise mobil faz olarak asetonitril ve % 0,1 formik asit kullanmıştır. RXB'nin daha önce yapılan hücre kültürü çalışmalarında 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit içeren ACN:su mobil faz olarak kullanılmıştır. İyonlaşma olmadığı için in vivo çalışmada da mobil faza amonyum format eklenmiştir. Mobil faz olarak % 0,1 formik asit içeren ACN:10 mM amonyum format içeren su gradiyent olarak kullanılmıştır. Plazma proteinlerini ayırmak üzere metanol, perklorik asit:metanol:su, ACN ile denemeler yapılmıştır. En iyi ayırım metanol ile sağlandığından çöktürme işlemi plazma:metanol (1:4, h:h) ile yapılmıştır. Tavşanlardan elde edilen kanlardan yaklaşık 200 µL plazma elde edilebildiği için analiz işlemleri 100-150 µL'lik insertler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işleminden sonra analiz öncesi plazma içerisine perklorik asit çözeltisi ilave edilerek daha düzgün pikler elde edilmiştir.

2,5 ng/mL-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında 9 noktalı hazırlanan kalibrasyon doğrusunun determinasyon katsayısı 0,991 olarak bulunmuştur. Elde edilen doğru RXB'nin plazmadan tayininde kullanılmıştır. İn vivo analitik yöntemin validasyonuna yönelik doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, duyarlılık ölçütleri EMA ve FDA tarafından yayınlanan kılavuzlar doğrultusunda değerlendirilmiştir (245, 246). Kalibrasyon doğrusuna ait doğrusallık bulguları Tablo 4.19'da verilmiştir. Determinasyon katsayısı $R^2=0,991$ 'in 1'e yakın olması yöntemin doğrusallığının sağlandığına işaret etmektedir.

Yöntemin doğruluğu Bölüm 3.2.9'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Tablo 4.20.'de gösterilen sonuçlarda % VK LOQ için % 20 diğer noktalar için % 15'den düşük olması gerekliliği karşılanmıştır.

Analitik yöntemin kesinliği iki düzeyde değerlendirilmiştir. Bu amaçla tekrar edilebilirlik ve ara kesinlik değerlendirilmiştir. Tekrar edilebilirlik için EMA'nın biyoanalitik yöntem validasyonu hakkındaki kılavuzunda belirtildiği gibi düşük, orta ve yüksek kalite kontrol çözeltilerinde 5 farklı ölçümün karşılaştırılmasıyla ölçülmüştür ve % VK değeri % 15'den küçük bulunmuştur. Ara kesinlik ise 3 farklı konsantrasyonun 3 gün boyunca çalışılması ile değerlendirilmiş, % VK % 15'in altında bulunmuştur. Böylelikle yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği gösterilmiştir. Doğruluk ve kesinlik sonuçları incelendiğinde eklenen ve tayin edilen

konsantrasyonlarda % 10'dan fazla sapma olmuştur. Bu durum kalite kontrol numunelerinin stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanması, proteinlerin çöktürülme işlemi, iç standart ilave edilmesi, metanol:su:perklorik asit çözeltisi ilavesi gibi bir dizi işlem sonucu hazırlanmasına bağlı olarak her bir basamakta deneysel hata payının artması, proteinlerin tam olarak çöktürülememesi, karıştırma ve santrifüj işlemlerinin yeterli sürede yapılmaması gibi nedenlere bağlanabildiği gibi tartımdan kaynaklanan hatalar da olabilir.

ACN ve metanol içeren boş plazma ve plazmaya RXB ilave edilmesi ile elde edilen kromatogramlar incelendiğinde aynı alıkonma zamanı boyunca RXB'dan başka bir maddenin pik vermediği gösterilmiş ve yöntemin seçiciliği gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.31.-4.34.).

Analitik yöntemin duyarlılığı kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en düşük noktayı ifade eder. Kalibrasyon doğrusunun en küçük noktası en düşük tayin edilebilir miktarı duyarlılık olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 2,5 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Bart ve ark. (8) tavşanlarda RXB tayini yapmış oldukları çalışmada bu değer 2 ng/mL olarak tespit edilmiş olup çalışmada kullandığımız veriye yakın bir değerdir.

5.4. Farklı Stabilizanlar Kullanılarak ve Tek Yöntem İle Hazırlanan Formülasyona İlişkin Sonuçlar

Nanokristal formülasyonları hazırlanmadan önce bir dizi ön deneme yapılmıştır. İlk olarak stabilizanlar belirlenmeye çalışılmıştır. Stabilitate nanosüspansiyonlar için çok önemlidir. Nanopartiküllerde depolama ve saklama esnasında agregatlar oluşabilir. Agregatlar zayıf fiziksel etkileşimlerle bir araya gelen partikül kümeleridir. Bazen bu kümeler geri dönüşsüz bir şekilde birleşirler. Partikül büyüklüğünü artması çözünürlük, çözünme hızı ve biyoyararlanımı değiştirmektedir. Nanokristal formülasyonlarında ise partikül büyüklüğü önemli derecede küçüldüğü için etkin madde moleküllerinin biraraya gelme eğilimleri yüksektir, bu nedenle, aglomerizasyonu önlemek için mutlaka stabilizan kullanılması gerekmektedir. Stabilizanlar partikül yüzeyine kendiliğinden adsorplanır ve yüzeyini kaplar. Bu şekilde; partiküllerin yüzeyler arası gerilimi ve sistemin serbest enerjisi azalır, hidrofobik partiküller etrafında yoğun bir hidrofilik tabaka oluşturarak partiküller

arasında sterik engel ve güçlü itme oluşturlar (sterik stabilizasyon). Eğer stabilizanların iyonize olabilen grupları mevcut ise partikül yüzeyini yükleyerek itici kuvveti artırır (elektrostatik stabilizasyon). Ayrıca elektrostatik ve sterik stabilizasyonu birlikte sağlarlar (Bkz. Şekil 2.2.). Genellikle nanosüspansiyon kombinasyonlarında stabilizan olarak polimerler ve yüzey etkin maddeler ve bunların kombinasyonu kullanılır (45, 49, 113, 114).

Bu amaçla öncelikle ilerleyen formülasyonlarda kullanılacak stabilizanları belirlemek üzere SDS, P 127, HPMC 60 cps ile UT yöntemi, UP yöntemi, BD yöntemi ile RXB:stabilizan oranı 2:1(a/a) olacak şekilde nanokristaller hazırlanmıştır. SDS, P 127 ve HPMC 60 cps ile üç farklı yöntem ile hazırlanan nanosüspansiyon ve nanokristal formülasyonlarında en küçük partikül büyüklüğü bilyeli değirmen yöntemi ile elde edilmiştir. Ancak her üç yöntemde de partikül büyüklüğü 1000 nm altına inememiştir. Bu üç stabilizan ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarında UT ve UP yöntemlerinin tek başına BD kadar partikül büyüklüğünü düşürmede başarılı olmadığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.23.). Bu nedenle diğer kullanılacak olan stabilizanlarla; tween 80, pluronik P75, poloxamer 188, pharmacoat 603 ve polivinilpirolidon K-30 (PVP K-30) ile hazırlanacak nanokristallerde bilyeli değirmen kullanılmıştır.

Farklı stabilizanlar kullanılarak bilyeli değirmende hazırlanan nanokristal formülasyonlarının liyofilizasyon öncesi partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında (Bkz. Tablo 4.23., Tablo 4.24.) en iyi partikül büyüklüğü dağılımı BD yöntemi ile P 127 (603 nm) ve P 603 (597 nm), P 188'in (652 nm) stabilizan olarak kullanıldığı formülasyonlarda elde edilmiştir. Liyofilizasyon sonrasında ise P 127 (1495 nm), P 603 (1071 nm) ve PVP K-30 (1329 nm) kullanılarak hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımının en iyi olduğu bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.24., Şekil 4.35.). Çalışmalarımızın devamında P 127, P 603, PVP K-30 ve P 188 stabilizan olarak kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır.

5.5. Çöktürme Yöntemi İle Hazırlanan Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar

Tablo 4.25. ve Tablo 4.26.'da görüldüğü gibi çöktürme yönteminde RXB'nin metanol içinde çözündürülerek ve anti çözücü eklenerek hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğünü tek başına yeterli ölçüde küçültülemediğinden ve RXB'nin

organik çözücülerde çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle kombinasyonlara dahil edilmemiştir.

5.6. İki Farklı Stabilizan Kullanılarak Bilyeli Değirmen Yöntemi İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar

RXB ve yalnızca P 127'nin stabilizan olarak kullanılarak 90 dk bilyeli değirmende öğütülerek elde edilen nanokristal formülasyonunun liyofilizasyon öncesi partikül büyüklüğü 968 ± 30 nm olarak bulunmuştur. Aynı deneysel koşullar altında formülasyona ikinci bir stabilizan ilavesi ile daha düşük partikül büyüklüğü elde edilmiş (Bkz. Tablo 4.28.) ve bu nedenle farklı stabilizan kombinasyonları içeren formülasyonların da hazırlanmasına karar verilmiştir.

5.7. Birden Fazla Nanokristal Hazırlama Yönteminin Kombinasyonu İle Hazırlanan Formülasyonlara İlişkin Sonuçlar

Her bir yöntem ile ayrı ayrı nanokristaller hazırlandıktan sonra her bir yöntemin birlikte kullanıldığı nanokristal formülasyonları denenmiştir. Kombine teknikler ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarına ait yöntem parametreleri, liyofilizasyon öncesi ve liyofilizasyon sonrası tayin edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.29. ve Tablo 4.30.'da verilmiştir.

Yukarıdan aşağıya hazırlama yöntemlerinin birbirleri ile ve aşağıdan yukarıya hazırlama teknikleri ile ikili kombinasyondan elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.29. ve Tablo 4.30.). Elde edilen bulgular doğrultusunda UP yöntemi ve BD yönteminin birlikte kullanıldığında, öğütme yönteminden önce UP kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminden önce partikül büyüklüğü küçültüldüğünde daha küçük partiküller elde edileceğini göstermektedir. Bu nedenle öğütme yönteminden ve homojenizasyon yönteminden önce UP veya UT gibi bir yöntem ile partikül büyüklüğünün küçültülmesine karar verilmiştir.

UT ve BD'nin kombine edildiği 5-UT+BD, 6-UT+BD ve 7-UT+BD numaralı formülasyonlarda RXB ve stabilizan oranı sabit tutularak ultra turaks karıştırma süresi ve hızı, bilyeli değirmende ise öğütme süresi artırılmıştır. En düşük partikül büyüklüğü

P 127 ve PVP'nin birlikte kullanıldığı ultra turaks karıştırma süresi ve öğütme süresinin artırıldığı formülasyonda elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.29. ve Tablo 4.30.).

İkili kombinasyonlar değerlendirildiğinde en düşük partikül büyüklüğü UT ve BD'nin kombine edildiği 6-UT+BD (474 ± 6 nm, RXB:P 127:P603:MN(2:1:1:1)) ve 7-UT+BD (547 ± 4 nm, RXB:P 127:MN (2:1:1)) ile elde edilmiştir. YH ile hazırlanan formülasyonlarda ise en düşük partikül büyüklüğü 2-UT+YH (854 ± 40 nm, RXB: P 603:MN (2:1:1)) formülasyonunda elde edilmiştir. Bu durumda UT+BD kombinasyonunun en iyi seçim olabileceği düşünülebilir. Ancak liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü sonuçları, zeta potansiyel değerleri incelendiğinde 6-UT+BD ve 7-UT+BD kombinasyonlarında partikül büyüklüğünün % 69 ve % 82 oranında arttığı (474 nm'den 755 nm'ye, 547 nm'den 1000 nm'ye) belirlenmiştir. Zeta potansiyel değerleri incelendiğinde ise UT+YH yönteminin kombinasyonu ile hazırlanan nanosüspansiyonların ve liyofilizasyon sonrası ölçülen zeta potansiyellerin -20 mV'a daha yakın olduğu görülmüştür. Literatürde ZP'nin elektrostatik stabilizasyon için en az -30 mV, sterik stabilizasyon için -20 mV olması halinde nanokristal süspansiyonlarının fiziksel olarak stabilitesini koruduğu belirtilmektedir (49, 253). 2-UT+YH formülasyonunda liyofilizasyon öncesi ZP değeri $-17\pm 0,54$ mV iken liyofilizasyon sonrasında $-20,6\pm 0,52$ mV olarak ölçülmüştür. Buna paralel olarak partikül büyüklüğündeki artış daha az olmuştur (% 32). 6-UT+BD ve 7-UT+BD yöntemlerinde liyofilizasyon sonrasında oluşan partikül büyüklüğü artışı karşılaştırılmıştır. Her iki formülasyonda etkin madde konsantrasyonu ve yöntem parametreleri (UT;3 dk 13.000 rpm+ BD;195 dk 300 rpm) aynıdır. 7-UT+BD formülasyonundaki artışın % 100'e yakın bir değer olmasının nedeninin stabilizan oranı ve yapısının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanokristallerin başarılı bir şekilde stabilizasyonu kullanılan stabilizanın bazı özellikler taşımasına bağlıdır. Öncelikle stabilizanın nanokristali stabilize edebilmek için yüzeyine ilgisinin olması gerekir (119). Örneğin SDS katı-sıvı arayüzeyine taşınabilir ve partiküllerin agregasyonuna karşı elektrostatik bariyer oluşturur. Non-iyonik bir yüzey etkin madde olan F68 etkin maddedeki hidrofobik fonksiyonel gruplar ile etkileşerek hidrofobik bir alana sahip olur, ve partiküller arasında sterik bir bariyer oluşmasını sağlar (254). Stabilizanalarda olması gereken bir diğer özellik ise yüzeyi hızla saracak şekilde hızlı difüzyon hızına sahip olmalıdır. Üçüncü olarak stabilizan miktarı partikül yüzeyini

kaplayacak miktarda olmalıdır (255). Ancak 7-UT+BD formülasyonunda RXB:toplam stabilizan oranı 2:1 iken, 6-UT+BD formülasyonunda bu oran 1:1'dir. Tablo 4.22.'deki sonuçlar bir önceki bölümde de işaret edildiği gibi RXB'nin ve yalnızca P 127'nin stabilizan olarak kullanıldığı aynı deney koşullarında nanokristal formülasyonunun stabilizan olarak P127 ve PVP K-30 ile kullanılmasıyla partikül büyüklüğü daha fazla küçülmüştür. Daha düşük partikül büyüklüğü edilmesinde daha yüksek oranda ve birden fazla stabilizan kombinasyonları içeren formülasyonların daha başarılı olduğu görülmüştür.

Partikül büyüklüğünün daha çok küçüldüğü BD ve daha kararlı nanokristallerin elde edildiği YH yöntemi ile ön küçültme işleminde kullanılacak UP ve UT yöntemlerinden oluşan 3'lü kombinasyonları denenmiştir (Bkz.Tablo 4.31. ve Tablo 4.32.).Üçlü kombinasyonlar incelendiğinde P127 ve PVP K-30'un stabilizan olarak kullanıldığı 1-UT-YH+BD formülasyonun partikül büyüklüğü liyofilizasyon öncesi 577 ± 17 iken liyofilizasyon sonrasında 890 ± 24 olarak ölçülmüştür. Partikül büyüklüğünü azaltmak için için bilyeli değirmende öğütme süresi ve homojenizasyon sayısı, ultra turaksta karıştırma hızı ve kullanılan bilye sayısı artırılmıştır. Beklendiği gibi partikül büyüklüğü daha da küçülmüştür (386 ± 10 nm). Ancak liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü 1000 nm'nin üzerinde ölçülmüştür. Liyofilizasyon öncesi ZP değerlerinin $-30,4\pm 0,62$ olması nanosüspansiyonda sterik stabilizasyonunun sağlandığına işaret etse de partikül boyutu liyofilizasyon işlemi ile birlikte artmıştır. Tablo 4.30. ve Tablo 4.32. karşılaştırıldığında UT, BD, YH yöntemlerinin birlikte kullanılması ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bilyeli değirmen yönteminde kullanılan bilye sayıları hazırlanan formülasyonun ağırlığının iki katı olacak şekilde ayarlanmış ve bilye sayısından kaynaklanacak değişimler elimine edilmeye çalışılmıştır. Bu nedenle farklı miktarda bilye kullanılmasının sonuçlara etkisi gösterilememiştir

5.8. RXB'nin Partikül Büyüklüğü Dağılımına Yöntem ve Stabilizan Etkisi

RXB'nin partikül boyutundaki değişikliğin nanokristal hazırlama yöntemleri veya stabilizan varlığına ne derece bağlı olduğunu değerlendirmek için bir dizi denemeler yapılmıştır. Tablo 4.33.'de görüldüğü gibi etkin madde sadece distile suda disperse edildikten sonra dondurarak kurutma (liyofilizasyon) işlemi uygulandığında

partikül büyüklüğü küçülmüştür. RXB'nin sudaki dispersiyonu liyofilize edildikten sonra partikül büyüklüğü Malvern Mastersizer ile ölçülmüştür ve 77.245 nm den 25.744 nm'ye değiştiği tespit edilmiştir. Salazar ve ark. (256)'nın glibenklamid ile yapmış oldukları bir çalışmada dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemi ile YH ve BD kombinasyonu ile nanokristal formülasyonu hazırlanmıştır. Farklı koşullarda dondurarak kurutma işlemine tabi tutulan formülasyonların partikül büyüklüğü, DSC, SEM ve X-ışını sonuçları karşılaştırıldığında dondurarak kurutma koşullarının partikülün fizikokimyasal karakterizasyonuna etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde kritik dondurma hızının nanosüspansiyonların kurutulmasında kritik bir parametre olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (123). RXB'nin partikül büyüklüğündeki değişim dondurarak kurutma işleminin bir sonucudur. Liyofilizasyon işleminin ve stabilizan madde eklenmesinin RXB'nin kristal yapısına etkisini değerlendirebilmek amacıyla liyofilize haldeki RXB ve P 127 ile hazırlanan formülasyonların X-ışını kırınımı analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler RXB kristal yapısını liyofilizasyon sonrasında ve stabilizan eklenerek öğütülmesi işleminden sonra da koruduğunu göstermiştir. RXB'nin 2:1 oranındaki P 127 ve P 603 ile fiziksel karışımları hazırlanmış ve 30 dk manyetik karıştırılarak partikül büyüklüğü ölçülmüş ve liyofilize edilmiştir. Partikül büyüklüğünün stabilizan eklenmesi ile 4292 ± 376 nm ve 4450 ± 119 nm'ye düştüğü görülmüştür. Her iki fiziksel karışımda liyofilize edildikten sonra partikül büyüklüğü düşmüştür. Etkin maddenin stabilizanlarla fiziksel karışımı sonucu elde edilen veriler partikül büyüklüğüne stabilizan ilavesinin etki ettiğini açıkça göstermektedir.

Partikül büyüklüğündeki küçülmenin stabilizan yanında nanokristal hazırlama yönteminin etkisi olup olmadığını görmek amacıyla RXB'a stabilizan eklemeyen sudaki dispersiyonu BD öğütülmüş ve aynı zamanda P 127 ve P 603 eklenerek öğütülmüştür. Stabilizan olmaksızın öğütülen RXB'nin partikül büyüklüğü 1785 ± 328 nm olarak ölçülmüş olup öğütme işleminin stabilizan ile hazırlanan fiziksel karışımdan daha fazla partikül boyutunu küçülttüğü tespit edilmiştir. En iyi partikül büyüklüğü dağılımı ise stabilizan eklenmesi ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarından elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar partikül büyüklüğünün küçülmesindeki ana etkenin BD öğütme olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.33.). Ortama stabilizan eklenmesiyle partikül boyutunun 1000 nm'nin altına düştüğü görülmektedir. Ancak liyofilizasyon

sonrası öğütülerek hazırlanan nanokristallerin partikül boyutu artmıştır. Liyofilizasyon işleminden önce daha küçük partikül boyutlarının elde edildiği süspansiyonlarda liyofilizasyon sonrasında partikül büyüklüğünün artması ise küçük partiküllerin daha fazla olması nedeniyle agregatlar oluştuğunu işaret etmektedir. Bu durum formülasyonlara kriyoprotektan madde olarak mannitol eklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Liyofilizasyon işleminin ve stabilizan madde eklenmesinin RXB'nin kristal yapısına etkisini değerlendirebilmek amacıyla liyofilize haldeki RXB ve P 127 ile hazırlanan formülasyonların X-ışını kırınımı analizi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.36.). Elde edilen veriler RXB'nin kristal yapısını koruduğunu göstermiştir.

5.9. Partikül Büyüklüğü Dağılımına Bilyeli Değirmende Öğütme Süresinin ve Homojenizasyon Döngü Sayısının Etkisinin İncelenmesi

Geçirgenlik çalışmalarında kullanılacak formülasyonlar hazırlanmadan önce öğütme süresinin ve döngü sayısının partikül boyutuna etkisi araştırılmıştır.

Partikül büyüklüğüne bilyeli değirmende öğütme süresinin etkisini incelemek amacıyla RXB:P 127:P 603 (2:1:1, a:a:a) oranında olacak şekilde BD hazırlanan nanosüspansiyona ait bulgular Tablo 4.34.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar öğütme süresinin artması ile birlikte partikül büyüklüğünün azaldığını ve 150 dk sonra öğütme süresindeki artışın artık partikül büyüklüğünde daha az düşüş sağladığını göstermiştir. PDI'deki değişim ise partikül büyüklüğündeki değişime oranla daha az olmuştur ve 0.3 civarında bulunmuştur.

Partikül büyüklüğü üzerine YH'de yapılan döngü sayısının etkisini incelemek amacıyla hazırlanan F1 ve F2 nanosüspansiyon formülasyonlarına ilişkin sonuçlar (Bkz.Tablo 4.35., Tablo 4.36., Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.) karşılaştırılmıştır. Partikül büyüklüğü üzerine YH yapılan döngü sayısının etkisini incelendiğinde iki farklı stabilizan ile hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğünün her iki formülasyonda da 20 döngü ve 30 döngü arasında anlamlı bir şekilde düştüğü görülmektedir. Her iki denemede de 50 ve 60 döngü sonrasında 1000 nm'nin altında partikül boyutu elde edilmiştir. P 603 ile hazırlanan formülasyonda PDI'nın dalgalanmalar gösterdiği ancak P 127 ve PVP K-30 ile hazırlanan formülasyonda PDI değerinin 0,2 nin altında olduğu ve 30 döngüden sonra çok fazla değişmediği tespit edilmiştir.

5.10. Mannitol İlavesinin Partikül Büyüklüğüne Etkisinin incelenmesi

UP ve BD kombinasyonu ile hazırlanan ve BD yöntemi ile hazırlanan nanosüspansiyonlar mannitol çözeltisi ilave edilerek ve mannitol ilave etmeden dondurarak kurutulmuştur. Tablo 4.29.'da görüldüğü gibi formülasyona dondurarak kurutmadan hemen önce mannitol eklenmesi partikül büyüklüğünün artmasını engellemiştir. Bilyeli değirmende hazırlanan ve kurutma öncesi partikül büyüklüğü, 597 ± 18 nm olan nanosüspansiyonun mannitollü ve mannitolsüz kurutulması sonucu RXB nanokristallerinin partikül büyüklüğü sırasıyla 768 ± 43 nm ve 1071 ± 46 nm olarak ölçülmüştür (Bkz.Tablo 4.37.). Bu sonuçlar dondurarak kurutma işleminde mannitol ilavesinin agregat oluşumunu engellediğini göstermektedir.

5.11. Nanokristal Ön Formülasyonlara İlişkin Karakterizasyon Sonuçları

Ön deneme çalışmalarında hazırlanan formülasyonlardan liyofilizasyon öncesi ve sonrası partikül boyutu arasındaki fark en az olan 1-UT+YH+BD (PB: 577 ± 17 , PB:LS 890 ± 24) ve 3-UT+BD+YH (PB: 573 ± 3 , PB-LS: 648 ± 3) ve ikili kombinasyonlardan 6-UT+BD (PB: 474 ± 6 PB-LS: 755 ± 21) formülasyonunun DSC termogramı, X-ışını kırınımı difraktogramı ve SEM görüntüleri incelenmiştir. Nanokristal formülasyonlarının SEM görüntüleri ile $1 \mu\text{m}$ ve $2 \mu\text{m}$ 'nin altındaki partiküllerin varlığı (Bkz. Şekil 4.40.-4.42.) gösterilmiştir. DSC termogramları incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.43.) her üç formülasyonda da başlangıçtaki erime noktalarından farklı olduğu görülmüştür. X-ışını kırınımı difraktogramlarında ise (Bkz. Şekil 4.44-4.46.) piklerin varlığı kristal yapının olduğuna işaret etmekte olup piklerin şiddeti azalmıştır.

5.12. Nanokristal Ön Formülasyonlara İn Vitro Çözünme Sonuçları

Çalışmalarımızda RXB nanokristal formülasyonları hazırlanarak artan çözünmeye bağlı olarak yüksek dozlarda azalan biyoyararlanımda artış sağlanarak doz orantısallığının sağlanması ve açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasındaki değişkenliği azaltmak amaçlanmıştır. Bu nedenle çözünürlük deneyleri doz orantısallığının olmadığı ve yiyecek etkisinin görüldüğü 20 mg dozda gerçekleştirilmiştir. En iyi partikül büyüklüğü dağılımına sahip formülasyonların, 20

mg dozda RXB içerecek şekilde tartılmış in vitro çözünme değerleri tayin edilmiştir. Deney sonucunda % çözünen RXB değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar ile RXB etkin maddesinin çözünmesine ait sonuçlar f_2 benzerlik testi ile karşılaştırılmıştır (Bkz.Tablo 4.38.). Sonuçlar RXB etkin maddesi ile nanokristal formülasyonlarına ait çözünme profillerinin benzer olmadığını göstermiştir (Bkz. Şekil 4.47.) Her bir formülasyonda RXB etkin maddesinin başlangıca göre % çözünen miktarının arttığı görülmüştür. Birden fazla yöntemin kombine edildiği formülasyonlarda daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. BD ve YH yöntemi ile hazırlanan 1-UT+YH+BD, 6-UT+BD formülasyonlarının partikül büyüklüğü en düşük çıkmasına rağmen ilk 30 dk içindeki % çözünen miktarları (% 58,88, % 81,07) daha düşük bulunmuştur. Bu durumun nanokristal formülasyonundaki küçük partiküllerin agregatlar oluşturması ve toz numunelerin homojen alınamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumu test etmek için aynı formülasyonun 6-UT+BD (PB: 474±.6 PB-LS: 755±21) hem nanosüspansiyon hem de liyofilizasyon sonrası in vitro çözünme deneyleri yapılmış (Bkz. Şekil 4.48.) ve aynı formülasyonun liyofilizasyon öncesi ve sonrası çözünme profillerinin f_2 benzerlik faktörü 21 olarak bulunmuş ve çözünme profillerinin benzer olmadığı gösterilmiştir. Bu durum dondurarak kurutma esnasında partiküllerin agregatlar oluşturduğunu veya toz numunenin homojen bir şekilde alınamadığını görüşünü desteklemektedir. Şekil 4.40.'da ise 6-UT+BD nanokristal formülasyonunun SEM'de x7.500 büyütmede 2 μm 'nin altında partiküllerin olduğu ve agregatlar oluşturduğu doğrulanmıştır. 1-UT+YH+BD ait görüntülerde (Bkz. Şekil 4.41.) de partiküllerin kümeleşmesi dikkat çekmektedir. İn vitro çözünmenin tamamlanmama nedeni partiküllerin agregatlar oluşturması olarak düşünülmektedir.

5.13. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılacak Formülasyonların Hazırlanması

Ön denemeler sonunda UT, BD, YH yönteminin kombinasyonu ile P 127, P603 PVP K-30 ile aynı yöntem parametreleriyle 4 farklı formülasyon hazırlanmıştır (Bkz.Tablo 4.34.). Burada BD veya YH yöntemlerinin hangi sıra ile kullanılacağı ve P 127+P 603, P127 +PVP K-30 stabilizan çiftinden birinin seçilmesi amaçlanmıştır. Partikül büyüklüğü analizi sonuçları (Bkz. Tablo 4.40.) incelendiğinde sırasıyla

UT+BD+YH kombinasyonu daha başarılı bulunmuştur. Stabilizan çiftini belirlemek üzere öğütme süresi 4 saat yapılarak aynı yöntem ile iki farklı stabilizan kombinasyonu içeren formülasyonlar hazırlanmıştır (Bkz.Tablo 4.39.) Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklükleri, PDI ve ZP değerleri tayin edilmiş ve elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Bkz.Tablo 4.40., Şekil 4.49.-4.50.) hazırlanan tüm formülasyonların partikül büyüklüğü 1000 nm'nin altında bulunmuştur. Hazırlanan formülasyonlarda en düşük partikül büyüklüğü P127 (% 0,5, a/h) ve P603 (% 0,5, a/h) içeren 0811AUTBDYH ($412\text{nm}\pm 12$) ve P127 (% 0,5, a/h) ve PVPK-30 (% 0,5, a/h) içeren 0911DUTBDYH ($417\text{nm}\pm 47$) formülasyonlarında elde edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklükleri yeniden ölçülmüştür ve tüm formülasyonlarda partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. Liyofilizasyondan sonra en düşük partikül büyüklüğü yine 0811AUTBDYH ($896\text{ nm}\pm 113$) ve 0911DUTBDYH ($792\text{ nm}\pm 27$) formülasyonlarında ölçülmüştür. Her iki formülasyonda önce BD yöntemi ile partiküller öğütülmüş daha sonra YH yöntemi ile formülasyonlar hazırlanmıştır. Bütün formülasyonlarda PDI'leri 0,5'ten küçüktür. PDI değerini yüksek olması halinde partikül büyüklüğü dağılımının daha geniş olduğu bilinmektedir (51, 257). Düşük PDI değerleri daha tekdüze ve monodispers partiküllerin varlığını işaret etmektedir. Teorik olarak 0 (monodispers bir dağılımı) – 0,50 (nispeten daha geniş bir dağılımı) arasındaki değerler alması beklenmektedir (258).

Hazırlanan formülasyonların ZP değerleri Tablo 4.40.'da verilmiştir. 0811AUTBDYH formülasyonunun ZP değeri liyofilizasyon öncesi $-20,9\pm 1,96$ olarak ölçülmüştür. Diğer formülasyonlarda ise -20 mV 'den daha yüksek bulunmuştur. 0911CUTYHBD formülasyonunun ZP değeri $(-2,1\pm 0,89)$ diğer formülasyonlara göre daha yüksek ölçülmüştür. Stabil bir süspansiyon elde etmek için ZP değeri elektrostatik olarak kararlı sistemler için en az -30 mV , fiziksel olarak kararlı sistemler için -20 mV olmalıdır (51). Formülasyon 0911CUTYHBD'nin liyofilizasyon öncesi fiziksel olarak stabil bir süspansiyon olmadığı görülmüştür. Liyofilizasyon sonrası saf suda disperse edilerek nanokristal formülasyonlarının PDI ve ZP değerleri yeniden ölçülmüştür. Formülasyon 0911CUTYHBD nin ZP'nin $-2,1\pm 0,89$ 'dan $-16,9\pm 1,46$ 'a düştüğü ve daha kararlı hale geldiği görülmüştür. Formülasyon 0811AUTBDYH'nin ise PDI'sı artmıştır ($0,494\pm 0,11$), partiküller daha polidispers bir hale gelmiştir. Elde edilen veriler ışığında ilerleyen çalışmalarda BD yöntemi ardından YH yöntemi

kullanılarak 2412AUTBDYH (348 nm $\pm$ 15) ve 2412BUTBDYH (403 nm $\pm$ 11) formülasyonları hazırlanmıştır. BD’de öğütme süresi artırılarak 4 saat süreyle öğütülmüştür. Formülasyon 2412AUTBDYH’nın ZP’i liyofilizasyon öncesi ve sonrası sırasıyla -8,08 $\pm$ 1,38 ve -23,4 $\pm$ 0,85 olarak ölçülmüştür. Nanokristal formülasyonu liyofilizasyon işlemi sonrasında daha stabil hale gelmiştir. Ancak liyofilizasyon işlemi sonrasında agregatlar oluştuğu düşünülmektedir. Partikül büyüklüğü de (1167 nm $\pm$ 33) artmıştır, partiküllerin stabil bir halde olmadığı için dondurarak kurutma işlemi sırasında agregatlar oluşturduğu düşünülmektedir. Dondurarak kurutma işlemi sırasında partikül büyüklüğünün arttığı ve agregatlar oluştuğu literatürde yer almaktadır. Bu amaçla formülasyonlara çeşitli kriyoprotektanlar eklenmektedir (259). Bu aşamadaki tüm formülasyonlara kriyoprotektan olarak mannitol eklenmiştir.

5.14. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Kristal yapıdaki moleküller DSC termogramlarında erime piki verirken amorf özellik gösteren moleküller pik vermemektedir (260). RXB termal özelliklerinde ve kristal yapısında değişiklik olup olmadığını incelemek amacıyla DSC analizi yapılmıştır. RXB etkin maddesi 233°C endotermik erime piki vermektedir RXB’nin 3 farklı polimorfu vardır ve üç farklı sıcaklıkta (230°C Polimorf I, 203°C polimorf II, 127°C polimorf III) kristalize olmaktadır. Polimorf I termodinamik olarak stabil olan formdur. Nanokristal formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde 220°C endotermik erime piki gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.51.-4.56.) RXB molekülüne ait 233°C’de görülen keskin erime pikinin nanokristal formülasyonlarında 220°C’de daha düşük şiddette görülmüştür. Nanokristal formülasyonlarının vermiş olduğu pik şiddetinin daha küçük olması ve 220°C’ye kaymasının nedeni ilacın yüzey etkin madde/stabilizan ile kaplanması olabilir (97, 261, 262). Literatür bilgileri ışığında bazı ilaçlar homojenizasyon ile kristal yapılarını korurken bazı ilaçlar ise homojenizasyon süresince amorf yapı oluşturmaktadır. Örneğin lovastatin ile yapılan bir çalışmada DSC termogramları daha düşük de olsa etkin maddedeki gibi endotermik pik mevcuttur. Pik kaymasının bir nedeni Gibbs-Thomson eşitliğine göre, hidrodinamik yarıçaptaki azalmanın Gibbs serbest enerjisini arttırmasıdır (263). Nifedipinle

hazırlanan formülasyonlarda DSC termogramları ve X-ışını kırınımı difraktomlarında değişiklik olmamıştır (97), kristal yapı korunmuştur. Azitromisinin nanokristallerinin hazırlanması sonucu ise amorf yapı oluşmuştur (264). Düşük pik şiddeti yüzey etkin madde/stabilizanların seyreltme etkisinden ve/veya kristal yapının bir miktar kaybolmasından kaynaklanabilmektedir (97, 261, 262, 265).

Formülasyonda kullanılan stabilizantlara ilişkin DSC termogramları incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.57.) P 127 ve MN'nin erime derecesi ile uyumlu olarak sırasıyla 58,84 °C ve 172,08 °C 'de karakteristik endotermik pikler görülmüştür. PVP K-30 tipik olarak amorf yapıda bir bileşik olup 50 °C -130 °C aralığında geniş bir dehidratasyon bandına sahiptir. Bu sonuçlar 220 °C 'deki erime pikinin RXB nanokristallerine ait olduğunu ve kristal yapısında olduğuna işaret etmektedir.

IR spektrumlarında da RXB'nin kristal formuna ait literatür verileri ile IR spektrumları karşılaştırıldığında molekülünün fonksiyonel gruplarına ait karakteristik pikler gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.66.) (250).

IR spektroskopisi ile RXB etkin maddesi ile stabilizanlar arasındaki etkileşim belirlenmektedir. RXB'nin FT-IR spektrumunda literatürde 564, 686, 708, 746, 757, 830, 846, 920, 991, 1011, 1056, 1077, 1120, 1146, 1163, 1219, 1286, 1307, 1323, 1341, 1374, 1411, 1429, 1470, 1486, 1517, 1546, 1605, 1646, 1669, 1737, 2867, 2895, 2936, 2976, 3354 cm^{-1} 'de karakteristik pikler verdiği belirtilmektedir (250). Hazırladığımız formülasyonlarda kullanılan RXB etkin maddesinin FT-IR spektrumunda 672, 685, 708, 744, 755, 826, 845, 920, 1010, 1055, 1077, 1098, 1119, 1145, 1210, 1278, 1307, 1324, 1340, 1374, 1407, 1428, 1469, 1486, 1514, 1546, 1606, 1644, 1666, 1732, 2870, 2939, 3068, 3349 cm^{-1} 'de görülen karakteristik pikler literatür ile uyumlu bulunmuştur. Liyofilize nanokristal formülasyonlarında ise 3222-3258 cm^{-1} 'de N-H, 2879-2940 cm^{-1} 'de C-H, 1023-1054 cm^{-1} 'de C-O, 1646-1737 cm^{-1} 'de C=O, 780-795 cm^{-1} 'de C-Cl fonksiyonel grupları görülmektedir (Bkz. Şekil 4.66.). Elde edilen bu sonuçlar RXB kimyasal yapısında değişiklik olmadığını ve stabilizanlar ile kimyasal bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Bu fonksiyonel gruplarda bir değişim olmaması, nanokristal formülasyonlarının bileşiminin ya da hazırlama yönteminin RXB'nin kimyasal stabilitesi üzerine görünen bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Formülasyonların X-ışını kırınımı analizi, nanokristal formülasyonlarında etkin maddenin kristal halinde bulunup bulunmadığının ve kristal miktarın da azalma olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. RXB'nin X-ışını kırınımı analizi 0.02°/dk tarama hızında 2θ: 10-40° arasında taranarak gerçekleştirilmiştir. RXB'nin literatürde 2θ'da 12,0, 14,3, 16,5, 17,4, 18,1, 19,5, 19,9, 21,7, 22,5, 23,4, 24,1, 24,5, 24,7, 25,6, 26,4, 26,7, 30,0, 30,1 ve 31,8 derecede pik verdiği kayıt edilmiştir (250). RXB'nin X-ışını kırınımı analizi sonucunda 15,14, 16,6, 17,44, 18,0, 19,54, 20,02, 21,7, 22,54, 23,34, 24,52, 24,62, 25,66, 26,7, 30,06, 30,32 derecede pikler verdiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.57.). Nanokristal formülasyonlarının X-ışını kırınımı analizinde etkin maddedeki bütün kırılma pikleri görülmüştür. Ancak nanokristal formülasyonlarında ek olarak yeni pikler gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.58.-4.65.). Ayrıca pik şiddetinin azaldığı dikkat çekmektedir. Pik şiddetinin azalması 1000 nm'den küçük kristal yapıdaki maddelerin X-ışını analizinde "partikül büyüklüğü genişletilmesi" olarak bilinen olgu olabileceği gibi kısmi miktarda amorf yapı varlığı da olabilir (266). Kristaller, yapıları nedeniyle raf ömürleri boyunca dayanıklı sistemlerdir, çözünme profilleri karardır. Amorf yapıdaki formülasyonların ise, çözünmesi kristal yapıdaki formülasyonlara göre daha fazla artmasına rağmen formülasyonlar dayanıklı değildir ve amorf yapıdan kristal yapıya geçme eğilimi gösterirler. Bu da raf ömürleri ve salım profillerini olumsuz etkiler (267). Sonuçlara bakıldığında, RXB'nin tek başına kristal yapıda olduğu ve nanokristal formülasyonlarında da kristal yapısını korudukları görülmektedir. Formülasyonda kullanılan stabilizantlara ilişkin X-ışını kırınımı difraktogramları incelendiğinde ise P 127 ve MN'nin karakteristik pikleri kristal yapısına sahip olduklarına işaret ederken, PVP K-30'da amorf yapısı nedeniyle pik görülmemektedir. RXB nanokristallerindeki pik şiddetinin azalması, PVP K-30 dispersiyonu ile kaplanmış olabileceğini göstermektedir. Elde edilen bulgular DSC analizi sonucu elde edilen veriler ile uyumludur.

Genellikle nanokristallerin yüzey morfolojik özelliklerini ve şeklini belirlemek üzere transmisyon elektron mikroskop (TEM) ve SEM kullanılmaktadır (49, 268). Nanokristal formülasyonlarından suyun uzaklaştırılması sonucu aglomerasyon görülebilir ve partikül boyutu büyüyebilir. Bu durum SEM'de görülebilmektedir (49). RXB etkin maddesinin ve nanokristal formülasyonlarının yüzey morfolojisi, partikül

büyükliği ve şeklini incelemek amacıyla farklı büyütme oranlarında (x2.500, x5.000, x7.500, x10.000) kristal yapıda RXB partikülleri incelenmiştir. x10.000 büyütmede 1000 nm ve daha düşük partikül büyüklüğündeki partiküller görüntülenmiştir (Bkz. Şekil 4.67.). RXB ile nanokristal formülasyonlarının morfolojisinin ve partikül büyüklüğünün farklı olduğu görülmektedir. Nanokristal formülasyonlarında düzensiz küresel şekilli partiküller elde edilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü sonuçları ile paralel olarak karşılaştırıldığında formülasyon 0811AUTBDYH, 0911DUTBDYH ve 2412BUTBDYH’da 1000 nm’nin altında partiküllerin yer aldığı ve polidispers bir dağılım olduğu görülmektedir. 0811BUTYHBD, 0911CUTYHBD ve 2412AUTYHBD formülasyonlarının partikül büyüklüğü liyofilizasyon sonrası arttığı daha önce partikül büyüklüğü ölçümlerinde elde edilmiştir. Buna paralel olarak SEM görüntülerinde de bu üç formülasyonda küçük partiküllerin bir araya gelerek agregatlar oluşturduğu görülmektedir. Bu üç formülasyonun ortak yönü ise BD ve YH yönteminin uygulanma sırasıdır. Her üç yöntemde de önce YH ile homojenize edilmiş en son BD ile öğütme yapılmıştır. En düşük partikül büyüklüğüne sahip 2412AUTYHBD (348 nm) nanosüspansiyon formülasyonunda ZP değerinin liyofilizasyon öncesi $-8,08 \pm 1,38$ mV olması liyofilizasyon sonrası ise $-23,4 \pm 0,85$ mV olması partiküllerin kararlı durumda olmadığını ve bu nedenle agregatlar oluşturarak partikül büyümesine neden olduğunu açıklamaktadır.

5.15. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonlarının Çözünürlük Tayini

Farklı çözünürlük ortamları kullanılarak tayin edilen değerler Tablo 4.41.’de verilmiştir. RXB’nin çözünürlüğü bütün formülasyonlarda pH 4,5 ve SDS (% 0,4) içeren ortamda etkin maddeye göre artış göstermiştir. Formülasyon 0811AUTBDYH’da pH 1,2 ve pH 4,5’de, formülasyon 0911CUTYHBD ve 0911DUTBDYH’de pH 4,5’de, ve formülasyon 2412BUTBDYH’de ise bütün ortamlarda çözünürlük artmıştır. Tüm formülasyonlarda RXB pH’dan bağımsız bir çözünürlük profili göstermektedir. pH 4,5 % 0.4 SDS içeren çözünme ortamında sink koşul 15 ve 20 mg dozlar için sağlanmaktadır.

5.16. Geçirgenlik Çalışmalarında Kullanılanacak Nanokristal Formülasyonlarının İn Vitro Çözünme Testleri

RXB gibi suda az çözünen ilaçların düşük çözünürlükleri nedeniyle çözünme hızları düşük, buna bağlı olarak oral biyoyararlanımları da düşüktür. Nanokristal sistemlerin hazırlanmasındaki temel amaç sudaki çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin in vitro çözünürlüğünü artırmaktır (54, 86). İlacın çözünürlüğünü artırmak için partikül büyüklüğünün küçültülmesi en çok kullanılan yöntemdir. Noyes–Whitney ve Ostwald–Freundlich eşitlikleri dikkate alındığında partikül yarıçapının düşmesi, yüzey alanın artması, doyguluk çözünürlüğü dolayısıyla çözünme hızı artırmaktadır. Nano boyutlu partiküllerin yüzey alanı arttığı için doyguluk çözünürlüğü, dolayısıyla in vitro çözünme hızı da artmaktadır. RXB etkin maddesinin ve hazırlanan formülasyonların in vitro çözünme profilleri Şekil 4.68.’de gösterilmiştir.

Her bir formülasyonun 45 dk sonundaki % çözünen miktarı Tablo 4.42.’de ve çözünme profilleri Şekil 4.68.’de verilmiştir. Formülasyon 0811AUTBDYH (30 dk’da çözünen miktar % 63) dışındaki bütün formülasyonlarda etkin maddenin % 80’ni 30 dk’da çözünmüştür. Etkin madde ile karşılaştırıldığında nanokristal formülasyonlarında in vitro çözünme artmıştır. Sink koşullar altında gerçekleştirilen çözünme testi sonucunda 0811AUTBDYH formülasyonu haricinde tüm formülasyonlarda 45. dakikada kümülatif çözünme platosuna ulaşılmıştır. Ancak etkin maddenin 45. dakika sonundaki % çözünen miktarı % 12.34 olarak tespit edilmiştir. Nanokristal formülasyonlarında çözünme hızındaki artış, partikül büyüklüğünün küçülmesine bağlı olarak, artmış doyguluk çözünürlüğü ile açıklanmaktadır (269, 270). Etkin maddenin kristal yapısındaki azalma da daha hızlı çözünme hızına ulaşılmasına neden olabilecek bir diğer etken olarak değerlendirilebilir (266, 271). Çözünme hızı artan formülasyonlarda in vitro ortamda görünen bu çözünme artışının in vivo ortama yansması beklenmektedir. RXB ve nanokristal formülasyonlara ait çözünme profilleri f_2 faktörü ile karşılaştırıldığında ise f_2 değeri 50’nin altında olup RXB ve nanokristallere ait profiller benzer değildir.

Uzun dönem stabilite nanosüspansiyonların bir diğer özelliğidir. Agregasyon ve Ostwald olgunlaşmasının olmaması nanosüspansiyonların stabilitesini yansıtmaktadır. Ostwald olgunlaşması, küçük ve büyük parçacıklar arasındaki

çözünme basıncı / görünür doygunluk çözünürlüklerindeki farklılıklardan kaynaklanır. Daha küçük parçacıklar daha hızlı çözülür ve serbest moleküller daha düşük çözünürlüğüne sahip olan daha büyük parçacıklara yayılır. Daha büyük parçacıkların etrafındaki aşırı doymuş bir ortam oluşur ve sonuç olarak daha büyük parçacıkların büyümesi ile sonuçlanır. Basitleştirirsek, Ostwald olgunlaşması daha küçük parçacıkların küçülmesi ve daha büyük parçacıkların büyümesi sürecidir. Ostwald olgunlaşması için iki ön koşul vardır. Bunlardan birisi nanosüspansiyonlardaki partikül büyüklüğünün tek düze olmaması yani polidispers olması ikincisi ise dispersiyon fazı yani ilaç nanopartiküllerinin dispersiyon ortamındaki sınırlı çözünürlüğe sahip olmasıdır (45, 272). Nanopartiküllerin doğasında disperse olduğu bir ortamda agrega olma eğilimi olduğu iyi bilinmektedir (273). Fiziksel kararsızlık, katı sıvı arasındaki yüksek yüzeyler arası yüzey enerjisini azaltma eğiliminden dolayı değişkendir. Agregasyon olayının olmaması uygun stabilizan seçimi ile gerçekleşmektedir. İlaçlar genellikle termal kararlılık, neme duyarlılık gibi özelliklerine bağlı belirlenmiş saklama koşulları altında saklanır. İlacın saklama koşullarına göre depolama, satış, paketleme gibi bazı parametreler belirlenir. ICH tarafından yayınlanan Q1A(R2) yeni ilaçların ve ürünlerin stabilite testleri hakkındaki kılavuzunda oda sıcaklığında saklanacak etkin maddeler için 25°C % 60 ±5 bağıl nem ortamında 12 ay süre ile ve 40°C % 75±5 ortamında 6 ay süre ile 3 ayda bir örnek olarak stabilitesinin test edilmesi önerilmektedir (274). Bu çalışmada hazırlanan nanokristallerin 12 ay ve 6 ay süreli stabilite çalışmalarına ilişkin bulgular Tablo 4.38.'de gösterilmiştir. Nanokristallerin stabilitesini değerlendirmek üzere partikül büyüklüğü, PDI, ZP ve % çözünen RXB değerleri karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar partikül büyüklüğünün değiştiğini göstermektedir (Bkz.Tablo 4.43.). Başlangıçtaki partikül büyüklüğüne göre her bir formülasyonda partikül büyüklüğünün arttığı görülmektedir. 25 °C ve 40 °C'de partikül büyüklüğü değişimi incelendiğinde ölçülen değerler arasında en yüksek varyasyon 0811AUTBDYH (25 °C'de % VK 15 ve 40 °C'de % VK 22) ve 2412BUTBDYH (25 °C'de % VK 23 ve 40 °C'de % VK 30) formülasyonlarında görülmüştür. Her iki formülasyonda da P 127 (% 0,5) ve P 603 (% 0,5) stabilizan olarak birlikte kullanılmıştır. Partikül büyüklüğü değişimindeki en düşük % VK ise 0811BUTYHBD (25 °C'de %VK 8) ve 0911DUTBDYH (25 °C'de % VK 8) formülasyonlarında

bulunmuştur. Ancak bu iki formülasyondaki stabilizan çifti aynı değildir. 0811BUTYHBD formülasyonunda P 127(% 0,5) ve P 603 (% 0,5) kullanılmışken diğer formülasyonda P127 (% 0,5) ve PVP K-30 (% 0,5) stabilizan olarak kullanılmıştır. Bu nedenle partikül büyüklüğündeki artışın başarısız stabilizan seçimine doğrudan bağlanması mümkün olmamaktadır. Ayrıca dikkat çeken bir diğer nokta 0. zamanda ölçülen partikül büyüklüğü ile diğer aylarda ölçülen partikül büyüklükleri arasındaki farkın aylar arasındaki farka göre çok daha fazla olmasıdır. Bu durum partiküllerin 0-1 ay arasında agregatlar oluşturduğu veya ölçüm yapılan örneklerin homojen olmaması şeklinde açıklanabilir. Stabilité çalışmaları sonrasında PDI değerlerinin artması dağılımın polidispers bir hale geldiğine işaret etmektedir. Genel olarak PDI değerleri 0.5'in altında ölçülmüştür.

ZP ölçülmesi boyutları mikron altı olan kolloidal dispersiyonların saklama sırasındaki stabilitesi hakkında tahmin yürütülmesini sağlamaktadır (275). Bu nedenle formülasyonların zeta potansiyeli de ölçülmüştür. 2412AUTYHBD ve 2412BUTBDYH 25 °C ve 40 °C'de zeta potansiyel değerleri sırasıyla -20mV veya daha yüksek bir değer ölçülmüştür. Diğer formülasyonlarda ise zeta potansiyel değerleri -16 mV-19 mV arasında ölçülmüştür. Daha önce belirtildiği gibi elektrostatik stabilite için bu değerin en az -30 mV sterik olarak stabil sistemler için ise -20 mV olması gerektiği literatürde yer almaktadır (253). Stabilité çalışması süresi sonunda RXB miktar tayini de yapılmıştır ve formülasyon 0911DUTBDYH'da hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite çalışmalarında 2412BUTBDYH formülasyonunda 25°C %75±5 ortamında başlangıçtaki miktar tayinine göre karşılaştırıldığında (Bkz.Tablo 4.43.) etkin madde kaybı % 5'den fazla olmuştur. Bu duruma içerik homojensizliği neden olabilir, içerik tek düzeligi testi ve tekrar sayısının fazla olması ile azaltılabilir. Diğer formülasyonlarda ise başlangıçtaki % RXB içeriğine göre % 5'den fazla değişim olmamıştır. 0811AUTBDYH formülasyonunda ise miktar tayini sonuçları formülasyondaki RXB içeriğinin yaklaşık olarak % 86 olduğunu göstermektedir. 40 °C % 75±5'de saklanan formülasyonların in vitro çözünme testleri yapılarak başlangıçtaki in vitro çözünen miktarları ile karşılaştırılmıştır. Formülasyon 0811BUTYHBD'nin başlangıçtaki % çözünen miktarı ile 40°C % 75±5'de 1 ay bekledikten sonra tayin edilen % çözünen miktarının benzer olmadığı (f₂:42) Şekil 4.67.'de gösterilmiştir. Ancak 6 ay sonunda yapılan çözünme testinde ise 0. zamandaki

ve 6 ay sonundaki çözünme profilleri benzer bulunmuştur.(f₂:88) Bu durum formülasyon içeriğindeki etkin madde miktarındaki sapmanın % 5'den fazla olmasına ve içerik tek düzeliliğinin sağlanamamasına bağlanabilir. 0811AUTBDYH formülasyonunda % çözünen RXB 0., 1. ve 6. ayda sırasıyla % 64,57, % 64,36 , % 80,03 bulunmuştur. 6 ayda çözünmenin artmasının nedeni formülasyonda % 86 oranında etkin madde olmasından, içerik tek düzeliliğinin sağlanamaması, tartımdan gelen hatalardan kaynaklanabilir. Diğer tüm formülasyonlarda % çözünen RXB 45 dk sonunda % 80'ne ulaşmıştır.

5.17. Hücre Kültürü Çalışmaları

Oral yoldan uygulanan maddelerin GİS'den absorpsiyonu üzerine etki eden en önemli faktörlerden birisi de etkin maddenin fizikokimyasal özellikleridir. Bu çalışmada partikül boyutu değiştirilen RXB'nin Caco-2 hücrelerindeki geçirgenlik özelliklerinin değişip değişmediği test edilmiştir. Bir ilaçtan uygun oral biyoyararlanım elde etmek için yeterli çözünürlük ve iyi geçirgenlik özelliği göstermesi gerekmektedir. İlacın oral yoldan alımına takiben absorpsiyonu karmaşık ve dinamik bir prosedir. İlaçların absorpsiyonu enterosit hücre zarları arasında (transselüler) veya enterositler arasındaki sıkı kavşaklardan (paraselüler) pasif difüzyon ile gerçekleşmektedir. Gastrointestinal kanaldan geçiş (permeabilite) oral yolla uygulanan ilaçların biyoyararlanımını tespit etmede anahtar faktörlerden biridir. Geçirgenlik çalışmaları ile ilacın mide bağırsak sistemindeki absorpsiyon bölgesinin belirlenmesinin yanında, ilacın bağırsak duvarından geçiş etkinliği de tayin edilmektedir (39). Bir etkin maddenin geçirgenlik derecesinin belirlenmesinde doğrudan ve dolaylı ölçüm yöntemleri kullanılır. Geçirgenlik tayini insanlarda mutlak biyoyararlanım çalışmaları veya kütle denge çalışmaları ile absorbe olan etkin madde miktarının belirlenmesi veya bağırsak perfüzyon çalışmaları ile yapılmaktadır. Etkin maddenin gastro intestinal sistemden geçirgenliğini tayin etmek için önerilen yöntemler; insanda in vivo perfüzyon çalışmaları, hayvanlarda in vivo veya in situ bağırsak perfüzyon çalışmaları, insan veya hayvanlardan alınmış bağırsak dokuları kullanılarak in vitro permeasyon çalışmaları, epitel kültür hücrelerinin tekli tabakasında in vitro permeasyon çalışmalarıdır (40). İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan in vivo çalışmalar pahalı, zaman alıcı ve etik kurul izni alınması

güç olduğundan bu yöntemler yerine in vitro yöntemlerin tercih edilmesi bazı durumlarda uygun olabilir. İlaç geçirgenliğini ve absorpsiyon potansiyelini değerlendirmede çeşitli hücre modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Genellikle kanser orijinli ölümsüz hücreler ile yapılan hayvan veya insan hücre kültürleri insanlarda ilaç absorpsiyonunun tahmini ve tayininde kullanılmaktadır. İntestinal absorpsiyon için in vitro model olarak insan kolorektal adenokarsinomadan elde edilen Caco-2 hücre tek tabakalarının kullanımı dünyada birçok laboratuvar tarafından kabul görmektedir. (276, 277). Bu hücreler en iyi karakterize edilen hücrelerdir. RXB polarize hücre hatlarında hücrelerarası geçişin, RXB ile üç farklı vitamin K antagonistlerinin geçişine P-gp etkisinin ve RXB'nin P-gp aracılı ilaç transportuna inhibitör etkisinin incelendiği çalışmalarda da Caco-2 hücreleri kullanılmıştır (228, 229, 252). Geçirgenlik çalışmalarında en çok kullanılan hücreler olması ve literatürde RXB ile yapılmış geçirgenlik çalışmalarında kullanılmalarından dolayı çalışmamızda Caco-2 hücreleri tercih edilmiştir.

Paraselüler geçirgenlik sonuçları hücrelerin tek tabaka bütünlüğüne bağlıdır. İyonize olabilen ilaçların çoğunluğu paraselüler boşluklar aracılığıyla geçiş gösterebilirler, bu nedenle geçirgenlikleri hücre tek tabaka bütünlüğünden etkilenir. Bu nedenlerle, hücre tek tabakalarının bütünlüğünün incelenmesi önemlidir. Hücre tek tabakalarının polarizasyonu ve sıkı kavşakların oluşumu hızlı ve güvenilir bir yöntem olan TEER ölçülmesi ile tespit edilebilir. Caco-2 tek tabaka hücre bütünlüğünün değerlendirilmesi için yapılan çalışmalarda öncelikle TEER değerleri ölçülerek TEER > 400 ohm.cm² olan hücreler transport çalışmaları için kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan formülasyonlardan seçilen 4 tanesi ile geçirgenlik çalışması yapılmıştır. Öncelikle pH 4,5 % 0.4 SDS içeren ortamda en iyi çözünürlüğe sahip olduğu ve liyofilizasyon sonrasında da partikül büyüklüğü (792 nm) 1000 nm'nin altında olan 0911DUTBDYH formülasyonu seçilmiştir. Daha sonra yine her üç pH'da (pH 1,2, pH4.5, pH 6,8) diğer formülasyonlara göre çözünürlük sonuçları en iyi olan ve SEM görüntülerinde 1000 nm altında partiküllerin olduğu görülen partikül boyutu 606 nm olan 2412BUTBDYH formülasyonu seçilmiştir. 0811AUTBDYH ve 0811BUTYHBD formülasyonlarında birincisinin 45 dk in vitro çözünmesi tamamlanmadığı için partikül boyutu diğer formülasyona göre daha düşük olmasına rağmen seçilmemiştir. Son olarak pH 4,5 asetat tamponunda en iyi ikinci çözünürlüğe

sahip olan 0911CUTYHBD formülasyonu ile geçirgenlik çalışması yapılmıştır. Literatürde RXB ait P_{app} değerleri 0,92 μM için $8,88 \times 10^{-6}$ cm/sn 9,2 μM için $7,98 \times 10^{-6}$ cm/sn ve 92 μM için $7,45 \times 10^{-6}$ cm/sn bulunmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde (Bkz.Tablo 4.45.) 80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon için RXB'ye ait P_{app} $7,257 \times 10^{-5}$ cm/sn değeri bulunmuştur (228). Nanokristal formülasyonlarına ait geçirgenlik katsayıları sırasıyla 2412BUTBDYH, 0811BUTYHBD, 0911CUTYHBD, 0911DUTBDYH için $11,663 \times 10^{-5}$ cm/sn, $9,444 \times 10^{-5}$ cm/sn, $10,184 \times 10^{-5}$ cm/sn, $11,620 \times 10^{-5}$ cm/sn bulunmuştur. Caco-2 ile yapılan geçirgenlik çalışmalarında geliştirilen tüm formülasyonların geçirgenlik katsayıları (P_{app} , cm/sn) RXB tozdan yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$), bu durum nanokristal formülasyonu hazırlamanın RXB'nin geçirgenliğini arttırdığını göstermektedir.

5.18. İn Vivo Çalışmada kullanılacak Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya olmak üzere iki farklı yaklaşım mevcuttur. Ayrıca birden fazla yöntemin kombine edildiği teknolojiler yeni bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. İn vivo çalışmalarda kullanılacak formülasyonda BD ile öğütme yöntemini takiben YH yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca öncesinde UT ile yüksek hızda karıştırılarak birden fazla yöntemin bir ara kullanıldığı kombine bir yaklaşım ile nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Yönteme karar vermeden önce, RXB etkin maddesinin çöktürme, BD, YH, UP, UT teknikleri ile nanosüspansiyonları ve her bir yöntemin birbiri ile kombine edildiği formülasyonlar hazırlanmıştır. İn vitro sonuçları incelendiğinde en iyi sonuç, UT ile yüksek hızda mikronizasyon sonrası BD ile öğütülmesi ve ardından YH işlemine tabi tutulması ile elde edilmiştir. Bu nedenle in vivo biyoyararlanım çalışmasında bu üç yöntemin kombine edildiği formülasyonlar kullanılmıştır. İlaç nanokristalleri stabilizan tabakası ile çevrilmiş katı ilaç partikülleridir, üretimleri oldukça kolaydır. Ancak stabilite ve stabilizan seçimi en kritik adımlardan biridir (88, 278). FDA tarafından gıda katkı maddesi ve farmasötik yardımcı madde olarak onaylanan poloksamerler çözünürlük, salım, stabilite ve biyoyararlanımı artırmaları nedeniyle nanokristal hazırlamada sıkça kullanılmaktadır. Nanokristal teknolojisinde tek stabilizan yeterli olabileceği gibi birçok çalışmada

kombine stabilizanlar kullanılmıştır (278, 279). Nisoldipinin PVP K-30 ile hazırlanan nanokristallerinin partikül büyüklüğü 472 nm iken formülasyona SDS eklenmesi üzerine partikül büyüklüğü 240 nm'ye düşmüştür (280). Ayrıca periyodik olarak stabilizan eklemenin daha küçük partikül büyüklüğü ve daha dar partikül büyüklüğü dağılımı sağladığı gösterilmiştir (281). Bu çalışmada hazırlanan formülasyonlarda ise, RXB nanokristal formülasyonlarının optimize edildiği bir dizi çalışmanın sonunda birden fazla stabilizan ile daha düşük partikül büyüklüğü elde edilmiştir. Literatürde F68 ve P 127 ile karşılaştırıldığında poloksamerlerin molekül ağırlığı artıka zeta potansiyelde azalmayı kolaylaştırdığı ($F_{68} < F_{127}$) ve bu azalışın sterik olarak stabilize edilmiş polimer ile oluştugu bilgisi yer almaktadır ve bu durumun artan P 127 konsantrasyonu ile olduğu vurgulanmaktadır (278). Genellikle poloksamerler, nanokristal formülasyonlarında en düşük molekül ağırlıklı HPMC kullanılarak stabilizan etki sağlanmaktadır (113, 282). Tüm bu bilgiler ışığında, en iyi in vitro performansı veren poloksamer F 127 ve pharmacoat 603 (HPMC cps 3) kombinasyonu stabilizan olarak seçilmiştir.

Partikül büyüklüğü dağılımı Malvern Zetasizer ile ölçülmüştür. RXB'nin toz halindeki ortalama partikül büyüklüğü $d(0,1)$ için $14,769 \pm 179 \mu m$, $d(0,5)$ için $77,245 \pm 1794 \mu m$ ve $d(0,9)$ için $235,929 \pm 15,531 \mu m$ olarak Malvern master sizer ile ölçülmüştür. Nanokristal formülasyonu sonucu partikül büyüklüğü dağılımı 1000 nm'nin altına düşmüştür. Her bir dönem öncesinde partikül büyüklüğü, PDI, ZP yeniden ölçülerek partikül büyüklüğündeki ve süspansiyonun stabilitesindeki değişim değerlendirilmiştir. Sırasıyla partikül büyüklüğü 445,52 nm, 454,00 nm ve 454,12 nm olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar partikül büyüklüğünde anlamlı bir değişme olmadığını göstermekte, bu nedenle de in vivo performansı etkilemeyeceğini göstermektedir. Ayrıca nanosüspansiyonun 1 ay süre ile buzdolabında beklemesi ile herhangi bir agregasyon gözlenmemiştir.

5.19. İn Vivo Çalışmalardaki Kullanılan Formülasyondaki RXB Miktar Tayini

Hazırlanan nanosüspansiyonları tavşanlara uygulamadan önce mL'deki madde miktarı tayin edilerek her bir tavşana 3 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg olacak şekilde nanosüspansiyon verilmiştir. Her bir uygulama öncesi mL'deki madde miktarı 58,12

mg/mL, 60,26 mg/mL ve 67,38 mg/mL olarak tayin edilmiştir. Bu durumun nedeni her seferinde doğru örnek alınamaması, süspansiyonun örnekleme öncesi yeterli sürede karıştırılmaması, agregatlar oluşturmaması, saklama kabı ve örnekleme pipeti çeperlerine yapışarak madde kaybının yaşanması olabileceği gibi partiküllerin çökmesi de olabilir. Her bir uygulama öncesi mL'deki madde miktarı artış göstermiştir. Madde miktarındaki bu değişkenliği in vivo sonuçlara yansıtmak üzere her bir uygulama öncesi tartılan tavşanların ağırlıklarındaki değişim göz önünde bulundurularak her bir tavşana uygulanacak doz her uygulamada ayrı ayrı hesaplanmıştır. Böylelikle her bir tavşan her bir etkene maruz kalırken formülasyondaki % madde miktarı ve kilo artış veya kaybına bağlı herhangi bir varyasyon oluşmasının önüne geçilmesi hedeflenmiştir.

5.20. Tavşanlarda İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda Yeni Zelanda Tavşanı kullanılmıştır. Aynı deney hayvanları ile 3 farklı dönem boyunca deneysel çalışma gerçekleştirileceği için ve daha önce tavşanlarda RXB'nin 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda yapılan çalışmalarında 10 mg/kg dozda doz orantısallığının gösterilememiş olması nedeniyle tavşanlarda çalışılmıştır (8). Her bir dönemden sonra en az 5 yarı ömür (RXB yarı ömür 7-9 saat) geçecek kadar ara verilmiştir (38). Bu nedenle kulak venlerinin iyileşmesi ve toplanan kan hacminin yerine konulması hedeflenmiştir. İn vivo çalışmalarda tavşanlara tek seferde verilebilecek hacim 10 mL/kg olup tavşanlara bu oranda sıvı verilmiştir (283). Her bir tavşandan tek seferde 24 saat için toplam kan hacminin % 20 sini geçmeyecek şekilde her bir zaman noktasında 0,5 mL kan örneği alınmıştır (283). Literatürde Perzborn ve ark. (35) RXB ile yaptığı çalışmada RXB solutol/etanol/su [40:10:50 (h/h/h)] içinde, Weinz ve ark. (222) yaptığı çalışmada ise PEG:su [60:40(h/h)] içinde uygulanmıştır. Bu çalışmada Weinz ve ark. yaptığı çalışmada olduğu gibi PEG:su [60:40 (h/h)] içinde disperse edilerek oral gavaj ile verilmiştir ve tüp içerisindeki kalan maddeyi yıkamak üzere maksimum 10 mL'yi geçmeyecek kadar su verilmiştir. İlaç uygulamasına, takiben toplanan kanlar bekletilmeksizin heparinize tüplere alınarak 1800 g'de santrifüjlenerek plazma ayrılmış -80 °C'de analiz zamanına kadar saklanmıştır.

5.21. İn Vivo Çalışmadan Elde Edilen Farmakokinetik Verilerin Değerlendirilmesi

İn vivo çalışmalarda hazırlanan RXB nanokristal formülasyonu nanosüspansiyon halinde tavşanlara oral yoldan uygulanarak plazma kan örnekleri 24 saat boyunca toplanmış ve analiz edilmiştir. Literatürde RXB'nin sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmaları sonucu 10 mg dozda açlık ve tokluk koşullarında biyoyararlanımının tam olduğu yiyecek ile alınması ile 10 mg dozda EAA'da ve C_{maks} değerlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ancak 20 mg dozda açlık koşullarında biyoyararlanım % 66 olarak bulunduğu rapor edilmiştir. 20 mg doz gıdalarla ile birlikte verildiğinde ise EAA'da % 39'luk bir artış gözlenerek absorpsiyonun tama yaklaştığı tespit edilmiştir. Tokluk koşullarında 10 mg, 15 mg ve 20 mg'da doz orantısallığı sağlanmıştır. Ancak 20 mg dozda açlık koşullarında biyoyararlanım % 66 olarak bulunmuş ve doz orantısallığı gözlenmemiştir. Bu durum açlık koşullarında ilacın biyoyararlanımında hız kısıtlayıcı basamak olan çözünme hızının düşük olmasına bağlanmaktadır (10, 31). Çalışmamızda RXB'nin nanokristal formülasyonlarının in vivo performansı ile bu sorunun çözümü araştırılmıştır. Sağlıklı gönüllülerde 10 mg dozdan daha yüksek dozlarda açlık koşullarında sağlanamayan doz orantısallığının ve tamamlanamayan biyoyararlanımın nanokristal teknolojisi ile değerlendirilmek üzere tavşanlarda çalışılmaya karar verilmiştir. Ancak çalışmanın tasarımı için sağlıklı gönüllülerde 10 mg doza kadar olan doz orantısallığının tavşanlarda hangi dozlarda ortaya çıktığının bilinmesi gerekmektedir. Bu konuda literatür taraması yapıldığında Barj ve arkadaşlarının, in vivo tavşanlara oral yoldan 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ve 10 mg/kg dozlara RXB verilmesi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde 0,3 mg/kg ve 3 mg/kg dozlarda ortalama plazma kan düzeyi doz ile orantılı olarak artarken 10 mg dozda doz orantısallığından daha az artış göstermiştir. Protrombin zamanının uzamasının plazma konsantrasyonu ile orantılı olduğu gösterilmiştir (8). Literatür bilgisine dayanarak doz orantısallığının bittiği 3 mg/kg ve 10 mg/kg, 15 mg/kg dozlarda RXB uygulanmasına karar verilmiştir. Tavşanlardan elde edilen ortalama sonuçlar incelendiğinde EAA_{0-t} değerleri doz 3 mg'dan 15 mg'a çıkarıldığında 2728,80 ng/mL.sa'den 8689.69 ng/mL.sa'ye $EAA_{0-\infty}$ değerleri 3221,67'den 10164,66 ng/mL.sa'e yükselmiştir. C_{maks} değeri ise 642,09 ng/mL'den 1554,67 ng/mL'ye yükselmiştir (Bkz.Tablo 4.51., Tablo 4.52., Tablo

4.53.). Plazma konsantrasyon düzeyinin maksimuma ulaştığı süre t_{maks} sırasıyla 0,5, 0,75, 0,5 saat olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.73.). 10 mg dozda plazma pik düzeyine daha geç ulaşılmıştır. Yarılanma ömrü $t_{1/2}$ incelendiğinde de 10 mg dozda yarılanma ömrünün çok yüksek olduğu görülmektedir sırasıyla 7,55, 19,63 ve 8,69 saat olarak hesaplanmıştır. 10 mg/kg doz ilaç uygulanan tavşanlara ait yarılanma ömrü sonuçları sırasıyla 10,17, 17,97, 12,32, 9,49, 48,90, 18,94 olarak hesaplanmıştır. 6 numaralı tavşana ait verinin yüksek oranda (% 75) varyasyon göstermesi belli bir zaman noktasında örnek hazırlamada veya analiz sırasındaki herhangi bir hatadan kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Her üç dozda da plazma ilaç seviyesi 1 saat içinde hızla artmıştır ve maksimum konsantrasyona ulaşmıştır. EAA_{0-t} $EAA_{0-\infty}$ 'nin sırasıyla % 87, % 62 ve % 83'lük kısmını oluşturmakta, olup bu durum örnek alma süresinin daha uzun tutulması gerektiğini ortaya koymaktadır. 10 mg doz uygulanan tavşanlardaki yarılanma ömrünün 19,63 saat olması nedeniyle örnekleme zamanı en az 3 terminal yarı ömür içerek şekilde olması gerekirken 24 saat örnek alma süresi yeterli görülmemiştir. Ancak plazma konsantrasyon-zaman profilinden eliminasyon yarı ömrü hesaplanabilmiştir. Farmakokinetik veriler incelendiğinde denekler arası varyasyon katsayılarının yüksek olduğu görülmektedir. Doz normalize edilmiş konsantrasyonun zamana karşı plazma profili incelendiğinde 3 doza ilişkin profillerin doz orantısal olması için birbiri ile çakışması gerekirken, böyle bir durum ile karşılaşılmamıştır (Bkz.Şekil 4.75.). Ancak doz orantısallığının doğru bir şekilde değerlendirilmesi için istatistiksel analizler yapılması gerekmektedir. Bu amaçla literatürde güç modeli, basit doğrusal regresyon analizi, doz normalize edilmiş farmakokinetik verilerin varyans analizi ve eşdeğerlik kriteri yöntemleri ile doz orantısallığı yaygın olarak değerlendirilmiştir. RXB nanokristallerinde 3 mg, 10 mg, 15 mg doz aralığında EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$ ve C_{maks} değerleri için doz orantısallığı olup olmadığı öncelikle güç modeli ile karşılaştırılmış ve log-log dönüşümü sonucu çizilen konsantrasyona karşı doz eğrisi Şekil 4.76.-4.78.'de verilmiştir. Güç modeli ile (*power model*) % 90 güven aralığında elde edilen sonuçlar minimum doz için $1+(\ln(0,8)/\ln(r))$ ve maksimum doz için $1+(\ln(1,25)/\ln(r))$ değeri olan 0,8613-1,1386 aralığında değerlendirilmiştir (r =maksimum doz oranı:15/3=5). EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$ ve C_{maks} için hesaplanan güven aralıkları 0,1196-0,7914, 0,3217-0,9244, 0,4481-0,9823 bulunmuş ve doz orantısallığı olmadığı yönünde sonuca varılmıştır.

Bisfenol A'nın 2-100.000 $\mu\text{g/kg}$ doz aralığında güç modeli ile doz orantısallığının karşılaştırıldığı çalışmada doz orantısallık gösterilirken aynı doz aralığı içindeki 2-400 $\mu\text{g/kg}$ doz aralığında aynı analizler yapılmıştır. Eğimin % 95 CI'da 100.000/2 doz oranı için önceden belirlenmiş CI değerleri; 0,9794-1,0206 ve 400/2 doz oranı için ise 0,7593-1,0212 olarak hesaplanmıştır (146). Smith ve ark. (235) tarafından istatistiksel güç yönteminin çok geniş doz aralığında daha dar doz aralığına göre daha güçlü sonuçlar verebileceğini belirtmiştir. Güç modelinde doz oranının artması ile β için kritik bölgenin daraldığı bu nedenle dar bir doz aralığına göre daha geniş doz aralığında bu yöntemle doz orantısallığı kriteri için daha sıkı olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle eşdeğerlik kriteri yöntemini önermektedir.

Güç modelinde β , doz ve cevap arasındaki orantısallığını göstermekte olup 0'a eşit olması dozdan bağımsız bir farmakokinetik profili 1'e eşit olması doz orantısallığını gösterir. Tablo 4.55.'de görüldüğü gibi β değerinin 1'e en yakın olduğu parametre $EAA_{0-\infty}$ 'dır. Güç analizi sonucunda 3 mg-15 mg doz aralığında doz orantısallığı olduğu gösterilememiştir.

Güç modeline ek olarak doz orantısallığını değerlendirmek üzere doz normalize edilmiş ve doğal logaritması alınmış farmakokinetik veriler kullanılarak varyans analizi yapılmıştır. Tablo 4.56.'da ANOVA tablosu verilmiştir. Bu yöntemde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise C_{maks} , EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$; $\alpha=0,05$ anlamlılık düzeyinde (2, 15) serbestlik düzeyinde F tablo değeri ölçümle bulunan F değerinden C_{maks} , için büyük EAA_{0-t} , $EAA_{0-\infty}$ için tablo değerinden küçük bulunmuş ve p değeri 0,028, 0,052, 0,225 olarak bulunmuş, C_{maks} için H_0 farksızlık hipotezi red edilmiştir. Bu yöntem ile C_{maks} değerlerinde doz orantısallığının olmadığı ama EAA değerleri arasında doz orantısallığının olduğu gösterilmiştir. Doz normalize edilmiş farmakokinetik verilerin 2'li gruplar halinde tek yönlü varyans analizi yapılarak ANOVA tabloları elde edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.57.-4.59.'da yer almaktadır. 3 mg-10 mg, 10 mg-15 mg, 3-15 mg dozlara ait C_{maks} verilerinin karşılaştırılması sonucu 3 mg ile 10 mg arasında doz orantısallığı olmadığı 10 mg ile 15 mg arasında ve 3 mg ile 15 mg dozlar arasında doz orantısallığının varlığından söz edilebilmektedir. 10 mg-15 dozlarda p değeri 0,052'dir, ancak F_{tablo} değeri hesaplanan F değeri ile karşılaştırıldığında H_0 hipotezi red edilmemiştir.

Tablo 4.58.'de EAA_{0-t} sonuçları incelendiğinde ise 3 mg ve 10 mg arasında yapılan karşılaştırma sonucunda $p < 0,05$ olup aralarında doz orantısallığı bulunamamıştır. $EAA_{0-\infty}$ 'de ise 3 mg, 10 mg ve 15 mg dozlarda her bir dozun birbiri ile doz orantısal olduğu görülmektedir (Bkz.Tablo 4.59.).

Basit doğrusal regresyon analizinde y eksenini kesme (intersept) değerinin 0'dan farksız olup olmadığı değerlendirilmiştir. Farmakokinetik verilerin % 95 güven aralığı sonuçları incelendiğinde ise C_{maks} için (0,049, -0,002), $p=0,034$, EAA_{0-t} için (-68,464, 7,817) $p=0,111$ ve $EAA_{0-\infty}$ için (-78,790, 9,675) $p= 0.117$ olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde de C_{maks} için doz orantısallığı sağlanamazken EAA parametreleri için sağlanmıştır (Bkz.Tablo 60.).

Son olarak eşdeğerlik kriteri yöntemi ile 3 mg doza normalize edilmiş veriler için % 90 güven aralığında % 80-125 kriterinin sağlanıp sağlanmadığı test edilmiştir. Her bir doz için her bir farmakokinetik veri karşılaştırılmıştır. Her üç farmakokinetik ölçüt için 3 mg ve 10 mg doz arasındaki değerlendirme sonucunda % 80-125 sınırları için eşdeğerlik kriteri sağlanamamıştır (Bkz.Tablo 4.61.). C_{maks} için elde edilen sonuçlar incelendiğinde 10 mg -15 mg (% 90 güven aralığı; 88,71-125,52) % 80-125 sınırları içinde olduğunu söylemek mümkün olabileceği gibi ve 3 mg -15 mg (% 90 güven aralığı; 78,14-118,39) dozlar için EMA'nın biyoeşdeğerlik kılavuzlarında belirtildiği üzere varyasyon katsayısı (% VK=31,592) %30'un üzerinde olduğu için eşdeğerlik kriteri sağlanması için %80-125 güven aralığından 77,23-129,48 aralığına genişletilebilir (242).

Basit doğrusal regresyon, varyans analizi ve eşdeğerlik kriteri yöntemleri ile elde edilen veriler birbiri ile uyumlu olup 3 mg-15 mg ve 10 mg -15 mg dozları arasında doz orantısallığının EAA ve C_{maks} parametreleri için sağlandığını göstermektedir.

Abirateron asetatın 250 mg, 500 mg, 1000 mg dozlarında yapılan doz orantısallığı çalışması sonuçları incelendiğinde, ortalama C_{max} ve EAA değerlerinin doza bağımlı olarak arttığı ancak güç modeli ile % 90 güven aralığında önceden belirlenen sınırlar içinde doz orantısallığının sağlanamadığı görülmüştür. Çalışmada güç modeli ile karşılaştırma yapıldıktan daha sonra 250 mg-1000 mg, 500 mg-1000 mg dozlar arasında doz orantısallığı değerlendirmesi güven aralığı yaklaşımı ile karşılaştırılmıştır. Ancak her bir dozun en yüksek doz ile karşılaştırılmasında hiçbir

doz orantısallığına ulaşamamıştır. Aynı çalışmada abirateron asetatın plazma değerlerinde çok fazla noktada tayin sınırının altında olması abirateron asetatın abiterona hızla dönüştüğünü düşündürmüştür ve doz orantısallığına etki edebileceği hususuna dikkat çekilmiştir (284).

Bardoksolonun 20-80 mg doz aralığında doz orantısallığını test etmek üzere güç modeli kullanılmıştır. Doz orantısallığı için β 'nin belirlenen % 90 güven aralığında olup olmadığı test edilmiştir ve 20 mg-80 mg doz aralığında doz orantısallığı sağlanamadığı görülmüştür. Bardoksolon $EAA_{0-\infty}$ için 20-60 mg aralığında doz orantılı bir artış göstermiş, ancak 60-80 mg aralığına orantısız olarak daha düşük bir artış göstermiştir; C_{maks} değerlerinde ise tüm doz aralığında (20-80 mg) orantısız olarak daha düşük bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (285). RXB ile yaptığımız çalışmada da güç modeli ile orantısallık sağlanamazken ikili karşılaştırmalar sonucunda 3 mg-15 mg ve 10 mg -15 dozlarda her bir farmakokinetik parametre için orantısallığın sağlandığı görülmektedir.

Estradiolün 4 farklı dozu arasındaki orantısallığı test etmek üzere bu dört doza ait log dönüşümlü farmakokinetik verilerden hareketle eğri çizilmiş ve eğimin 0 veya anlamsız olduğu yerde doz orantısallığı olduğu sonucuna varılmıştır. Doz orantısallığını test etmek üzere baseline düzeltilmiş logaritma dönüştürülmüş estradiol ve esteron serum konsantrasyonları ve doz düzeltilmiş EAA ve C_{maks} değerleri kullanılmıştır. Baseline düzeltilmiş estradiol dozlarında tüm dozlarda her iki farmakokinetik parametre için doğrusal doz cevabı elde edilmiştir. Baseline düzeltilmiş estradiol dozlarında doz orantısallığı dört doz içinde sağlanırken baseline düzeltilmiş esteron dozlarında EAA için 5 ve 10 cm^2 dozları dışında orantısallık görülmemiştir. Baseline düzeltilmiş estereon dozlarında C_{maks} için ise test edilen 4 doz için doz orantısallığı sağlanmıştır (286). Bu sonuçlar aynı anda C_{maks} ve EAA için doz orantısallığının sağlanamadığı durumların varlığını göstermektedir.

Paliperidonun 25, 50, 100, 150 mg dozlarda i.m enjeksiyonu sonucu doz orantısallığını test etmek üzere doz normalize edilmiş farmakokinetik veriler kullanılarak doğrusal regresyon analizi yöntemi kullanılmıştır. EAA için doz orantısallığı sağlanırken C_{maks} için doz orantısallığından daha az artış görülmüştür. Her bir dozun güven aralığı yöntemi ile ikişerli olarak 150 mg doz ile karşılaştırılması sonucunda AUC için her bir dozun 150 mg doz ile doz orantısız olduğu gösterilmiştir.

Ancak ara dozların birbirleri ile karşılaştırılması yapılmamıştır (287). Sonuç olarak AUC için paliperidonun doz orantısallığını sağladığı sonucuna varılmıştır. RXB ile yapmış olduğumuz çalışmada da en yüksek dozun diğer dozlarla karşılaştırılması (3 mg-15 mg ve 10 mg -15 mg) sonucunda C_{maks} için % 90 güven aralığında doz orantısallığının sağlandığını söylemek mümkün olmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre doz orantısallığı hesaplamaları yaparken, doz aralığının dar veya geniş olması, hesaplama yöntemini seçmede önemli bir noktayı oluşturmaktadır. Düşük doz olan 3 mg ve 10 mg dozlarda verilen ilacın C_{maks} değeri için 10 mg ile 3 mg arasında doz oranları arasında istatistiksel olarak fark varken 3 mg ile 15 mg doz oranları arasında fark yoktur. Elde edilen bu parametreler ile düşük ve yüksek dozlara ait verilerin karşılaştırılma olanağını sağlanmış, doz orantısallığı artırmak üzere geliştirilen nanosüspansiyon fomülasyonu ile farmakokinetik parametreler iyileştirmiş, biyoyararlanımı olumsuz etkileyen çözünme sorunu aşılmıştır.

Elde edilen bulgular ışığında RXB nanokristal formülasyonu hazırlanarak artan dozlarda farmakokinetik verilerin iyileştirilebileceği bir başka anlatımla yüksek dozlardaki EAA ve C_{maks} için doz orantısallığı sorununun ve açlık koşullarında tamamlanamayan absorpsiyonun nanokristal teknolojisi ile hazırlanan formülasyonlar ile ortadan kaldırılabilceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında yeni oral antikoagülan bir ilaç olan RXB'nin nanokristal formülasyonları hazırlanarak, partikül büyüklüğünün küçültülmesiyle çözünme hızının artırılması böylelikle in vivo biyoyararlanımın tamamlanamadığı dozlarda (≥ 20 mg) absorpsiyonun artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Etkin madde RXB'nin fizikokimyasal karakterizasyonu yapılarak partikül büyüklüğü ve çözünürlüğü, kristal yapısı, erime derecesi belirlenmiştir. Partikül büyüklüğünün mikron boyutlarda olduğu ve çözünürlüğünün zayıf ve pH'dan bağımsız olduğu ve partiküllerinin kristal yapıda olduğu saptanmıştır.
- Nanokristal hazırlanmasında kullanılan stabilizanların partikül büyüklüğü değişimine etkisi incelenmiş ve stabilizan tipi ve miktarının ve sayısının partikül büyüklüğüne küçültülmesine etki ettiği görülmüştür.
- Kullanılan yöntemlerin RXB nanokristali hazırlanmasındaki performansları değerlendirilmiş, partiküllerin UT yöntemi ile ön mikronizasyon işleminden sonra BD ve YH ile hazırlandığında daha iyi sonuçlar elde edileceği sonucuna varılmıştır. Yöntem parametrelerinin her bir yöntem için ayrı ayrı çalışılması sonucunda yöntemlerden herbirinin en iyi partikül dağılımı verdiği noktalar saptanmıştır. Ayrıca kombine teknolojilerin uygulanma sırası değiştirildiğinde elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı, stabilitesinin değiştiği belirlenmiştir.
- P 127, P 603 ve PVP K-30 ile kombine teknolojiler kullanılarak hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonlarının partikül büyüklüğü 1000 nm'nin altında bulunmuştur. Tek başına bir yöntemin kullanıldığı yöntemlere göre partikül büyüklüğünün daha fazla küçüldüğü sonucuna varılmıştır.
- Hazırlanan nanokristal formülasyonlarının çözünürlük ve çözünme hızları toz RXB göre artmıştır. Toz RXB 45 dakika sonundaki % çözünen miktarı % 12,34 iken nanokristal formülasyonlarında 30 dk sonunda % 80'i çözülmüştür.
- Hazırlanan nanosüspansiyonların su içeriğinin uzaklaştırılması sırasında partikül büyüklüğünün artma eğilimindedir, bu durumun önlenmesi için mannitol gibi kriyoprotektanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

- RXB toz ve nanokristal formülasyonlarda yapılan geçirgenlik çalışması sonucunda nanokristal formülasyonlarda toz RXB'a göre geçirgenlik katsayısı artmıştır.
- BSS sınıf II bir ilaç olan RXB'nin çözünürlüğü ve geçirgenlik katsayısı artmıştır.
- Nanokristal olarak hazırlanması ile ayrıca gastrointestinal sistemdeki yapışkanlığın ve kalış süresi artacağından in vivo ortamda biyoyararlanımının artacağı öngörülmüş ve tavşanlar da biyoyararlanım çalışması yapılmıştır. İn vivo sonuçların değerlendirilmesinde, doz orantısallığı hesaplamaları yaparken doz aralığının dar veya geniş olması, hesaplama yöntemi önemli bir noktayı oluşturmaktadır. Düşük doz olan 3 mg ve 10 mg dozlarda verilen ilacın C_{maks} değeri için 10 mg ile 3 mg arasında doz oranları arasında istatistiksel olarak fark varken 3 mg ile 15 mg doz oranları arasında fark yoktur. Elde edilen bu parametreler ile düşük ve yüksek dozlara ait verilerin karşılaştırılma olanağını sağlamış olup nanokristal teknolojisinin doz orantısallığını artırmak üzere geliştirilen nanosüspansiyon fomülasyonu ile farmakokinetik parametreler iyileştirilerek biyoyararlanımı olumsuz etkileyen çözünme hızı artırılabilmiştir.
- RXB'nin nanokristal formülasyonu hazırlanarak artan dozlarda farmakokinetik verilerin iyileştirilebileceği bir başka anlatımla yüksek dozlardaki EAA ve C_{maks} için doz orantısallığı probleminin ve açlık koşullarında tamamlanamayan absorpsiyonun nanokristal teknoloji ile hazırlanan formülasyonlar ile ortadan kaldırılabilceği sonucuna varılmıştır.
- Geliştirilen RXB nanokristal formülasyonunun kullanılacağı oral dozaj şekillerinde, piyasa preparatında 20 mg dozda karşılaşılan doz orantısallığının sağlanamaması ve biyoyararlanımın tamamlanamaması gibi problemler aşılabacaktır ve hasta uyuncu artacaktır.
- Bu tez çalışmasındaki yöntemler bir ürünün geliştirilmesine ve üretilmesine katkı sağlayacak etkili, güvenilir, ekonomiye katkıda bulunacak umut vaadeden formülasyonlar olarak önerilmektedir. Bu geliştirilen formülasyonlardan hareketle endüstriyel boyutta nanokristal hazırlama teknolojileri kullanılarak ticari ürüne yönelik çalışmalar yapılabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Turpie AGG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis – pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2011;105(4):586-96.
2. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, Prandoni P, Bounameaux H, Goldhaber SZ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-based clinical practice guidelines. *CHEST.* 2012;141(2 suppl):e419S-e96S.
3. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe - The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):756-64.
4. Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E, Pesavento R, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica.* 2007;92(2):199-205.
5. Kahn SR, Ginsberg JS. Relationship between deep venous thrombosis and the postthrombotic syndrome. *Arch Intern Med.* 2004;164(1):17-26.
6. Goldhaber SZ, Morrison RB. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Circulation.* 2002;106(12):1436-438.
7. Gruber MP, Bull TM. Pulmonary embolism. Spiro S, Silvestri G, Agustí A, editörler. *Clinical Respiratory Medicine.* Baskı sayısı(4): Saunders; 2012. s. 690-709.
8. Biemond BJ, Perzborn E, Friederich PW, Levi M, Buetehorn U, Büller HR. Prevention and treatment of experimental thrombosis in rabbits with rivaroxaban (BAY 597939) – an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):471-77.
9. Haas S. Rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – lessons from a broad clinical study programme. *Eur J Haematol.* 2009;82(5):339-49.
10. Xarelto; Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(S). Food and Drug Administration; 2009. Rapor no: 022406Orig1s000. [Erişim tarihi:20 Nisan 2018] Erişim adresi:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/022406Orig1s000ClinPharmR.pdf
11. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitza D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: A new oral factor Xa inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(3):376-81.
12. Rivaroxaban for the treatment of deep vein thrombosis and prevention of recurrent deep vein thrombosis and pulmonary embolism.: National Institute for Health and Clinical Excellence.; 2012. [Erişim tarihi:7 Ağustos 2017] Erişim adresi:
<https://www.nice.org.uk/guidance/ta261/resources/rivaroxaban-for-the-treatment-of-deep-vein-thrombosis-and-prevention-of-recurrent-deep-vein-thrombosis-and-pulmonary-embolism-pdf-82600546953157>
13. Xarelto (rivaroxaban) Prescribing Information: Food and Drug Administration; [Erişim tarihi: 10 Mayıs 2017]. Erişim adresi:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022406s004lbl.pdf.

14. Assessment Report-Xarelto International Nonproprietary Name:Rivaroxaban. European Medicines Agency; 2011. Rapor no.: EMA/CHMP/301607/2011. [Erişim tarihi: 2 Ocak 2017] Erişim adresi:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Assessment_Report_-_Variation/human/000944/WC500120736.pdf
15. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X, et al. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. *Pharm Res.* 2013;30(2):307-24.
16. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26.
17. Venkatesh S, Lipper RA. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J Pharm Sci.* 2000;89(2):145-54.
18. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(2):113-20.
19. Assessment report:Xarelto International non-proprietary name: Rivaroxaban. European Medicines Agency; 2013. Rapor no.: EMA/CHMP/794349/2012. [Erişim tarihi:2 Ocak 2017]. Erişim adresi:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Assessment_Report_-_Variation/human/000944/WC500144718.pdf
20. Jens-Uwe A H Junghanns RHM. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications *Int J Nanomedicine* 2008;3(3):295-309
21. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol.* 2004;113(1-3):151-70.
22. Hao L, Wang X, Zhang D, Xu Q, Song S, Wang F, et al. Studies on the preparation, characterization and pharmacokinetics of Amoitone B nanocrystals. *Int J Pharm.* 2012;433(1-2):157-64.
23. Gulsun T, Gursoy RN, Oner L. Design and characterization of nanocrystal formulations containing ezetimibe. *Chem Pharm Bull.* 2011;59(1):41-5.
24. Jinno J-i, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 2006;111(1-2):56-64.
25. Ferrie' res J, Cambou J-P, Ruidavets J-B, Pous J. Trends in acute myocardial infarction prognosis and treatment in Southwestern France between 1985 and 1990 (The MONICA project-Toulouse). *Am J Cardiol.* 1995;75(17):1202-205.
26. Abildstrom SZ, Rasmussen S, Rosén M, Madsen M. Trends in incidence and case fatality rates of acute myocardial infarction in Denmark and Sweden. *Heart.* 2003;89(5):507-11.
27. Ellekjær H, Holmen J, Indredavik B, Terent A. Epidemiology of stroke in innherred, Norway, 1994 to 1996. Incidence and 30-day case-fatality rate. *Stroke.* 1997;28(11):2180-184.

28. Thaler J, Pabinger I, Ay C. Anticoagulant treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: The present state of the art. *Front Cardiovasc Med*. 2015;2:30. doi: 10.3389/fcvm.2015.00030.
29. NÆSs IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, HammerstrØM J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):692-99.
30. Buller HR, Sohne M, Middeldorp S. Treatment of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1554-560.
31. Mueck W, Stampfuss J, Kubitz D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(1):1-16.
32. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e44S-e88S.
33. Weitz JI, Bates SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1843-853.
34. Gong IY, Kim RB. Importance of pharmacokinetic profile and variability as determinants of dose and response to dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. *Can J Cardiol*. 2013;29(7 Suppl):S24-S33.
35. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlman J, Roehrig S. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2005;3:514–21.
36. Capan Y. Biyoyararlanım. Gursøy AZ, editör. *Farmasötik Teknoloji Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2004. s. 159-68.
37. Bioavailability and Bioequivalence Studies For Orally Administered Drug Products-General Considerations. ABD: Food and Drug Administration; 2003. [Erişim tarihi: 12 Mart 2018] Erişim adresi: https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3995B1_07_GFI-BioAvail-BioEquiv.pdf
38. Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted In NDAs or INDs—General Considerations. ABD: Food and Drug Administration; 2014. [Erişim tarihi: 11 Mart 2018] Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm389370.pdf>
39. Dressman J, Amidon G, Reppas C, Shah V. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharm Res*. 1998;15(1):11-22.
40. Waiver of In Vivo Bioavailability And Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on A Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. ABD: Food and Drug Administration; 2017. [Erişim tarihi: 7 Ocak 2018]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf>

41. Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol.* 2008;36(1):43-8.
42. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm.* 2006;321(1):1-11.
43. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 1897;19(12):930-4.
44. Junghanns J-UAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(3):295-310.
45. Liu P. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs.[Doktora tezi] Finlandiya: Helsinki Üniversitesi; 2013.
46. Tarling MM, Toner CC, Withington PS, Baxter MK, Whelpton R, Goldhill DR. A model of gastric emptying using paracetamol absorption in intensive care patients. *Intensive Care Med.* 1997;23(3):256-60.
47. Jamzad S, Fassihi R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide—A technical note. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7(2):E17-E22.
48. Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11(Supplement 2):S73-S80.
49. Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(5):845-62.
50. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):785-96.
51. Müller RH, Jacobs C. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *Int J Pharm.* 2002;237(1–2):151-61.
52. Radtke M. Pure drug nanoparticles for the formulation of poorly soluble drugs *NewDrugs.* 2001;3:62-8.
53. Moschwitz J, H.Muller R. Drug nanocrystals-The universal formulation approach for poorly soluble drugs. *Drug Pharm Sci.* 2007;166:71-88.
54. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today.* 2011;16(7–8):354-60.
55. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals—special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(1):1-9.
56. Hovey D, Pruitt J, Ryde T, Nanoparticulate megestrol formulations Patent no: US7101576 B2. U.S Patent and Trademark Office; 2006.
57. Liversidge G, Jenkins S, Nanoparticulate candesartan formulations Patent no: US20060165806. U.S Patent and Trademark Office; 2006.
58. Ruddy SB, Ryde NP, Solid dose nanoparticulate compositions Patent no: WO2002024163A1. World Intellectual Property Organization; 2002.

59. Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;62(1):3-16.
60. Möschwitzer J, Achleitner G, Pomper H, Müller RH. Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(3):615-9.
61. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine—Challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(5):872-97.
62. Gulsun T, Gursoy RN, Oner L. Nanocrystal technology for oral delivery of poorly water-soluble drugs. *FABAD J Pharm Sci.* 2009;34:55-65.
63. de Waard H, Hinrichs WLJ, Frijlink HW. A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying. *J Control Release.* 2008;128(2):179-83.
64. Martin L, Heinz S, Pharmaceutical colloidal hydrosols for injection Patent no: 2200048. UK Patent; 1998.
65. Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm.* 2013;453(1):126-41.
66. Guo Z, Zhang M, Li H, Wang J, Kougoulos E. Effect of ultrasound on anti-solvent crystallization process. *J Cryst. Growth.* 2005;273(3-4):555-63.
67. Xia D, Quan P, Piao H, Piao H, Sun S, Yin Y, et al. Preparation of stable nitrendipine nanosuspensions using the precipitation-ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2010;40(4):325-34.
68. Rogers T, Gillespie I, Hitt J, Fransen K, Crawl C, Tucker C, et al. Development and characterization of a scalable controlled precipitation process to enhance the dissolution of poorly water-soluble drugs. *Pharm Res.* 2004;21(11):2048-57.
69. Zhang J-Y, Shen Z-G, Zhong J, Hu T-T, Chen J-F, Ma Z-Q, et al. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. *Int J Pharm.* 2006;323(1-2):153-60.
70. Zhang H, Hollis CP, Zhang Q, Li T. Preparation and antitumor study of camptothecin nanocrystals. *Int J Pharm.* 2011;415(1-2):293-300.
71. Badawi A, El-Nabarawi M, El-Setouhy D, Alsammit S. Formulation and stability testing of itraconazole crystalline nanoparticles. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(3):811-20.
72. Liu Y, Cheng C, Liu Y, Prud'homme RK, Fox RO. Mixing in a multi-inlet vortex mixer (MIVM) for flash nano-precipitation. *Chem Eng Sci.* 2008;63(11):2829-42.
73. Miao X, Yang W, Feng T, Lin J, Huang P. Drug nanocrystals for cancer therapy. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2017, e1499. doi: 10.1002/wnan.1499

74. Mou D, Chen H, Wan J, Xu H, Yang X. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. *Int J Pharm.* 2011;413(1–2):237-44.
75. Koradia KD, Parikh RH, Koradia HD. Albendazole nanocrystals: Optimization, spectroscopic, thermal and anthelmintic studies. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017;43:369-78.
76. Ali HSM, York P, Ali AMA, Blagden N. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J Control Release.* 2011;149(2):175-81.
77. Ali HSM, York P, Blagden N. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *Int J Pharm.* 2009;375(1–2):107-13.
78. Lee SH, Heng D, Ng WK, Chan H-K, Tan RBH. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int J Pharm.* 2011;403(1–2):192-200.
79. Wang M, Rutledge GC, Myerson AS, Trout BL. Production and characterization of carbamazepine nanocrystals by electrospraying for continuous pharmaceutical manufacturing. *J Pharm Sci.* 2012;101(3):1178-88.
80. Eerikäinen H, Watanabe W, Kauppinen EI, Ahonen PP. Aerosol flow reactor method for synthesis of drug nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;55(3):357-60.
81. Douroumis D, Fahr A. Nano- and micro-particulate formulations of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;63(2):173-5.
82. Rasenack N, Müller BW. Micron-size drug particles: Common and novel micronization techniques. *Pharm Dev Technol.* 2004;9(1):1-13.
83. Peltonen L, Hirvonen J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials. *Int J Pharm.* 2018;537(1):73-83.
84. Soliman KA, Ibrahim HK, Ghorab MM. Effects of different combinations of nanocrystallization technologies on avanafil nanoparticles: in vitro, in vivo and stability evaluation. *Int J Pharm.* 2017;517(1):148-56.
85. Bansal S, Bansal M, Kumria R. Nanocrystals: Current strategies and trends. *International J Res in Pharm Biomed Sci.* 2012;3(1):406-19.
86. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):3-19.
87. Liversidge GG, Cundy KC, Bishop JF, Czekai DA, Surface modified drug nanoparticles Patent no: US5145684. U.S Patent and Trademark Office; 1992.
88. Peltonen L, Hirvonen J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J Pharm Pharmacol* 2010;62(11):1569-79.

89. Singh SK, Srinivasan KK, Gowthamarajan K, Singare DS, Prakash D, Gaikwad NB. Investigation of preparation parameters of nanosuspension by top-down media milling to improve the dissolution of poorly water-soluble glyburide. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(3):441-6.
90. Tanaka Y, Inkyo M, Yumoto R, Nagai J, Takano M, Nagata S. Nanoparticulation of probucol, a poorly water-soluble drug, using a novel wet-milling process to improve in vitro dissolution and in vivo oral absorption. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(8):1015-23.
91. Li M, Alvarez P, Bilgili E. A microhydrodynamic rationale for selection of bead size in preparation of drug nanosuspensions via wet stirred media milling. *Int J Pharm.* 2017;524(1):178-92.
92. Liversidge GG, Conzentino P. Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. *Int J Pharm.* 1995;125(2):309-13.
93. Bruno JA, Doty BD, Gustow E, Illig KJ, Rajagopalan N, Sarpotdar P. Method of grinding pharmaceutical substances. Patent no: US5518187. U.S Patent and Trademark Office; 1996.
94. Katteboinaa S, Chandrasekhar P VSR, Balaji S. Drug nanocrystals: A novel formulation approach for poorly soluble drugs. *Int J PharmaTech Res.* 2009;682-94.
95. Muller RH, Becker R, Kruss B, Peters K. Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution Patent no: US5858410. U.S Patent and Trademark Office; 1999.
96. Sharma P, Denny WA, Garg S. Effect of wet milling process on the solid state of indomethacin and simvastatin. *Int J Pharm.* 2009;380(1-2):40-8.
97. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm.* 2005;299(1-2):167-77.
98. Lai F, Pini E, Angioni G, Manca ML, Perricci J, Sinico C, et al. Nanocrystals as tool to improve piroxicam dissolution rate in novel orally disintegrating tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79(3):552-8.
99. Pardeike J, Müller RH. Nanosuspensions: A promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18. *Int J Pharm.* 2010;391(1-2):322-9.
100. Parikh I, Selvaraj U. Composition and method of preparing microparticles of water-insoluble substances Patent no: US5922355 A. U.S Patent and Trademark Office; 1999.
101. Dube N, Dutta J, Katti DS. Development of nanostructures for drug delivery applications. *Biomedical Nanostructures: John Wiley & Sons, Inc.;* 2007. s. 139-206.
102. Verma S, Lan Y, Gokhale R, Burgess DJ. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *Int J Pharm.* 2009;377(1-2):185-98.

103. Xiong R, Lu W, Li J, Wang P, Xu R, Chen T. Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension. *Int J Pharm.* 2008;350(1–2):338-43.
104. Al-Kassas R, Bansal M, Shaw J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J Control Release.* 2017;260:202-12.
105. Liua P, Rongb X, Laruc J, Veenc B, Kiesvaarac J, Hirvonena J, et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: preparation and development by wet milling. *Int J Pharm.* 2011;411(1-2):215-22.
106. Pua X, Suna J, Wanga Y, Wanga Y, Liua X, Zhanga P, et al. Development of a chemically stable 10-hydroxycamptothecin nanosuspensions. *Int J Pharm* 2009;379:167–73.
107. Quan P, Xia D, Piao H, Piao H, Shi K, Jia Y, et al. Nitrendipine nanocrystals: Its preparation, characterization, and in vitro–in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(4):1136-43.
108. Dolenc A, Govedarica B, Dreu R, Kocbek P, Srčič S, Kristl J. Nanosized particles of orlistat with enhanced in vitro dissolution rate and lipase inhibition. *Int J Pharm.* 2010;396(1–2):149-55.
109. Keck C, Kobierski S, Mauludin R, Müller RH. Second generation o f drug nanocrystals for delivery o f poorly soluble drugs : Smart crystals technology. *Dosis.* 2008;24(2):124-8.
110. Möschwitzer JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 2013;453(1):142-56.
111. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X. Drug nanocrystals: In vivo performances. *J Control Release.* 2012;160(3):418-30.
112. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):427-40.
113. Van Eerdenbrugh B, Vermant J, Martens JA, Froyen L, Van Humbeeck J, Augustijns P, et al. A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals. *J Pharm Sci.* 2009;98(6):2091-103.
114. Cerdeira AM, Gander B, Mazzotti M. Role of milling parameters and particle stabilization on nanogrinding of drug substances of similar mechanical properties. *Chem Engin Techn.* 2011;34(9):1427-38.
115. Ghosh I, Schenck D, Bose S, Liu F, Motto M. Identification of critical process parameters and its interplay with nanosuspension formulation prepared by top down media milling technology – A QbD perspective. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):719-29.
116. George M, Ghosh I. Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(1–2):142-52.
117. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):456-69.

118. Douroumis D, Fahr A. Stable carbamazepine colloidal systems using the cosolvent technique. *Eur J Pharm Sci* . 2007;30(5):367-74.
119. Lee J, Lee S-J, Choi J-Y, Yoo JY, Ahn C-H. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. *Eur J Pharm Sci*. 2005;24(5):441-9.
120. Sinswat P, Gao X, Yacaman MJ, Williams Iii RO, Johnston KP. Stabilizer choice for rapid dissolving high potency itraconazole particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution. *Int J Pharm*. 2005;302(1–2):113-24.
121. Bilgili E, Afolabi A. A combined microhydrodynamics–polymer adsorption analysis for elucidation of the roles of stabilizers in wet stirred media milling. *Int J Pharm*. 2012;439(1–2):193-206.
122. Liversidge E, Wei L, Stabilization of chemical compounds using nanoparticulate formulations Patent no: US20030054042 A1. U.S Patent and Trademark Office; 2003.
123. Lee J, Cheng Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J Control Release*. 2006;111(1–2):185-92.
124. Lee J. Drug nano- and microparticles processed into solid dosage forms: Physical properties. *J Pharm Sci*. 2003;92(10):2057-68.
125. Chaubal M, Popescu C. Conversion of nanosuspensions into dry powders by spray drying: A case study. *Pharm Res*. 2008;25(10):2302-8.
126. Goldblith SA. Freeze drying and advanced food technology. İngiltere: Academic Press; 1975.
127. Toziopoulou F, Malamataris M, Nikolakakis I, Kachrimanis K. Production of aprepitant nanocrystals by wet media milling and subsequent solidification. *Int J Pharm*. 2017;533(2):324-34.
128. Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(1):13-23.
129. Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm*. 1995;125(1):91-7.
130. Zuo B, Sun Y, Li H, Liu X, Zhai Y, Sun J, et al. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of fenofibrate nanocrystals. *Int J Pharm*. 2013;455(1–2):267-75.
131. Jacobs C, Kayser O, Müller RH. Production and characterisation of mucoadhesive nanosuspensions for the formulation of buprivaquone. *Int J Pharm*. 2001;214(1–2):3-7.
132. Wu Y, Loper A, Landis E, Hettrick L, Novak L, Lynn K, et al. The role of biopharmaceutics in the development of a clinical nanoparticle formulation of MK-0869: a Beagle dog model predicts improved bioavailability and diminished food effect on absorption in human. *Int J Pharm*. 2004;285(1–2):135-46.
133. Zhu T, Ansquer J-C, Kelly MT, Sleep DJ, Pradhan RS. Comparison of the gastrointestinal absorption and bioavailability of fenofibrate and fenofibric acid in humans. *J Clin Pharmacol* 2010;50(8):914-21.

134. Rabinow B, Kipp J, Papadopoulos P, Wong J, Glosson J, Gass J, et al. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int J Pharm.* 2007;339(1–2):251-60.
135. Irizarry LD, McKoy JM, Samaras A, Lurie RH. Cremophor EL-containing paclitaxel- induced anaphylaxis: a call to action. *Comm Oncol.* 2009;6(63):132-6.
136. Böhm BHL, Müller RH. Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. *Pharm Sci Tech Today.* 1999;2(8):336-9.
137. Pandey S. Itraconazole nanosuspension meant for oral use: Development of formulation, characterization and in vitro comparison with some marketed formulations. *Der Pharm Lett.* 2010;2(1):162-71.
138. Xiong R, Lu W, Yue P, Xu R, Li J, Chen T, et al. Distribution of an intravenous injectable nimodipine nanosuspension in mice. *J Pharm Pharmacol* 2008;60(9):1155-9.
139. Baert L, van 't Klooster G, Dries W, François M, Wouters A, Basstanie E, et al. Development of a long-acting injectable formulation with nanoparticles of rilpivirine (TMC278) for HIV treatment. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(3):502-8.
140. Zheng JY, Bosch HW. Sterile filtration of Nanocrystal™ drug formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 1997;23(11):1087-93.
141. Mauludin R, Müller RH, Keck CM. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm.* 2009;370(1–2):202-9.
142. Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm.* 2010;399(1–2):129-39.
143. Piao H, Kamiya N, Hirata A, Fujii T, Goto M. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium. *Pharm Res.* 2008;25(4):896-901.
144. Shegokar R, Shaal LA, Müller RH, editors. Local anaesthetic nanocrystal as prologed release formulation. First Combined Annual Meeting of the International Pharmaceutical Federation, PSWC and AAPS 2010; New Orleans, Louisiana, USA,; PSWC and AAPS
145. Yu Q, Wu X, Zhu Q, Wu W, Chen Z, Li Y, et al. Enhanced transdermal delivery of meloxicam by nanocrystals: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Asian J Pharm Sci.* 2017(in press).
146. Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, Maltese A, Puleo A, Puglisi G. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur J Pharm Sci.* 2002;16(1–2):53-61.
147. Bucolo C, Maltese A, Puglisi G, Pignatello R. Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an Eudragit RS100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic Res.* 2002;34(5):319-23.
148. Jacobs C, Müller R. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm Res.* 2002;19(2):189-94.

149. Chiang P-C, Hu Y, Thurston A, Sommers CD, Guzova JA, Kahn LE, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the suitability of using fluticasone and an acute rat lung inflammation model to differentiate lung versus systemic efficacy. *J Pharm Sci.* 2009;98(11):4354-64.
150. Shegokar R. SKK, Müller R.H., . Targeting to Latent HIV reservoirs: production optimization and evaluation of nevirapine nanosuspensions, (Poster Abstract) 69th International Congress of FIP; Istanbul, Turkey. 2009
151. Chogale M, Ghodake V, Patravale V. Performance parameters and characterizations of nanocrystals: A brief review. *Pharmaceutics.* 2016;8(3): E26 doi: 10.3390/pharmaceutics8030026.
152. Li W, Quan P, Zhang Y, Cheng J, Liu J, Cun D, et al. Influence of drug physicochemical properties on absorption of water insoluble drug nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2014;460(1):13-23.
153. Kumar S, Jog R, Shen J, Zolnik B, Sadrieh N, Burgess DJ. In vitro and in vivo performance of different sized spray-dried crystalline itraconazole. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):3018-28.
154. Hu L, Kong D, Hu Q, Gao N, Pang S. Evaluation of high-performance curcumin nanocrystals for pulmonary drug delivery both in vitro and in vivo. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1):381.
155. Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2013;49(2):175-86.
156. Peltonen L, Strachan C. Understanding critical quality attributes for nanocrystals from preparation to delivery. *Molecules.* 2015;20(12):19851.
157. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Wang F, Wang H, et al. Paclitaxel nanosuspension coated with P-gp inhibitory surfactants: II. Ability to reverse the drug-resistance of H460 human lung cancer cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2014;117:122-7.
158. Varma MVS, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: Effect on solubility and permeability in vitro, in situ and in vivo. *Eur J Pharm Sci.* 2005;25(4):445-53.
159. Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF, Croft SL. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm.* 2003;254(1):73-5.
160. Liu C, Chang D, Zhang X, Sui H, Kong Y, Zhu R, et al. Oral fast-dissolving films containing lutein nanocrystals for improved bioavailability: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(8):2957-64
161. Guo Y, Wang Y, Xu L. Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(3):223-9.
162. Pokharkar VB, Malhi T, Mandpe L. Bicalutamide nanocrystals with improved oral bioavailability: in vitro and in vivo evaluation. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):660-6.

163. Quan P, Shi K, Piao H, Piao H, Liang N, Xia D, et al. A novel surface modified nitrendipine nanocrystals with enhancement of bioavailability and stability. *Int J Pharm.* 2012;430(1–2):366-71.
164. Jiang T, Han N, Zhao B, Xie Y, Wang S. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of simvastatin nanocrystal prepared by sonoprecipitation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(10):1230-9.
165. Ghosh I, Schenck D, Bose S, Ruegger C. Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: Effect of Vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(4):718-28.
166. Sauron R, M. Wilkins, Jessent V. Absence of a food effect with a 145 mg nanoparticle fenofibrate tablet formulation. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006;44(2):64-70.
167. Balimane PV, Chong S, Morrison RA. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(1):301-12.
168. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1990;79:476-82.
169. Jackson MJD. Drug transport across gastrointestinal epithelia. Johnson LR, editor. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, . Baskı sayısı (2) New York: Raven Press; 1987. s. 1597-621.
170. Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem.* 2001;1(5):385-401.
171. Raeissi SD, Hidalgo IJ, Segura-Aguilar J, Artursson P. Interplay between CYP3A-mediated metabolism and polarized efflux of terfenadine metabolites in intestinal epithelial Caco-2 (TC7) cell monolayers. *Pharm Res* 1999;16(5):625-32.
172. Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1991;8(4):305-30.
173. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):186-98.
174. Swaan PW. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm Res.* 1998;15(6):826-34.
175. Davis JM. Basic techniques and media, the maintenance of cell lines, and safety. *Animal Cell Culture: John Wiley & Sons*; 2011. s. 91-151.
176. Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. İngiltere: John Wiley&Sons; 2000.
177. Freshney R. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. Baskı sayısı(3). NewYork: Wiley-Liss; 1994.
178. Hilgers A, Conradi R, Burton P. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res.* 1990;7(9):902-10.

179. Audus K, Bartel R, Hidalgo I, Borchardt R. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res.* 1990;7(5):435-51.
180. Hunter J, Jepson MA, Tsuruog T, Simmons NL, Hirst BH. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *The J Biol Chem*, 268. 1993;268:14991-7.
181. Walle UK, Galijatovic A, Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(3):431-8.
182. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005;1(2):175-85.
183. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1997;14(3):221-86.
184. Legen I, Salobir M, Kerč J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *Int J Pharm.* 2005;291(1-2):183-8.
185. Kreutz R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundam Clin Pharmacol.* 2012;26(1):27-32.
186. Plosker G. Rivaroxaban: a review of its use in acute coronary syndromes. *Drugs.* 2014;74(4):451-64.
187. Chemistry Review (Rivaroxaban). Food and Drug Administration; 2011. Rapor no: 202439Orig1s000 [Erişim tarihi:15 Eylül 2015]. Erişim adresi:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202439Orig1s000ChemR.pdf
188. Grunenberg A, Lenz J, Braun GA, Keil B, Thomas CR. Neue polymorphe form und die amorphe form von 5-chlor-n- ((5s) -2-0x0-3-[4-(3-oxo-4-morpholiny) -phenyl] -1,3-oxazolidin-5-yl} -methyl) -2- thiophencarboxamid Patent no: WO2007039132 A1. World Intellectual Property Organization; 2007.
189. Rivaroxaban [Internet]. Pubchem. 2015. [Erişim tarihi: 15 Mayıs 2015] Erişim adresi: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivaroxaban#section=Top>.
190. Product Block Rivaroxaban (CAS 366789-02-8) Santa Cruz Biotechnology; [Erişim tarihi:21 Kasım 2015]. Erişim adresi: <http://www.scbt.com/datasheet-208311-rivaroxaban.html> .
191. Takács-Novák K, Szőke V, Völgyi G, Horváth P, Ambrus R, Szabó-Révész P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;83:279-85.
192. Rivaroxaban DrugBank [Erişim tarihi: 21 Kasım 2015] Erişim adresi: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06228>.
193. Satyanarayana P, Madhavi AS. New spectrophotometric methods for the quantitative estimation of rivaroxaban in formulations. *Int J Res Rev Pharm Appl Sci.* 2(4):611-20.

194. Çelebier M, Kaynak MS, Altınöz S, Sahin S. UV spectrophotometric method for determination of the dissolution profile of rivaroxaban. *Dissolution Tech.* 2014;56-9.
195. Sekaran CB, Bind VH, Damayanthi MR, Sireesha A. Development and validation of UV spectrophotometric method for the determination of rivaroxaban. *Der Pharma Chemica.* 2013;5(4):1-5.
196. Sekhar KC, Vani PS, Lakshmi AD, Ch.LL.Devi, Barik A, Devanaboyina N. A new method development and validation for analysis of rivaroxaban in formulation by rp hplc. *Res Desk,.* 2012;1(1):24-33.
197. Satyanarayana P, Madhavi AS. RP-HPLC method development and validation for the analysis of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Science Innovations and Discoveries.* 2012;2(1):226-31.
198. Kasad PA, Muralikrishna KS. Design and validation of dissolution profile of rivaroxaban by using RP-HPLC method in dosage form. *Asian J Pharm Analy.* 2013;3(3):75-8.
199. Çelebier M, Reçber T, Koçak E, Altınöz S. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian J Pharm Sci.* 2013;49(2):359-66.
200. Nallagatla D, Ra VB, Reddy BS. A novel RP-HPLC method for the quantification of rivaroxaban in formulations. *Int J Pharma and Bio Sciences.* 2013 4(4):756-64.
201. Prajapati AM, Patel HA. Simultaneous RP-HPLC method development and validation of clopidogrel and rivaroxaban in synthetic mixture. *Int J Pharmacy.* 2015;5(2):610-3.
202. Seshamamba BSV, Venkata PV, Satyanarayana, Sekaran CB. Application of stability indicating HPLC method with uv etector to the analysis of rivaroxaban in bulk and tablet dosage form. *Chem Sci Trans.* 2014;3(4):1546-54.
203. Korostelev M, Bihan K, Ferreol L, Tissot N, Hulot J-S, Funck-Brentano C, et al. Simultaneous determination of rivaroxaban and dabigatran levels in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;100:230-5.
204. Abdallah MA, Al-Ghobashy MA, Lotfy HM. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC,TLC-densitometry and LC/MS/MS: Application to pre-formulation studies. *Bull Facul Pharm, Cairo Univ.* 2015;53:53–61.
205. Çelebier M, Reçber T, Koçak E, Altınöz S, Kır S. Determination of rivaroxaban in human plasma by solid-phase extraction–high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2015:1-5.
206. Rao P, Cholleti V, Reddy V. Stability-indicating UPLC method for determining related substances and degradants in Rivaroxaban. *Int J Res Pharm Sci.* 2015;5(2):17-24.

207. Harenberg J, Krämer R, Giese C, Marx S, Weiss C, Wehling M. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32(3):267-71.
208. Samama MM, Genevieve Contant, Spiro TE, Perzborn E, Flem LL, Guinet CI, et al. Evaluation of the prothrombin time for measuring rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls: Results of a multicenter field trial. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;18(2):150-8.
209. Iqbal M, Khalil NY, Imam F, Khalid Anwer M. A validated high-throughput UHPLC-MS/MS assay for accurate determination of rivaroxaban in plasma sample. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;39(1):79-88.
210. Rohde G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;872(1):43-50.
211. Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(5):1056-64.
212. Zhang W-l, Lou D, Zhang D-t, Zhang Y, Huang H-j. Determination of rivaroxaban, apixaban and edoxaban in rat plasma by UPLC–MS/MS method. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42(2):205-11.
213. Assessment Report For Xarelto International Nonproprietary Name: Rivaroxaban: European Medicines Agency; 2008. Rapor no.: EMEA/543519/2008 [Erişim tarihi: 15.09.2017] Erişim adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Public_assessment_report/human/000944/WC500057122.pdf
214. Xarelto 15 mg Tablet Kısa Ürün Bilgisi. [Erişim tarih: 5 Aralık 2017] Erişim adresi: <https://www.bayer.com.tr/static/documents/KUB/XARELTO%C2%AE%2015%20mg.pdf>
215. Turpie AGG, Lassen MR, Eriksson BI, Gent M, Berkowitz SD, Misselwitz F, et al. Rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism after hip or knee arthroplasty. *Thromb Haemost*. 2011;105(3):444-53.
216. Manesh R, M.D.Patel, Kenneth W. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011; 365:883-9.
217. Bauersachs R, Berkowitz S, Brenner B, Buller H, Decousus H. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2010;363:2499-510.
218. Buller H, Prins M, Lensin A. Oral Rivaroxaban for the Treatment of Symptomatic Pulmonary Embolism. *T N Engl J Med*. 2012;366:1287-97.
219. Kubitza D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(12):873-80.

220. Kubitza D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(4):412-21.
221. Kubitza D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M. Safety, tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rivaroxaban—an oral, direct factor xa inhibitor—are not affected by aspirin. *J Clin Pharmacol* 2006;46(9):981-90.
222. Weinz C, Buetehorn U, Daehler HP, Kohlsdorfer C, Pleiss U, Sandmann S, et al. Pharmacokinetics of BAY 59-7939 – an oral, direct Factor Xa inhibitor – in rats and dogs. *Xenobiotica.* 2005;35(9):891-910.
223. Stampfuss J, Kubitza D, Becka M, Mueck W. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2013;51(7):549-61.
224. Kubitza D, Becka M, Roth A, Mueck W. Dose-escalation study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in healthy elderly subjects. *Curr Med Res Opin.* 2008;24(10):2757-65.
225. Kubitza D, Becka M, Zuehlsdorf M, Mueck W. Effect of food, an antacid, and the h2 antagonist ranitidine on the absorption of BAY 59–7939 (rivaroxaban), an oral, direct factor xa inhibitor, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2006;46(5):549-58.
226. Zhao X, Sun P, Zhou Y, Liu Y, Zhang H, Mueck W, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single/multiple doses of the oral, direct Factor Xa inhibitor rivaroxaban in healthy Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(1):77-88.
227. Sabarinath SN, Mcdowell T-Y. Xarelto; Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(S). Food and Drug Administration; 2011. Rapor no: 202439Orig1s000. [Erişim tarihi: 27 Nisan 2018] Erişim adresi: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202439Orig1s000ClinPharmR.pdf
228. Gnoth MJ, Buetehorn U, Muenster U, Schwarz T, Sandmann S. In vitro and in vivo p-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(1):372-80.
229. Gong IY, Mansell SE, Kim RB. Absence of both mdr1 (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) transporters significantly alters rivaroxaban disposition and central nervous system entry. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;112(3):164-70.
230. Ludden TM. Nonlinear Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1991;20(6):429-46.
231. Eisenblaetter T, Teichert L. Dose linearity and proportionality. In: Vogel HG, Maas J, Geabuer A, editors. *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology.* Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2011.
232. Cawello W, Brett M, Weimann H-j, Zimmerman H, Pabst G, Sierakowski B, et al. Parameters for compartment-free pharmacokinetics: standardisation of study design, data analysis, and reporting. Germany. Shaker Verlag GmbH; 1999.

233. Frick A, Marshallsay C, Steintraesser W. Clinical studies – typical designs. In: Vogel HG, Maas J, Mayer D, Hock FJ, editors. Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006.
234. Hummel J, McKendrick S, Brindley C, French R. Exploratory assessment of dose proportionality: review of current approaches and proposal for a practical criterion. *Pharm Stat.* 2009;8(1):38-49.
235. Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA, Farid NA, Welch PA, Callaghan JT, et al. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. *Pharm Res.* 2000;17(10):1278-83.
236. Sethuraman VS, Leonov S, Squassante L, Mitchell TR, Hale MD. Sample size calculation for the Power Model for dose proportionality studies. *Pharm Stat.* 2007;6(1):35-41.
237. Yucheng S, Yingchun H, Xiaohui H, Juan Y, Kun W, Qingshan Z. Systematic evaluation of dose proportionality studies in clinical pharmacokinetics. *Curr Drug Metab.* 2010;11(6):526-37.
238. Kim YH, Choi HY, Noh Y-H, Lee SH, Lim H-S, Kim C, et al. Dose proportionality and pharmacokinetics of carvedilol sustained-release formulation: a single dose-ascending 10-sequence incomplete block study. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:2911-8.
239. Sun J, Zhang L, Song J, Tian S, Huang C, Feng Z, et al. Pharmacokinetic study of salvianolic acid A in beagle dog after oral administration by a liquid chromatography–mass spectrometry method: A study on bioavailability and dose proportionality. *J Ethnopharmacol.* 2013;148(2):617-23.
240. Schmitz NS, Krach LE, Coles LD, Mishra U, Agarwal SK, Cloyd JC, et al. A randomized dose escalation study of intravenous baclofen in healthy volunteers: Clinical tolerance and pharmacokinetics. *PM&R.* 2016; 9(8):743-750.
241. Oberyé JLL, Mannaerts BMJL, Huisman JAM, Timmer CJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran). part II. dose-proportionality and gonadotropin suppression after multiple doses of ganirelix in healthy female volunteers. *Ferti Ster.* 1999;72(6):1006-12.
242. Guideline on The Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency 2010. [Erişim tarihi:16 Kasım] 2015 Erişim adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf
243. Dissolution Methods (rivaroxaban) [Internet]. Food and Drug Administration. 2015 [Erişim tarihi:16.Kasım 2015]. Erişim adresi: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm.
244. Validation of Analytical Procedures:Text and Methodolgy Q2(R1) The International Council for Harmonisation (ICH); 2005. [Erişim tarihi:16.Kasım 2017]. Erişim adresi:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

245. Guideline on Bioanalytical Method Validation. European Medicines Agency; 2011. [Erişim tarihi:16.Kasım 2017]. Erişim adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
246. Bioanalytical Method Validation ABD: Food and Drug Administration; 2013. [Erişim tarihi:16.Kasım 2017]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf>
247. Ludescher J, Sturm H, Griesser U, Ziegert-Knepper RE, Pichler A, Haddow M, Crystalline form of rivaroxaban dihydrate Patent no: US20130245017 A1. U.S Patent and Trademark Office; 2013 .
248. Rao RN, Kuntamukkala R. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. RSC Advan. 2014;4(44):23155-67.
249. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res. 1995;12(3):413-20.
250. Mohan RD, Venkat RB. Amorphous coprecipitates of rivaroxaban. Patent no: WO2014016842 A1. World Intellectual Property Organization; 2014.
251. Grunenberg A, Lenz J, Braun GA, Keil B, Thomas CR. Polymorphous form of 5-chloro-N-({(5S)-2-oxo-3[4-(3-oxo-4-morpholinyl)-phenyl]-1,3-oxazolidine-5-yl}-methyl)-2-thiophene carboxamide Patent no: US8188270 B2. U.S Patent and Trademark Office; 2012.
252. Gschwind L, Rollason V, Daali Y, Bonnabry P, Dayer P, Desmeules JA. Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the Caco-2 Cell Model. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2013;113(4):259-65.
253. Jacobs C, Kayser O, Müller RH. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. Int J Pharm. 2000;196(2):161-4.
254. Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. Int J Pharm. 2004;284(1-2):109-22.
255. Choi J-Y, Yoo JY, Kwak H-S, Uk Nam B, Lee J. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. Curr Appl Phys. 2005;5(5):472-4.
256. Salazar J, Ghanem A, Müller RH, Möschwitzer JP. Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. Eur J Pharm Biopharm. 2012;81(1):82-90.
257. Liu P, Rong X, Laru J, van Veen B, Kiesvaara J, Hirvonen J, et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. Int J Pharm. 2011;411(1-2):215-22.

258. Bushrab FN, Müller RH. Nanocrystals of poorly soluble drugs for oral administration. *New Drugs*. 2003;5:20-2.
259. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(15):1688-713.
260. Bresciani M, Magarotto L, Dobetti L, Process of thermodynamical activation of water-insoluble drugs loaded into cross-linked polymers. Patent no: US8889182 B2. U.S Patent and Trademark Office; 2014.
261. Sahoo NG, Kakran M, Shaal LA, Li L, Müller RH, Pal M, et al. Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. *J Pharm Sci*. 2011;100(6):2379-90.
262. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinšek O. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *Int J Pharm*. 2009;376(1–2):204-12.
263. Jackson CL, McKenna GB. The melting behavior of organic materials confined in porous solids. *J Chem Phys*. 1990;93(12):9002-11.
264. Zhangab D, Tianwei Tana, Gaob L, Zhaob W, Wangb P. Preparation of azithromycin nanosuspensions by high pressure homogenization and its physicochemical characteristics studies. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(5):569-75.
265. Morakul B, Suksiriworapong J, Leanpolchareanchai J, Junyaprasert VB. Precipitation-lyophilization-homogenization (PLH) for preparation of clarithromycin nanocrystals: Influencing factors on physicochemical properties and stability. *Int J Pharm*. 2013;457(1):187-96.
266. Zhang J, Huang Y, Liu D, Gao Y, Qian S. Preparation of apigenin nanocrystals using supercritical antisolvent process for dissolution and bioavailability enhancement. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;48(4–5):740-7.
267. Teeranachaideekul V, Junyaprasert VB, Souto EB, Müller RH. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. *Int J Pharm*. 2008;354(1–2):227-34.
268. Muller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I.Nielloud F, Marti-Mestres G. editörler. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*. New York.: Marcel Decker Inc.; 2000.
269. Buckton G, Beezer AE. The relationship between particle size and solubility. *Int J Pharm*. 1992;82(3):R7-R10.
270. Hammond RB, Pencheva K, Roberts KJ, Auffret T. Quantifying solubility enhancement due to particle size reduction and crystal habit modification: Case study of acetyl salicylic acid. *J Pharm Sci*. 2007;96(8):1967-73.
271. He X. Integration of physical, chemical, mechanical, and biopharmaceutical properties in solid oral dosage form development. Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, editörler. *Developing Solid Oral Dosage*. New York: Academic Press; 2009.
272. Verma S, Kumar S, Gokhale R, Burgess DJ. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *Int J Pharm*. 2011;406(1):145-52.

273. Drews TO, Tsapatsis M. Model of the evolution of nanoparticles to crystals via an aggregative growth mechanism. *Microporous Mesoporous Mater.* 2007;101(1–2):97-107.
274. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2) The International Council for Harmonisation (ICH); 2003. [Erişim tarihi:16 Kasım] 2015 Erişimadresi:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf
275. Li Y, Dong L, Jia A, Chang X, Xue H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded traditional chinese medicine. *Int J Biol Macromol.* 2006;38(3–5):296-9.
276. Masungi C, Borremans C, Willems B, Mensch J, Dijck AV, Augustijns P, et al. Usefulness of a novel Caco-2 cell perfusion system. I. in vitro prediction of the absorption potential of passively diffused compounds. *J Pharm Sci.* 2004;93(10):2507-21.
277. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26.
278. Tuomela A, Hirvonen J, Peltonen L. Stabilizing agents for drug nanocrystals: Effect on bioavailability. *Pharmaceutic.* 2016;8(2):16.
279. Susarla R, Afolabi A, Patel D, Bilgili E, Davé RN. Novel use of superdisintegrants as viscosity enhancing agents in biocompatible polymer films containing griseofulvin nanoparticles. *Powder Tech.* 2015;285:25-33.
280. Fu Q, Ma M, Li M, Wang G, Guo M, Li J, et al. Improvement of oral bioavailability for nisoldipine using nanocrystals. *Powder Techn.* 2017;305:757-63.
281. Bhakay A, Merwade M, Bilgili E, Dave RN. Novel aspects of wet milling for the production of microsuspensions and nanosuspensions of poorly water-soluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(8):963-76.
282. Tuomela A, Liu P, Puranen J, Rönkkö S, Laaksonen T, Kalesnykas G, et al. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: Reduction of elevated intraocular pressure in vivo. *Int J Pharm.* 2014;467(1):34-41.
283. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001;21(1):15-23.
284. Inoue K, Shishido A, Vaccaro N, Jiao J, Stieltjes H, Bernard A, et al. Pharmacokinetics of abiraterone in healthy Japanese men: dose-proportionality and effect of food timing. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75(1):49-58.
285. Teuscher NS, Kelley RJ, Dumas EO, Klein CE, Awni WM, Meyer CJ. A food effect study and dose proportionality study to assess the pharmacokinetics and safety of bardoxolone methyl in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2014;3(4):314-20.
286. Hossain M, Quebe-Fehling E, Sergejew T, Schmidt G, Skerjanec A, Ibarra de Palacios P, et al. Dose proportionality study of four doses of an estradiol transdermal system, Estradot. *Maturitas.* 2003;46(3):173-85.

287. Cleton A, Rossenu S, Crauwels H, Berwaerts J, Hough D, Gopal S, et al. A single-dose, open-label, parallel, randomized, dose-proportionality study of paliperidone after intramuscular injections of paliperidone palmitate in the deltoid or gluteal muscle in patients with schizophrenia. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(9):1048-57.



8.EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575

Sayı: 52338575

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 05.11.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2015/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/84
KARAR NUMARASI	: 2015/84 – 11
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof. Dr. Levent ÖNER
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	Dr. Ecz. Melike Hacer ÖZKAN ve Uzm. Ecz. Huriye DEMİR
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Selma ŞAHİN ve Tekn. Erdoğan AKSAY
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 12 adet yeni Zelanda Tavşanı (2500-3000g)

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Levent ÖNER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2015/84 kayıt numaralı **"Oral Antikoagülan Rivaroksaban'ın Doz Orantısallığını Sağlamak Üzere Geliştirilen Nanokristal Formülasyonlarının Tavşanlarda Biyoyararlanım Çalışması ile İn Vivo Değerlendirilmesi"** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

1. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Nanocrystals Using High Pressure Homogenization and Wet Milling Methods, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA. (Özet bildiri)
2. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Preparation of Rivaroxaban Nanocrystals with Wet Ball Milling, 77th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 10-14 Eylül 2017, Seul, Kore Cumhuriyeti (Özet bildiri).
3. **H. Demir**, T. Gulsun, E. Sener, S. Sahin, L. Oner, Estimation of Rivaroxaban Nanocrystals Permeability across Caco-2 Cell Monolayers by LC-MS/MS, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Colorado, USA .(Özet bildiri)
4. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Effect Of Milling Time and Homogenization Cycle on The Particle Size Distribution, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 September 2016, Antalya- Türkiye. (Özet bildiri)
5. **H. Demir**, T. Gulsun, S. Sahin, L. Oner, 6th BBBB - Conference On Pharmaceutical Sciences: Strategies To Improve The Quality And Performance Of Modern Drug Delivery Systems, Preparation and Characterization of Rivaroxaban Nanocrystals, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya.(Özet bildiri)
6. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Preparation of Rivaroxaban Nanocrystals By Top Down Methods, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya, Türkiye. (Özet bildiri)

9.ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

İsim : Huriye Demir Kabaş
 Doğum Tarihi ve Yeri : 30.10.1984, AKSARAY
 Uyuğu :Türkiye Cumhuriyeti
 Cep Telefonu : 0 505 824 49 86
 E-Mail Adresi : huriye_demir@yahoo.com

II- Eğitimi

Doktora : H.Ü Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı 2011-

Yüksek Lisans :H.Ü Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı 2007-2009

Lisans 2 : Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi 2012-2016

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2002-2006

Lise : Aksaray Hazım Kulak Anadolu Lisesi 1995-2002

III-Mesleki Deneyimi

Daha Önce Çalıştığı Yerler ve İş Deneyimi

- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Farmakoekonomi Daire Başkanlığı Fiyatlandırma Departmanı 2006-2007
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Ruhsatlandırma Daire Başkanlığı Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Departmanı 2007-2011
- Sinop Atatürk Devlet Hastanesi Eczane Birimi-2011-2013
- Mülga Sinop Kamu Hastaneleri Kurumu-Stok Yönetimi ve Hastane Eczacılığı Birimi 2013- 2017
- Sinop İl Sağlık Müdürlüğü-Tıbbi Cihaz ve İlaç Birimi 2018- halen
- Akılcı İlaç Kullanımı Hastaneler İl Temsilcisi- devam etmekte

Staj

- Bozkurt Eczanesi- Aksaray (2004)
- Eczacıbaşı İlaç Sanayi- Kırklareli (2005)

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yüksek Lisans Tez Konusu

Zayıf Asit Sınıf II İlaçların Sınıf I İlaç Olarak Değerlendirilebilmesi Üzerine Çalışmalar (Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Levent ÖNER; İkinci Danışman: Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN)

Doktora Tez Konusu

Rivaroksaban Nanokristallerinin Hazırlanması ve In Vitro - In Vivo Değerlendirilmesi (Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Levent ÖNER; İkinci Danışman: Prof. Dr. Selma ŞAHİN)

Yapılan Projeler

1. Nanokristal Teknolojisinin İlaç Biyoyararlanımına Etkisi. 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı TÜBİTAK (2013- 2015), (Proje no: 113S200)- Araştırmacı
2. Antikoagülan Rivaroksabanın Doz Orantısallığını Sağlamak Üzere Geliştirilen Nanokristal Formülasyonlarının Tavşanlarda Biyoyararlanım Çalışması İle İn Vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Hızlı Destek Projesi ((2017-2017), Proje no: THD-2017-13071)-Araştırmacı

Poster Bildirileri

1. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Nanocrystals Using High Pressure Homogenization and Wet Milling Methods, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando, USA
2. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Preparation of Rivaroxaban Nanocrystals with Wet Ball Milling, 77th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 10-14 Eylül 2017, Seul, Kore Cumhuriyeti
3. **H. Demir**, T. Gülsün, E. Sener, S. Sahin, L. Oner, Estimation of Rivaroxaban Nanocrystals Permeability across Caco-2 Cell Monolayers by LC-MS/MS, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Colorado, USA

4. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Effect Of Milling Time and Homogenization Cycle on The Particle Size Distribution, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 September 2016, Antalya- Türkiye,
5. **H. Demir**, T. Gulsun, S. Sahin, L. Oner, 6th BBBB - Conference On Pharmaceutical Sciences: Strategies To Improve The Quality And Performance Of Modern Drug Delivery Systems, Preparation and Characterization of Rivaroxaban Nanocrystals, 10-12 Eylül 2015, Helsinki, Finlandiya
6. **H. Demir**, S. Sahin, L. Oner, Preparation of Rivaroxaban Nanocrystals By Top Down Methods, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya, Türkiye
7. **H. Demir**, Ü. Koçkan, B. Arıca - Yegin L. Oner, Prediction of Etodolac IR Tablets Dissolution Using Artificial Neural Network (ANN) Based on Multilayer Perceptrons, 15th International Pharmaceutical Technology Symposium, 13-15 Eylül 2010, Antalya, Türkiye

Yayınlar

1. H. Demir B. Arica Yegin, L. Oner, Evaluation of Solubility Class of Weak Acidic Drug: Etodolac. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2009: 38(1 Suppl):80-82,
2. H. Demir B. Arica Yegin, L. Oner, Application of Artificial Neural Network Model in Predicting Dissolution Data and Determining Effect of pH Combined with Surfactant on Solubility and Dissolution of Weak Acid Drug Etodolac , Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018 submitted

Hakemlikler:

AAPS PharmSciTech, Springer, Ocak 2018

Katıldığı Kongreler, Sempozyumlar vb.

1. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2016, Antalya, Türkiye

2. 6th BBBB - Conference On Pharmaceutical Sciences: Strategies To Improve The Quality And Performance Of Modern Drug Delivery Systems, 2015, Helsinki-Finlandiya
3. Akılcı İlaç Kullanımı İl Koordinatörlükleri ve Tıbbi Cihaz Uygulamaları Değerlendirme Toplantısı, 2015, İstanbul,
4. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2014, Antalya, Türkiye
5. 10.Türkiye Eczacılık Kongresi,2010, Ankara, Türkiye
6. 15th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2010, Antalya-Türkiye
7. 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2009, Antalya, Turkey
8. 14th International Pharmaceutical Technology Symposium “Overcoming biological barriers in innovative delivery systems” 2008, Antalya – Türkiye
9. Impurities in Pharmaceutical: Scientific and Regulatory Aspects Meeting, TÜFTAD, 2009, İstanbul-Türkiye
10. Ruhsatlandırma ve Biyoeşdeğerlik Yönünden Sabit Dozlu Kombinasyonlarda Son Gelişmeler, IDE 2009,Ankara, Türkiye
11. Symposium on Bioavailability/Bioequivalence and Regulatory Issues, FATUM,2008, İstanbul,Türkiye
12. Türkiye’de İlaç Fiyatlandırma ve Geri Ödemede Güncel Yaklaşımlar, FATUM, 2007,Ankara,Türkiye
13. 4.Ulusal Eczacılık Fuarı, 2005, İstanbul, Türkiye