T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

EKSEMESTAN YÜKLÜ KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN SİTU DEĞERLENDİRMELER

BURCU TİMUR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2024


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

EKSEMESTAN YÜKLÜ KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN SİTU DEĞERLENDİRMELER

Burcu TİMUR

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2024

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

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

Burcu TİMUR
26 / 01 / 2024

EKSEMESTAN YÜKLÜ KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN SİTU DEĞERLENDİRMELER

(Doktora Tezi)

Burcu TİMUR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Eksemestan meme kanserinin hormonal tedavisinde kullanılan, kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli östrojen sentezini inhibe eden bir aromataz inhibitörüdür. Tez çalışması kapsamında eksemestanın suda düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanım sorununun kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SEDDS) formülasyon stratejisi yaklaşımıyla çözülmesi amaçlanmıştır. SEDDS formülasyonlar etkin madde çözünmüş halde taşıdığından düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar için umut vadeden bir yaklaşımdır. Bu amaçla, eksemestan yüklü SEDDS formülasyonları Box-Behnken deneysel tasarım yaklaşımı ile Design Expert® V11 programı kullanılarak geliştirilmiştir. Hazırlanan eksemestan yüklü SEDDS formülasyonları damlacık boyutu, polidispersite indeksi, seyreltme ve pH'ya dayanıklılık, viskozite, %Transmittans, stabilite ve in vitro çözünme hızı çalışmaları ile değerlendirilmiştir. SEDDS'lerin antiproliferatif etkinliği MCF-7 hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Formülasyonlar, eksemestan çözeltisine göre daha düşük hücre canlılığı sağlamıştır. SEDDS formülasyonlardaki yağ oranı, sindirilebilir sürfaktan varlığı, kosolvan kullanımı ve miktarının SEDDS formülasyonun performansına etkisi in vitro lipoliz çalışması ile incelenmiştir. Lipoliz oranı ve kosolvan miktarı düşük formülasyonlar sulu fazda daha yüksek eksemestan miktarı sağlamıştır. İn vitro lipoliz çalışması, sink koşulu sağlayan absorpsiyon basamağını içermemesi nedeniyle, ex-vivo permeabilite ve in situ intestinal perfüzyon yöntemleriyle birleştirilmiştir. SEDDS formülasyonlarının eksemestan permeabilitesine etkisi birleşik lipoliz – ex-vivo permeabilite ve birleşik lipoliz - in situ intestinal perfüzyon yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Birleşik yöntemlerin sonuçlarına göre formülasyon lipoliz oranı ve kosolvan miktarı eksemestan permeabilitesini etkilememiştir ($p>0,05$). SEDDS formülasyonlardan eksemestan absorpsiyonu referans ürüne göre daha yüksek bulunmuştur. İn situ perfüzyon çalışmasından hareketle insanda absorbe edilen doz fraksiyonu ($\%F_a$) kestirimi yapılmıştır. SEDDS formülasyonların insandaki eksemestan absorpsiyonunu artırdığı tahmin edilmiştir. Böylece referans ürüne kıyasla daha düşük dozda eksemestan içeren SEDDS formülasyonlarının, eksemestanın çözünürlüğünü artırmasıyla etkinliğinin de artırıldığı kanıtlanmıştır.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Eksemestan, kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler, Box-Behnken deney tasarımı, in vitro çözünme, in vitro lipoliz, in situ intestinal perfüzyon
Sayfa Adedi : 343
Danışman : Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

DEVELOPMENT OF EXEMESTANE LOADED SELF-EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS AND IN VITRO – IN SITU EVALUATIONS

(Ph. D. Thesis)

Burcu TİMUR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

Exemestane is an aromatase inhibitor used in the hormonal treatment of breast cancer, which inhibits estrogen synthesis. This thesis was aimed to solve the problem of low water solubility and low bioavailability of exemestane with the self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) formulation strategy approach. SEDDS formulations are a promising approach for drugs with low solubility because they carry the drug in dissolved form. For this purpose, exemestane-loaded SEDDS formulations were developed using the Design Expert® V11 program with the Box-Behnken experimental design approach. The prepared exemestane-loaded SEDDS formulations were characterized in terms of droplet size, polydispersity index, robustness to dilution and pH, viscosity, %Transmittance, stability, and in vitro dissolution study. The antiproliferative activity of SEDDSs was evaluated using the MCF-7 cell line. The formulations provided lower cell viability than exemestane solution. The in vitro lipolysis study was conducted to evaluate the effects of the oil content in SEDDS formulations, the presence of digestible surfactant, the use of the cosolvent, and the amount of cosolvent on the SEDDS formulation performance. Formulations with the low lipolysis ratio and low cosolvent amount provided higher exemestane amounts in the aqueous phase. In vitro lipolysis study has been combined with ex-vivo permeability and in situ intestinal perfusion methods because lipolysis study lacks an absorption step that exists in vivo conditions which provide the sink condition. The effect of SEDDS formulations on exemestane permeability was evaluated by combined lipolysis – ex-vivo permeability and combined lipolysis - in situ intestinal perfusion methods. According to the results, the formulation lipolysis ratio and cosolvent amount did not affect exemestane permeability. Exemestane absorption from SEDDS formulations was found to be higher than the reference product. Based on the in situ perfusion study, the absorbed dose fraction (%F_a) in humans was estimated. SEDDS formulations have been predicted to increase exemestane absorption in humans. Thus, it has been proven that the effectiveness of SEDDS formulations containing lower doses of exemestane compared to the reference product is increased by increasing the solubility of exemestane.

Science Code : 1020
Key Words : Exemestane, self emulsifying drug delivery systems, Box-Behnken experimental design, dissolution, in vitro lipolysis, in situ intestinal perfusion
Page Number : 343
Supervisor : Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her konuda yol gösteren, yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, ilgisini, desteğini ve deneyimlerini asla esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, tez izleme komitemde yer alarak bilimsel katkılarıyla tezime yön veren değerli hocalarım Prof. Dr. Yeşim TEZEL KARASULU ve Prof. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, fikirleri ve duruşuyla örnek aldığım, geleceğime önemli dokunuşlar yapan değerli hocam Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye, hücre kültürü çalışmalarımı yürüten Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN'a, in vivo çalışmalarımda karşılaştığım sorunlara benimle birlikte çözüm arayan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ayşe DEMİREL'e, HPLC'de yaşadığım problemlerde bana yardımcı olan ve in vivo analiz yönteminin geliştirilmesine katkı sağlayan Öğr. Gör. Ayhan AYSAL'a, fenol kırmızısı teminindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Selma ŞAHİN'e, perfüzyon çalışmalarında tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Tuğba GÜLSÜN İNAL'a, domuz bağırsağı temini ve temizliğindeki yardımlarından dolayı Vet. Hek. Utku USTA'ya, çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, her koşulda beni destekleyen ve motive eden, bir abla ve bir kardeş olarak gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi Duygu YILMAZ USTA ve Arş. Gör. Seval OLĞAÇ'a, doktora eğitimime katkıları için başta Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Sevgi TAKKA, Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER, Prof. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ, Doç. Dr. Başaran Mutlu AĞARDAN, Doç. Dr. Serdar TORT ve Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre YALÇIN'a, tez çalışmalarımda sunduğu imkan ve destekleri için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mehmet AKYÜZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Yasin HAZER ve Dr. Öğr. Üyesi Aysun ÇELİK SOYSAL başta olmak üzere Eczacılık Fakültesi akademik ve idari personeline, dostluğu ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Sinem SAAR'a, kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşegül YILDIZ, Ecz. Aysel YILMAZ, Arş. Gör. Ceren YETGİN başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma ve Fatma ÇELİK'e, in vivo çalışmalarımda yardımları ve hoş sohbeti için Hacer ŞİRİN'e, tez dönemi boyunca her türlü derdime koşan, ilgisi, sevgisi, desteği ve sabrını bir an olsun esirgemeyen Arş. Gör. Emre TUNÇEL'e, bu uzun ve zorlu zaman diliminde her zaman bana destek olan, varlıklarından ve yanımda olmalarından güç aldığım canım annem Emine SİM, ablam Duygu TİMUR AMASRALI, eşi Akın AMASRALI, kuzenim Emine MARTI, her şeyden çok sevdiğim biricik yeğenim Akın Ali AMASRALI'ya, 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı çerçevesinde eğitimimi ve 123S357 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xviii
RESİMLERİN LİSTESİ xxvi
SİMGELER VE KISALTMALAR xxviii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Meme Kanseri 3
2.1.1. Meme kanserinde östrojen 4
2.2. Eksemestan 6
2.2.1. Eksemestanın fizikokimyasal özellikleri 7
2.2.2. Eksemestanın farmakodinamik özellikleri 8
2.2.3. Eksemestanın farmakokinetik özellikleri 9
2.2.4. Eksemestanın tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar 13
2.3. Lipit Temelli Formülasyonlar 17
2.3.1. Tip I formülasyonlar 21
2.3.2. Tip II formülasyonlar 21
2.3.3. Tip III formülasyonlar 22
2.3.4. Tip IV formülasyonlar 24
2.4. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler 25

Sayfa

2.4.1. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin suda çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanımını artırma mekanizmaları 26

2.4.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin genel bileşenleri ve formülasyon performansındaki rolü 29

2.4.3. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin optimizasyonu 32

2.4.4. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu 33

2.5. İn Vitro Lipoliz 36

2.5.1. pH-stat lipoliz modeli 38

2.5.2. Gastrointestinal lipoliz modeli 50

2.5.3. Yüksek verimli lipoliz modeli 51

2.5.4. Dinamik gastrik model 51

2.5.5. TNO gastrointestinal model (TIM) 52

2.6. İn situ intestinal perfüzyon 53

3. GEREÇ VE YÖNTEM 57

3.1. Gereç 57

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 57

3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar 58

3.2. Yöntem 59

3.2.1. Eksemestanın fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 60

3.2.2. Eksemestanın miktar tayini yöntemleri ve validasyonu 61

3.2.3. SEDDS formülasyon geliştirme çalışmaları 71

3.2.4. Geliştirilen SEDD sistemlerde yapılan karakterizasyon çalışmaları 80

3.2.5. İn vitro çözünme hızı çalışmaları 84

3.2.6. İn vitro lipoliz çalışmaları 86

3.2.7. Ex-vivo permeabilite çalışması 89

Sayfa

3.2.8. Hücre kültürü çalışmaları 93
3.2.9. İn situ intestinal perfüzyon çalışması 98
3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler 110
4. BULGULAR 111
4.1. Eksemestanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar .. 111
4.1.1. Çözünürlük çalışması 111
4.1.2. Partikül büyüklüğü ölçümü 111
4.1.3. FT-IR analizi 112
4.1.4. Erime derecesi tayini 114
4.2. Eksemestanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonu 114
4.2.1. Eksemestanın UV spektrofotometresi ile dalga boyu taraması . 114
4.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi ve validasyonu 116
4.2.3. Kromatografik miktar tayini yöntemi ve validasyonu 120
4.3. SEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları 176
4.3.1. Çözünürlük çalışması 176
4.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması 177
4.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyon bileşiminin belirlenmesi 180
4.3.4. SEDD sistemlere eksemestan yüklenmesi 193
4.4. Geliştirilen SEDD Sistemlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 194
4.4.1. Damlacık boyutu ve PDI 194
4.4.2. Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık 200
4.4.3. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği 202
4.4.4. Kendiliğinden emülsifikasyon zamanı 203
4.4.5. %Transmittans 203
4.4.6. Morfoloji 204

Sayfa

4.4.7. Viskozite 206
4.4.8. FT-IR analizi 208
4.4.9. Termodinamik stabilite çalışmaları 214
4.4.10. Uzun dönem stabilite çalışmaları 218
4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları 229
4.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları 232
4.7. Ex-vivo Permeabilite Çalışması 235
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları 246
4.9. İn Situ İntestinal Perfüzyon 251
4.9.1. Tubing çapının belirlenmesi 251
4.9.2. Tubing ile etkileşimin incelenmesi 252
4.9.3. Perfüzyon çalışması 252
4.9.4. Eksemestan ve antipirinin insandaki P_{eff} değeri ve %absorbe edilen doz fraksiyonunun kestirimi 256
5. TARTIŞMA 261
5.1. Eksemestanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar .. 262
5.2. Eksemestanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonu 264
5.3. SEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları 267
5.3.1. Çözünürlük çalışması 268
5.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması 269
5.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyon bileşiminin belirlenmesi 270
5.3.4. SEDD sistemlere eksemestan yüklenmesi 273
5.4. Geliştirilen SEDD Sistemlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 274
5.4.1. Damlacık boyutu ve PDI 274
5.4.2. Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık 276
5.4.3. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği 277

Sayfa

5.4.4. Kendiliğinden emülsifikasyon zamanı 277
5.4.5. %Transmittans 278
5.4.6. Morfoloji 278
5.4.7. Viskozite 278
5.4.8. FT-IR analizi 279
5.4.9. Termodinamik stabilite çalışmaları 280
5.4.10. Uzun dönem stabilite çalışmaları 281
5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları 283
5.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları 285
5.7. Ex-vivo Permeabilite Çalışması 289
5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları 294
5.9. İn Situ İntestinal Perfüzyon 296
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 301
KAYNAKLAR 305
EKLER 331
EK-1. Etik Kurul Onayı 332
EK-2. Tez Konusu Değişiklik Onayı 334
EK-3. Yayın Bilgisi 336
ÖZGEÇMİŞ 339

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Meme kanseri moleküler alt tipleri ve patalojik durumları	4
Çizelge 2.2.	EKM'nin pH-çözünürlük profili (FDA, 1999b)	7
Çizelge 2.3.	Sağlıklı ve ileri evre meme kanseri postmenopozal kadınlara tokluk oral tek ve tekrarlanan 25 mg EKM uygulamasında elde edilen farmakokinetik parametreler (FDA, 1999b)	10
Çizelge 2.4.	Sağlıklı postmenopozal kadınlara açlık ve tokluk durumlarında tek doz 25 mg EKM uygulanmasında elde edilen farmakokinetik parametreler	10
Çizelge 2.5.	İnsan ve hayvan türlerinde EKM'nin plazma proteinlerine bağlanma oranı.....	13
Çizelge 2.6.	Literatürde bulunan EKM ile yapılmış formülasyon geliştirme çalışmaları	15
Çizelge 2.7.	LFCS'ye göre çeşitli lipit formülasyon türlerinin bileşimleri, özellikleri, avantaj ve dezavantajları (Pouton, 2006).....	20
Çizelge 2.8.	SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS formülasyonları arasındaki temel farklar (Dokania ve Joshi, 2015; Pouton, 2000)	26
Çizelge 2.9.	SEDD sistemler için karakterizasyon parametreleri, in vitro, ex-vivo, in situ ve in vivo çalışmalar.....	34
Çizelge 2.10.	LTF'leri değerlendirmek için tasarlanmış pH-stat lipoliz-permeabilite modelleri.....	48
Çizelge 3.1.	İn vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanılan HPLC yönteminin koşulları	67
Çizelge 3.2.	İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında kullanılan HPLC yönteminin koşulları.....	68
Çizelge 3.3.	HPLC gradient akış mobil faz koşulları.....	68
Çizelge 3.4.	EKM çözünürlüğünün belirlendiği yardımcı bileşenler	72
Çizelge 3.5.	Üçgen faz diyagramı yardımcı madde miktarları	73
Çizelge 3.6.	BBD düzeni.....	75
Çizelge 3.7.	BBD kullanılan bağımsız ve bağımlı değişkenler.....	75
Çizelge 3.8.	Design Expert® programı tarafından oluşturan on beş formülasyon	76

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.9. Geliştirilen SEDDS formülasyonların bileşenleri 79

Çizelge 3.10. pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları..... 81

Çizelge 3.11. İn vitro çözünme hızı yöntemi 84

Çizelge 3.12. Çözünme hızı çalışmasında kullanılan ortamlar ve hazırlanışları 85

Çizelge 3.13. İn vitro lipoliz çalışma koşulları 86

Çizelge 3.14. Lipoliz ortamı bileşenleri 87

Çizelge 3.15. İn vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışma koşulları..... 90

Çizelge 3.16. Alıcı hücre ortamı ve hazırlanışı 90

Çizelge 3.17. Perfüzyon çalışması için uygulama grupları 99

Çizelge 3.18. Perfüzyon çözeltisinin bileşenleri..... 102

Çizelge 4.1. EKM'ye ait çözünürlük sonuçları..... 111

Çizelge 4.2. EKM'nin distile su ortamında deney içi kesinlik sonuçları 118

Çizelge 4.3. EKM'nin distile su ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları . 118

Çizelge 4.4. EKM'nin distile su ortamında geri elde sonuçları 118

Çizelge 4.5. EKM'nin distile su ortamında stabilite sonuçları..... 120

Çizelge 4.6. EKM'nin metanol ortamında deney içi kesinlik sonuçları 122

Çizelge 4.7. EKM'nin metanol ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları... 122

Çizelge 4.8. EKM'nin metanol ortamında geri elde sonuçları 122

Çizelge 4.9. EKM'nin metanol ortamında stabilite sonuçları..... 126

Çizelge 4.10. EKM'nin asetonitril ortamında deney içi kesinlik sonuçları..... 128

Çizelge 4.11. EKM'nin asetonitril ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 128

Çizelge 4.12. EKM'nin asetonitril ortamında geri elde sonuçları..... 128

Çizelge 4.13. EKM'nin asetonitril ortamında stabilite sonuçları 136

Çizelge 4.14. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında deney içi kesinlik sonuçları 138

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.15. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 138

Çizelge 4.16. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında geri elde sonuçları 138

Çizelge 4.17. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında stabilite sonuçları 143

Çizelge 4.18. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında deney içi kesinlik sonuçları 145

Çizelge 4.19. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 145

Çizelge 4.20. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında geri elde sonuçları 146

Çizelge 4.21. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında stabilite sonuçları 151

Çizelge 4.22. EKM'nin FaSSIF ortamında deney içi kesinlik sonuçları 152

Çizelge 4.23. EKM'nin FaSSIF ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları ... 152

Çizelge 4.24. EKM'nin FaSSIF ortamında geri elde sonuçları 153

Çizelge 4.25. EKM'nin FaSSIF ortamında stabilite sonuçları 157

Çizelge 4.26. EKM'nin FeSSIF ortamında deney içi kesinlik sonuçları 159

Çizelge 4.27. EKM'nin FeSSIF ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları ... 159

Çizelge 4.28. EKM'nin FeSSIF ortamında geri elde sonuçları 159

Çizelge 4.29. EKM'nin FeSSIF ortamında stabilite sonuçları 164

Çizelge 4.30. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları 167

Çizelge 4.31. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları 167

Çizelge 4.32. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları 168

Çizelge 4.33. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 168

Çizelge 4.34. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 168

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.35. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları 169

Çizelge 4.36. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları 169

Çizelge 4.37. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları 169

Çizelge 4.38. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları 170

Çizelge 4.39. ACN:Perfüzat (9:1) ortamında duyarlılık ve saptama sınırı değerleri..... 174

Çizelge 4.40. EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında stabilite sonuçları 174

Çizelge 4.41. Kullanılan ortamlara ait validasyon sonuçları..... 175

Çizelge 4.42. EKM'nin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü..... 176

Çizelge 4.43. Üçgen faz diyagramlarına ait berrak alan büyüklükleri ve ağırlık merkezi oranları 179

Çizelge 4.44. BBD için oluşturulan bağımsız ve bağımlı değişken değerleri ... 181

Çizelge 4.45. Damlacık boyutu ve PDI için model uyumu 181

Çizelge 4.46. Damlacık boyutu ve PDI için istatistiksel analiz sonuçları ve matematiksel denklemler 183

Çizelge 4.47. Bağımsız ve bağımlı değişkenler için hedef özellikler..... 192

Çizelge 4.48. Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS'in %95 güven aralığında damlacık boyutu ve PDI değerleri 193

Çizelge 4.49. Optimum SEDDS formülasyon bileşimi ve ölçülen damlacık boyutu ve PDI değerleri 193

Çizelge 4.50. Geliştirilen SEDDS formülasyonlarında EKM çözünürlüğü 194

Çizelge 4.51. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait damlacık boyutu ve PDI sonuçları 195

Çizelge 4.52. EKM içermeyen ve EKM yüklü F1 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları 200

Çizelge 4.53. EKM içermeyen ve EKM yüklü F2 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları 201

Çizelge 4.54. EKM içermeyen ve EKM yüklü F3 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları 201

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.55. EKM içermeyen ve EKM yüklü F4 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları 202

Çizelge 4.56. EKM içermeyen ve EKM yüklü F5 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları 202

Çizelge 4.57. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği sonuçları 203

Çizelge 4.58. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifikasyon zamanı sonuçları 203

Çizelge 4.59. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının %Transmittans sonuçları 204

Çizelge 4.60. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının viskozite sonuçları 206

Çizelge 4.61. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının ısıtma-soğutma döngüsü sonrası damlacık boyutu ve PDI sonuçları 214

Çizelge 4.62. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının donma-çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ve PDI sonuçları 215

Çizelge 4.63. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları 219

Çizelge 4.64. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları 221

Çizelge 4.65. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları 223

Çizelge 4.66. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları 225

Çizelge 4.67. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları 227

Çizelge 4.68. SEDDS formülasyonları için f_2 benzerlik faktörü sonuçları 232

Çizelge 4.69. SEDDS formülasyonları için harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı 235

Çizelge 4.70. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için 24.saat sonunda %difüze olan EKM miktarı ve AUC değerleri 240

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.71. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için akı ve P_{app} değerleri..... 243

Çizelge 4.72. Kullanılan tubinglere ait bulgular..... 251

Çizelge 4.73. Başlangıç ve örnekteki EKM konsantrasyonu..... 252

Çizelge 4.74. Perfüzyon çalışmasında kullanılan sıçanlara ait bilgiler..... 252

Çizelge 4.75. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için normalize konsantrasyon grafiğinin AUC değerleri..... 254

Çizelge 4.76. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'ye P_{eff} değerleri..... 255

Çizelge 4.77. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $P_{eff,insan}$ değerleri 257

Çizelge 4.78. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $\%F_a$ değerleri..... 258

Çizelge 4.79. SEDDS formülasyonları, referans ürün ve EKM çözeltisine ait in vitro, ex-vivo ve in situ çalışma sonuçları..... 259

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Östrojen sentezi (Lønning, 2001)	5
Şekil 2.2.	EKM'nin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.3.	Androstenedion ve EKM'nin kimyasal yapıları	8
Şekil 2.4.	EKM'nin metabolizasyonu	12
Şekil 2.5.	Lipitlerin ilaç emilimine etkileri (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007)	18
Şekil 2.6.	LTF'nin sınıflandırılması	19
Şekil 2.7.	SEDD sistemlerin biyoyararlanım artırma mekanizmaları (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007)	28
Şekil 2.8.	pH-stat lipoliz modeli (Berthelsen ve diğerleri, 2019)	39
Şekil 2.9.	İki bölmeli gastrointestinal lipoliz modeli (Berthelsen ve diğerleri, 2019)	50
Şekil 2.10.	TIM cihazının şematik gösterimi (Dickinson ve diğerleri, 2012)	52
Şekil 2.11.	Açık ve kapalı döngü intestinal perfüzyonun şematik gösterimi	54
Şekil 3.1.	İn vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışmasının şematik gösterimi	89
Şekil 3.2.	96 kuyucuklu plaka şablonu	97
Şekil 3.3.	Perfüzyon çalışmasında kullanılan çözeltiler	103
Şekil 3.4.	Perfüzyon çalışması akış şeması	106
Şekil 3.5.	Perfüzyon çalışmasının şematik gösterimi	106
Şekil 4.1.	EKM'nin partikül büyüklüğü dağılım grafiği	112
Şekil 4.2.	EKM'nin FT-IR spektrumu	113
Şekil 4.3.	EKM'nin DSC termogramı	114
Şekil 4.4.	EKM'nin distile su ortamındaki UV spektrumu	115
Şekil 4.5.	EKM'nin %0,5 SLS çözeltisindeki UV spektrumu	115
Şekil 4.6.	EKM'nin asetonitril ortamındaki UV spektrumu	116

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.7. EKM'nin metanol ortamındaki UV spektrumu 116

Şekil 4.8. EKM'nin distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=6) 117

Şekil 4.9. EKM içermeyen distile su ortamına ait UV spektrumu 119

Şekil 4.10. EKM içeren distile su ortamına ait UV spektrumu 119

Şekil 4.11. EKM'nin metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)..... 121

Şekil 4.12. Metanol ortamına ait kromatogram 123

Şekil 4.13. EKM içermeyen formülasyonların metanol ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 125

Şekil 4.14. 8 µg/mL EKM'nin metanol ortamındaki kromatogramı 126

Şekil 4.15. EKM'nin asetonitril ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=8) 127

Şekil 4.16. Asetonitril ortamına ait kromatogram 129

Şekil 4.17. EKM içermeyen formülasyonların asetonitril ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 132

Şekil 4.18. 15 µg/mL EKM'nin asetonitril ortamındaki kromatogramı 132

Şekil 4.19. EKM içermeyen formülasyonların lipoliz ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 135

Şekil 4.20. EKM'nin lipoliz ortamındaki kromatogramı..... 135

Şekil 4.21. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12) 137

Şekil 4.22. %0,5 SLS çözeltisi ortamına ait kromatogram 139

Şekil 4.23. EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 142

Şekil 4.24. 10 µg/mL EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramı . 142

Şekil 4.25. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)..... 144

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.26. %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamına ait kromatogram 146

Şekil 4.27. EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Verici hücre ortamı ve domuz bağırsağı..... 149

Şekil 4.28. 14 µg/mL EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramı..... 150

Şekil 4.29. EKM'nin FaSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)..... 151

Şekil 4.30. FaSSIF ortamına ait kromatogram..... 154

Şekil 4.31. EKM içermeyen formülasyonların FaSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 156

Şekil 4.32. 10 µg/mL EKM'nin FaSSIF ortamındaki kromatogramı..... 157

Şekil 4.33. EKM'nin FeSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)..... 158

Şekil 4.34. FeSSIF ortamına ait kromatogram..... 160

Şekil 4.35. EKM içermeyen formülasyonların FeSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 163

Şekil 4.36. 16 µg/mL EKM'nin FeSSIF ortamındaki kromatogramı..... 163

Şekil 4.37. ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kalibrasyon doğruları ve denklemleri a) EKM (Ort ± SS, n=11) b) ANT (Ort ± SS, n=11) c) FK (Ort ± SS n=9)..... 166

Şekil 4.38. ACN:Perfüzat (9:1) ortamına ait kromatogram..... 170

Şekil 4.39. Bağırsak segmentinden toplanan serum fizyolojik perfüzatına ait kromatogram..... 171

Şekil 4.40. EKM içermeyen formülasyonların ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatogramı..... 171

Şekil 4.41. EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatogramları a) 200 µg/mL EKM b) 200 µg/mL ANT c) 40 µg/mL FK d) 50 µg/mL EKM, 50 µg/mL ANT ve 14 µg/mL FK..... 173

Şekil 4.42. EKM'nin yağ grubundaki çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3) 177

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.43. EKM'nin sürfaktan ve kosolvan gruplarındaki çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3)..... 177

Şekil 4.44. Kolliphor® RH40: Labrasol® ALF'nin 4:1 Smix oranına (kırmızı bölge), 3:1 S_{mix} oranına (mavi bölge), 2:1 S_{mix} oranına (yeşil bölge) ve 1:1 S_{mix} oranına (sarı bölge) ait üçgen faz diyagramları..... 179

Şekil 4.45. Kolliphor® RH40: Labrasol® ALF'nin 4:1 S_{mix} oranına ait üçgen faz diyagramı..... 180

Şekil 4.46. Damlacık boyutu için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için..... 185

Şekil 4.47. Damlacık boyutu için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için..... 187

Şekil 4.48. PDI için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için..... 189

Şekil 4.49. PDI için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için..... 191

Şekil 4.50. Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS formülasyonun bileşimi ve özellikleri..... 192

Şekil 4.51. SEDDS fomülasyonlarında EKM çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3)..... 194

Şekil 4.52. SEDDS formülasyonların damlacık boyutu ve PDI sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) EKM içermeyen SEDDS'lerin damlacık boyutları b) EKM içermeyen SEDDS'lerin PDI'ları c) EKM yüklü SEDDS'lerin damlacık boyutları d) EKM yüklü SEDDS'lerin PDI'ları..... 196

Şekil 4.53. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 198

Şekil 4.54. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu..... 200

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.55. SEDDS formülasyonlarına ait viskozite sonuçları a) EKM içermeyen formülasyonlara ait viskozite sonuçları b) EKM yüklü formülasyonlara ait viskozite sonuçları 206

Şekil 4.56. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait reogramlar a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu 207

Şekil 4.57. EKM, etkin madde içermeyen F1, EKM yüklü F1, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu..... 209

Şekil 4.58. EKM, etkin madde içermeyen F2, EKM yüklü F2, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Transcutol® HP'ye ait FT-IR spektrumu 210

Şekil 4.59. EKM, etkin madde içermeyen F3, EKM yüklü F3, Maisine®, Kolliphor® RH40, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu..... 211

Şekil 4.60. EKM, etkin madde içermeyen F4, EKM yüklü F4, İmwitor® 988, Tween® 80, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu 212

Şekil 4.61. EKM, etkin madde içermeyen F5, EKM yüklü F5, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Transcutol® HP'ye ait FT-IR spektrumu 213

Şekil 4.62. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ölçümleri b) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası PDI ölçümleri..... 216

Şekil 4.63. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ölçümleri b) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası PDI ölçümleri..... 217

Şekil 4.64. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)..... 219

Şekil 4.65. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)..... 220

Şekil 4.66. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)..... 220

Şekil 4.67. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) 221

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.68. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) 222

Şekil 4.69. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) 222

Şekil 4.70. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) 223

Şekil 4.71. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) 224

Şekil 4.72. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) 224

Şekil 4.73. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) 225

Şekil 4.74. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01) 226

Şekil 4.75. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (**p<0,01) 226

Şekil 4.76. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, ****p<0,0001)..... 227

Şekil 4.77. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01) 228

Şekil 4.78. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01) 228

Şekil 4.79. %0,5 SLS çözeltisi ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3) 230

Şekil 4.80. FaSSIF ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3)..... 230

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.81. FeSSIF ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3) 231

Şekil 4.82. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının zamana karşı sulu faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) 233

Şekil 4.83. Lipoliz sonunda EKM yüklü SEDDS formülasyonları için sulu faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) . 233

Şekil 4.84. Lipoliz sonunda EKM yüklü SEDDS formülasyonları için pellet faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) 234

Şekil 4.85. SEDDS formülasyonlarının lipolizi (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) Harcanan toplam NaOH miktarı b) Lipoliz oranı (%) 234

Şekil 4.86. Referans tablet için sulu ve pellet faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) 235

Şekil 4.87. F1 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 236

Şekil 4.88. F2 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 237

Şekil 4.89. F3 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 237

Şekil 4.90. F4 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 238

Şekil 4.91. F5 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 238

Şekil 4.92. Referans tabletin başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3) 239

Şekil 4.93. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için 24.saat sonunda %difüze olan EKM miktarı (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Referans tablet 241

Şekil 4.94. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için P_{app} değerleri (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Referans tablet 244

Şekil 4.95. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için P_{app} değerleri (Ort ± SS, n=3) a) 0. dakika b) 15. dakika c) 60. dakika 245

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.96. EKM yüklü ve etkin madde içermeyen SEDDS formülasyonlarının saf EKM ile karşılaştırmalı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde 48 saatlik inkübasyon süresi için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 58 µM EKM konsantrasyonu b) 38,5 µM EKM konsantrasyonu 247

Şekil 4.97. EKM yüklü ve etkin madde içermeyen SEDDS formülasyonlarının saf EKM ile karşılaştırmalı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde 72 saatlik inkübasyon süresi için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 58 µM EKM konsantrasyonu b) 38,5 µM EKM konsantrasyonu 249

Şekil 4.98. Saf EKM ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının farklı konsantrasyonlar için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 48 saat inkübasyon süresi b) 72 saat inkübasyon süresi 250

Şekil 4.99. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5) ve grup 3 (saf EKM) için EKM absorpsiyon profili (Ort ± SS, n=6) 253

Şekil 4.100. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için ANT absorpsiyon profili (Ort ± SS, n=6) 254

Şekil 4.101. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için EKM ve ANT'ye ait P_{eff} değerleri (Ort ± SS, n=6)..... 255

Şekil 4.102. Gruplar için P_{eff} değerleri (Ort ± SS, n=6) a) EKM'ye ait P_{eff} değerleri b) ANT'ye ait P_{eff} değeleri..... 256

Şekil 4.103. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $P_{eff,insan}$ değerleri (Ort ± SS, n=6)..... 257

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. MCF-7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü 94

Resim 3.2. Hücre kültürü çalışmaları a) 75 cm^2'lik flaska besiyeri ilavesi b) Hücre sayım plakasına dolum yapılması c) Hücre sayım plakası d) Hücre sayımının yapılması. 95

Resim 3.3. MCF-7 hücrelerinin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi 95

Resim 3.4. 6 kuyucuklu plakada seyreltme işlemi 97

Resim 3.5. WST-1 boyası ile inkübe edilen plakalar 98

Resim 3.6. Ksilazin ve ketamin uygulanması 103

Resim 3.7. Perfüze edilecek jejunum segmenti..... 104

Resim 3.8. Perfüze edilecek jejunum segmentinin uzunluğunun belirlenmesi 105

Resim 3.9. Cerrahi işlemler a) Jejunum segmentine küçük bir kesi atılması b) Cerrahi iplik ile kataterin sabitlenmesi..... 105

Resim 4.1. Titrasyon çalışmasına ait görsel..... 178

Resim 4.2. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait TEM görüntüleri a) F1 formülasyonuna ait TEM görüntüsü b) F2 formülasyonuna ait TEM görüntüsü c) F3 formülasyonuna ait TEM görüntüsü d) F4 formülasyonuna ait TEM görüntüsü e) F5 formülasyonuna ait TEM görüntüsü 205

Resim 4.3. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite çalışmasına ait görseller a) Isıtma-soğutma döngüsü sonrası b) Donma çözme döngüsü sonrası..... 218

Resim 4.4. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite çalışmasına ait görseller a) Isıtma-soğutma döngüsü sonrası b) Donma çözme döngüsü sonrası 218

Resim 4.5. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 0. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda 228

Resim 4.6. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 1. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda 229

Resim **Sayfa**

Resim 4.7. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 3. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda 229

Resim 4.8. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 6. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda 229

Resim 4.9. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 12. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda 229

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
AUC	Plazma konsantrasyonu zaman eğrisi altında kalan alan
$AUC_{0-\infty}$	Sıfırdan sonsuza plazma zaman eğrisi altında kalan alan
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
Cl	Klirens
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
R^2	Determinasyon katsayısı
t_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu için geçen süre
λ_{maks}	Maksimum absorbans dalga boyu

Kısaltmalar	Açıklamalar
ACN	Asetonitril
ANT	Antipirin
AP	Sulu faz
BBD	Box-Behnken deney tasarımı
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BN	Bağıl nem
BSA	Bovin serum albümin
CYP	Sitokrom enzim ailesi
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle’s Besiyeri
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EKM	Eksemestan
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ER	Östrojen reseptörü
FaSSIF	Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı
FaSSIF-V2	Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı, versiyon 2
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FeSSIF	Tokluk durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı
FK	Fenol kırmızısı
FL	Fosfolipit
GIS	Gastrointestinal sistem
HBSS	Hanks' Balanced tuz çözeltisi
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HLB	Hidrofilik lipofilik denge
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IC_{50}	Yarı inhibisyon konsantrasyonu

IVIVC	İn vivo in vitro korelasyon
KL	Kolestrol
LOD	Duyarlılık sınırı
LOQ	Saptama sınırı
LFCS	Lipit formülasyon sınıflandırma sistemi
LTF	Lipit temelli formülasyon
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDCK	Madin Darby köpek böbrek hücre hattı
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NWF	Net su akışı
Ort	Ortalama
OP	Yağ fazı
PAMPA	Paralel yapay membran permeabilite yöntemi
PBS	Fosfat tamponu
PDI	Polidispersite indeksi
PP	Pellet faz
PR	Progesteron reseptörü
PVDF	Poliviniliden diflorür
PVPA	Vezikül temelli permeasyon yöntemi
s	Saat
SEDDS	Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
SMEDDS	Kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
sn	Saniye
SNEDDS	Kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
SIF	Simüle bağırsak sıvısı
SLS	Sodyum lauril sülfat

SPIP	Tek geçişli intestinal perfüzyon
SS	Standart sapma
ST	Safra tuzu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TG	Trigliserit
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
VK	Varyasyon katsayısı

1. GİRİŞ

Günümüzde kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Meme kanseri tedavisinde cerrahi prosedürler, hormon tedavisi, immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli teknikler tek başına veya kombine halde kullanılır. Östrojen meme dokusunda kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişmesini desteklemektedir. Hormon tedavisi ile östrojen sentezinin inhibisyonu kanserde önemli bir tedavi stratejisidir.

Eksemestan östrojen sentezini inhibe eden ve meme kanserinin hormonal tedavisinde klinik kullanıma sahip bir enzim inhibitörüdür. Eksemestan suda düşük çözünürlüğe sahiptir ve pratik olarak suda çözünmediği kabul edilmektedir. Oral olarak uygulandığında gastrointestinal sistemden %42 oranında absorbe edildiği ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğradığı bilinmektedir. Gastrointestinal sıvılarda yeterli ilaç konsantrasyonu ve buna bağlı olarak permeasyon ve emilim sağlamak için kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasının eksemestan için etkili bir formülasyon stratejisi olabileceği düşünülmüştür.

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvanın izotropik karışımı olarak tanımlanmaktadır. Kendiliğinden emülsifiye sistemler yapılarında su içermez ve gastrointestinal sisteme ilacı önceden çözünmüş halde sunarlar. Bu sistemlerin başarısının temel anahtarı emilimden önce gerekli çözünme adımını atlamaları ve gastrointestinal sıvılarla karşılaştıklarında yağ/su emülsiyonu ve miseller gibi kolloidal yapılar oluşturma yetenekleridir. Ayrıca, formülasyon bileşenlerinin lenfatik absorpsiyonu stimüle etmesi, effluks taşıyıcıları inhibe etmesi, sıkı bağlantı noktalarını ve membran akışkanlığını etkileyerek permeabilite artışı sağlaması ile de biyoyararlanımın arttırılabileceği gösterilmiştir.

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler gastrointestinal sistemde sindirime uğrayabilen lipit yapılı yardımcı maddeler içermektedir. Bu nedenle bu formülasyonların performansı in vitro lipoliz çalışması ile değerlendirilmektedir. Bu sistemlerin bağırsakta taşınması ve sindirimi sırasında oluşan yeni kolloidal yapılar ilaç için çözme kapasitesini kaybedebilir. Bu durum aşırı doygunluğa ve potansiyel

olarak ilacın çökmesine neden olabilir. Gastrointestinal kanalda ilaç çökmesinin genellikle emilim açısından uygun olmadığı düşünülmektedir. Ancak çalışmalar termodinamik aktivitedeki artışa bağlı olarak artan ilaç emiliminin elde edilebileceğini göstermektedir. İn vitro lipoliz çalışması ile söz konusu bu durumun incelenemeyeceği düşünülmektedir. Bu durumun temel sebebi ise in vivo ortamda var olan sink koşulu sağlayan absorpsiyon basamağının in vitro lipoliz çalışmasında mevcut olmamasıdır. Absorpsiyon basamağının olmayışı lipoliz ortamındaki ilaç konsantrasyonunu, aşırı doygunluğu ve dolayısıyla ilaç permeabilitesini etkilemektedir. Bu kapsamda, sindirim ve emilimi eş zamanlı incelemeyi mümkün kılan sink koşulun sağlandığı birleştirilmiş lipoliz ve permeabilite yöntemlerinin kullanımı son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

“Eksemestan Yüklü Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro – İn Situ Değerlendirmeler” isimli tez çalışmasında suda zayıf çözünürlüğe sahip eksemestan model etkin madde olarak seçilmiştir. Bu kapsamda eksemestanın çözünürlük ve biyoyararlanım problemini çözmek için kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi tez çalışmasının ilk amacını oluşturmaktadır. Geliştirilen sistemlerin antiproliferatif etkinliğinin hücre kültürü çalışmalarıyla incelenmesi hedeflenmiştir. İkinci amaç, eksemestan yüklü kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin sindirimini ve sindirimin eksemestan absorpsiyonuna etkisini eş zamanlı araştırmaya izin verebilecek in vitro lipoliz çalışması ile ex-vivo permeabilite ve in vitro lipoliz çalışması ile in situ perfüzyon yönteminin birleştirilmesidir. Eksemestan yüklü formülasyonların sindirimi ile ilaç çökmesi, aşırı doygunluk, emilim arasındaki bağlantılar ve bu formülasyonların sindiriminin emilim üzerine olası etkisi ilk kez incelenmiştir. Bu kapsamda, çalışmalar sırasında yapılan yayınla da literatüre katkı sağlanmıştır. Tez çalışması 123S357 kodlu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri en çok teşhis edilen kanser türü olup Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yeni kanser vakalarının %24'ünden fazlasını oluşturmaktadır (Jiang, Jiang, Wang ve Ma, 2022; Siegel, Miller, Fuchs ve Jemal, 2021). Türkiye'de ise kadınlarda en sık görülen kanser türü dağılımında birinci sırada yer almaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2024). Meme kanseri gelişiminde temel risk faktörleri yaş, doğum yapma ve sayısı, laktasyon, menopoz yaşı, aile öyküsü, genetik faktörler, postmenopozal dönemde yüksek endojen östrojen ve progesteron seviyeleri, yoğun meme yapısı, kemik mineral yoğunluğu, hormon replasman tedavisi, oral kontraseptif, alkol, sigara kullanımı ve iyonize radyasyona maruziyettir (Özbaş, Boylu ve Soyder, 2012; Vogel, 2018).

Memede duktuslar ve lobüller olmak üzere iki ana doku türü mevcuttur. Meme kanserinin köken aldığı dokuya göre yapılan sınıflandırmada süt kanallarından köken alan kanserler duktal karsinom olarak adlandırılmakta ve teşhis edilen meme kanserlerinin %40-75'ini oluşturmaktadır. Lobüler karsinom olarak sınıflandırılan meme lobüllerinden köken alan türü ise teşhis edilen vakaların %10-15'ini oluşturmaktadır.

Duktal ve lobüler karsinomlar spesifik onkoproteinlere ve gen ekspresyon profiline sahip olduğu için morfolojik ve moleküler farklılıklar içerir (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo ve Lluch, 2012; Yu ve diğerleri, 2022). Bu heterojenite nedeniyle tanı ve tedavi yöntemlerini belirlemek için çeşitli sınıflandırma sistemleri mevcuttur. En yaygın kullanılan sınıflandırma sistemi ise moleküler sınıflandırmadır. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) varlığına ve gen ekspresyon profiline dayalı olarak dört moleküler alt tip tanımlanmaktadır. Bunlar luminal A, luminal B, HER2-zengin tip ve üçlü negatif (basal-like) meme kanseridir (Hope, Wade, Aghmesheh ve Vine, 2022; Jiang ve diğerleri, 2022). Meme kanseri alt tiplerinin reseptör durumları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Meme kanseri moleküler alt tipleri ve patalojik durumları

Meme kanseri alt tip	Patolojik durum
Luminal A	ER+, PR+, HER2-
Luminal B	ER+, PR+, HER2+/-
HER2-zengin	ER-, PR-, HER2+
Üçlü negatif	ER-, PR-, HER2-

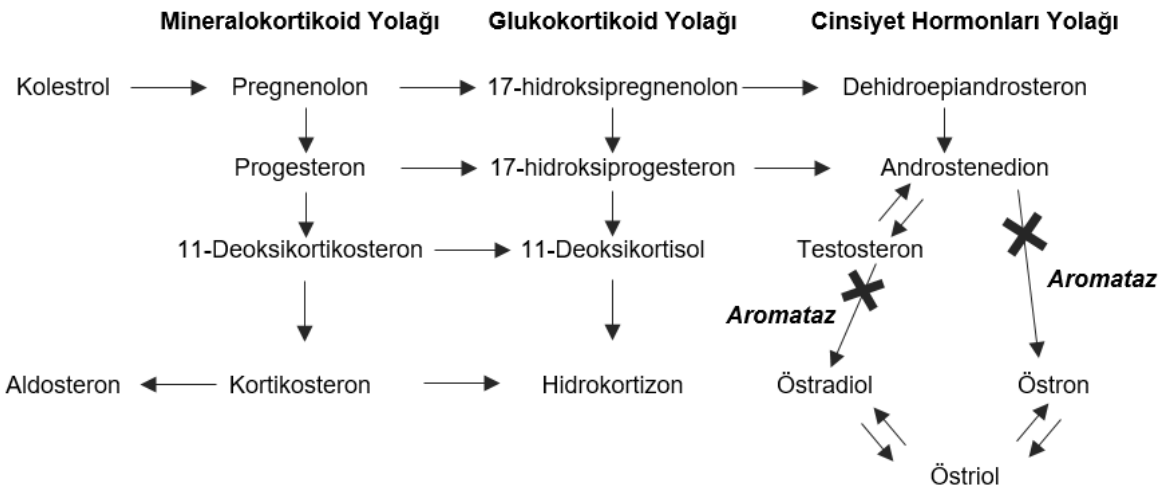
+: Reseptör pozitif, -: Reseptör negatif

Meme kanserinin heterojenliği nedeniyle, histolojik ve moleküler faktörler tedavi şemasını büyük ölçüde etkilemektedir. Tedavi stratejisinin seçimi tümör büyüklüğü ve lokasyonu, lenf nodu tutulumu, moleküler alt tipi ve hasta yaşı dikkate alınarak belirlenir (Senkus ve diğerleri, 2015). Meme kanseri vakalarında tedavinin temel amacı, cerrahi işlem ile lokalize primer tümörleri olan hastalarda meme dokusunun tamamen veya kısmen çıkarılması ve cerrahi işlemi takiben lokal veya sistemik adjuvan tedavinin uygulanmasıdır (See ve Siziopikou, 2021; Wahba ve El-Hadaad, 2015). Cerrahi operasyondan önce tümör boyutunu küçültmek amacıyla da tedavi uygulanabilir (Dahan, Cortet, Lafon ve Padilla, 2023).

Postoperatif sistemik tedavide ise radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, immunoterapi veya kombinasyonları uygulanmaktadır. Sistemik tedavinin amacı mikrometastazları ortadan kaldırmak, hastalığın tekrarlama ve ölüm riskini azaltmak veya engellemek, sağ kalımı uzatmaktır.

2.1.1. Meme kanserinde östrojen

Östrojen meme kanseri hücrelerinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli ana hormondur. Östrojen sentezi, premenopozal dönemde temel olarak ovaryumda postmenopozal dönemde ise sadece periferal dokularda devam etmektedir. Östrojen androstenedion ve testosteronun aromataz enzimi aracılığıyla östron ve östradiole dönüştürülmesiyle sentezlenir (Dixon, 2004). Östrojen sentezi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Östrojen sentezi (Lønning, 2001)

Aromataz enzimi CYP19A1 geni tarafından kodlanmaktadır. Meme dokusunda çoğalan kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla daha yüksek CYP19 gen ekspresyonu göstermiştir (Agarwal, Bulun, Leitch, Rohrich ve Simpson, 1996). Bu durum meme kanseri hücrelerinde artan östrojen konsantrasyonu ile sonuçlanmıştır. Çalışmalar postmenopozal kadınlarda da meme kanseri hücrelerinde yüksek miktarda östrojen sentezi olduğunu göstermiştir. Ayrıca sağlıklı postmenopozal kadınlarla karşılaştırıldığında meme kanseri postmenopozal kadınlar için kan östrojen seviyeleri 20 kat daha yüksek bulunmuştur (Chaturvedi ve Garg, 2022).

Östrojen ve progesteron reseptörünü eksprese etmesiyle karakterize luminal A ve luminal B moleküler alt tipler hormon reseptör pozitif meme kanseri olarak tanımlanmaktadır ve meme kanserlerinin %75'ini oluşturmaktadır (Hagen, Aas, Kvaløy, Søiland ve Lind, 2019). Hormon reseptör pozitif meme kanseri hastalarında hormonal tedavi hedefe yönelik en etkili tedavidir (Henry ve diğerleri, 2020). Meme kanserinin hormonal tedavisinde temel hedef kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli ana hormon olan östrojen sentezinin veya reseptöre bağlanmasının inhibe edilmesidir. Östrojen etkilerini ortadan kaldırmak için kullanılan etkin maddeler üç sınıfa ayrılabilir (Henry ve diğerleri, 2020; Yavuz, 2009):

- Selektif östrojen reseptör modülatörleri (Tamoksifen, toremifen)
- Selektif östrojen reseptör down-regülatörleri (Fulvestrant)
- Aromataz inhibitörleri (Anastrozol, letrozol, **eksemestan**)

2.2. Eksemestan

Östrojen, aromataz adı verilen enzim ile androjenlerin aromatizasyonu sonucu sentezlenir. Premenopozal dönemde ise östrojenin ana kaynağı ovaryumdur. Postmenopozal dönemde ovaryum kaynaklı östrojen sentezi çok azalır. Böbrek üstü bezi ve periferal dokularda (yağ dokusu, kas dokusu, meme dokusu) östrojen sentezi devam eder (Güler, 2012).

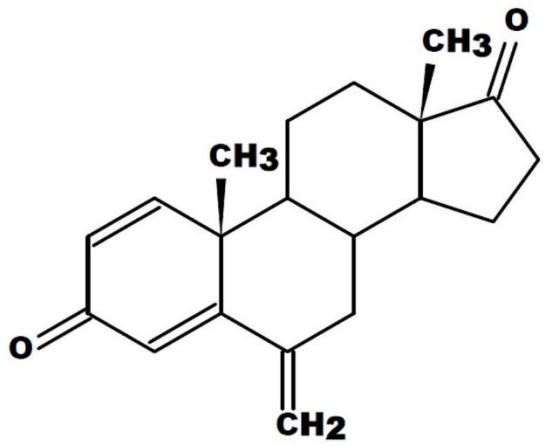
Postmenopozal dönemde plazma östrojen seviyesi %90 oranında azalmaktadır. Buna rağmen meme kanseri dokusunda östrojen konsantrasyonunun postmenopozal ve premenopozal kadın grubu arasında farklılık göstermediği bulunmuştur (Russo ve Russo, 2006). Bu nedenle enzim inhibisyonu sağlayan aromataz inhibitörleri periferal dokulardaki aromataz enzim inhibisyonu sonucu östrojen konsantrasyonunu azalttığı için postmenopozal kadınlarda etkili bir tedavi stratejisi olarak klinikte yer almıştır (Carleton ve diğerleri, 2022).

Birinci kuşak aromataz inhibitörlerinin (aminoglutetimit) steroid sentezini nonselektif olarak inhibe etmesi ve yan etkilere sahip oluşu, ikinci kuşak aromataz inhibitörlerinin (formestan ve fadrozol) klinik avantaj sağlamaması nedeniyle üçüncü kuşak aromataz inhibitörleri geliştirilmiştir (Dixon, 2004).

Eksemestan (EKM) üçüncü kuşak aromataz inhibitörüdür. Aromataz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden steroidal yapıya sahip tek üçüncü kuşak aromataz inhibitörü olma özelliğine sahiptir (Van Asten, Neven, Lintermans, Wildiers ve Paridaens, 2014). FDA tarafından kullanımı 1999 yılında onaylanmıştır (FDA, 1999a). İlaç piyasasında 25 mg EKM içeren Aromasin®, Exetu® ve Femmex® kaplı tableti bulunmaktadır. Orijinal ilaç olduğu için tez çalışmasında Aromasin® tablet referans olarak kullanılmıştır.

2.2.1. Eksemestanın fizikokimyasal özellikleri

EKM'nin kimyasal ismi 6-metilenandrosta-1,4-dien-3,17-dion'dur. Kimyasal formülü $C_{20}H_{24}O_2$ olup molekül ağırlığı 296,40 g/mol'dür (Beltrame, di Salle, Giavini, Gunnarsson ve Brughera, 2001). EKM steroidal yapıya sahiptir. EKM'nin kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Sahip olduğu steroid yapısı nedeniyle nötr bir bileşiktir (Chaturvedi ve Garg, 2022).



Şekil 2.2. EKM'nin kimyasal yapısı

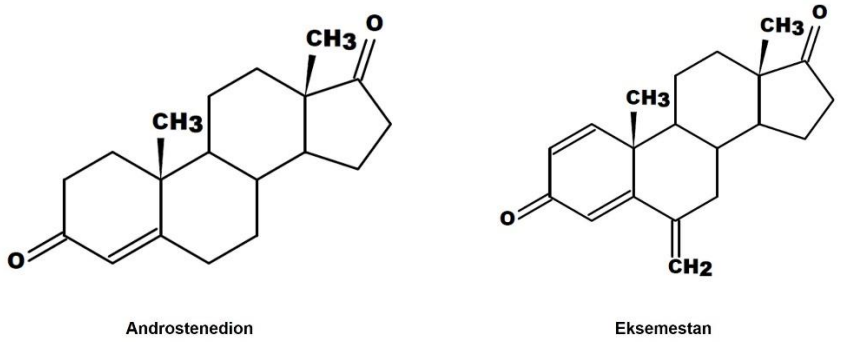
EKM'nin sudaki çözünürlüğü 80 µg/mL'dir (Singh ve diğerleri, 2023). Suda pratik olarak çözünmediği kabul edilmiştir. EKM metanol ve etanolde çözünür, N,N-dimetilformamitte serbestçe çözünür. EKM'nin 37°C'de 24 saat karıştırıldıktan sonra elde edilen pH-çözünürlük profili Çizelge 2.2'de sunulmuştur. EKM polimorfik özellik göstermemektedir. Erime noktası 194°C'dir ve higroskopik değildir. EKM'nin tamamen n-oktanol içinde toplanması nedeniyle n-oktanol:su içindeki partisyon katsayısı belirlenememiştir. Yapısında asidik grup içermemektedir (FDA, 1999b).

Çizelge 2.2. EKM'nin pH-çözünürlük profili (FDA, 1999b)

Ortam	pH	Çözünürlük (µg/mL)
Su	-	80
Klorür tamponu	1,5	86
Asetat tamponu	5,5	79
Fosfat tamponu	7,4	73

2.2.2. Eksemestanın farmakodinamik özellikleri

EKM aromataz enziminin doğal substratı olan androstenediona yapısal olarak benzemektedir. Androstenedion ve EKM'nin kimyasal yapıları Şekil 2.3'te gösterilmiştir. EKM yapısal benzerlik sayesinde aromataz enziminin aktif bölgesine bağlanmak için androstenedion ile yarışır (Beltrame ve diğerleri, 2001; Deeks ve Scott, 2009). Yanlış substrat olarak tanınan EKM, aromataz enzimine geri dönüşümsüz ve kovalent bağ ile bağlanarak enzimi inhibe eder (Jones ve Jones, 2000; Robinson, 2009). Aromataz enziminin geri dönüşümsüz olarak inhibisyonu EKM yapısındaki C1-C2 çifte bağın varlığından kaynaklanmaktadır (Marcos-Escribano, Bermejo, Bonde-Larsen, Retuerto ve Sierra, 2009).



Şekil 2.3. Androstenedion ve EKM'nin kimyasal yapıları

EKM periferal dokulardaki aromataz enzimini inhibe etmektedir ve ovaryumdaki östrojen sentezine etkisi bulunmamaktadır (Shah ve O'Regan, 2018; Yavuz, 2009). Bu nedenle genellikle postmenopozal meme kanseri hastalarında kullanılmaktadır. Premenopozal kadınlarda EKM kullanımı periferal östrojen sentezini azaltarak hipotalamus ve hipofiz bezine geri bildirimin azalmasına yol açar. Ovaryum stimülasyonu gerçekleşir ve östrojen sentezi başlar (Goss ve Gwyn, 1994). Bu nedenlerden dolayı premenopozal meme kanseri hastalarında EKM gibi aromataz inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili yapılmış çalışmalar oldukça azdır (Pistelli, Della Mora, Ballatore ve Berardi, 2018).

Çalışmalar ileri evre meme kanseri olan postmenopozal kadınlarda 25 mg/gün EKM'nin iyi tolere edildiğini göstermiştir. Görülen advers olaylar çoğunlukla hafif ve orta şiddettedir (Scott ve Wiseman, 1999). Erken evre meme kanseri hastalarında en yaygın görülen yan etkiler, sıcak basması, artralji ve yorgunluktur. İleri evre

meme kanseri hastalarında ise sıcak basması ve bulantı olmuştur. Advers etkilerin çoğunluğu östrojen yoksunluğunun normal farmakolojik sonucu olarak da yorumlanabilmektedir (FDA, 2018).

EKM'nin diğer bir yan etkisi kemik demineralizasyonuna bağlı osteoporoz ve kırık riski, artralji ve miyaljidir (Coleman ve diğerleri, 2010; Fusi, Materazzi, Benemei, Coppi ve diğerleri, 2014; Gaillard ve Stearns, 2011). EKM ile tedavi gören hastaların kemik mineral yoğunluğu ve D vitamini düzeylerinin rutin şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir (FDA, 2018).

2.2.3. Eksemestanın farmakokinetik özellikleri

EKM'nin farmakokinetik çalışmaları sağlıklı ve ileri evre meme kanseri postmenopozal kadınlarda gerçekleştirilmiştir. Sıçan ve köpeklerde yapılan klinik öncesi biyoyararlanım çalışmaları da bulunmaktadır (Yavuz, 2009).

EKM oral olarak uygulandığında gastrointestinal sistemden %42 oranında absorbe edilir. Oral uygulamayı takiben 2 saat içerisinde (t_{maks}) maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{maks}) ulaşır ve plazma seviyesi poliekspоnansiyonel olarak düşer. İleri evre postmenopozal meme kanseri kadınlarda EKM absorpsiyonu sağlıklı postmenopozal kadınlara göre daha hızlıdır (Çizelge 2.3). Ortalama biyolojik yarı ömrü 24 saattir (Deeks ve Scott, 2009). EKM tek doz oral uygulamada 10-200 mg, tekrarlanan uygulamada 0,5-50 mg doz aralığında lineer farmakokinetik göstermektedir (Pfizer, 2018).

Çizelge 2.3. Sağlıklı ve ileri evre meme kanseri postmenopozal kadınlara tokluk oral tek ve tekrarlanan 25 mg EKM uygulamasında elde edilen farmakokinetik parametreler (FDA, 1999b)

Parametre	İleri evre meme kanseri hastaları	Sağlıklı gönüllüler
	Tek doz	
t_{maks} *(s)*	1,0	2,3
C_{maks} *(ng/mL)*	40,4	17,1
AUC (ng.s/mL)	76,7	57,8
Cl/F (L/s)	415	517
	Tekrarlanan doz	
$t_{maks.ss}$ *(s)*	1,16	2,9
$C_{maks.ss}$ *(ng/mL)*	29,6	11,4
$AUC_{\tau,ss}$ *(ng.s/mL)*	75,4	41,4
Cl/F_{ss} *(L/s)*	319	715

EKM'nin gıda varlığında biyoyararlanımı %40 oranında artmaktadır (Jones ve Jones, 2000). Açlık ve tokluk durumlarında plazma konsantrasyonu zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) sırasıyla 29,7 ng.s/mL ve 41,3 ng.s/mL olarak bulunmuştur (Clemett ve Lamb, 2000; Scott ve Wiseman, 1999). Açlık ve yüksek lipit içerikli gıda alımı ile yapılan tokluk biyoyararlanım çalışmalarında elde edilen farmakokinetik parametreler Çizelge 2.4'te sunulmuştur (FDA, 1999b). Tokluk durumunda AUC değerinde %40, C_{maks} değerinde %59 artış gözlenmiştir. Bu durum gıda içinde bulunan lipitlerin EKM çözünürlüğünü artırması ve ilk geçiş metabolizasyonunu azaltması ile açıklanmaktadır (FDA, 1999b). EKM biyoyararlanımı yüksek lipit içerikli gıda alımından etkilendiği için yemeklerden sonra alınması önerilmektedir (Pfizer, 2018).

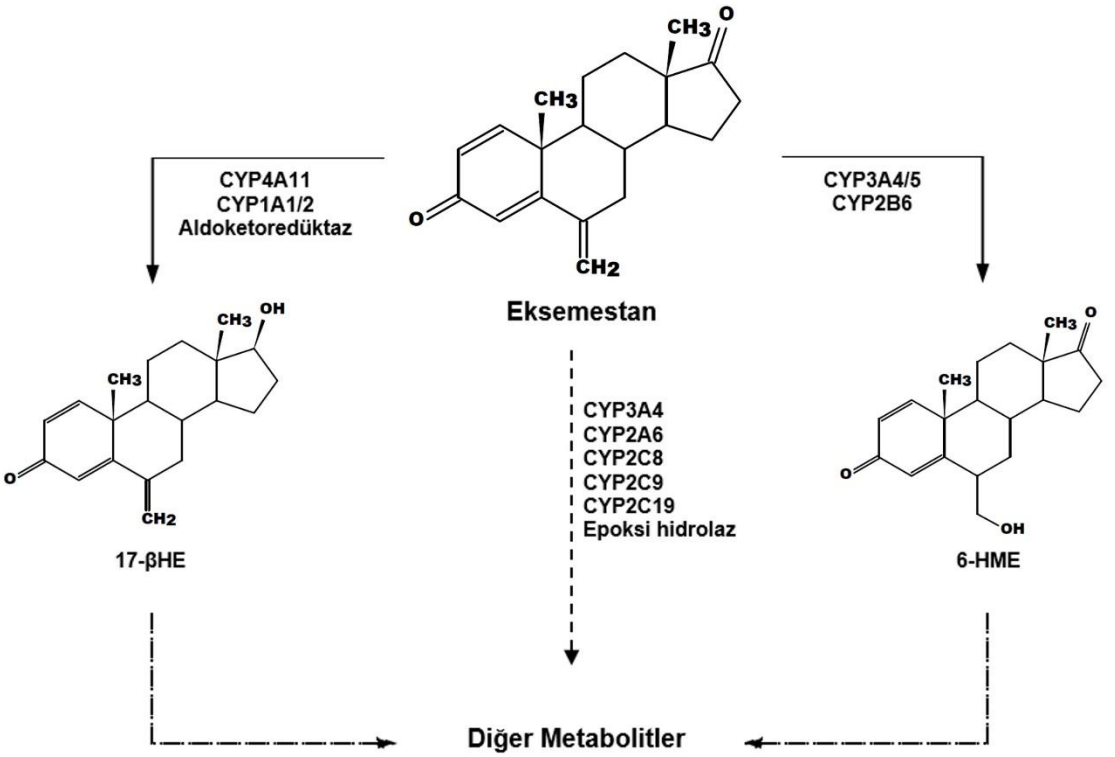
Çizelge 2.4. Sağlıklı postmenopozal kadınlara açlık ve tokluk durumlarında tek doz 25 mg EKM uygulanmasında elde edilen farmakokinetik parametreler

Parametre	Açlık durumu	Tokluk durumu
C_{maks} *(ng/mL)*	11,1	17,7
t_{maks} *(s)*	0,97	1,88
AUC (ng.s/mL)	29,7	41,3
$t_{1/2}$ *(s)*	24,0	21,5

EKM'nin uygun intravenöz formülasyonu olmadığı için insanlarda mutlak biyoyararlanımı belirlenememiştir. Oral biyoyararlanımın düşük olmasından lipofilik yapının ve yüksek ilk geçiş etkisinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sıçan ve köpeklerde yapılan klinik öncesi çalışmalar EKM'nin biyoyararlanımının yaklaşık %5 olduğunu göstermiştir (FDA, 1999b; Yavuz, Bilensoy ve Sumnu, 2007).

Klinik öncesi çalışmalarda sıçan ve köpeklere intravenöz uygulama sonrası merkezi kompartman hacmi sırasıyla 4,8 L/kg ve 1,8 L/kg'dir. Sıçanlarda yapılan doku dağılım çalışması EKM'nin beyin dokusu hariç dokulara yüksek oranda dağıldığını göstermiştir (FDA, 1999b; Yavuz, Bilensoy ve Sumnu, 2007). EKM'nin plazma proteinlerine (albümin ve α_1-asit glikoprotein) bağlanma oranı %90'dır (Moen ve Wagstaff, 2006). EKM ve metabolitleri eritrositlere bağlanmamaktadır (Pfizer, 2018).

EKM sitokrom (CYP) P450 enzim ailesi (CYPA11/2, CYP4A11, CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) ve aldoketoredüktazlar tarafından büyük oranda metabolize edilir. EKM, 6. konumdaki metilen grubunun oksidasyonu ve 17. konumda bulunan keto grubunun redüksiyonu ile sırasıyla 6-hidroksimetileneksemestan (6-HME) ve 17β-hidroksieksemestana (17-βHE) metabolize olur. Bu ana metabolitlerden hidroliz ve konjugasyon reaksiyonları sonucu sekonder metabolitler oluşur (Şekil 2.4) (FDA, 1999b; Varela ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.4. EKM'nin metabolizasyonu

Metabolitler inaktif ya da EKM'den daha düşük aktiviteye sahiptir. Bu nedenle ilacın gözlenen uzun süreli etkisinde herhangi bir metabolitin olası bir katkısı bulunmamaktadır (Lombardi, 2002). 17-βHE metaboliti EKM'den 2,6 kat daha az etkindir ve plazma EKM seviyesinin ortalama %10'unu oluşturmaktadır (Wang ve diğerleri, 2015; Yavuz, 2009). 17-βHE'nin androjen reseptörüne yüksek afinitesi olduğundan EKM alımında gözlenen androjenik etkilerin bu metabolitten kaynaklandığı düşünülmesine rağmen sadece intratümöral androjenik aktivitenin yüksek olduğu görülmüştür (Sobral ve diğerleri, 2016).

EKM eliminasyonu sağlıklı postmenopozal gönüllülere radyoaktif işaretli doz uygulaması ile belirlenmiştir. EKM eliminasyonu %42 feçes ve %42 idrar yoluyla olmuştur. Uygulanan dozun %1'den azı idrarla değişmeden atılmıştır (Deeks ve Scott, 2009). Sağlıklı postmenopozal gönüllülere tek doz 25 mg EKM uygulamasında oral klirens 517 L/s, tekrarlanan doz EKM uygulamasında oral klirens 715 L/s olarak ölçülmüştür (Çizelge 2.3) (Spinelli ve diğerleri, 1999).

EKM CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4 olmak üzere CYP enzimlerini inhibe etmemektedir (Deeks ve Scott, 2009). CYP3A4 enzim inhibitörü

ketokonazol ile birlikte uygulandığında EKM'nin farmakokinetik özelliklerinde belirgin değişiklik görülmemiştir. Klinik olarak önemli bir etkileşim olmadığı belirtilmiştir (Robinson, 2009). CYP3A4 enzim indükleyicisi rifampin ile birlikte uygulandığında EKM'nin C_{maks} ve $AUC_{0-\infty}$ değerinde sırasıyla %41 ve %54 azalma görülmüştür. Böbrek ve karaciğer yetmezliği olan hastaların $AUC_{0-\infty}$ değerinde artış görülmesine rağmen EKM iyi tolere edildiği için doz ayarlamasının gerekli olmadığı belirtilmiştir (Buzdar, Robertson, Eiermann ve Nabholtz, 2002; Pfizer, 2018).

EKM'nin insanlardaki farmakokinetiği çeşitli hayvan türleriyle (sıçan ve köpek) karşılaştırılmıştır. İnsan ve hayvan türlerinde plazma proteinlerine bağlanma oranı ve metabolitlerin benzer olduğu görülmüştür (Çizelge 2.5) (FDA, 1999b).

Çizelge 2.5. İnsan ve hayvan türlerinde EKM'nin plazma proteinlerine bağlanma oranı

Tür	%Bağlanma
İnsan	90-91
Fare	90-91
Sıçan	88-89
Tavşan	97-98
Köpek	91-92

2.2.4. Eksemestanın tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar

EKM postmenopozal dönemdeki hormon reseptör pozitif olan erken ve ileri evre meme kanseri hastalarının hormonal tedavisinde ve nüksü önlemek için kullanılmaktadır. EKM dahil olmak üzere aromataz inhibitörleri için tedavide farklı algoritmalar çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda hastalık nüksü görülmeden sağ kalım süresi açısından EKM daha üstün bulunmuştur. Tamoksifen tedavisinden sonra EKM tedavisine geçiş, yalnızca tamoksifen tedavisine göre tümör progresyonu ve mortalitede önemli derecede azalma sağlamıştır (Coombes ve diğerleri, 2007; Van de Velde ve diğerleri, 2011).

Genel görüş, aromataz inhibitörlerinin hormon reseptör pozitif meme kanseri tedavisinin bir parçası olması gerektiği yönündedir (Güler, 2012). Amerikan Klinik

Onkoloji Derneği 10 yıla kadar EKM'nin de bir parçası olduğu adjuvan hormonal tedaviyi önermektedir (Burstein ve diğerleri, 2019).

EKM suda düşük çözünürlüğe (80 µg/mL) sahiptir ve ilk geçiş etkisine uğramaktadır (Yavuz, Bilensoy, Vural ve Şumnu, 2010). Bu nedenle biyoyararlanım problemi vardır (Hiremath, Soppimath ve Betageri, 2009). Literetürde, EKM'nin çözünürlüğünü, oral biyoyararlanımını ve antikanser etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar kendiliğinden mikroemülsifiye sistem, prolipozom, siklodekstrin kompleksi, katı dispersiyon, PLGA nanopartikülleri, lipit temelli dispersiyon, aljinat nanopartikülleri, polimerik nanopartikül, nanoyapılı lipit taşıyıcı, misel ve nanokapsül gibi formülasyon yaklaşımlarından oluşmaktadır. Transdermal olarak uygulanmak üzere geliştirilmiş prolipozom, sıvı kristal jel ve nanoemülsiyon formülasyonu bulunmaktadır. Ayrıca, intravenöz uygulama yolu için geliştirilmiş teranostik kullanım potansiyeline sahip EKM yüklü manyetik silika nanopartikül formülasyon çalışması da mevcuttur. Literatürdeki EKM içeren formülasyon geliştirme çalışmaları Çizelge 2.6'da sunulmuştur.

Çizelge 2.6. Literatürde bulunan EKM ile yapılmış formülasyon geliştirme çalışmaları

Formülasyon çalışması	Uygulama yolu	Elde edilen bulgular	Referans
Kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SMEDDS)	Oral	SMEDDS, Aromasin® ile karşılaştırıldığında 15 dakika içinde %100 EKM salımı göstermiştir. Wistar sıçanlarda yapılan oral biyoyararlanım çalışmasında EKM yüklü SMEDDS formülasyonu EKM süspansiyonu ile karşılaştırıldığında AUC'de 2,87 kat artış sağlamıştır.	(Singh ve diğerleri, 2009)
Nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLC)	Oral	Wistar sıçanlarda EKM biyoyararlanımı EKM süspansiyonu ile karşılaştırıldığında EKM yüklü NLC formülasyonu ile 3,9 kat artmıştır.	(Singh, Neupane, Mangla ve Kohli, 2019)
Pegile lipozom	Oral	Ex-vivo permeabilite çalışmasında pegile lipozomlar EKM permeabilitesini 3,7 kat artırmıştır. İn vivo farmakokinetik çalışmada klasik ve pegile lipozomlar EKM biyoyararlanımını sırasıyla 2,4 ve 3,5 kat artırmıştır.	(Singh, Neupane, Shafi, Mangla ve Kohli, 2020)
Lipit polimer hibrit nanopartikül	Oral	Geliştirilen formülasyon in vitro çözünme hızı çalışmasında 24 saat boyunca sıfır derece kinetikle EKM salımı sağlamıştır. MCF-7 hücre hattında saf EKM'ye kıyasla yüksek in vitro hücresel alım ve sitotoksisite göstermiştir.	(Rizwanullah, Perwez, Mir, Rizvi ve Amin, 2021)
Aljinat nanopartikül	Oral	İn vitro çözünme hızı çalışmasında geliştirilen formülasyon hızlı bir ilaç salımını takiben sürekli salım göstermiştir.	(Jayapal ve Dhanaraj, 2017)
D-α-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat (TPGS) polimerik nanopartikül	-	Geliştirilen formülasyon in vitro salım çalışmasında sürekli salım göstermiştir. Salım kinetiği Korsmeyer-Peppas modeline uygunluk göstermiştir. İn vitro sitotoksisite çalışmasında TPGS polimerik nanopartikül formülasyonu saf EKM ile aynı sitotoksik etki için EKM konsantrasyonunda 31,7 kat azalma sağlamıştır.	(Mishra, Padaliya ve Patel, 2017)
Polimerik misel	Oral	MCF-7 hücre hattı kullanılarak yapılan sitotoksisite çalışmasında saf EKM için IC_{50} değeri 7,58 ± 0,145 µg/mL iken polimerik misel formülasyonu için bu değer 0,225 ± 0,124 µg/mL olarak bulunmuştur. Oral biyoyararlanım çalışmasında polimerik misel formülasyonu EKM biyoyararlanımını 10,6 kat artırmıştır.	(Singh ve diğerleri, 2021)
Nanokristal	Oral	Geliştirilen formülasyon EKM biyoyararlanımını saf EKM'ye kıyasla 2,7 kat artırmıştır.	(Parmar ve Shah, 2021)
Nanokapsül	Oral	Saf EKM ile karşılaştırıldığında nanokapsül formülasyonu tümör hacminde 2,4 kat azalma sağlamıştır.	(Elzoghby, El-Lakany, Helmy, Abu-Serie ve Elgindy, 2017)

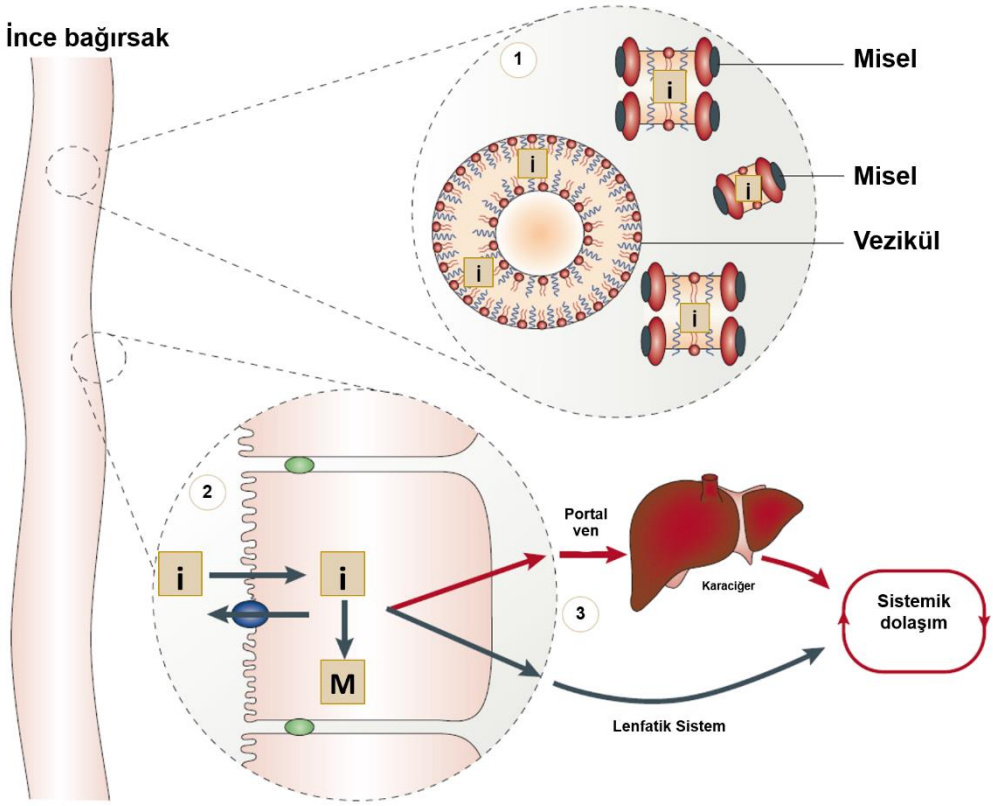
Çizelge 2.6. (devam) Literatürde bulunan EKM ile yapılmış formülasyon geliştirme çalışmaları

Formülasyon çalışması	Uygulama yolu	Elde edilen bulgular	Referans
Nanoküre	İntravenöz	Geliştirilmiş formülasyon saf EKM'ye kıyasla çok daha düşük IC_{50} değerinde MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki artışı sağlamıştır.	(El-Lakany, Elgindy, Helmy, Abu-Serie ve Elzoghby, 2018)
Siklodekstrin kompleksi	Oral	Caco-2 hücre hattında inklüzyon kompleksi EKM için permeabilite katsayısını 3 kat artırmıştır.	(Yavuz ve diğerleri, 2010)
Katı dispersiyon	Oral	Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılan permeabilite çalışmasında lipit temelli katı dispersiyon formülasyonu EKM permeabilitesini 4,6 kat artırmıştır. İn vivo farmakokinetik çalışmada EKM biyoyararlanımı 2,3 kat artmıştır.	(Kaur, Jena, Samal, Saini ve Sangamwar, 2017)
Lipit temelli dispersiyon	Oral	TPGS içeren dispersiyon EKM çözünürlüğünü 11,4 kat artırmıştır. Ex-vivo permeabilite çalışmasında EKM permeabilitesi geliştirilen formülasyon ile 2,6 kat artmıştır.	(Eedara ve Bandari, 2017)
Lipit nanokapsül	Oral	İn vivo farmakokinetik çalışmada lipit nanokapsül formülasyonu EKM süspansiyonuna göre 4,2 kat biyoyararlanım artışı sağlamıştır.	(Singh ve diğerleri, 2023)
Manyetik silika nanopartikül	İntravenöz	Hücre kültürü çalışmasında demir oksit nanopartiküllerinin sitotoksik olmadığı gözlemiştir. Formülasyon 72 saat boyunca sürekli salıma sahiptir ve %98,8 salım oranına ulaşmıştır.	(Laranjeira ve diğerleri, 2022)
Nanoemülsiyon	Transdermal	Ex-vivo deri permeasyon çalışmasında geliştirilen formülasyon EKM'nin permeabilite katsayısını 3,33 kat artırmıştır.	(Chaturvedi ve Garg, 2023)
Prolipozom	Transdermal	Optimize prolipozom formülasyonu, EKM süspansiyonu ile karşılaştırıldığında EKM için bağıl biyoyararlanımı 2,4 kat artırmıştır.	(Jukanti, Sheela, Bandari ve Veerareddy, 2011)
Isı duyarlı sıvı kristal jel	Transdermal	Geliştirilen formülasyon 37°C'de jelden sıvıya geçiş göstermiştir. Sitotoksisite çalışmasında 2,7 kat aktivite artışı sağlamıştır.	(Shah ve diğerleri, 2021)

2.3. Lipit Temelli Formülasyonlar

Gıda ile alınan lipitlerin suda çözünürlüğü çok düşük olmasına rağmen insanlarda emilimi yüksektir. Bu durum suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeler için çözünürlük ve biyoyararlanım probleminin aşılmasını sağlayabilen lipit absorpsiyon mekanizmasının mevcudiyetini yansıtmaktadır (Kalepu, Manthina ve Padavala, 2013). Yüksek lipit içerikli gıdaların suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların biyoyararlanım artışını desteklediği uzun yıllardır bilinmektedir (Charman, Rogge, Boddy ve Berger, 1993; Ogunbona, Smith ve Olawoye, 1985). Burada, lipitlerin ve lipidik yardımcı maddelerin ilaç emilimi üzerindeki potansiyel etkisi üç mekanizma ile açıklanabilir (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007):

1. Veziküller ve karışık miseller gibi kolloidal ortam bileşimini değiştirerek intestinal sıvılarda ilaç çözünürlüğünü artırabilirler.
2. Enterosit aracılı taşıma ve metabolizasyon süreçlerini etkileyerek ilaç alımı, effluks ve enterositlerde gerçekleşen metabolizasyonu değiştirebilirler.
3. İlacın sistemik dolaşıma transportunu portal ven yerine intestinal lenfatik sistem olarak değiştirebilirler. Her bir mekanizmanın şematik gösterimi Şekil 2.5’te sunulmuştur.

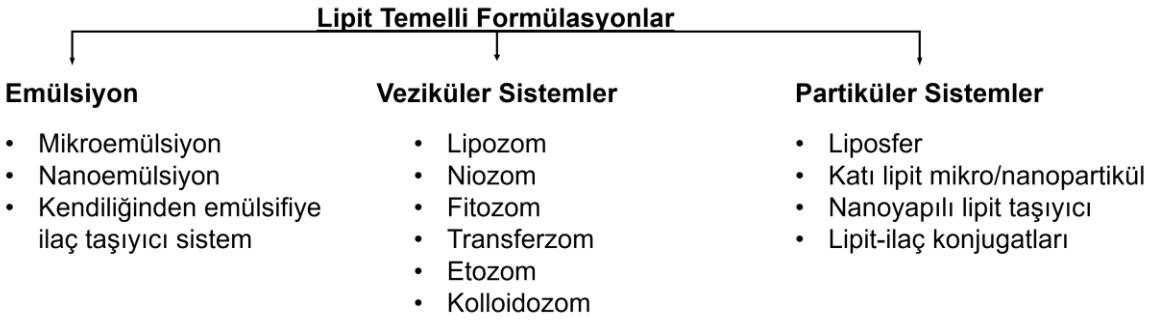


(İ:İlaç, M:Metabolit)

Şekil 2.5. Lipitlerin ilaç emilimine etkileri (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007)

Bu bağlamda lipit ve lipidik bileşenleri içeren lipit temelli formülasyonlar (LTF) suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların biyoyararlanımı artırmak için uygun bir yaklaşımdır (Feeney ve diğerleri, 2016).

LTF terimi yardımcı madde, yardımcı madde kombinasyonlarını ve ilaç taşıyıcı sistemleri içeren geniş bir aileyi kapsamaktadır (Şekil 2.6) (Shrestha, Bala ve Arora, 2014). Bu formülasyonlar basit bir veya iki yardımcı maddeli lipit çözeltilerinden kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlere (Self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS), kompleks mikro veya nano boyuta sahip kolloidler ve miseller sistemlerde dahil olmak üzere farklı fiziksel yapıya sahip sistemlere kadar uzanmaktadır (Kalepu ve diğerleri, 2013; Müllertz, Ogbonna, Ren ve Rades, 2010).



Şekil 2.6. LTF'nin sınıflandırılması

Lipit temelli formülasyonların pek çok farklı türü olduğundan 2000 yılında Pouton tarafından bir sınıflandırma yapılarak Lipit Formülasyon Sınıflandırma Sistemi (Lipid Formulation Classification System-LFCS) oluşturulmuştur (Pouton, 2000). 2006 yılında da sınıflandırma sistemine yeni bir sınıf eklenerek güncellenmiştir (Pouton, 2006). Bu sisteme göre gliserit, sürfaktan, kosürfaktan veya yardımcı çözücüler gibi benzer bileşenlere sahip ve benzer özellikleri paylaşan formülasyonlar bileşim, bileşen oranları, dispersiyon ve sindirim durumuna göre dört kategoriye ayrılmaktadır (Çizelge 2.7) (Pouton, 2006). Tüm kategorideki formülasyonlar genellikle izotropik sistemlerdir. Çoğunlukla yağ, sürfaktan ve kosürfaktan karışımı halinde bulunmalarına rağmen bazen tek yardımcı maddeden de oluşabilirler (Kuentz, 2012). LFCS'ye ait formülasyon kategorileri aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 2.7. LFCS'ye göre çeşitli lipit formülasyon türlerinin bileşimleri, özellikleri, avantaj ve dezavantajları (Pouton, 2006)

Formülasyon bileşenleri	**Tip I**	**Tip II**	**Tip IIIA**	**Tip IIIB**	**Tip IV**
	Miktar (%a/a)				
Yağlar (Trigliserit veya mono ve digliserit karışımı)	100	40-80	40-80	<20	-
Suda çözünmeyen sürfaktanlar (HLB<12)	-	20-60	-	-	0-20
Suda çözünen sürfaktanlar (HLB>12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Hidrofilik yardımcı çözücüler	-	-	0-40	20-50	0-50
Özellikleri	Sadece yağ içerirler. Suda disperse olmazlar. Sindirim gereklidir.	Suda çözünür bileşenler içermez.	Suda çözünür bileşenler içerirler.	Suda çözünür bileşenlere ve düşük yağ içeriğine sahiptirler.	Sürfaktan ve/veya yardımcı çözücülerden oluşurlar.
Avantajları	Basit formülasyonlardır.	Dispersiyon ile çözücü kapasitesini kaybetme olasılığı düşüktür.	Genellikle berrak dispersiyon oluştururlar. Emilimleri için sindirim gerekli değildir.	Berrak dispersiyon oluştururlar. Emilimleri için sindirim gerekli değildir.	Dispersiyon ile misel çözeltisi oluştururlar. Birçok ilaç için yüksek çözücü kapasitesine sahiptir.
Dezavantajları	Sadece yüksek oranda lipofilik ilaçlar için uygundur. Düşük çözücü kapasitesine sahiptir.	Su ile bulanık dispersiyon oluştururlar.	Dispersiyon ile çözücü kapasitesi kaybı olasıdır.	Dispersiyon ile çözücü kapasitesi kaybı yüksektir.	Dispersiyon ile çözücü kapasitesi kaybı meydana gelir.

HLB: Hidrofilik lipofilik denge

2.3.1. Tip I formülasyonlar

Tip I formülasyonlar trigliserit veya monogliserit/digliserit karışımını içeren yağ içinde ilacı çözünmüş halde taşıyan sistemlerdir (Pandey ve Kohli, 2018). Tip I formülasyonlar biyolojik olarak uyumlu ve basittirler. İlaç dozunun formülasyonda tamamen çözünebilmesi durumunda genellikle ilk olarak denenen sistemlerdir (Savla, Browne, Plassat, Wasan ve Wasan, 2017). Bu sistemler yapılarında sürfaktan içermedikleri için başlangıçta zayıf su dispersiyonu sergiler ve kolaylıkla disperse olmazlar. Uygulama sonrası gastrointestinal kanalda arayüzey gerilimini azaltarak disperse olabilmeleri için safra tuzları, fosfolipitler ve lipit sindirim ürünlerine ihtiyaç vardır (Kuentz, 2012). Bu nedenle Tip I formülasyonların ana dezavantajı dispersiyonu sağlamak ve amfifilik lipit sindirim ürünü elde ederek kolloidal sulu faza ilaç taşınımını artırmak için sindirim gerekliliğidir (Pandey ve Kohli, 2018).

2.3.2. Tip II formülasyonlar

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem olarak adlandırılan Tip II formülasyonlar su ile karıştırıldığında su içinde yağ emülsiyonu oluşturmak üzere kendiliğinden emülsifiye olan yağ ve lipofilik sürfaktanların izotropik karışımı olarak tanımlanmaktadır (Pouton, 1997; Thakare, Mogal, Borase, Dusane ve Kshirsagar, 2016). Formülasyondaki sürfaktan miktarı emülsifikasyon özelliklerini etkiler. Kendiliğinden emülsifikasyon genellikle %25'in (a/a) üzerindeki sürfaktan varlığında elde edilir. Optimum sürfaktan oranı %25-60 (a/a) arasında değişmektedir. Formülasyonda daha yüksek sürfaktan kullanıldığında emülsifikasyon yağ-su arayüzeyinde viskoz sıvı kristal jellerin oluşması nedeniyle zorlaşabilir. Bu durum emülsifikasyon için güçlü bir karıştırma gerektirir (Pouton, 2000).

Tip II formülasyonlar, katı dozaj formlarında tipik olarak gözlemlenen yavaş dağılma ve çözünme adımlarına gerek duymamaktadır. İlacın yağ damlacıkları ile emilen faz olan sulu faz arasında etkili bir şekilde bölünmesine olanak tanıyan geniş arayüzey alanları oluşturur (Gersanik ve Benita, 2000). Suda az çözünen ilaçların çözünürlük ve biyoyararlanım problemlerinin üstesinden gelmek için sert veya yumuşak kapsüller gibi tek üniteli dozaj formları ile yararlı bir platform sunar (Rodríguez, Qiu,

Mulcey, Weigandt ve Tamblyn, 2015). Ancak bu formülasyonlar sınırlı ilgi görmüştür. İlaç piyasasında mevcut ürünü bulunmamaktadır. Bunun nedeni Tip II formülasyon için kullanılabilecek en etkili sürfaktanların FDA tarafından yayınlanan inaktif bileşenler listesinde yer almayışı olduğu düşünülmektedir (Pouton ve Porter, 2008).

2.3.3. Tip III formülasyonlar

Tip III formülasyonlar yapılarında yağ ve hidrofilik sürfaktan veya polietilen glikol (PEG), propilen glikol ve Transcutol® gibi yardımcı çözücüler içeren, kendiliğinden emülsifikasyon sağlayan ve genel olarak kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (Self-microemulsifying drug delivery system- SMEDDS) olarak adlandırılan sistemlerdir (Pandey ve Kohli, 2018). Formülasyona yardımcı çözücü ilavesi yağdaki çözünürlüğü daha düşük olan ilaçlar için daha yüksek ilaç yüklemesine olanak tanımaktadır. Hidrofilik bileşenlerin eklenmesi ayrıca daha küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyon oluşumunu sağlar. Yağ/su arayüzeyinde hidrofilik sürfaktan varlığı emülsiyon damlacıklarının arayüzey gerilimini düşürerek dispersiyonu kolaylaştırır. Bu nedenle bu tür formülasyonlar su ile karşılaştığında hızlıca dağılarak genellikle nano boyutlu şeffaf dispersiyonlar oluştururlar. Başarılı Tip III formülasyon geliştirmede kilit nokta hidrofilik yardımcı bileşen miktarıdır. Yüksek miktarda hidrofilik bileşen kullanımı, formülasyon dispersiyonu ile çözücü kapasitesi kaybına yol açabilmektedir (Pouton ve Porter, 2008).

İlaç piyasasındaki ürünlerin çoğu, çok çeşitli yağda ve suda çözünebilen etkin maddeler içeren Tip III sistemlerdir (Kalepu ve diğerleri, 2013).

Tip III formülasyonlar bileşimlerindeki hidrofilik sürfaktan miktarına bağlı olarak Tip IIIA ve Tip IIIB olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Tip IIIA formülasyonlar Tip IIIB formülasyonlara kıyasla daha fazla yağ içermektedirler. Tip IIIB LTF'ler daha yüksek düzeyde hidrofilik sürfaktan içerdikleri için Tip IIIA'ya göre daha kolay disperse olurlar ve daha küçük damlacık boyutlarına sahip berrak emülsiyonlar oluştururlar. Ancak formülasyonda yağ içeriğinin düşük olması, hidrofilik ve suyla karışabilen bileşenlerin yüksek konsantrasyonda kullanılması ilacı çözme

kapasitesinde azalmaya yol açmakta ve ilacın çökme riskini artırmaktadır (Thakare ve diğerleri, 2016).

Yüksek enerji gerektirmeden hafif bir çalkalama ile emülsifikasyonun kendiliğinden oluşmasıyla üretilen ve SMEDDS veya kendiliğinden nano emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (self-nanoemulsifying drug delivery systems-SNEDDS) olarak adlandırılan bu formülasyonlar için terminolojik karışıklık mevcuttur. Literatürde mikroemülsiyon veya nanoemülsiyon olarak adlandırılan örneklerin çoğunun aslında birbirine yerine kullanıldığı görülmüştür (Anton ve Vandamme, 2011). Nanoemülsiyon ile mikroemülsiyon arasında karışıklığa neden olan ise üretim yöntemlerinin, morfoloji ve damlacık boyutlarının benzerliğidir.

Nanoemülsiyonlar yaklaşık 300 nm'den daha küçük damlacık boyutu sergileyen termodinamik açıdan kararsız ancak Ostwald olgunlaşması, flokülasyon ve koalesansın çok yavaş bir kinetik ile gerçekleşmesi nedeniyle kinetik olarak stabil kabul edilen sistemlerdir (Anton ve Vandamme, 2011; Tadros, Izquierdo, Esquena ve Solans, 2004). Nanoemülsiyonlar yağ/su arayüzey alanını artırmak için yüksek basınçlı homojenizatörler gibi spesifik cihazlar kullanılarak yüksek enerji adı gerektiren yöntemlerle üretilirler. Cihaz veya yüksek enerji gerektirmeyen kendiliğinden emülsifikasyon ve faz geçiş sıcaklığı yöntemi gibi düşük enerjili yöntemler de nanoemülsiyon üretiminde kullanılır (Tadros ve diğerleri, 2004).

Kendiliğinden emülsifikasyon yönteminde formülasyon bileşenlerinin kendine özgü fizikokimyasal özelliklerinden yararlanılır. Yağ fazı ile su fazının oda sıcaklığında karıştırılması sonucu, yağ fazında bulunan hidrofilik sürfaktanlar hızlı bir şekilde su fazına difüze olarak, yağ bileşeninin amfifilik yapılar tarafından nano boyuttaki damlacıklar içinde çözünmesini sağlar (Anton, Benoit ve Saulnier, 2008). Bu düşük enerjili kendiliğinden emülsifikasyon boyutları yağ ve sürfaktan oranına bağlı olarak 10 nm ile 300 nm arasında değişen kinetik olarak stabil emülsiyon damlacıklarının oluşumunu sağlar (Anton ve Vandamme, 2011).

Mikroemülsiyonlar ise kendiliğinden oluşan, düşük viskoziteli, şişmiş miseller olarak bilinen ve nano boyutta homojen görünüşe sahip formülasyonlardır. Mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonların aksine termodinamik olarak stabil

sistemlerdir ve hazırlanmaları için yüksek sürfaktan konsantrasyonu gerektirirler. Bu sistemlerin termodinamik stabilitesi onları yalnızca kinetik olarak stabil olan nanoemülsiyonlardan ayırmaktadır (Akkuş-Arslan, 2013; Kuentz, 2012). Ayrıca nanoemülsiyon damlacıkları sıcaklık değişimleri, dilüsyon gibi stres koşullarında stabil kalır. Öte yandan mikroemülsiyonlar sıcaklık değişikliklerinden veya dilüsyondan etkilenir. Aralarındaki diğer fark ise nanoemülsiyon sürfaktanın ilk olarak yağ fazı ile karıştırıldığı durumda oluşurken, mikroemülsiyon oluşumu karıştırma sırasından etkilenmemektedir (Dokania ve Joshi, 2015).

Mikroemülsiyonlar üretimin basitliği, yüksek stabilitesi ve endüstriyel ölçek büyütmedeki potansiyeli nedeniyle geçmişten günümüze önem kazanan, geniş çapta araştırılan ve en çok ticarileşen formülasyonlardır (Anton ve Vandamme, 2011).

Yukarıda sunulan bilgiler göz önünde bulundurulduğunda SEDDS, SMEDDS veya SNEDDS olarak ifade edilen sistemlerin tamamının yağ, lipofilik ya da hidrofilik sürfaktan ve bazen de yardımcı çözücünün izotropik karışımından oluşan, hafif çalkalama veya gastrointestinal sistem motilitesi ile kendiliğinden su içinde yağ emülsiyonu oluşturan mikroemülsiyon formülasyonları olduğu açıkça görülmektedir (Dokania ve Joshi, 2015). Tez kapsamında geliştirilmesi amaçlanan formülasyon SNEDDS formülasyonu olup bu sistemler ve farklılıkları Bölüm 2.4'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.3.4. Tip IV formülasyonlar

Yağ içermeyen formülasyonların artan kullanımlarına bağlı olarak LTFC'ye dördüncü grup olarak eklenen Tip IV formülasyonları yalnızca hidrofilik sürfaktan veya yardımcı çözücü karışımından oluşmaktadır. Sınıflandırma sisteminin en hidrofilik kategorisidir. Düşük lipofilikliğe sahip suda çözünürlüğü düşük olan ilaçlar için çok uygundur (Pouton, 2006).

Tip IV formülasyonların çözücü kapasitesi yardımcı çözücü varlığından dolayı genellikle yüksektir. Bu da LTFC'ndeki diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında yüksek miktarda ilaç yüklemesi sağlar. Formülasyonda yardımcı çözücü

kullanmanın diğer avantajları, dispersiyonu kolaylaştırmak ve yüksek sürfaktan konsantrasyonlarının neden olduğu iritasyonu azaltmaktır (Pouton ve Porter, 2008). Ancak sistemde yüksek oranda bulunan hidrofilik bileşenler dispersiyon sonucu formülasyonu çözme kapasitesi kaybına yatkın hale getirmektedir (Thakare ve diğerleri, 2016). Ayrıca ilacın devamlı kullanılması durumunda, Tip IV formülasyonlar iyi tolere edilemeyebilmektedir (Pouton, 2006).

2.4. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler

SEDDS'ler yağ (doğal veya sentetik), sürfaktan, kosürfaktan veya yardımcı çözücünün izotropik karışımı olarak tanımlanmaktadır. Gastrointestinal sıvılarla karıştığında gastrointestinal motilite yardımıyla veya suda disperse edildiğinde hafif bir çalkalamanın ardından kendiliğinden emülsifiye olarak Y/S emülsiyon damlacıklarını oluştururlar (Singh, Bandopadhyay, Kapil, Singh ve Katare, 2009).

SEDDS'ler çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanım sorununu çözmede başarılı formülasyon stratejileridir. Hidrofobik veya lipofilik ilaçlar sistemde çözünmüş halde bulunur. Böylece bu ilaçların dozaj formu içerisinde oral olarak uygulanmasına olanak sağlanır (Kohli, Chopra, Dhar, Arora ve Khar, 2010).

SEDDS, literatürde mikroemülsiyonları kapsayan geniş bir terim olarak kullanılmaktadır. Ancak SEDDS'in LTFC'ne göre Tip II formülasyon sınıfının genel adıdır. Tip II formülasyon olan SEDDS terimi, SMEDDS ve SNEDDS formülasyonlarıyla morfolojik, bileşen ve boyut açısından farklılıklara sahiptir. Literatürde 250 nm'den büyük damlacık boyutu sahip formülasyonları SEDDS, 100 nm ile 250 nm arasında değişen damlacık boyutuna sahip sistemler SMEDDS, 100 nm'den küçük damlacık boyutuna sahip sistemler ise SNEDDS olarak adlandırılmaktadır (Kohli ve diğerleri, 2010). LFCS'ye göre Tip II SEDDS ve Tip III SMEDDS arasındaki temel farklılık, SEDDS opak emülsiyonlar oluştururken, SMEDDS'in şeffaf emülsiyon damlacıkları oluşturmasıdır (Mohsin, Long ve Pouton, 2009). SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS arasındaki temel farklılıklar Çizelge 2.8'de listelenmiştir. Tez kapsamında, SEDDS terimi 250 nm'den küçük berrak emülsiyon damlacıklarını oluşturan sistemleri ifade etmek için kullanılmaktadır.

Çizelge 2.8. SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS formülasyonları arasındaki temel farklar (Dokania ve Joshi, 2015; Pouton, 2000)

Özellik	SEDDS	SMEDDS	SNEDDS
Damlacık boyutu	>250 nm	<250 nm	<100 nm
Görünüş	Opak	Berrak	Berrak
HLB değeri	<12	>12	>12
LFCS'ye göre sınıfı	Tip II	Tip IIIA	Tip IIIB
Yağ konsantrasyonu	%40-80	%40-80	<%20

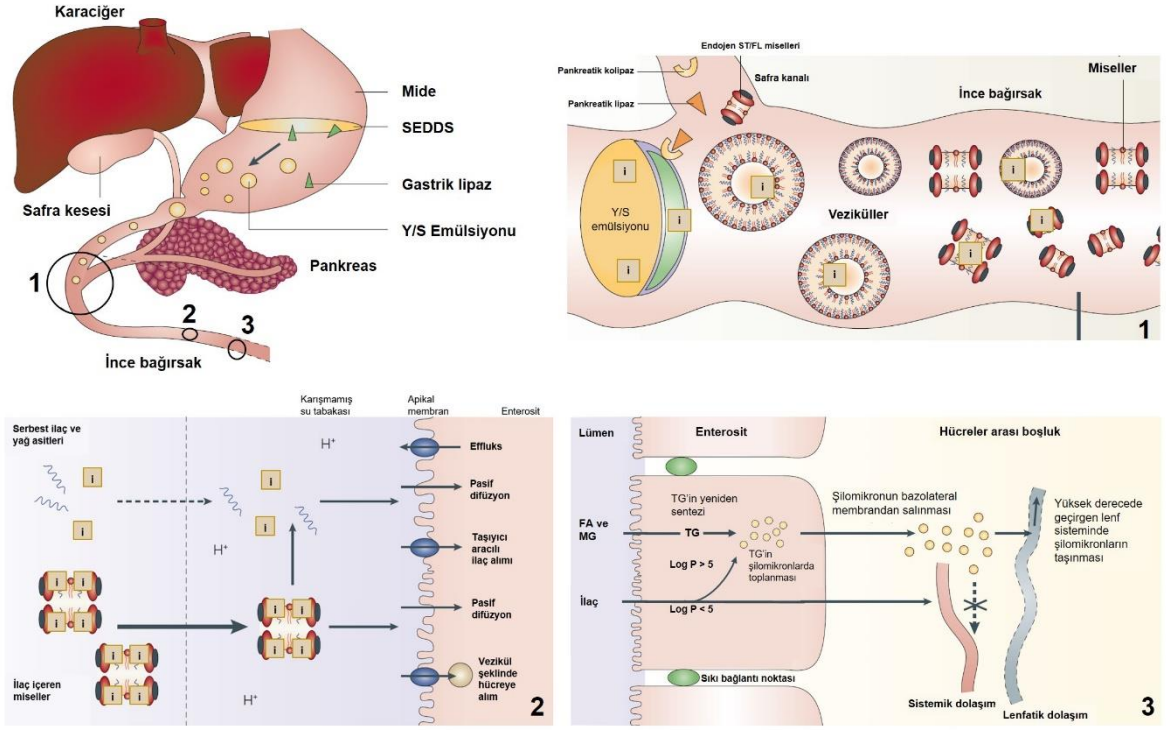
2.4.1. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin suda çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanımını artırma mekanizmaları

Suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların oral uygulamadan sonra gastrointestinal kanalda büyük ölçüde çöktüğü gözlenmiştir (Carrière, 2016). Bu durum çoğunlukla zayıf biyoyararlanımla sonuçlanmaktadır. SEDDS'ler, lipofilik veya hidrofobik bileşiklerin oral uygulanmasıyla ilgili çözünürlük sınırlamasının aşılmasında yüksek potansiyele sahiptir (Buya, Beloqui, Memvanga ve Préat, 2020). SEDD sistemler düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar için hız sınırlayıcı basamak olan çözünme adımını ilacı çözünmüş halde taşımaları sayesinde atlayarak oral biyoyararlanımda iyileşme sağlamaktadır. Ancak biyoyararlanımda artış sağlayan tek mekanizma çözünürlük probleminin aşılması ile sınırlandırılmamalıdır. SEDD sistemlerin biyoyararlanım artırma mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir (Şekil 2.7) (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007):

- Gastrointestinal sıvıların çözme kapasitesinin artması: Gastrointestinal kanalda lipitlerin varlığı safra tuzları (ST), fosfolipitler (FL) ve kolesterol (KL) dahil olmak üzere safra ve pankreas salgılarını uyarır. Bu ürünler, motilite ile birlikte lipofilik ilacın çözünmesini destekleyen ST/FL/CH misellerinin oluşumunu sağlar (Dahan ve Hoffman, 2008). Az miktarlardaki lipitlerin bile pankreas ve safra kesesini uyarabildiği gösterilmiştir (Kossena, Charman, Wilson, O'Mahony, Lindsay ve diğerleri, 2007). Safra salgılarındaki artışın yanı sıra SEDD sistemin eksojen lipidik bileşenleri direkt veya pankreatik lipaz ile sindirim sonucu oluşan ürünler şeklinde ST/FL ile etkileşime girerek var olan misellerin şişmesini sağlar veya lipofilik ilacın çökelmesini önleyen

farklı misel türleri oluşturur (Berthelsen, Klitgaard, Rades ve Müllertz, 2019). Şekil 2.7'de gastrointestinal sistem içeriği şematik olarak gösterilmiştir.

- Gastrik kalış süresinin uzaması: Gastrointestinal kanaldaki lipitler, mide boşalmasında gecikmeye neden olur, yani SEDDS'in mide geçiş süresi artar. Sonuç olarak birlikte uygulanan lipofilik ilacın ince bağırsakta kalma süresi artar. Bu, ilacın emilim bölgesinde daha iyi çözünmesini sağlar ve böylece emilimi artırır (Serajuddin, Mufson, Bernstein, Sheen ve Augustine, 1988).
- Lenfatik transportun uyarılması: Oral uygulanan ilaçların çoğu portal ven ile sistemik dolaşıma geçer. Ancak yüksek oranda lipofilik bileşikler bağırsaktaki lenfatik sistem ile de emilebilir. Bağırsaklardan lenfatik ilaç emiliminin ana mekanizması ilacın enterositlerde in situ sentezlenen şilomikronların lipidik çekirdekleriyle birleşmesi yoluyla gerçekleşir. Lipit çekirdeğinde ilaç içeren şilomikron golgi cisimciğinde paketlenir ve enterositlerin bazolateral membranından hücreler arası boşluğa salınır (Porter, Pouton, Cuine ve Charman, 2008). Gözenekli lenf damarları tarafından emilerek sol juguler ve sol subklavyen damarların birleştiği yerde sistemik dolaşıma katılır (O'Driscoll, 2002). İlacın özellikle uzun zincirli trigliseritlerle uygulanması, enterositlerdeki şilomikron sentezini ve lenfatik transport kapasitesini artırarak biyoyararlanımı iyileştirir (Porter ve Charman, 2001(a)). Ayrıca lenfatik sistemin anatomisi sonucu hepatik ilk geçiş metabolizasyonu aşılmış olur (Porter ve Charman, 2001(b)). Şekil 2.7'de lenfatik emilim mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.
- İntestinal permeabilitenin değiştirilmesi: Çeşitli lipidik bileşenler ve sürfaktanlar gastrointestinal kanalın bariyer fonksiyonunu etkilemektedir. Bu yardımcı maddeler membran akışkanlığında artış sağlayarak ve paraselüler taşımaya izin veren sıkı bağlantı noktalarını (tight junction) açarak permeabilite artışı sağlaması ile absorpsiyonu artırmaktadır (Berthelsen ve diğerleri, 2019).
- Gastrointestinal sistemin biyokimyasal bariyer fonksiyonunun değiştirilmesi: SEDDS formülasyonundaki bazı yardımcı maddelerin (Kolliphor®, Tween® 80, Labrasol® ve Transcutol®) P-glikoprotein (P-gp) gibi effluks taşıyıcıları ve metabolizasyondan sorumlu sitokrom P450 enzim ailesinin aktivitesini inhibe ederek emilen ilaç fraksiyonunda artış sağladığı gösterilmiştir (Akhtar ve diğerleri, 2020; Singh ve diğerleri, 2016).



(İ: İlaç, ST: Safra tuzu, FL: Fosfolipit, FA: Yağ asidi, MG: Monogliserit, TG: Trigliserit)

Şekil 2.7. SEDD sistemlerin biyoyararlanım artırma mekanizmaları (Porter, Trevaskis ve Charman, 2007)

Yapılan literatür araştırmasına göre exendin-4, α-lipoik asit, sefiksim, iloperidon için geliştirilen SEDDS formülasyonları saf etkin maddeye kıyasla sırasıyla 0,8, 7, 2 ve 3,8 kat biyoyararlanım artışı sağlamıştır (Banik, Halder, Sato ve Onoue, 2021; Celik-Tekeli, Celebi, Tekeli ve Aktas, 2021; Saifullah ve diğerleri, 2021; Suram, Narala ve Veerabrahma, 2020). Ayrıca Yılmaz-Usta ve ark. geliştirdikleri bosentan yüklü SNEDDS formülasyonu ticari ürüne kıyasla açlık koşullarında 2 misli biyoyararlanım artışı sağlamıştır (Yılmaz-Usta, Timur ve Teksin, 2022).

Lipofilik ilaçlar için oral biyoyararlanımda iyileşme, emilim için geniş yüzey alanı sağlama, karışmamış su tabakasından ilaç transportunu kolaylaştırma, P-gp inhibisyonu, ilk geçiş etkisinin aşılmasını sağlaması gibi avantajların yanı sıra SEDDS formülasyonu, oral olarak kullanılan birçok ilaç için uygulanabilir olması, birey içi ve bireyler arası değişkenliği, gıda etkisini azaltması, termodinamik olarak stabil olması, üretim-ölçek büyütme kolaylığı sağlaması, ilaç yükleme kapasitesinin yüksek olması ve ilacı enzimatik degredasyondan koruması gibi avantajlara da sahiptir (Sarpal, Pawar ve Bansal, 2010; Yılmaz-Usta, 2022). SNEDD sistemler sahip oldukları bu avantajlar sayesinde ticarileşme potansiyeli taşıması ve

patentlenmesi ile de günümüzde en çok araştırılan ilaç taşıyıcı sistemlerden birisidir (Buya ve diğerleri, 2020). FDA tarafından onay alarak çeşitli hastalıkların tedavisi için piyasada mevcut olan kendiliğinden emülsifiye formülasyonlara Sandimmune® (Siklosporin), Neoral® (Siklosporin), Accutane® (İsotretinoin), Depakin® (Valproik asit), Norvir® (Ritonavir), Rokaltrol® (Kalsitrol), Ageneraz® (Amprenavir), Rapamun® (Sirolimus), Fortovaz® (Sakunavir), Aptivus® (Tipranavir), Lipirex® (Fenofibrat), Konvuleks® (Valproik asit) örnek olarak verilebilir. Bu ticari formülasyonların çoğu patent koruması altındadır.

SEDDS formülasyonunun birçok avantajı olmasına rağmen bu sistemle ilgili bazı sınırlamalar da vardır (Singh ve diğerleri, 2016):

- Dilüsyon sonucu ilacın çökmesi
- SEDDS'in yumuşak jelatin kapsüle dolumunun yüksek üretim maliyetine sahip olması
- SEDDS formülasyonunda kullanılan lipitlerin oksidasyonu
- SEDDS'in değerlendirilmesinde kullanılan in vitro modellerin tahmin gücünün düşük olması

2.4.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin genel bileşenleri ve formülasyon performansındaki rolü

SEDD sistemler üç ana kategoride sınıflandırılan çok çeşitli yardımcı maddelerden oluşur. Bunlar lipofilik bir çekirdek sağlayan yağ, kolloidal dispersiyonu fiziksel olarak stabilize eden sürfaktan ve kosürfaktan, ilaç yükleme kapasitesini artırmak için kullanılan kosolvandır (Feeney ve diğerleri, 2016; Pouton, 2006). Kendiliğinden emülsifikasyon süreci, yağ ve sürfaktan gibi spesifik bileşenlerin etkileşiminin bir sonucudur. Her bir yardımcı madde, formülasyonun emülsifikasyon yeteneğini, fizikokimyasal stabilitesini, oral biyoyararlanımını ve ilaç salım kinetiğini farklı şekilde etkilemektedir (Ashkar, Sosnik ve Davidovich-Pinhas, 2022). Etkili bir formülasyon için yağ/sürfaktan/kosolvan türü ve oranlarının dikkatli bir şekilde seçilmesi gerekmektedir.

Yağ

SEDDS formülasyonunda yağ olarak doğal veya sentetik farklı doyurulma oranları sunan orta veya uzun zincirli trigliseritler, monogliserit ve digliserit karışımları kullanılır. Doğal yağlar (hint yağı, soya fasulyesi yağı, hindistan cevizi yağı) nispeten düşük ilaç yükleme kapasitesi ve zayıf emülsifikasyon sergiledikleri için genellikle tercih edilmezler (Pouton ve Porter, 2008). Orta zincirli yağlar ağırlıklı olarak zincir uzunlukları C8 ile C12 arasında değişen trigliseritlerden veya mono/digliserit karışımlarından oluşur. Örnek olarak Capmul® MCM, İmwitor® 948, İmwitor® 988, Miglyol® 812, Captex® 300, Labrafac® CC verilebilir. Uzun zincirli yağlar ise zincir uzunluğu C12'den büyük olan trigliseritlerden oluşur. Örnekleri ise Maisine® ve Peceol®'dür. Ek olarak Capryol® 90, Miglyol® 840 gibi propilen glikol yağ asidi esterleri de yağ olarak kullanılmaktadır (Singh ve diğerleri, 2009).

Yağ fazı seçiminde en önemli faktörlerin başında ilacı çözme kapasitesi, emülsifikasyon kapasitesi ve sindirilebilirlik durumu gelmektedir. Sindirilebilir yağ fazı oral uygulandıktan sonra pankreatik lipaz tarafından monogliserit ve yağ asitlerine parçalanır. Safra tuzu, fosfolipit ve kolesterolden oluşan misel yapılarına dahil olarak intestinal içeriğin çözme yeteneğini artırır (Kollipara ve Gandhi, 2014; Mu, Holm ve Müllertz, 2013). Orta zincirli yağlar daha iyi çözme yetenekleri ve emülsifikasyon kapasiteleri nedeniyle tercih edilmektedir ancak ilaçların lenfatik transportunu artırma konusunda sınırlı bir kapasiteye sahiptir (Chatterjee, Hamed, Ahmed, Mandal ve Sengupta, 2016; Qian ve diğerleri, 2017). Tersine, uzun zincirli yağlar ise hepatik ilk geçiş metabolizmasını atlayarak ilaçların lenf damarı yoluyla taşınmasını artırır; ancak bazen emülsifiye edilmeleri zordur (Chen, 2008). Bu nedenle, orta ve uzun zincirli yağ karışımının optimum özellikleri karşıladığı ve biyoyararlanımı iyileştireceği düşünülebilir.

Sürfaktan ve kosürfaktan

SEDDS'lerdeki ikinci zorunlu bileşen sürfaktanlardır. Amfifilik özelliklerinden dolayı yağ/su arayüzeyinde bulunur ve yüzey gerilimini azaltarak nano boyutlu emülsiyonun stabilizasyonuna yardımcı olur. Emülsifikasyon yeteneği, HLB değeri

ve ilacın maksimum çözünürlüğü sürfaktan seçerken üç önemli faktördür (Buya ve diğerleri, 2020).

Sürfaktanlar yüklerine ve hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerlerine göre sınıflandırılır. Yüklerine göre iyonik (anyonik, katyonik ve amfoterik) ve noniyonik olarak ikiye ayrılır. İyonik sürfaktanlarla karşılaştırıldığında, noniyonik sürfaktanlar genellikle daha düşük toksisiteleri ve emülsiyonu daha geniş bir pH ve iyonik şiddet aralığında stabilize etme yetenekleri nedeniyle tercih edilirler (Li, Zhou ve Xu, 2019). Yaygın olarak kullanılan noniyonik sürfaktanlara örnek olarak Tween® 20, Tween® 80, Kolliphor® EL, Kolliphor® RH40, Labrasol®, Gelucire® 44/14, Labrafil® M 2125 CS verilebilir.

Yüksek emülsifikasyon performansı elde etmek için SEDDS formülasyonunda yer alan sürfaktanın, küçük boyutlu damlacıklarının oluşumuna ve formülasyonun sulu ortamda hızla yayılmasına yardımcı olması açısından, 12'den büyük HLB'ye sahip olması gerekir (Dokania ve Joshi, 2015). Ayrıca sürfaktan konsantrasyonunun damlacık boyutunu etkilediği gösterilmiştir. Sürfaktan miktarının artırılması, sürfaktanın yağ/su arayüzeyinde emülsifikasyon için serbest enerjiyi azaltan yüzey gerilimini düşürücü özelliğinden dolayı, damlacık boyutunu azaltabilir (Gursoy ve Benita, 2004). Ancak bazı durumlarda sürfaktan miktarındaki artış, suyun damlacığa aşırı nüfuz etmesinden dolayı daha yüksek boyuta neden olur, bu da yağ/su arayüzeyinin büyük ölçüde bozulmasına ve yüksek polidispersiteye sahip damlacıkların oluşmasına neden olur (Zupančič, Partenhauser, Lam, Rohrer ve Bernkop-Schnürch, 2016).

Tween® 80 ve Kolliphor® EL gibi birçok noniyonik sürfaktan membran akışkanlığını artırma, enterositlerin apikal tarafını etkileyerek sıkı bağlantı noktalarındaki yapısal değişiklikler veya transselüler yol aracılığıyla permeabilite artışı sağlama ve effluks taşıyıcıları inhibe etme yeteneğine sahiptir (Mountfield, Senepin, Schleimer, Walter ve Bittner, 2000; Yin ve diğerleri, 2009). Sürfaktan moleküllerinin yapıya veya konsantrasyona bağlı toksisite göstermesi de söz konusudur. (Date, Desai, Dixit ve Nagarsenker, 2010). Formülasyon için sürfaktan seçimi sırasında otorite kriterleri (örneğin, GRAS - genellikle güvenli olarak kabul edilir) dikkate alınmalıdır.

Kosürfaktanlar ise genellikle kısa hidrokarbon zincirine bağlı bir hidroksil grubundan oluşan amfifilik moleküllerdir. Bu moleküller tek başına stabilizasyon sağlayamaz çünkü polar baş grubunun boyutu küçüktür. Bu nedenle genellikle sürfaktanlarla birleştirilir. Amfifilik doğaları nedeniyle arayüzeyde birikme eğilimi gösterirler ve böylece arayüzey filminin akışkanlığını artırırlar (Gradzielski, 1998). Ayrıca kosürfaktanlar iki faz arasındaki viskozite oranını optimize edebilir ve kolloidal sistemin fiziksel stabilitesini artırabilir (Ashkar ve diğerleri, 2022).

Kosolvan

Kosolvanlar, kendiliğinden emülsifiye sistemlerin oluşumunu kolaylaştıran ve ilaçların formülasyonda çözünmesini artıran, kendileri sürfaktan özellikte olmayan hidrofilik moleküllerdir (Pouton ve Porter, 2008). Yaygın olarak kullanılan kosolvanlar arasında propilen glikol, etanol, polietilen glikol (PEG) ve Transcutol® HP gibi çözücüler yer almaktadır. Kosolvanlar formülasyondaki ilaç çözünürlüğü ve yüklenen dozda artış sağlarken polariteleri nedeniyle dispersiyonun ardından kolaylıkla su fazına doğru hareket ederek ilacın çökmesine neden olabilirler (Memvanga, Coco ve Préat, 2013).

2.4.3. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin optimizasyonu

SEDD sistemin potansiyel bileşenleri seçildikten sonra kendiliğinden nano emülsifiye sistem oluşturacak optimum miktarda yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvan elde etmek için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Üçgen faz diyagramları emülsifikasyon alanını belirlemek için kullanılır. Emülsifikasyon alanı görsel olarak veya dispersiyondan sonra emülsiyonun damlacık boyutunun ölçülmesiyle tanımlanır (Yoo, Baskaran ve Yoo, 2013).

Üçgen faz diyagramına ek olarak, SEDDS'in optimizasyonu için Box-Benkhen tasarımı, merkezi kompozit tasarım, faktöriyel tasarım ve D-optimal tasarım gibi çeşitli deneysel tasarım türleri de kullanılabilir. Üçgen faz diyagramlarıyla karşılaştırıldığında, istatistiksel deney tasarımlarının temel avantajı zaman, kaynak kullanımı ve deneysel çalışmalar açısından harcamaları en aza indirebilmeleridir (Yılmaz-Usta, 2022). Ayrıca faktörlerin (yağ, sürfaktan ve yardımcı çözücü)

SNEDDS'in özellikleri (yani damlacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI), emülsifikasyon süresi gibi) üzerindeki eş zamanlı etkisi de incelenebilir.

2.4.4. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu

Geliştirilen SEDDS'leri çeşitli parametreler açısından değerlendirmek her zaman önemlidir. Bu çok bileşenli lipidik formülasyonların çeşitli in vitro, ex-vivo ve in vivo prosedürler kullanılarak değerlendirilmesi, karakterize edilmesi ve formülasyon performansının belirlenmesi için bir takım yöntemler kullanılmaktadır. SEDDS'in in vitro, in situ, ex-vivo ve in vivo karakterizasyonu için kullanılan yöntemler Çizelge 2.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. SEDD sistemler için karakterizasyon parametreleri, in vitro, ex-vivo, in situ ve in vivo çalışmalar

Fizikokimyasal karakterizasyon	**Önemi**	**Referans**
Damlacık boyutu ve PDI	Damlacık boyutu SEDDS'in çözünme hızını ve biyoyararlanımını etkilemektedir. Literatürde daha küçük damlacık boyutunun bir ilacın oral biyoyararlanımı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. PDI ise damlacık boyutu homojenliğinin bir ölçüsüdür. PDI değerinin sıfıra yakınlığı damlacıkların boyut açısından birbirine benzer/eşit olduğunu ifade eder. SEDDS formülasyonlarının dar boyut dağılımına sahip olması istenir.	(Buya ve diğerleri, 2020)
Seyreltmeye dayanıklılık	Gastrointestinal sistemi içerik, pH ve miktar açısından taklit eden ortamlar ile seyreltildikten sonra sistem, herhangi birleşme, faz ayrımı veya ilaç çökmesi göstermemelidir. Bu durumda formülasyonun seyreltmeye karşı dayanıklı olduğu kabul edilir.	(Khedekar ve Mittal, 2013)
Dispersiyon ve emülsifikasyon zamanı	Emülsifikasyon süresi, formülasyon su içerisinde disperse edildikten sonra berrak bir dispersiyon elde etmek için gereken süre olarak kaydedilir. Bu süre sistemdeki sürfaktan miktarından etkilenir. Hızlı bir emülsifikasyon, hızlı bir ilaç salımına ve ardından hızlı bir etki başlangıcına katkıda bulunabilir.	(Wang, Dong, Chen, Eastoe ve Li, 2009)
%Transmittans	Su ile seyreltilmiş SEDDS'in optik berraklığının ölçümüdür. %Transmittans genellikle damlacık boyutuyla ilişkilidir ve SEDD sistemler nano boyutlarından ötürü şeffaf ve berrak bir görünüme sahip olmalıdır. Yüksek % Transmittans ilaç çökmesi olmadan formülasyonun şeffaflığını kanıtlar ve aynı zamanda küçük damlacık boyutunu da yansıtır.	(Prajapat, Patel, Bariya, Patel ve Butani, 2017)
Morfoloji	Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) veya Cryo-TEM ile seyreltilerek elde edilen emülsiyon damlacıkları boyut, yapı ve biçimsel olarak incelenir.	(Kazi ve diğerleri, 2019)
Viskozite	Viskozite ölçümü, SEDD sistemi birçok yönden etkilemektedir. SEDD sistemin kapsüle dolumunun kolay olması, sızıntının önlenmesi, emülsifikasyon etkinliği ve hızında önemli bir role sahiptir. Yüksek viskoziteye sahip sistem, sulu ortamda gecikmiş bir dispersiyona sahip olabilir ve emülsifikasyon hızında azalmaya sebep olabilir.	(Nasr, Gardouh ve Ghorab, 2016)
Termodinamik stabilite	Bu çalışma için santrifüj, ısıtma-soğutma ve donma-çözme döngüleri gerçekleştirilir. Bu deneyler sırasında faz ayrımı, bulanıklık. çökme ve damlacık boyutu gibi çeşitli hususlar gözlemlenerek stabil formülasyonlar tespit edilir.	(Singh ve diğerleri, 2016)
İlaç yükleme	SEDD sistemden ilaç uygun çözücüye ekstre edilerek formülasyondaki ilaç miktarı analitik bir yöntemle belirlenir. Hedeflenen miktardan az ya da çok olmamalıdır.	(Patil ve Paradkar, 2006)

Çizelge 2.9. (devam) SEDD sistemler için karakterizasyon parametreleri, in vitro, ex-vivo, in situ ve in vivo çalışmalar

İn vitro yöntemler	Önemi	Referans
İn vitro çözünme hızı	SEDD sistemden ilaç salım hızı ve miktarını belirlemek için farmakopede belirtilen çözünme hızı ortamları veya gastrointestinal sistemi pH, iyonik şiddet, osmolalite, tampon kapasitesi, safra tuzu ve lesitin içeriği açısından taklit eden biyouyumlu ortamlarda gerçekleştirilir.	(Yılmaz-Usta ve Teksin, 2017).
İn vitro lipoliz	SEDDS'de kullanılan yardımcı maddeler yapıları gereği gastrointestinal sistemde sindirime uğrama eğilimindedir. Lipoliz çalışması, yağ ve sürfaktan sindiriminin SEDDS'in performansı üzerine etkisini incelemeyi amaçlamaktadır.	(Larsen, Sassene ve Müllertz, 2011)
Hücre kültürü çalışmaları	Hücre hatları (Caco-2 hücre hattı, MDCK hücre hattı, izole bağırsak hücreleri gibi) veya PAMPA, diyaliz membran, PermeaPad® gibi yapay membranlar kullanarak in vitro ortamda ilaç yüklü SEDDS'in transport miktarı, hızı ve mekanizmasını belirlemeye ek olarak formülasyonun güvenilirlik ve etkinliğini mevcut hastalıkla ilişkili hücre hattı (hormon pozitif meme kanseri hastalığı için MCF-7 hücre hattı gibi) ile incelemek mümkündür.	(Singh ve diğerleri, 2016)
Ex-vivo yöntemler	Gastrointestinal sistemden absorpsiyon SEDDS'e yüklenmiş ilaçların plazma konsantrasyonunu etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle izole edilmiş intestinal mukoza dokusu kullanılarak Franz difüzyon hücresi, yan yana difüzyon hücresi, dışa dönük bağırsak kesesi gibi yöntemlerle SEDD sistemin intestinal permeabilitesi değerlendirilir.	(Rajesh ve diğerleri, 2018)
İn-situ yöntemler	İn situ intestinal perfüzyon yöntemi oral uygulamadan sonra SEDDS'in karşılaştığı in vivo koşullara daha yakın koşullar sağlayarak ilaç absorpsiyonu, lenfatik transport, emilim mekanizmasının tahmini ve P-gp etkisini araştırmak için yürütülür.	(Kazi ve diğerleri, 2019)
İn vivo çalışmalar	İn vivo farmakokinetik çalışmalar, SEDDS'in oral biyoyararlanımın tahmin edilmesi, farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi, insanlarda ilk klinik denemeler sırasında kullanılacak uygun bir dozun seçilmesi için önemli bir rol oynamaktadır.	(Sandhu, Beg, Mehta, Singh ve Trivedi, 2015)

SEDDS'ler için in vitro, ex-vivo ve in situ yöntemler preklinik ve klinik çalışmalardan önce in vivo performansı tahmin etmek ve optimum yağ, sürfaktan ve kosürfaktan bileşimini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile gastrointestinal sistemde ilaç absorpsiyonu ile ilgili temel süreçler taklit edilerek in vivo verilere yakın sonuçların elde edilmesi amaçlanmaktadır (Andreas ve diğerleri, 2018; Kostewicz ve diğerleri, 2014). Yöntemler, in vivo ortamı taklit düzeyleri, karmaşıklık ve fizyolojik uygunlukları açısından farklılık gösterirler. Basit tek basamaklı, tek bölmeli modellerden, aynı anda birkaç işlemi taklit eden çok bölmeli yöntemlere kadar uzanırlar (Berthelsen ve diğerleri, 2019).

Gastrointestinal sistemin karmaşık yapısı nedeniyle SEDDS'in in vivo performansını değerlendirmek için tüm fizyolojik koşulları barındıran mükemmel bir yöntem bulunmamaktadır. Ancak bu sistemler için sindirim ve permeabilite gibi adımların taklit edilebilirliği açısından in vitro lipoliz ve in situ intestinal perfüzyon çalışmaları oldukça önem taşımaktadır. Tez çalışmasında kullanılan bu iki yöntem aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.5. İn Vitro Lipoliz

Gastrointestinal lipit sindirimi (lipoliz) sindirim sürecinde önemli bir basamaktır ve çeşitli lipolitik enzimlerin oral olarak alınan lipitler üzerindeki aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvandan oluşan LTF'ler trigliserit, di/monogliserit, fosfolipit (FL), PEG mono- ve diesterleri ve polisorbatın taşıdığı ester bağları nedeniyle pankreatik lipaz, kolipaz, fosfolipaz A_2, kolestrol esteraz enzimleri tarafından hidroliz olma potansiyeli taşımaktadırlar (Carrière, 2016; Fernandez ve diğerleri, 2008; Larsen ve diğerleri, 2011). Bu bileşenler veya sindirim ürünleri safra tuzları ve fosfolipitlerle etkileşerek kolloidal yapıları oluşturur. İlaç ise bu yapılar arasında dağılmıştır (Fatouros ve diğerleri, 2007; Kossena, Boyd, Porter ve Charman, 2003). Sindirim sonucu bu kolloidal yapıların ilacı çözme kapasitesi azalırsa ilaç çökmesi meydana gelebilir (Sassene ve diğerleri, 2010). Bu durum suda az çözünen ilaçların biyoyararlanımını etkileyebilmektedir. LTF'lerin biyoyararlanım artışı sağlamaları ise gastrointestinal sistemde (GIS) çözünme adımını atlamaları ve GIS boyunca ilacı çözelti içinde tutabilme yetenekleri ile ilgilidir (Bibi, Holm ve Bauer-Brandl, 2017; Larsen ve diğerleri, 2011). Bu bağlamda LTF'nin

formülasyon performansı ve biyoyararlanım değerlendirilmesinde kullanılan in vitro yöntemler ile formülasyon sindiriminin anlaşılması son derece önemlidir.

Oral uygulanmadan sonra meydana gelen sindirim, çökme, aşırı doygunluk ve emilim gibi olayların karmaşıklığı nedeniyle LTF'nin dispersiyon veya in vitro çözünme hızı gibi çalışmalarla değerlendirmesi genellikle yeterli değildir. Çünkü bu yöntemler yardımcı maddelerin lipaz ile hidrolize uğrayabileceği ihtimalini hesaba katmamaktadır. İn vitro lipoliz olarak da bilinen in vitro sindirim çalışmaları bu nedenle LTF'den ilaç salımının aydınlatılmasında önemli bir rol oynar. Bazı LTF gruplarında sindirim aşamasının ilacın formülasyondan salınması için çok önemli olduğu kabul edilir (Pouton, 2006).

LTF'nin oral uygulamasını takiben insan GI kanalında meydana gelen olayları simüle ederken, sindirim süreçlerinin her adımı gerçekçi pH ve enzimatik koşullar, geçiş süreleri ve karıştırma ile taklit edilmelidir. İnsan gastrointestinal sisteminde gerçekleşen sindirim mekanik ve enzimatik olmak üzere iki temel süreci içermektedir. Ağızda gıdalar çiğnenerek mekanik sindirime uğrar ve daha küçük parçalara ayrılırlar. Bu sayede yüzey alanları artar ve tükürük ile karışarak bolus adını taşıyan yumuşak ve yutulabilir kütle oluşturur (McClements ve Li, 2010). Yağ sindirimi bolusun özefagusu geçerek mideye gelmesi sonucu fundus bezlerinden salgılanan gastrik lipaz ile başlamaktadır. Mide TG'lerin yaklaşık %5-40'ının sindiriminden sorumludur (Carrière, Barrowman, Verger ve René, 1993). Asidik mide ortamına giren lipitler, mide motilitesi ve kısmi hidroliz edilmiş proteinler, sürfaktanlar ve mineraller gibi gıda bileşenlerinin emülsifiye edici özellikleri sayesinde kimüs adını taşıyan kaba emülsiyonları oluştururlar. Duodenumda kimus, lipaz, amilaz ve proteaz enzimlerini içeren pankreas ve safra salgılarıyla karıştırılır (Dressman ve diğerleri, 1990). TG molekülleri monogliserit ve serbest yağ asitlerine sindirilir (Larsen ve diğerleri, 2011). Bu sindirim ürünlerinin ST ve FL ile oluşturduğu kolloidal yapılar karışmamış su tabakasından difüze olur. Paraselüler pasif difüzyon, transselüler pasif difüzyon, aktif taşıma veya endositoz gibi epitel boyunca mevcut farklı taşıma yollarıyla taşınan moleküller portal ven veya lenfatik transport ile sistemik dolaşıma katılır (Thomas ve diğerleri, 2013). LTF'lerin oral kullanımda, yukarıda açıklanan süreçlerin farklı açılardan taklit edilebileceği birçok in vitro sindirim modeli geliştirilmiştir.

İn vitro lipoliz çalışması ile LTF'lerle ilgili olarak;

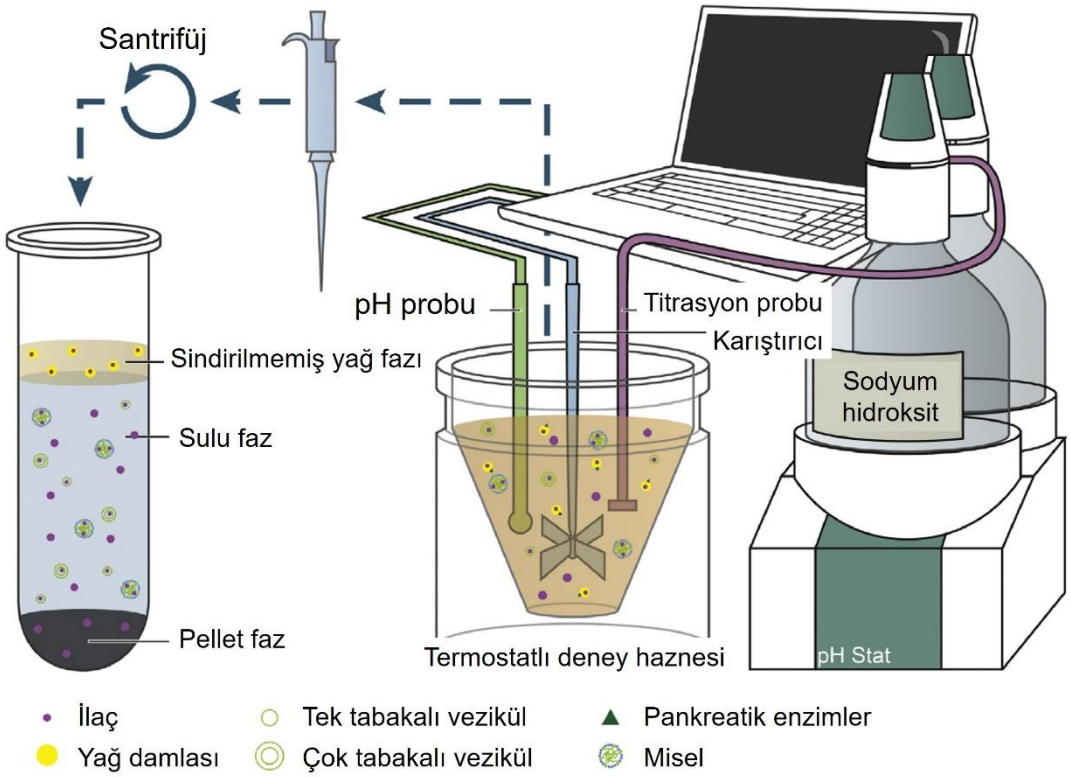
- gastrointestinal sıvılarda dispersiyonu ve sindirimi sonucu ilaç için çözünürlük kapasitesini koruma durumu
- formülasyon sindirim oranı ve hızı
- sindirilmiş formülasyonun ürünleri ile zenginleşen gastrointestinal ortamın ilacı çözme kapasitesi değerlendirilmektedir (Williams ve diğerleri, 2012a).

2.5.1. pH-stat lipoliz modeli

LTF'lerin değerlendirilmesi için en sık kullanılan in vitro sindirim modeli pH-stat lipoliz modelidir. Modelde, in vivo açlık veya tokluk durumu intestinal bileşimi tampon kapasitesi, pH, sıcaklık, safra tuzları, fosfolipitler ve pankreastan salgılanan pankreatik lipaz gibi sindirim enzimleri açısından taklit eden ortam kullanılır. Bu ortamı belirli hızda karıştıran ve termostatlı deney haznesini içinde barındıran tek kompartmanlı ototitrasyon cihazı kullanılarak lipoliz çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Williams ve diğerleri, 2012a). Modelin şematik gösterimi Şekil 2.8'de sunulmuştur.

Lipoliz, pankreas ekstresinin ortama eklenmesiyle başlatılır. Pankreatik lipaz kaynağı olarak insan pankreas ekstresine yakın benzerlik göstermesi ve pankreatik lipaz ve diğer esterazları içermesi nedeniyle domuz pankreatin ekstresi kullanılmaktadır (Larsen ve diğerleri, 2011; Sassene ve diğerleri, 2014).

İlaç içeren LTF'lerin yapısındaki yağ veya sürfaktanların lipoliz ortamındaki pankreatik lipaz ile lipolize uğraması sonucu açığa çıkan yağ asitleri lipoliz ortamının pH'sında düşüşe yol açar. pH'daki bu azalmaya karşılık yağ asitleri pH-stat ototitratör cihazı tarafından sodyum hidroksit (NaOH) ile otomatik olarak titre edilir ve pH sabit tutulur. Ortam pH'sının sabit tutulması veya diğer bir deyişle yağ asitlerini nötralize etmek için harcanan NaOH miktarından hareketle formülasyon sindirim hızı ve oranı tespit edilir (Berthelsen ve diğerleri, 2019; Williams ve diğerleri, 2012a).



Şekil 2.8. pH-stat lipoliz modeli (Berthelsen ve diğerleri, 2019)

İn vitro lipoliz sırasında tipik olarak üç farklı faz oluşur. Bu fazlar LTF'lerin oral performansının tahminini sağlayabilmektedir. Yağ fazı (oil phase, OP) sindirilmemiş ve emülsifiye olmamış yağ damlacıklarından, sulu faz (aqueous phase, AP) formülasyon bileşenleri ve safra salgılarının oluşturduğu veziküller ve miseller gibi kolloidal yapılardan, pellet faz ise presipite ilaç ve nötralize olmuş yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarından oluşmaktadır (Carrière, 2016). Yağ fazı ve sulu faz ilacı çözünmüş halde bulundurmaları ve içerdikleri kolloidal yapıların UWL'den ilaç taşınmasını kolaylaştırması nedeniyle in vivo ortamda absorpsiyon için uygundur (Klitgaard, Müllertz ve Berthelsen, 2021; Larsen ve diğerleri, 2011). İn vitro lipoliz çalışması ile formülasyonların in vivo performansının tahmin edilebilmesi de tam olarak bu hipoteze dayanmaktadır. Yüksek sulu faz ve düşük pellet faz ilaç konsantrasyonu emilen ilaç fraksiyonunda artış ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle yağ fazı, sulu faz ve pellet fazında bulunan ilaç miktarının belirli zaman aralıkları ile belirlenmesi oldukça önemlidir, çünkü lipoliz dinamik bir süreçtir. Fatouros ve ark. SNEDDS'in in vitro lipolizini Cryo-TEM ile inceleyerek lipolizin dinamik bir süreç olduğunu, kolloidal yapıların zamana bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Çalışmada sindirim başlangıcında tek ve iki tabakalı veziküller, miseller ve yağ

damlacıklarının ortamda bulunduğu ve sindirimin ileri safhalarında yağ damlacıkları ve iki tabakalı veziküllerin sindirilerek sayılarının azaldığı ve misellerin sindirim boyunca ortamda mevcut olduğu gözlenmiştir (Fatouros ve diğerleri, 2007). Bu nedenle lipoliz çalışmasında değişen kolloidal yapılarda çözünürlük kapasitesinin sürdürülme durumu belirli zaman aralıklarında örnek alınarak yağ fazı, sulu faz ve pellet fazlarında ilaç analizi ile mümkün olmaktadır.

Dahan ve ark. in vitro lipoliz çalışmasının in vivo oral biyoyararlanımı tahmin etme yeteneğini iki farklı etkin madde yüklü (deksametazon ve griseofulvin) kısa, orta ve uzun zincirli yağ içeren LTF'ler kullanarak araştırmıştır. LTF'lerin lipoliz çalışmasında deksametazon yüklü kısa, orta ve uzun zincirli formülasyonlar için sulu faz deksametazon miktarı eşit bulunurken, griseofulvin için orta>uzun>kısa zincirli formülasyon şeklinde sulu faz grisefulvin miktarı elde edilmiştir. İn vivo oral biyoyararlanım çalışması ise in vitro lipoliz sulu faz ilaç miktarı ile iyi bir korelasyon göstererek deksametazon yüklü üç formülasyon için eşit, griseofulvin yüklü formülasyonlar için orta>uzun>kısa zincirli formülasyon şeklinde bir sıralama göstermiştir. Çalışmada in vitro lipolizin LTF'lerin geliştirilmesi, performans değerlendirilmesi ve biyoyararlanım tahmininde faydalı bir araç olduğu belirtilmiştir. (Dahan ve Hoffman, 2007).

Borkar ve ark. tarafından yürütülen bir başka çalışmada fenofibrat yüklü 100 nm, 400 nm ve 10 µm boyuta sahip lipit matriks partikülleri geliştirilmiş ve fenofibrat süspansiyonu da çalışmaya dahil edilerek lipoliz ve in vivo oral biyoyararlanım çalışması yapılmıştır. Lipoliz çalışmasında sulu faz fenofibrat miktarı 10 µm boyutlu formülasyona kıyasla 100 nm ve 400 nm boyutlu formülasyonlar için önemli ölçüde yüksek bulunurken, fenofibrat süspansiyonu için en düşük olarak bulunmuştur. Oral biyoyararlanım çalışmasında da lipoliz çalışmasına benzer olarak 100 nm ve 400 nm boyutlu formülasyonlar için en yüksek biyoyararlanım elde edilirken iki formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu iki formülasyonu sırasıyla mikro boyuta sahip lipit matriks partikül ve süspansiyon takip etmiştir. Mevcut çalışma in vitro lipolizin in vivo performans tahmin yeteneğini bir kez daha göstermiştir (Borkar ve diğerleri, 2014).

İn vitro lipoliz ortamının koşul ve anahtar bileşenleri

Sindirim enzimleri

İn vitro lipoliz çalışmalarında genellikle intestinal ortamda gerçekleşen lipoliz öne çıkmıştır. İntestinal lipoliz çalışmalarında lipaz kaynağı olarak domuz pankreatik ekstresi (pankreatin) kullanılmaktadır (Carrière, 2016). Domuz pankreatini, pankreastan salgılanan tüm enzimlerin bir karışımını içerir. Yağ sindirimi için en önemli pankreas enzimleri pankreatik triaçilgliserit lipaz (pankreatik lipaz), ko-lipaz, fosfolipaz A_2 ve kolesterol esterazdır. Pankreatik lipazın afinitesi, uzun zincirli trigliseritlere kıyasla orta zincirli trigliseritlere karşı daha yüksektir. İn vitro lipoliz sırasında bu, orta zincirli formülasyonların daha hızlı ve daha kapsamlı bir lipolizi ile sonuçlanır (Larsen ve diğerleri, 2011). Safra asitleri ve fosfolipitlerin varlığında pankreatik lipaz, optimal aktiviteye ulaşmak için kolipaza ihtiyaç duyar (Brockman, 2022). Pankreatik lipaz pH'a bağlıdır ve pH 6,5 ile 8,0 arasında optimal aktiviteye sahiptir (Armand ve diğerleri, 1992).

Safra tuzları ve fosfolipitler

Safra tuzları ve fosfolipitler suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların miselizasyon ile çözünürlüklerini artırmayı desteklediği için lipoliz ortamının vazgeçilmez bileşenleridir. İnsan bağırsak sıvılarındaki safra tuzu konsantrasyonları açlık durumunda 2 mM ile 5 mM arasında değişirken tokluk durumunda 8 mM ile 15 mM arasındadır (Kalantzi ve diğerleri, 2006; Persson ve diğerleri 2005). İn vivo fosfolipit konsantrasyonu, açlık durumunda 0,1 mM ile 0,6 mM ve tokluk durumunda 0,1 mM ile 4,8 mM arasında değişmektedir (Kleberg, Jacobsen ve Müllertz, 2010). Lipoliz çalışmalarında ise safra tuzu ve fosfolipit konsantrasyonları bu aralıklarda kullanılmıştır.

Kalsiyum

Kalsiyumun, karışık miseller ve kalsiyumdan oluşan katalitik olarak aktif bir lipaz kompleksinin oluşumu yoluyla in vivo lipoliz için önemli olduğu öne sürülmüştür (Alvarez ve Stella, 1989). Ayrıca pankreatik lipaz, sindirim sonucu açığa çıkan

serbest yağ asitleri tarafından inhibe edilir. İn vivoda serbest yağ asitleri emilir ve dolayısıyla pankreatik lipazın serbest yağ asitleri tarafından inhibisyonu meydana gelmez. Ancak in vitro lipoliz sırasında serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması gerekir bu durum lipolizin devam etmesi açısından önemlidir (Borel ve diğerleri, 1994). Kalsiyum, yağ asitlerinin enzimin görev yapacağı arayüzeyden lipoliz ortamında çözünmeyen sabun oluşturarak uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Kalsiyum ekleme hızı ve miktarıyla lipoliz hızı kontrol edilebilir (Zangenberg, Müllertz, Kristensen ve Hovgaard, 2001).

Ortam pH'sı

Açlık ve tokluk intestinal pH sırasıyla 6-7,5 ve 5-6,6 arasındadır (Carrière ve diğerleri, 1993; Persson ve diğerleri, 2005). Pankreatik lipaz aktivitesi pH'a bağlıdır ve optimum aktivite 6,5 ila 8,0 pH aralığında gözlenir (Armand ve diğerleri, 1992). Sindirim ürünü olarak açığa çıkan yağ asitlerinin NaOH ile titre edilebilmesi için iyonize olmaları gerekir. Uzun zincirli yağ asitlerinin pK_a değeri genellikle 8'den büyüktür, ancak safra tuzu misellerinde ve kalsiyum varlığında pK_a'nın 6,5'e düştüğü gösterilmiştir (Kanicky ve Shah, 2002). Lipoliz ortamı için bu nedenler dikkate alınarak pH 6,5 ile 8,5 arasındaki değerler kullanılmaktadır.

Ancak serbest yağ asitlerinin hepsinin pK_a değerlerini tam olarak bilmek zor olduğundan, serbest yağ asitlerinin toplam miktarını belirlemek için lipoliz deneyinin sonunda bir geri titrasyon adımının yapılması tavsiye edilir. Geri titrasyonda ortam pH'sı 9'a yükseltilerek tüm yağ asitleri titre edilir (Fernandez ve diğerleri, 2007).

Hidrodinamik ve örnekleme

Lipoliz termostatlı bir deney haznesinde karıştırılarak gerçekleştirilir. Karıştırma koşulları bağırsaktaki hidrodinamik koşullardan uzaktır. Ancak homojen örnekler alabilmek için gereklidir. Örneklemeden hemen sonra örneklerdeki lipaz aktivitesi bir lipaz inhibitörünün eklenmesiyle inhibe edilir (Larsen ve diğerleri, 2011). Böylece karıştırma ve taşıma sırasında lipoliz önlenir.

pH-stat lipoliz modelinin kullanıldığı çalışmalarda ST ve FL konsantrasyonları, lipaz kaynağı ve aktivitesi, kalsiyum ekleme şekli ve ortam hacmi gibi faktörler farklı araştırma grupları arasında farklılık gösterir (Larsen ve diğerleri, 2011; Thomas, Holm, Müllertz ve Rades, 2012). Faktörler genel olarak in vivo durumu mümkün olduğu kadar yakın taklit edecek şekilde ayarlanır. Ancak insan gastrointestinal sisteminin karmaşıklığı ve dinamikliği nedeniyle, aynı anda meydana gelen tüm süreçlerin yakından taklit edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle, pH-stat lipoliz modellerinin tasarlanmış tüm versiyonları fizyolojik olarak uygun kabul edilebilir ve hiçbir model diğerlerine üstünlük sağlamamaktadır (Berthelsen ve diğerleri, 2019).

Geçtiğimiz yıllarda, endüstri-akademi iş birliğini temsil eden LFCS Konsorsiyumu, LTF'ler için standartlaştırılmış in vitro lipoliz çalışmalarının oluşturulmasına yönelik çok sayıda çalışma yürütmüştür. Çalışmaların amaç ve sonuçları aşağıda kronolojik olarak açıklanmıştır:

- Wiiliam ve ark. tarafından gerçekleştirilen ilk çalışmada düşük çözünürlüğe sahip model ilaç yüklü sekiz farklı tipte LTF kullanılarak laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, örneklerin faz ayrımı için santrifüj kullanımı ve her bir fazdaki ilaç miktarı incelenmiştir. İki farklı laboratuvardan elde edilen sonuçlar tutarlı bulunmuştur. OP, AP ve PP ayrımı sağlamak için ultrasantrifüj yerine masaüstü santrifüj cihazlarının kullanılabileceği gözlenmiştir. Üç fazda bulunan ilaç miktarının formülasyonlardaki yağ (uzun zincirli veya orta zincirli), sürfaktan ve kosürfaktan miktarından ve formülasyonların sindiriminden etkilendiği anlaşılmıştır (William ve diğerleri, 2012a).

- İş birliği kapsamında yapılan ikinci çalışmada, lipoliz ortamındaki ST konsantrasyonu; ayrıca formülasyondaki ilaç çözünürlüğü ve aşırı doygunluğun oluşması araştırılmıştır. Artan ST ile Tip I ve Tip II LTF'nin sindiriminin arttığı ancak diğer tiplerin sindirimi üzerinde çok az etkisi olduğu, AP ilaç miktarında artış, çöken ilaç miktarında azalma sağladığı ve 3 mM konsantrasyonun üzerinde ST'nin sindirim üzerine etkisinin sınırlı olduğu gözlenmiştir. LTF'lerde ilaç yüklemesi artması tüm formülasyonlarda sindirim ile beraber aşırı doygunluğun oluşmasına yol açmıştır. Uzun zincirli formülasyonlar için aşırı doygunluk durumu lipoliz boyunca devam ettirilmiş

ve ilaç bu süreçte çözünmüş halini korumuştur. Ancak orta zincirli formülasyonlar ve Tip IV için bu durum daha fazla ilaç presipitasyonu ile sonuçlanmıştır (William, 2012b).

- Grubun üçüncü çalışmasında sindiriminin hem aşırı doygunluğu hem de ilaç çökmesini etkilemesi nedeniyle aşırı doygunluk-çökme dengesinin formülasyon tipi ve ilaç yüküne göre değişimi değerlendirilmiştir. Araştırma grubu aşırı doygunluk oranını (maximum supersaturation ratio-SR^M) LBF sindirimi sırasında sulu sindirim fazlarındaki ilaç konsantrasyonunun aynı ortamdaki ilaç çözünürlüğüne oranı şeklinde tanımlamıştır. Artan ilaç dozunun uzun zincirli LBF performansı üzerinde ihmal edilebilir etkilere sahip olduğu ancak orta zincirli ve Tip IV LBF için ilaç çökmesini teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. İlaç çökmesi için SR^M oranı ise 3 olarak belirlenmiştir (William ve diğerleri, 2013).

- Konsorsiyum, LTF'lerin standart pH-stat lipoliz çalışması ile birbirine benzer performans gösterdiği durumlarda optimum formülasyonu seçmek için stres lipoliz testlerinin geliştirilmesini ve testlerin de dahil edilerek belirlenen yeni bir LTF sınıflandırma sistemi oluşturmayı amaçlamıştır. Stres koşulları LTF konsantrasyonu, ST konsantrasyonu ve pH değişikliği olarak belirlenmiştir. Lipoliz koşullarının değiştirilmesi formülasyonların performansında önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Değişen koşullar altında sürekli olarak iyi performans gösteren formülasyonların stres testlerini başarılı olarak geçtiği kabul edilmiştir (William ve diğerleri, 2014).

- pH-stat lipoliz modeli ile rekombinant köpek mide lipazı kullanılarak gastrik lipazın LTFC'deki formülasyonlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gastrik lipazın midede lipit sindirimini başlattığı, bağırsakta etkinliğini sürdürdüğü ve LBF'lar üzerinde etki gösterdiğinde gözlenmiştir (Bakala-N'Goma ve diğerleri, 2015).

- Pankreatin aktivitesi ve kalsiyum konsantrasyonunun LTF'lerin lipolizi üzerindeki etkisi, sindirim oranları ve model ilacın fazlardaki dağılımı açısından araştırılmıştır. Artan kalsiyum seviyeleri sonucu, yağ asitleri ve

safra tuzlarının kalsiyum sabunları halinde çökmesi ve sindirim ürünlerinin çözeltiden uzaklaşmasına yol açmıştır. Bu durum ilacın çökmesinde artışa neden olmuştur. Bu nedenle fizyolojik seviyeden daha yüksek miktarda kalsiyum kullanılması, çöken ilacın olması gerekenden daha fazla tahmin edilmesine sebebiyet vermiştir. Pankreatin aktivitesinin sindirimin oranını etkilediği ancak ilaç çökmesini etkilemediği anlaşılmıştır (Sassene ve diğerleri, 2014).

pH-stat in vitro lipoliz modelinin in vitro - in vivo korelasyonları

Yüksek ilaç çözünürlüğünün yüksek biyoyararlanıma neden olduğu varsayımıyla, in vitro sindirim çalışmaları sırasında sulu fazda çözünen ilaç miktarı ile AUC veya C_{maks} gibi in vivo farmakokinetik parametreler ilişkilendirilmiştir. Ancak pH-stat lipoliz modeli ile LTF'lerin sıralama korelasyonu elde edilmesi A seviyesi IVIVC'lerin kurulmasından daha güvenilirdir (Huang ve diğerleri, 2021). Larsen ve arkadaşları danazol yüklü LTF formülasyonların in vitro lipolizi sonrasında sulu fazdaki çözünmüş danazol yüzdesine dayalı olarak biyoyararlanım çalışmasında formülasyonlar için aynı sıralamayı elde etmiştir. Ancak danazolün salım profili farmakokinetik çalışmadaki absorpsiyon profili ile korelasyon göstermemiştir (Larsen, Holm, Pedersen ve Müllertz, 2008).

IVIVC'lerin kurulduğu pH-stat lipoliz modellerinin potansiyelini gösteren bir dizi çalışmaya rağmen, aynı lipoliz modelini kullanan birçok çalışma IVIVC'lerin eksikliğini ortaya çıkarmıştır (Christophersen ve diğerleri, 2014; Dahan ve Hoffman, 2006; Dahan ve Hoffman, 2007). IVIVC eksikliğinin, in vitro lipoliz çalışmaları sırasında yüksek sulu faz ilaç çözünürlüğünün ve düşük miktarda çökmüş ilacın yüksek biyoyararlanıma eşit olduğu varsayımından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Bolko, Zvonar ve Gašperlin, 2014). Çünkü pH-stat lipoliz modeli yalnızca emilim öncesi süreçleri dikkate aldığından, permeabilite, effluks, hepatik ilk geçiş etkisi gibi olası in vivo olayları göz ardı etmektedir. Bu nedenle yüksek sulu faz ilaç miktarının yüksek biyoyararlanıma neden olduğu varsayımı aslında yanlış olabilir.

İn vivo ortamın mümkün olduğu kadar yakın taklit edilmesiyle ilgili olarak, pH-stat lipoliz modelinin çeşitli dezavantajları vardır:

- Modelde bir absorpsiyon basamağı yoktur. İn vitro lipoliz sırasında lipoliz ürünlerinin emülsiyon arayüzeyinde birikmesi ve ileri sindirimin engellenmesi ilacın aşırı doymuş bir durumda çökmesine yol açabilir.
- pH-stat lipoliz modeli kurulumu mide sindirimini incelemek için uygun değildir (Thomas ve diğerleri, 2014).
- Modelde ortamın karıştırılması GI kanalının hidrodinamiğini doğru şekilde taklit etmemektedir. Kolayca emülsifiye olan LTF'lerin değerlendirilmesi ve homojen örnekleme sağlamak için bu karıştırmanın genellikle yeterli olduğu kabul edilir, ancak sulu ortamda kolayca dağılmayan LFCS Tip I formülasyonlarında in vivo karıştırmanın taklit edilmesi çok önemli olabilir (Berthelsen ve diğerleri, 2019).

pH-stat in vitro lipoliz modelinde güncel yaklaşımlar

pH-stat in vitro lipoliz modeli yalnızca sulu fazda çözünmüş halde bulunan ilacın emilim için uygun olduğu ve in vivo ilaç performansının tahmin edilebileceğini varsayılmaktadır (Feeney ve diğerleri, 2016; Larsen ve diğerleri, 2008). Çeşitli çalışmalar in vitro lipoliz modelinin tahmin gücünü doğrulamaya çalışmıştır. Ancak yakın zamanda Feeney ve ark. tarafından tanımlandığı gibi, yalnızca birkaçı IVIVC elde etmeyi başarmıştır (Feeney ve diğerleri, 2016). Birçok yazar, in vitro lipoliz verilerini plazma konsantrasyon-zaman profilleri ile karşılaştırırken, emilim adımının eksikliğinin IVIVC kurulamamasına neden olabileceğini vurgulamıştır.

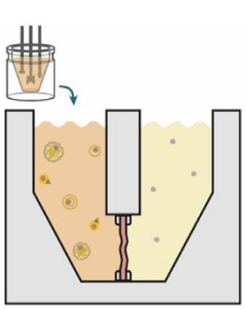
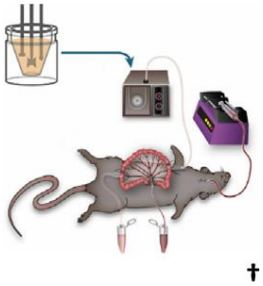
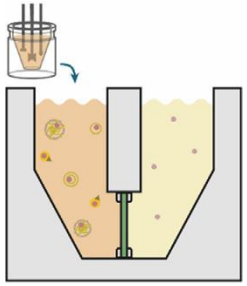
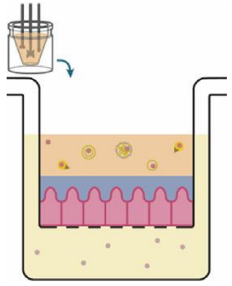
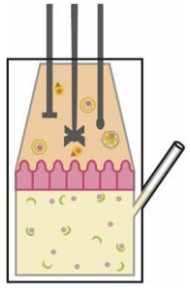
Mevcut pH-stat intestinal in vitro lipoliz modelleri kapalı bir sistem olduğundan, ilacın çözünmesi, çökmesi ve insan gastrointestinal kanalında mevcut olan sink koşul ve permeasyon arasındaki dinamik etkileşimi yansıtmayabilir (Alskär ve Bergström, 2015; Berthelsen, Sassene, Rades ve Müllertz, 2016; Buckley, Fischer, Fricker ve Brandl, 2012). Bu tartışmalara dayanarak, in vitro lipoliz modelini permeasyon basamağıyla birleştiren bir yöntemin tasarlanması, LTF'lerin oral performans ve emiliminin tahminini muhtemelen geliştirebilir (Timur, Yılmaz-Usta and Teksin, 2022). Bu tür birleşik yöntemler yeni araştırma konusu olmuştur.

Literatürde in vitro lipoliz çalışması, in situ intestinal perfüzyon çalışmasıyla birleştirilerek in vitro lipit sindirimi/in vivo emilim modeli geliştirilmiştir (Crum,

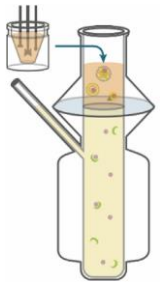
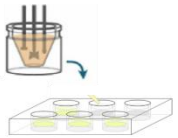
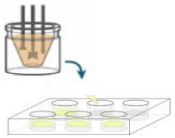
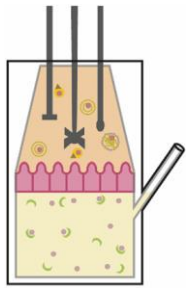
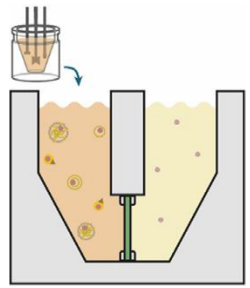
Trevaskis, Williams, Pouton ve Porter, 2016; Suys, Brundel, Chalmers, Pouton ve Porter, 2021). Benzer şekilde, permeabilite adımı olarak Caco-2 hücre hattı kullanılarak lipoliz-permeabilite yöntemi oluşturulmuştur. Yöntemde Caco-2 hücre hattı, domuz pankreas ekstresi ile geçimsiz olduğu için, pankreatin yerine mikrobiyal lipaz kullanılmıştır. Fenofibrat ve karvedilol yüklü LTF'ler için, geliştirilen yöntem ve oral biyoyararlanım çalışması arasında sıralı korelasyon elde edilmiştir (Alskär ve diğerleri, 2019; Keemink ve Bergström, 2018; Keemink ve diğerleri, 2019).

Hayvan temelli modellerin zaman alıcı olması ve hücre hattının lipoliz koşullarıyla uyumlu olmaması nedeniyle permeabilite basamağı olarak yapay bir membranın kullanıldığı çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, birleşik yöntemlerin, LTF'lerin geliştirilmesi ve emilimin tahmin edilmesi için teşvik edici araçlar olduğunu göstermiştir. Çalışmalar Çizelge 2.10'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. LTF'leri değerlendirmek için tasarlanmış pH-stat lipoliz-permeabilite modelleri

Model tasarımı					
Permeasyon basamağı	Yan yana difüzyon hücresi	İn situ perfüzyon	Yan yana difüzyon hücresi	Transwell sistemi	İki kompartmanlı model
Permeasyon bariyeri	Sıçan jejunumu	Sıçan jejenumu	PermeaPad®	Caco-2 hücre hattı	Caco-2 hücre hattı
Lipoliz ortamının transferi	Lipolizin 30. dakikası	Peristaltik pompa ile lipoliz ortamının sürekli transferi	Lipolizin 10. dakikası	Lipolizin 60. dakikası	Lipoliz ortamına sürekli maruziyet
Alıcı hücre ortamı	Ringer tamponu	Mezenterik ven	FaSSIF-V2	HBSS	%4 BSA içeren HBSS
IVIVC	Kurulamamıştır.	Kurulmuştur.	Değerlendirilmemiştir.	Değerlendirilmemiştir.	Kurulmuştur.
Model ilaç	Deksametazon ve griseofulvin	Fenofibrat	Sinnarizin	Mannitol ve progesteron	Danazol, fenofibrat ve karvedilol
Referans	(Dahan ve Hoffman, 2007)	(Crum ve diğerleri, 2016)	(Bibi ve diğerleri, 2017)	(Keemink ve diğerleri, 2018)	(Alskär ve diğerleri, 2019; Keemink ve diğerleri, 2019)

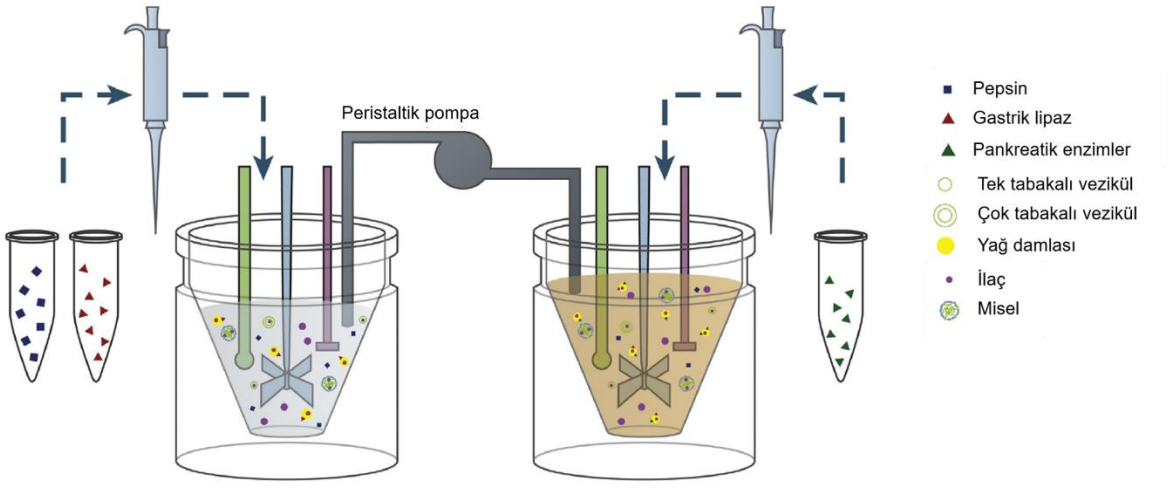
Çizelge 2.10. (devam) LTF'leri değerlendirmek için tasarlanmış pH-stat lipoliz-permeabilite modelleri

Model tasarımı					
Permeasyon basamağı	Franz difüzyon hücresi	Transwell sistemi	Transwell sistemi	İki kompartmanlı model	Transwell sistemi
Permeasyon bariyeri	PermeaPad® ve diyaliz membran	LiDo yapay membranı	Mukus-PVPA membranı ve %0,5 HEC (mukus tabakasının taklidi)	MDCK hücre hattı ve LiDo yapay membran	Diyaliz membran
Lipoliz ortamının transferi	Lipolizin 0,15, 30 ve 60. dakikası	Lipoliz öncesi ve sonrası	Lipoliz öncesi ve sonrası	Lipoliz ortamına sürekli maruziyet	Lipolizin 15 ve 30. dakikası
Alıcı hücre ortamı	%4 BSA içeren HBSS	%4 BSA içeren fosfat tamponu	PBS	%4 BSA içeren HBSS	Lipoliz ortamı
IVIVC	Kurulmuştur.	Kurulmuştur.	Mukus-PVPA membranı için kurulmuştur, %0,5 HEC için değerlendirilmemiştir.	MDCK hücre hattı için kurulamamış ve LiDo yapay membranı için kurulmuştur.	Değerlendirilmemiştir.
Model ilaç	Sinnarizin, fenofibrat ve danazol	Fenofibrat	Fenofibrat ve oridonin	Fenofibrat	Sakunavir
Referans	(Higashino ve diğerleri, 2023; Klitgaard ve diğerleri, 2021)	(Hedge ve Bergström, 2020)	(Falavigna, Brurok, Klitgaard ve Flaten, 2021; Wang ve diğerleri, 2023)	(Keemink, Hedge, Bianco, Hubert ve Bergström, 2022)	(Tanaka, Nguyen, Suys ve Porter, 2021)

2.5.2. Gastrointestinal lipoliz modeli

Genellikle tek bölmeli bağırsak lipoliz modeli yeterli kabul edilir; ancak düşük pH ve mide sindiriminin yanı sıra mide boşalması ve ani pH değişikliklerinin etkisini değerlendirmek pH-stat lipoliz düzeneği kullanılarak hem gastrik hem de bağırsak sindiriminin simülasyonuna olanak tanıyan iki aşamalı iki bölmeli pH-stat lipoliz modeli geliştirilmiştir (Christophersen ve diğerleri, 2014; Klitgaard, Sassene, Selen, Müllertz ve Berthelsen, 2017). İki aşamalı, iki bölmeli GI sindirim modelinde, sırasıyla mide ve ince bağırsağı simüle eden iki reaksiyon kabı ve iki pH-stat aparatı ardışık olarak kullanılır (Şekil 2.9) (Berthelsen ve diğerleri, 2019).

İki bölmeli GI sindirim modelinde simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvıları kullanılır. LTF'nin mide ortamında disperse edilmesi ve mide sindirim enzimlerinin eklenmesini takiben sindirim ortamı, mide bölmesinden konsantre bağırsak ortamı ve pankreas enzimlerini içeren bağırsak bölmesine sürekli olarak pompalanır. GI transferinin hızı, gastrik boşalma modelini taklit edecek şekilde ayarlanır. Tek bölmeli modelle karşılaştırıldığında in vivo durumu daha yakından taklit ettiği düşünülmektedir (Jørgensen ve diğerleri, 2018; Klitgaard ve diğerleri, 2017). Ancak insan mide lipazının optimum pH değeri ve substrat afinitesi mikrobiyal ve hayvansal kökenli lipazlardan farklı olduğundan, insan mide lipazının iyi bir alternatifi mevcut değildir (Sassene ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.9. İki bölmeli gastrointestinal lipoliz modeli (Berthelsen ve diğerleri, 2019)

2.5.3. Yüksek verimli lipoliz modeli

LTF'lerin daha hızlı değerlendirilmesi için pH titrasyonu olmayan yüksek verimli (high throughput-HTP) bir model tasarlanmışlardır (Mosgaard, Sassene, Mu, Rades ve Müllertz, 2015). HTP modeli pH-stat modeline benzer olarak termostatlı deney haznesi kullanılarak test edilmiş, verim artırmak ve miktar küçültmek için 96 kuyucuklu plakalara geçilmiştir. Modelde pH titrasyonu adımını atlamak ve sindirim ile ilişkili pH düşüşünü azaltmak için yüksek tampon kapasitesine sahip farklı bir tampon sistemi kullanılmıştır (Mosgaard, Sassene, Mu, Rades ve Müllertz, 2017).

HTP modeli, pH-stat modeli ile eşdeğer bulunmuştur ancak henüz in vivo veriler ile doğrulanmadığından ve pH-stat modelinin eksikliklerini paylaştığı için LTF'lerin in vivo performansı için tutarlı tahminler sağlayacağı beklenmemektedir.

2.5.4. Dinamik gastrik model

Dinamik gastrik model (DGM), mide sindiriminin hem mekanik hem de biyokimyasal yönlerini zamana bağlı olarak gerçekçi bir şekilde taklit etmek için geliştirilmiş bir mide sindirim modelidir (Wickham, Faulks, Mann ve Mandalari, 2012). Ana gövde ve antrum olmak üzere iki bölümden oluşan DGM insan midesinin farklı kısımlarını taklit eder. Üst kısım olan huni, fundus ve mide gövdesini simüle eder ve mide içeriği için bir rezervuar görevi görür. Asit ve mide enzimlerinin eklenmesi bilgisayar kontrollü olup, mide gövdesinin üst kısmına yerleştirilen delikli bir halka aracılığıyla gerçekleşir. Alt kısmı midenin antrumunu taklit eder. Mide içeriğinin karıştırılması ve öğütülmesinin in vivoya benzer şekilde gerçekleşmesi için kuvvet uygulayan hareketli bir pistondan oluşur. Mide boşalması bir çıkış valfi yoluyla taklit edilir (Vardakou ve diğerleri, 2011).

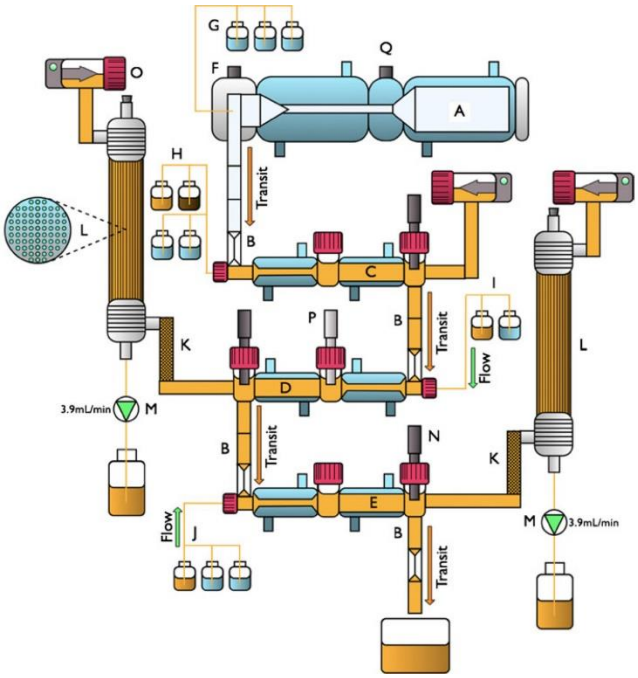
LTF'lerle ilgili olarak DGM, soya fasulyesi yağı, Tween® 80 ve Span® 80 ile hazırlanan SEDDS'in emülsifikasyonunu araştırmak için bir karakterizasyon aracı olarak kullanılmıştır. DGM'nin mekanik stresine bağlı olarak elde edilen damlacıkların boyutu (2-6 μm), USP cihaz II palet yöntemiyle (11-33 μm) karşılaştırıldığında, 5-10 kat daha küçük bulunmuştur. Sonuçlar, SEDDS'lerin kendiliğinden emülsifiye sistemler olmasına rağmen mekanik stresin damlacık

boyutunu etkilediğini göstermiştir (Mercuri ve diğerleri, 2011). Damlacık boyutu, sindirim ve ilaç salımı için yüzey alanını etkileyeceğinden, Mercuri ve arkadaşları tarafından elde edilen sonuçlar, LTF'lerin in vitro değerlendirmesi sırasında mekanik sindirimin taklit edilmesinin önemini göstermektedir.

Gastrik sindirimin biyokimyasal yönleri asit, domuz kökenli gastrik pepsin ve Rhizopus Oryzae'den elde edilen mikrobiyal lipazın eklenmesiyle DGM'de taklit edilir (Wickham ve diğerleri, 2012). Mikrobiyal lipaz, insan gastrik lipazın optimal bir ikamesi değildir ve DGM'deki yağların sindirimi muhtemelen in vivoyu tahmin edemez. Bu nedenle DGM, LTF'lerin in vivo performansının tahmin edilmesi açısından henüz değerlendirilmemiştir.

2.5.5. TNO gastrointestinal model (TIM)

TIM gastrointestinal kanalın üst bölümlerini dinamik olarak taklit eden çok bölmeli bir modeldir. Şekil 2.10'da, mideden ince bağırsağa kadar GI kanalı temsil eden dört bölmeyi içeren TIM sisteminin şematik bir gösterimi sunulmuştur (Dickinson ve diğerleri, 2012).



A	Mide	**K**	Filtre
B	Peristaltik valf	**L**	Membran
C	Duodenum	**M**	Pompa
D	Jejunum	**N**	pH elektrodu
E	İleum	**O**	Hacim sensörü
F	Basınç sensörü	**P**	Sıcaklık sensörü
G	Mide sekresyonu	**R**	Dozlama ünitesi
H	Duodenum sekresyonu		
I	Jejunum sekresyonu		

Şekil 2.10. TIM cihazının şematik gösterimi (Dickinson ve diğerleri, 2012)

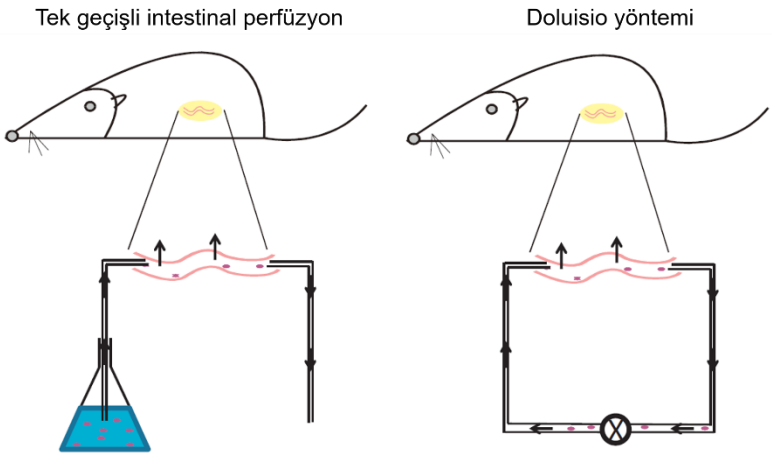
Peristaltizm dönüşümlü olarak daralan iki bölüm ile taklit edilir. Fizyolojik olarak uygun geçiş süreleri sağlayan pompalar mevcuttur. Safra salgıları ve sindirim enzimlerini içeren mide, duodenal, jejunal ve ileal sekresyonların eklenmesini sağlayan bölümler vardır. TIM, LTF'lerin in vivo performansının tahmin edilmesi açısından değerlendirilmemiştir. Ancak çalışmalar modelin suda çözünürlüğü düşük BCS Sınıf II ilaçlar için pH, GIS transport ve ST konsantrasyonları ve yiyecek etkisiyle ilişkili olarak in vivo verileri doğru bir şekilde tahmin edebildiğini gösterdiğinden, LTF'lerin in vivo performansının tahmin edilmesi konusunda ümit verici olmuştur (Mármol ve diğerleri, 2022; Souliman, Blanquet, Beyssac ve Cardot, 2006).

2.6. İn situ intestinal perfüzyon

Amidon ve ark. tarafından 1995 yılında tanıtılan Biyofarmasötik Sınıflandırma Sisteminde (BCS) ilaçlar suda çözünürlüklerine ve permeabilitelerine göre dört kategoriye ayrılmıştır (Amidon, Lennernäs, Shah ve Crison, 1995). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA), yüksek çözünürlük ve yüksek permeabiliteye sahip ilaçların (BCS Sınıf I) klinik çalışmalar olmaksızın eşdeğerliğin kanıtlanabildiği biyomuafiyet uygulamasını başlatmıştır. Bu amaçla BCS temelli biyomuafiyete ilişkin kılavuzlar yayınlamıştır. Bu kılavuzlarda ilacın gastrointestinal permeabilitesini belirlemeye yönelik yöntemler arasında in situ intestinal perfüzyon çalışması yer almaktadır (Ateş, Kaynak ve Şahin, 2016).

İn situ intestinal perfüzyon tekniğinde anestezi uygulanmış hayvanın karın duvarı orta hat boyunca kesildikten sonra bağırsağın duedonum, jejunum, ileum ve/veya kolon gibi bir bölümü açığa çıkarılır ve perfüze edilecek bağırsak segmentinin proksimal ve distal uçları kanüle edilir. Bu segment, ilacı önceden bilinen bir konsantrasyonda içeren çözelti ile perfüze edilir. Segmentin perfüzyonu ile ilaç fizikokimyasal ve biyofarmasötik özelliklerine bağlı olarak bir miktar emilir ve perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu azalır. Perfüzyon çözeltisindeki başlangıç konsantrasyonu ile izole edilmiş segmentten çıkan çözeltinin konsantrasyonu arasındaki fark intestinal bariyerin apikal membranından (transselüler taşıma) veya hücreler arası boşluktan (paraselüler taşıma) taşınan ilaç miktarını ifade eder (Stappaerts, Brouwers, Annaert ve Augustijns, 2015).

Perfüzyon çalışması açık veya kapalı döngü şeklinde gerçekleştirilebilir (Şekil 2.11) (Stappaerts ve diğerleri, 2015). İlk olarak 1958 yılında Schanker ve arkadaşları tarafından uygulanan tek geçişli intestinal perfüzyon (single pass intestinal perfusion-SPIP) tekniği açık döngü olarak bilinmektedir (Hens, Gonzalez-Alvarez ve Bermejo, 2022). Bu yöntemden perfüze edilen segmentten çıkan perfüzat doğrudan atığa gitmektedir (Strappaerts ve diğerleri, 2015). Doluisio yöntemi olarak bilinen kapalı döngüde ise perfüzyon çözeltisi sürekli olarak bağırsak segmenti boyunca yeniden sirküle edilmektedir (Gülsün-İnal, 2016; Tuğcu-Demiröz, Gonzalez-Alvarez, Gonzalez-Alvarez ve Bermejo, 2014). SPIP ile karşılaştırıldığında Doluisio yönteminde gereken perfüzyon çözeltisi miktarı oldukça azdır (Doluisio, Billups, Dittert, Sugita ve Swintosky, 1969).



Şekil 2.11. Açık ve kapalı döngü intestinal perfüzyonun şematik gösterimi

SPIP yöntemi ilaçların permeabilitesinin belirlenmesinin yanı sıra:

- Pasif veya aktif transport gibi emilim mekanizmasının belirlenmesi,
- Yardımcı maddelerin ilaç permeabilitesi üzerindeki etkisinin araştırması,
- Bağırsak permeabilitesindeki bölgesel farklılıkların araştırılması,
- Elde edilen sonuçlardan insan permeabilitesinin hesaplanması,
- İn vitro çözünme/lipoliz çalışmalarını perfüzyon tekniğiyle birleştirerek formülasyon özelliklerinin değerlendirilmesi için de çok önemli bir emilim modelidir (Hens ve diğerleri, 2022).

Tez çalışması kapsamında EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi ve etkinliklerinin hücre kültürü çalışması ile incelenmesi amaçlanmıştır. SEDDS

sistemlerin lipit temelli olması nedeniyle in vitro lipoliz çalışması ile değerlendirilmesi gereklidir. Literatürde in vitro lipoliz çalışması ve permeabilite yöntemlerinin birleştirilmesi çok yenilikçi bir yaklaşımdır. Tez kapsamında in vitro lipoliz ile ex-vivo permabilite basamağı ve in vitro lipoliz ile in situ intestinal perfüzyon çalışmasının birleştirilmesi hedeflenmiştir. Birleştirilmiş yöntem kurulumu ve bu yöntem ile EKM yüklü SEDDS formülasyonların değerlendirilmesi tez çalışmasının yenilikçi yönünü oluşturmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

4-bromobenzenboronik asit	Sigma Aldrich, ABD
Antipirin	Alfa Aesar, ABD
Asetonitril	Sigma Aldrich, ABD
Capmul® MCM C8	Abitec, ABD
Capryol® 90	Gattefosé, Fransa
Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri (DMEM)	Biowest, Fransa
Eksemestan	Deva İlaç, Türkiye
Fenol kırmızısı	Merck, Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Biowest, Fransa
Fosfotungustik asit	Sigma, ABD
Glasiyel asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, Almanya
İmwitor® 948	Olechemicals, Almanya
İmwitor® 988	Olechemicals, Almanya
Kalsiyum klorür dihidrat	Sigma Aldrich, ABD
Keta-Control®	Doğa İlaç, Türkiye
Kolliphor® EL	BASF, Almanya
Kolliphor® RH40	BASF, Almanya
Ksilen	Tekkim, Türkiye
Labrasol® ALF	Gattefosé, Fransa
Labrafil® M 1944 CS	Gattefosé, Fransa
Maisine®	Gattefosé, Fransa
MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı	ATCC, ABD
Metanol	Sigma Aldrich, ABD
Miglyol® 812 N	Olechemicals, Almanya
Miglyol® 818	Olechemicals, Almanya
Pankreatin	Sigma Aldrich, ABD
Peceol®	Gattefosé, Fransa

PEG 400	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin-streptomisin (1000 U/1000 µg/mL)	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum fosfat monobazik	Merck, Almanya
Propilen glikol	Sigma Aldrich, ABD
Referans ürün (Aromasin®)	Pfizer, ABD
(Parti No ER4407, Seri No 8213072100184282)	
SIF® Powder	Biorelevant, İngiltere
Sodyum fosfat dibazik	Merck, Almanya
Sodyum fosfat monobazik dihidrat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Sodyum lauril sülfat	Merck, Almanya
Transcutol® HP	Gattefosé, Fransa
Tripan mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin/EDTA	Sigma Aldrich, ABD
Tween® 80	Merck, Almanya
WST1	Roche, Almanya

3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar

0,22 µm PVDF filtre	Labfil, Çin
0,45 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
Alüminyum pan	Shimadzu, Japonya
Çözünme hızı cihazı	Agilent 708-DS, ABD
Damlacık büyüklüğü ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere
Diferansiyal taramalı kalorimetre	DSC 60, Shimadzu, Japonya
Distile su cihazı	Nüve NS112, İngiltere
Eppendorf tüp	Isolab, Almanya
Enjektör	Ayset, Türkiye
FT-IR Spektrofotometre	Perkin Elmer Spectrum, FT-NIR
Franz difüzyon hücresi	Çalıkan Cam, Türkiye
Hassas terazi	Precisa, İsviçre
Hücre kültürü flaskı (75 ve 25 cm^2)	Corning, ABD

Hücre sayıcı	Biorad, ABD
HPLC	Agilent 1100 series, Almanya
Işık mikroskobu	Leica DM6B, Almanya
İnsülin enjektörü	Beybi, Çin
İklimlendirme dolabı	TK252, Nüve, Türkiye
Kuyucuklu hücre kültürü plakası (6 ve 96'lı)	Corbion, ABD
Lipoliz cihazı	Metrohm 902 Titrando, İsviçre
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
Nazogastrik beslenme katateri	Bıçakçılar, Türkiye
ODS C18 Kolon (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	GL Sciences, Japonya
Otomatik pipet seti	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Sympatec Helos, Almanya
Plaka okuyucu	Molecular Devices, ABD
Peristaltik pompa	Ecoline, Harvard Apparatus, ABD
pH metre	Ohaus, ABD
Santrifüj	Allegra X-30, ABD
Sert jelatin kapsül (00el)	Capsugel®, Belçika
Su banyosu	Nüve, Türkiye
TEM	FEI Tecnai G2 Spirit, ABD
Tubing	Alibaba Group, Çin
UV spektrofotometre	Cary 60 UV-Vis, Agilent, Almanya
Vial	Agilent, Almanya
Viskozimetre	Brookfield DV III+, ABD
Vorteks	Firlabo, Fransa

3.2. Yöntem

Tez kapsamında yapılan çalışmalar in vitro ve in situ olmak üzere iki ana bölüme ayrılmıştır. Eksemestanın (EKM) fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu, formülasyon geliştirilmesi, formülasyonların karakterizasyon çalışmaları, çözünme hızı ve in vitro lipoliz, ex-vivo permeabilite ve hücre kültürü çalışmaları in vitro çalışmaları oluşturmaktadır. İn situ çalışmalar ise lipoliz çalışması ile birleştirilmiş tek geçişli intestinal perfüzyon

çalışmasını içermektedir. Bu çalışmalar EKM'nin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi, EKM için miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi, formülasyon geliştirme çalışmaları, karakterizasyon çalışmaları, in vitro çözünme hızı çalışmaları, in vitro lipoliz çalışmaları, ex-vivo permeabilite çalışmaları, hücre kültürü çalışmaları ve in situ perfüzyon çalışmaları olmak üzere olmak üzere 9 ana başlıkta sunulmuştur.

3.2.1. Eksemestanın fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Önformülasyon çalışmaları kapsamında EKM'nin çözünürlük, partikül büyüklüğü, FT-IR analizi, erime derecesi gibi fizikokimyasal özellikleri tespit edilmiştir.

Çözünürlük çalışması

FDA veri tabanında EKM'nin in vitro çözünme hızı deneyinde çözünme ortamı olarak %0,5 sodyum lauril sülfat (SLS) çözeltisinin kullanılması önerilmektedir (FDA, 2006). Bu nedenle çözünürlük çalışmasında çözünme ortamı olarak distile su, %0,5 SLS çözeltisi ve ex-vivo çalışmalarda alıcı hücre ortamı olan %0,5 SLS içeren fosfat tamponu (PBS) kullanılmıştır. EKM'nin çözünürlük değerini belirlemek amacıyla çözünme ortamlarına çözünebilecek miktardan fazla EKM eklenmiştir. Çözünme ortamlarında aşırı miktarda EKM içeren flakonlar distile su ve %0,5 SLS çözeltisi için 25 ± 0,5°C ve 37 ± 0,5°C sıcaklığındaki, %0,5 SLS içeren fosfat tamponu (PBS) için 37 ± 0,5°C sıcaklığındaki su banyosuna yerleştirilmiştir. Karışımlar manyetik karıştırıcı yardımıyla 72 saat boyunca karıştırılmıştır. 72 saat sonunda alınan örnekler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, süpernatant 0,45 µm'lik membran filtreden süzülmüştür. Süzüntü gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra distile su için UV spektrofotometresi, %0,5 SLS çözeltisi ve %0,5 SLS içeren PBS tamponu için yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) kullanarak analiz edilmiştir. Kalibrasyon denklemleri ve seyreltme faktörleri kullanılarak üç farklı ortamda çözünürlük değerleri belirlenmiştir. Çalışma 3 paralel olarak yürütülmüştür.

Partikül büyüklüğü ölçümü

Etkin maddenin partikül büyüklüğünü ölçmek için Sympatec Helos Particle Size Analyzer cihazı kullanılmıştır. Cihazın çalışma prensibi lazer ışığının partiküller ile etkileşimi sonucu saçılıma uğramasıdır. Cihaz 0,1-8750 µm aralığında ölçüm yapabilmektedir. EKM'nin partikül büyüklüğü çözünmediği ortam olan distile suda disperse edilerek ölçülmüştür. Ölçümler 3 paralel gerçekleştirilmiştir.

FT-IR analizi

EKM'nin Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) spektrumu Perkin Elmer Spectrum cihazı kullanılarak 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında toz halde belirlenmiştir. FT-IR analizinde gönderilen kızılötesi ışığı çeşitli dalga boylarında absorbe etmesi sonucu numunenin moleküler yapısı aydınlatılır. Moleküler yapı ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak her numuneye özgü spektrum elde edilir.

Erime derecesi tayini

EKM'nin erime derecesi tayini Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) yöntemi ile alüminyum pan içine yerleştirilen yaklaşık 2 mg'lık örnek için dakikada 10°C'lik artış sağlayarak 20-300°C aralığında Shimadzu DSC-60 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen termogram yorumlanmıştır. DSC yönteminde referans ve örnek sıcaklıklarının aynı olması için dışarıdan verilmesi gereken ısı enerjisi ölçülür. Örnekte erime gibi endotermik bir değişim meydana gelmesi durumunda referansa göre daha fazla ısı verilmesi gerekir. Örnek ile referans arasında ısı akışı farkı oluşur.

3.2.2. Eksemestanın miktar tayini yöntemleri ve validasyonu

EKM'nin miktar tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi için Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometre, kromatografik miktar tayini yöntemi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) olan Agilent 1100 Series HPLC cihazı kullanılmıştır.

Eksemestanın UV spektrofotometresi ile dalga boyu taraması

Miktar tayini yöntemleri için ilk olarak UV spektrofotometre ile distile su, %0,5 SLS içeren distile su, asetonitril ve metanol ortamlarında 200-800 nm dalga boyu aralığında tarama yapılmıştır. Bu ortamlarda etkin maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{maks}) tespit edilmiştir.

Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi ve validasyonu

Spektrofotometrik miktar tayini çalışmaları çözünürlük çalışmalarında kullanmak üzere distile su ortamında 250 nm dalga boyunda yapılmış ve yöntem valide edilmiştir. Validasyon, etkin maddenin miktar tayini yönteminin amaçlanan kullanım açısından güvenilirliğini göstermek ve beklenen sonuçları devamlı olarak sağladığının kanıtlanması için yapılan işlemlerden oluşan bir prosedürdür. Analitik yöntemin validasyonu ICH Q2(R1) Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Test ve Metodoloji kılavuzunda belirtilen validasyon kriterlerine göre yapılmıştır (ICH, 1995).

Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı deneysel bulguların numune etkin madde miktarı ile belirli aralıkta orantılı olmasıdır. Analitik yöntem validasyonunda doğrusallık parametresini göstermek amacıyla EKM'nin distile su ortamında 25 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 4 µg/mL - 20 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan 7 adet çözeltinin absorbans değerleri 250 nm'de okunmuştur. Çalışmalar 3 paralel gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin konsantrasyon değerlerine karşı okunan absorbans değerlerine doğrusal regresyon modeli uygulanmıştır. Kalibrasyon doğrusunun, kalibrasyon denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusunun doğrusallığı R^2 değeri ile değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği belirli şartlar altında farklı gün ve farklı laboratuvarda tekrarlanan ölçümler yapıldığında ölçüm sonuçları arasındaki yakınlığın derecesi ile ifade edilmektedir. Kesinlik aynı konsantrasyona sahip örneklerin ölçülen

konsantrasyonlarının ortalama (ort), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısının (VK) hesaplanması ile değerlendirilir. Kullanılan analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek için deney içi kesinlik (tekrar edilebilirlik) ve deneyler arası kesinlik (ara kesinlik) çalışmaları yapılmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin distile sudaki stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak hazırlanan 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltinin absorbansı 250 nm dalga boyunda 10 kez ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu, SS ve VK'ı hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin distile sudaki stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak hazırlanan 6 µg/mL, 10 µg/mL ve 14 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerin absorbansı birbirini takip eden 3 gün içerisinde 250 nm dalga boyunda 3 kez ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu, SS ve VK hesaplanmıştır.

Doğruluk ve geri elde

Doğruluk, analitik yöntem kullanılarak bulunan etkin madde miktarı ile gerçek etkin madde miktarındaki yakınlıktır. Konsantrasyonu bilinen örnekler analitik yöntem kullanılarak analiz edilir. Geri elde, %geri elde, SS ve VK hesaplanır. Yöntemin doğruluğunu göstermek için distile su ortamında 25 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiden hareketle kalibrasyon sınırları içinde olmak koşuluyla, düşük, orta ve yüksek konsantrasyona sahip üç değişik konsantrasyonda hazırlanan 3 seri çözeltinin absorbansı 250 nm dalga boyunda 3 kez ölçülmüştür. Absorbans değerlerinden hareketle kalibrasyon denklemi yardımıyla geri elde, %geri elde, SS ve VK hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan yöntemin analiz edilen etkin maddeye özgün olduğunu, etkin maddeye ait cevabı diğer tüm cevaplardan ayırdığını ifade eder. Yöntemin seçiciliğini araştırmak için distile su 200-800 nm dalga boyları arasında taranmıştır. EKM ile aynı dalga boyunda absorbansın olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Bir numune içinde analizi yapılan etkin madde için, analitik yöntem tarafından saptanabilen en küçük etkin madde konsantrasyonu saptama sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebilen en küçük etkin madde konsantrasyonu tayin sınırı (LOQ) olarak ifade edilir. LOD ve LOQ değerleri Eş. 3.1 ve Eş. 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3{,}3 \times \sigma) / S \quad (3.1)$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S \quad (3.2)$$

σ: Kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması
S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Stabilite

Çalışma süresi boyunca EKM'nin distile su ortamında stabil olduğunu göstermek için 10 µg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 25 ± 0,5°C ve 37 ± 0,5°C'de tutulmuştur. Çözeltilerin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda absorbansı ölçülmüş ve EKM konsantrasyonu kalibrasyon denklemi kullanılarak tayin edilmiştir.

Kromatografik miktar tayini yöntemi ve validasyonu

Kromatografik yöntem, çözünürlük çalışması için metanol ortamında, in vitro çözünme hızı çalışmalarında kullanmak üzere FDA tarafından önerilen ortam olan %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında, in vitro lipoliz çalışmasında kullanmak üzere asetonitrilde, ex-vivo permeabilite çalışmasında kullanmak üzere %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında ve in situ intestinal perfüzyon çalışmasında kullanmak üzere ACN:Perfüzat (9:1) ortamında EKM miktarını tayin etmek için geliştirilmiştir.

İn vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanmak üzere; metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında EKM için USP monografı ve literatürde belirtilen HPLC koşullarında mobil faz oranları, akış

hızı ve enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek, en uygun çalışma koşulları elde edilmiştir (Singh ve diğerleri, 2009). Bu çalışmalar için izokratik akış kullanılmıştır.

İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında EKM perfüze edilen bağırsak segmentinden toplanan örneklerde (perfüzat) çözünmüş veya çökmüş halde bulunabilir. Çözünmüş ve çökmüş haldeki EKM'nin asetonitrile çekilmesinin analiz için uygun olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle validasyon ortamı olarak ACN:Perfüzat (9:1) kullanılmıştır. Perfüzyon çalışmasında permeabilite katsayısı hesaplanırken konsantrasyonların net su akışına (Net Water Flux, NWF) göre düzeltilmesi gereklidir. Bu amaçla perfüzyon çözeltisine referans madde olarak absorbe edilmeyen fenol kırmızısı (FK) eklenmektedir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2014). Ayrıca SEDD sistemlerin ve in vitro lipoliz ortamı içeriğinin perfüzyonu sırasında jejunum membran bütünlüğünün bozulmadığından emin olmak için pasif permeabilite belirteci ve referans madde olarak antipirin (ANT) kullanılmıştır (Suys, Chalmers, Pouton ve Porter, 2018). Bu amaçla ACN:Perfüzat (9:1) ortamında EKM, ANT ve FK'nin eş zamanlı tayin edilebileceği HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma için gradient akış kullanılmıştır.

Yöntemlerin validasyonu için doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve geri elde, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı parametreleri incelenmiştir. İn vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanılan HPLC yönteminin validasyonu için kullanılan yöntem koşulları, cihaz, EKM stok ve standart çözelti konsantrasyonları Çizelge 3.1'de, in situ çalışmalarda kullanılan HPLC yönteminin validasyonu için kullanılan koşullar, EKM, FK ve ANT stok ve standart çözelti konsantrasyonları Çizelge 3.2'de, HPLC gradient akış mobil faz programı Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Doğrusallık

EKM'nin metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında aynı konsantrasyona sahip üç farklı stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltiler HPLC'ye enjekte edilmiştir. Ölçümler 3 paralel gerçekleştirilmiştir. EKM konsantrasyonlarına karşılık ölçülen pik alanlarına

doğrusal regresyon uygulanarak kalibrasyon doğrusunun, kalibrasyon denklemi ve R^2 hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrunun doğrusallığı R^2 değeri ile değerlendirilmiştir.

İn situ intestinal perfüzyon çalışması için EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 100 µg/mL konsantrasyona sahip üç farklı stok çözeltisi hazırlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda ACN:Perfüzat (9:1) ortamında FK'nin çözünmediği görülmüştür. FK perfüzat içerisinde, EKM ve ANT asetonitrilde çözülerek 9:1 (h/h) oranında karıştırılmış ve balonjojede istenen hacme ACN:Perfüzat (9:1) karışımı ile tamamlanmıştır. Stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile hazırlanan 11 farklı konsantrasyondaki çözeltiler HPLC'ye enjekte edilmiştir. Ölçümler 3 paralel gerçekleştirilmiştir. EKM, ANT ve FK konsantrasyonlarına karşılık ölçülen pik alanlarına doğrusal regresyon uygulanarak kalibrasyon doğrusunun, kalibrasyon denklemi ve R^2 hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrunun doğrusallığı R^2 değeri ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. İn vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanılan HPLC yönteminin koşulları

	Metanol	**Asetonitril**	**%0,5 SLS çözeltisi**	**%0,5 SLS içeren PBS tamponu**	**FaSSIF**	**FeSSIF**
Cihaz	Agilent 1200	Agilent 1200	Agilent 1200	Agilent 1200	Agilent 1200	Agilent 1200
Kolon	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)
Akış tipi	İzokratik	İzokratik	İzokratik	İzokratik	İzokratik	İzokratik
Kolon sıcaklığı	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Mobil faz	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)	Asetonitril:Saf su (55:45 h/h)
Akış hızı (mL/dk)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Enjeksiyon hacmi (µL)	20	20	20	20	20	20
Dalga boyu (nm)	245	250	250	250	250	250
Stok çözelti (µg/mL)	100	50	100	100	50	50
Standart çözeltiler (µg/mL)	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 30, 40, 50	0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 18	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 30, 40	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 30, 40	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 30, 40	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 30, 40
Alıkonma zamanı (dk)	7,1	7,2	7,2	7,2	7,2	7,0

Çizelge 3.2. İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında kullanılan HPLC yönteminin koşulları

	Fenol kırmızısı	**Antipirin**	**Eksemestan**
Cihaz	Agilent 1200	Agilent 1200	Agilent 1200
Kolon	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)	Inertsil ODS-2 (4,6 × 250 mm, 5 µm)
Ortam	ACN:Perfüzat (9:1, h/h)	ACN:Perfüzat (9:1, h/h)	ACN:Perfüzat (9:1, h/h)
Akış tipi	Gradient	Gradient	Gradient
Kolon sıcaklığı	25°C	25°C	25°C
Enjeksiyon hacmi (µL)	20	20	20
Dalga boyu (nm)	250	250	250
Stok çözelti (µg/mL)	100	10	100
Standart çözeltiler (µg/mL)	1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 40, 50, 100	1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 40, 50, 100	1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 40, 50, 100
Alıkonma zamanı (dk)	5,9	7,8	17,4

Çizelge 3.3. HPLC gradient akış mobil faz koşulları

Zaman (dk)	**%ACN**	**%Saf su**	**Akış hızı (mL/dk)**
0	10	90	1,3
2	10	90	1,3
2,5	25	75	1,3
10	25	75	1,3
11	60	40	1,3
19	60	40	1,3
20	90	10	1,3
27	90	10	1,3
30	10	90	1,3
32	10	90	1,3

Kesinlik

Deney içi kesinlik için EKM'nin metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen EKM konsantrasyonu, SS ve VK hesaplanmıştır. Deneyler

arası kesinlik çalışması için EKM'nin metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanına karşılık gelen EKM konsantrasyonu, SS ve VK hesaplanmıştır.

İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında deney içi kesinlik için ACN:Perfüzat (9:1) ortamında ANT ve FK'nin 8 µg/mL konsantrasyonda, EKM'nin 30 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen EKM, ANT ve FK konsantrasyonları, SS ve VK hesaplanmıştır. İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında deneyler arası kesinlik için EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 8 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen EKM, ANT ve FK konsantrasyonları, SS ve VK hesaplanmıştır.

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin asetonitril ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 15 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri, metanol, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilmiştir. EKM için pik alanına ait konsantrasyon değerlerinden hareketle geri elde, SS, %geri elde ve VK hesaplanmıştır.

İn situ intestinal perfüzyon çalışması için ACN:Perfüzat (9:1) ortamında EKM, ANT ve FK'nin 8 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilmiştir. EKM ve referans maddeler için pik alanlarına ait konsantrasyon değerlerinden hareketle geri elde, SS, %geri elde ve VK hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Çalışılan dalga boyunda ve EKM'nin alıkonma zamanında girişim yapan madde varlığını kontrol etmek için her bir ortam tek başına ve EKM içermeyen SEDDS formülasyonları, metanol, asetonitril, çözünme hızı ve ex-vivo permeabilite çalışmasında kullanılan alıcı hücre ortamlarında disperse edilerek HPLC'ye enjekte edilmiştir. EKM'ye ait piki belirlemek için her bir ortamda hazırlanan EKM çözeltisi de HPLC'ye enjekte edilmiştir. EKM ile aynı alıkonma zamanında pik olup olmadığı kontrol edilmiştir.

İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında kullanılan HPLC yönteminin özgünlüğünü göstermek için ACN:Perfüzat (9:1) ortamı, bağırsak segmentinden toplanan serum fizyolojik ve EKM içermeyen SEDDS formülasyonları HPLC'ye enjekte edilmiştir. EKM, ANT ve FK'ya ait pikleri belirlemek için ACN:Perfüzat (9:1) ortamında hazırlanan EKM, ANT ve FK çözeltisi de HPLC'ye enjekte edilmiştir. EKM, ANT ve FK ile aynı alıkonma zamanında pik olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Analitik yöntem tarafından saptanabilen en küçük etkin madde konsantrasyonu olan LOD ve kantitatif olarak tayin edilebilen en küçük etkin madde konsantrasyonu olan LOQ EKM ve referans maddeler için "Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi ve validasyonu" ara başlığında ifade edildiği şekilde Eş. 3.1 ve Eş. 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Stabilite

Çalışma süresi boyunca kullanılan EKM çözeltisinin stabil olduğunu göstermek için metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamlarında 10 µg/mL konsantrasyonda, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında 16 µg/mL konsantrasyonda EKM çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 25 ± 0,5°C ve 37 ± 0,5°C sıcaklıklarda tutulmuştur. Çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda HPLC'de analiz edilmiş ve kalibrasyon denklemi yardımıyla EKM miktarları hesaplanmıştır.

İn situ intestinal perfüzyon çalışması için yapılan stabilite tayininde EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 30 µg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 37°C sıcaklıkta tutulmuştur. Çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda HPLC'de analiz edilmiştir. Kalibrasyon denklemi yardımıyla EKM ve referans madde miktarları hesaplanmıştır.

3.2.3. SEDDS formülasyon geliştirme çalışmaları

SEDDS formülasyon geliştirme çalışmalarında ilk basamak olarak en uygun yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvanı seçmek için yardımcı maddelerde EKM çözünürlüğü tayin edilmiştir. EKM'nin en yüksek çözünürlük gösterdiği yardımcı maddeler ile üçgen faz diyagramları oluşturulmuştur. Üçgen faz diyagramlarının yardımıyla uygun sürfaktan:kosürfaktan (S_{mix}) oranı belirlenmiştir. Deney tasarımı kullanılarak optimum SEDDS formülasyon bileşimi seçilmiştir. Formülasyon geliştirme çalışmaları kapsamında yapılan bu çalışmalar aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Çözünürlük çalışması

EKM'nin çözünürlüğü orta zincirli trigliserit, orta zincirli mono ve digliserit karışımı, uzun zincirli mono ve digliserit karışımı, propilen glikol yağ asidi esteri, sürfaktan ve kosolvan gruplarında belirlenmiştir. Çözünürlük çalışmasında kullanılan yardımcı maddeler ve HLB değerleri Çizelge 3.4'te sunulmuştur (Singh ve diğerleri, 2016).

Çizelge 3.4. EKM çözünürlüğünün belirlendiği yardımcı bileşenler

Sınıf	Ticari isim	HLB değeri
Orta zincirli trigliserit	Miglyol® 812 N	5
	Miglyol® 818	10
Orta zincirli mono ve digliserit karışımı	İmwitor® 988	3-4
	İmwitor® 948	3-4
	Capmul® MCM C8	5-6
Uzun zincirli mono ve digliserit karışımı	Maisine®	1
	Peceol®	1
Propilen glikol yağ asidi esteri	Miglyol® 840	5
Sürfaktan	Labrasol® ALF	12
	Tween® 80	15
	Tween® 20	16,7
	Kolliphor® RH40	15
	Kolliphor® EL	13
Kosolvan	Transcutol® HP	-
	PEG 400	-
	Propilen glikol	-

Çalışmada her bir yağ, sürfaktan ve kosolvandan 3 g içeren flakona fazla miktarda EKM ilave edilmiştir. Her bir flakon vortekslendikten sonra karışımlar 25 ± 0,5°C'deki su banyosunda 72 saat karıştırılmıştır. Karışımlar 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatandan 20 µL alınarak tartılmıştır (Bektaş, 2019) . Tartım işlemi, kullanılan yardımcı maddelerin viskoz yapısı nedeniyle, pipette kalan kısımdan kaynaklanan standart sapmayı en aza indirmek için yapılmıştır. Formülasyon geliştirme ve hazırlama çalışmalarının tamamında ağırlık üzerinden gidilmiştir. Tartılan bu kısım kalibrasyon aralığına göre metanol ile seyreltimiş ve vortekslenmiştir. Hazırlanan örnekler 0,45 µm membran filtreden viallere süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir. Çözünürlük çalışması 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

Çözünürlük çalışmasından hareketle seçilen EKM'nin yüksek çözünürlük gösterdiği yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvan ile kendiliğinden emülsifikasyon alanını tayin etmek, en büyük nanoemülsiyon alanını sağlayan S_{mix} oranını ve optimum yağ,

sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvan miktarını belirlemek için üçgen faz diyagramları kullanılmıştır (Akartas ve Karasulu, 2020).

S_{mix} oranını belirlemek için 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 olmak üzere dört farklı oran çalışılmıştır. Her S_{mix} oranı için, seçilen yağ ile sürfaktan ve kosürfaktanın 9:1 ile 1:9 arasındaki oranlarda karışımları kullanılmıştır. Karışımdaki yardımcı madde miktarları Çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Üçgen faz diyagramı yardımcı madde miktarları

S_{mix}		**1:1**		**2:1**		**3:1**		**4:1**	
Oran	***% Yağ (a/a)***	***%Sürfaktan (a/a)***	***%Kosürfaktan (a/a)***	***%Sürfaktan (a/a)***	***%Kosürfaktan (a/a)***	***%Sürfaktan (a/a)***	***%Kosürfaktan (a/a)***	***%Sürfaktan (a/a)***	***%Kosürfaktan (a/a)***
9:1	90	5	5	6,7	3,3	7,5	2,5	8	2
8:2	80	10	10	13,3	6,7	15	5	16	4
7:3	70	15	15	20	10	22,5	7,5	24	6
6:4	60	20	20	26,7	13,3	30	10	32	8
5:5	50	25	25	33,3	16,7	37,5	12,5	40	10
4:6	40	30	30	40	20	45	15	48	12
3:7	30	35	35	46,7	23,3	52,5	17,5	56	14
2:8	20	40	40	53,3	26,7	60	20	64	16
1:9	10	45	45	60	30	67,5	22,5	72	18

Karışımlar gerekli miktarda yardımcı bileşenlerin tartılarak flakonlara ilave edilmesi ve homojen karışım sağlanıncaya kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılması ile hazırlanmıştır. Karışımlar bulanıklık elde edilene kadar su ile titre edilmiştir. Titrasyon öncesi ve sonrası flakonlar tartılarak titrasyon için harcanan su miktarı belirlenmiştir. Su, yağ, sürfaktan ve kosürfaktan yüzdeleri hesaplanarak üçgen faz diyagramları oluşturulmuştur. Nanoemülsiyon alanı veya emülsifikasyon bölgesi olarak ifade edilen berrak alan üçgen faz diyagramları ile belirlenmiştir. Dört farklı S_{mix} oranına ait emülsifikasyon bölgeleri incelenerek en büyük alan sağlayan oran belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda bu oran kullanılmıştır.

Faz diyagramları Microsoft Visual Basic programlama dili kullanarak geliştirilmiş faz diyagramı oluşturma programı ile çizilmiştir (Ege, Karasulu ve Guneri 2004). Veri

olarak formülasyondaki yağ, sürfaktan:kosürfaktan ve su yüzdeleri programa girilir ve faz diyagramı otomatik olarak oluşturulur. Belirlenen bölge, ağırlık merkezi program tarafından belirlenen nanoemülsiyon alanıdır (Akartas ve Karasulu, 2020).

Nanoemülsiyon alanı içerisinde optimum formülasyon bileşimini belirlemeye yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Optimum formülasyon bileşimini belirlemek için üçgen faz diyagramlarının ağırlık merkezi etrafında noktalar seçilmiştir. Bu oranlarda hazırlanan karışımlar bir bardak su hacmine denk olacak şekilde 1:250 oranında distile su ile seyreltilmiş, damlacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) ölçülmüştür. Optimum formülasyona ait yağ, sürfaktan ve kosürfaktan yüzdelerinin belirlenmesi için rastgele belirlenen sayısız nokta yerine deney tasarımı kullanmanın daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Deney tasarımı ile optimum formülasyon bileşiminin belirlenmesi

Optimum formülasyon bileşimini belirlemek için Box-Behnken deney tasarımından (BBD) yararlanılmıştır. Deney tasarımı için Design Expert® V11 yazılımı kullanılmıştır. Tasarımda formülasyon bileşenleri (yağ, sürfaktan ve kosürfaktan) bağımsız değişken (faktör), damlacık boyutu ve PDI bağımlı değişken (yanıt) olarak seçilmiştir. Bu sayede yağ, sürfaktan ve kosürfaktan miktarındaki artış veya azalış ile formülasyonun in vitro ve in vivo performansı üzerinde etkili olan damlacık boyutu ve PDI'nın nasıl değiştiği incelenmiştir.

BBD'de üretilen deneysel noktaların emülsifikasyon alanı içinde olması gerektiğinden nanoemülsiyon bölgesinin sınırları üç bağımsız değişkenin aralığını tanımlamak için kullanılmıştır (Zhu, Hong, Liu ve Pei, 2009). BBD'de bağımsız değişkenler için alt (-1 olarak kodlanır), orta (0 olarak kodlanır) ve üst (1 olarak kodlanır) olmak üzere üç seviye tanımlanır. BBD'de bağımsız değişkenlerden birinin değeri merkez değerde sabitlenirken (örneğin kosürfaktan, orta değer (0)) diğer bağımsız değişkenlerin (yağ ve sürfaktan) tüm seviyelerinin kombinasyonları uygulanır ve aynı işlemler diğer bağımsız değişkenler için de uygulanır. Üç faktörlü BBD düzeni Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. BBD düzeni

Sıralama	Bağımsız değişken 1	Bağımsız değişken 2	Bağımsız değişken 3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Geliştirilmesi amaçlanan SEDD sistem LTFC'ye göre Tip IIIB sınıfına aittir. Bu sistemler %20'den az yağ içermektedir (Pouton, 2006). Bu amaçla BBD'de yağ üst değeri %20 olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler için alt, orta ve üst değerler ve optimum formülasyon için istenen özellikler Çizelge 3.7'de sunulmuştur.

Çizelge 3.7. BBD kullanılan bağımsız ve bağımlı değişkenler

Bağımsız değişken	Birim	Alt değer (-1)	Orta değer (0)	Üst değer (+1)
Yağ miktarı (İmwitor® 988)	g	0,080	0,140	0,200
Sürfaktan miktarı (Kolliphor® RH40)	g	0,640	0,688	0,736
Kosürfaktan miktarı (Labrasol® ALF)	g	0,160	0,172	0,184
Bağımlı değişken	**Yanıt**			
Damlacık boyutu (nm)	<100			
PDI	<0,2			

Design Expert® programı tarafından üç değişkenli (yağ, sürfaktan, kosürfaktan), üç seviyeli (alt, orta ve üst değer), üç orta değer tekrarlı BBD verileri ile 15 formülasyon oluşturulmuştur (Çizelge 3.8). Formülasyonlardaki her bir bileşen tartılmış ve homojen oluncaya kadar karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar 1:250

oranında su ile seyreltilmiş ve nanoemülsiyon oluşması sağlanmıştır. Nanoemülsiyonların damlacık büyüklüğü ve PDI değerleri Malvern Zetasizer Nano ZS ile ölçülmüştür.

Çizelge 3.8. Design Expert® programı tarafından oluşturan on beş formülasyon

Formülasyon	İmwitor® 988 (A)	Kolliphor® RH40 (B)	Labrasol® ALF (C)
1	8	64	17,2
2	20	64	17,2
3	8	73,6	17,2
4	20	73,6	17,2
5	8	68,8	16
6	20	68,8	16
7	8	68,8	18,4
8	20	68,8	18,4
9	14	64	16
10	14	73,6	16
11	14	64	18,4
12	14	73,6	18,4
13	14	68,8	17,2
14	14	68,8	17,2
15	14	68,8	17,2

Formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve PDI ölçüm sonuçları programa girilerek bağımsız değişkenler ve yanıtlar arasında matematiksel denklemler ve modeller elde edilmiştir.

BBD'de lineer, 2FI (two-factor interaction, ikili etkileşim), kuadratik (ikinci derece) modeller mevcuttur. Bağımsız değişkenler ve yanıtlar arasındaki ilişkinin belirtilen modellerden hangisine uyduğu incelenmiştir. Bu amaçla modele uyumun istatistiksel anlamlılığı R^2, varyans analizi (ANOVA) ve uyum eksikliği testi (lack of fit) ile değerlendirilmiştir.

Kuadratik modelde üç bağımsız değişkenin optimum değerini tahmin etmek için ikinci dereceden polinom denklem modeli kullanılmaktadır. BBD'de kullanılan genelleştirilmiş ikinci dereceden polinom modeli Eş. 3.3 kullanılarak ifade edilmektedir (Iqbal, Bakar, Toemen, Razak ve Azelee, 2020).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \qquad (3.3)$$

Y: Bağımlı değişken için tahmin edilen yanıt
i: 1, 2, 3
j: 1, 2, 3
β_0: Kesişim regresyon katsayısı
β_i: Doğrusal etki için regresyon katsayısı
β_{ii}: İkinci derece etki için regresyon katsayısı
β_{ij}: İki değişkenin etkileşimi için regrasyon katsayısı
X_i: Bağımsız değişken
X_j: Bağımsız değişken

Uygun model belirlendikten sonra bağımsız değişkenlerden hangilerinin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisinin anlamlı olduğunu belirlemek için Design Expert® programı tarafından yapılan ANOVA sonucu değerlendirilmiştir. ANOVA kaynak (varyasyonun kaynağı), serbestlik derecesi (degree of freedom, df), kareler toplamı (sum of squares, SS), kareler toplamının serbestlik derecesine bölümü olan kareler ortalaması (mean square, MS), F değeri ve p olasılık değerini içermektedir. Anlamlılık düzeyi $\alpha = 0,05$ kabul edilmiştir.

Optimum SEDDS formülasyon bileşimi Design Expert® programının sayısal optimizasyon özelliği kullanılarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler ve bağımlı değişkenler için hedef özellikler programa girilmiştir. Hedef özellikleri sağlayan bağımsız ve tahmin edilen bağımlı değişken sonuçları Design Expert® programı tarafından çözüm olarak listelenmiştir. Çözümlere ait arzedilebilirlik değeri (istenilen hedefe ulaşma) ve S_{mix} oranına bakılarak, bağımsız değişken miktarları seçilmiştir. Bu miktarlarda hazırlanan SEDDS formülasyonu kesinleştirilmemiş optimum formülasyon olarak tanımlanmıştır. Bu formülasyona ait tahmin edilen damlacık boyutu ve PDI değerlerinin %95 güven aralıkları belirlenmiştir. Kesinleştirilmemiş optimum formülasyon hazırlanarak deneysel olarak damlacık boyutu ve PDI ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonuçlarının %95 güven aralığı içerisinde olması durumu incelenerek optimum bileşim kesinleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında EKM yüklü SEDDS formülasyonu geliştirmeye ek olarak in vitro, ex-vivo ve in situ çalışmalarla uzun ve orta zincirli yağ fazı içeren SEDD sistemleri, yüksek ve düşük oranda yağ içeren formülasyonları karşılaştırmak,

kosürfaktan yerine kosolvan kullanımını, kosolvan miktarını ve sindirilebilir sürfaktan etkisini incelemek de amaçlanmıştır. BBD ile belirlenen optimum SEDDS formülasyon bileşiminden yola çıkarak üç farklı formülasyon daha geliştirilmiştir. Bu formülasyonlara ek olarak, araştırma grubumuzda yürütülen doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen SEDDS formülasyonu da kullanılmıştır (Yılmaz-Usta, 2022). Bu formülasyon uzun zincirli yağ ve yüksek konsantrasyonda sürfaktan içermektedir. Uzun zincirli yağ ve sürfaktan miktarının formülasyon lipolizi ve EKM permeabilitesine etkisini incelemek için kullanılmıştır. Formülasyonlara ait yardımcı maddeler ve formülasyonların geliştirilme amaçları Çizelge 3.9'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Geliştirilen SEDDS formülasyonların bileşenleri

Formülasyon	Yağ	Miktar (%)	Sürfaktan	Miktar (%)	Kosürfaktan/kosolvan	Miktar (%)	S_{mix}
F1[a]	İmwitor® 988	14	Kolliphor® RH40	68,8	Labrasol® ALF	17,2	4:1
F2[b]	İmwitor® 988	14	Kolliphor® RH40	68,8	Transcutol® HP	17,2	4:1
F3[c]	Maisine®	10,1	Kolliphor® RH40	80,9	Labrasol® ALF	8,9	9:1
F4[d]	İmwitor® 988	14	Tween® 80	68,8	Labrasol® ALF	17,2	4:1
F5[e]	İmwitor® 988	40	Kolliphor® RH40	30	Transcutol® HP	30	1:1

[a]: BBD kullanılarak geliştirilen formülasyon

[b]: Kosürfaktan yerine aynı miktarda kosolvan kullanımını incelemek için geliştirilen formülasyon

[c]: Araştırma grubumuzda yürütülen doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen SEDDS formülasyonu

[d]: Sindirilebilir sürfaktan kullanımını incelemek için geliştirilen formülasyon

[e]: Yüksek miktarda yağ ve kosolvan miktarını incelemek için geliştirilen formülasyon

SEDD sistemlerde eksemestan çözünürlüğünün saptanması

BBD ile elde edilen optimum F1 formülasyonu ve diğer formülasyonların ilaç yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Fazla miktarda EKM (75 mg) boş SEDDS formülasyonlarını (2 g) içeren cam flakona eklenmiş ve vortekslenmiştir. Karışımlar 3 dk ultrasonik su banyosunda sonikasyona tabi tutulduktan sonra 37 ± 0,5°C sıcaklıktaki su banyosunda 72 saat karıştırılmıştır. Karışım 15000 rpm, 37 ± 0,5°C'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatan, kalibrasyon doğrusunun konsantrasyon aralığı dikkate alınarak metanol ile seyreltilmiş ve vortekslenmiştir. Dilüsyonlar 0,45 µm membran filtreden süzüldükten sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre formülasyonlara yüklenecek EKM miktarına karar verilmiştir.

Eksemestan yüklü SEDDS hazırlanması

EKM yüklü SEDDS hazırlamak için belirlenen miktarda yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvan tartılmış ve homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Bu karışıma 15 mg/g olacak şekilde EKM ilave edilmiştir. Vorteks ve sonikasyon işlemlerinden hemen sonra karışımlar 37 ± 0,5°C'de 24 saat boyunca su banyosunda karıştırılmıştır.

3.2.4. Geliştirilen SEDD sistemlerde yapılan karakterizasyon çalışmaları

Damlacık boyutu ve PDI

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDD sistemler hafif karıştırma altında 1:250 oranında 25°C deiyonize su ile seyreltilerek emülsiyon damlacıkların oluşumu sağlanmıştır. Emülsiyonların damlacık boyutu ve PDI'sı, dinamik ışık saçılım yöntemine göre Malvern Zetasizer Nano ZS ile ölçülmüştür. Formülasyonların zeta potansiyel değeri kullanılan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvan yüküne bağlı olarak değişebilir. Geliştirilen formülasyonların büyük çoğunluğu noniyonik sürfaktandan oluştuğu için yapılan ön çalışmalarda zeta potansiyel değerinin sıfıra oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. SEED sistemin in vivo ortamda hızlıca emülfiye

olması ve emiliminin gerçekleşmesi nedeniyle zeta potansiyel değerlendirmesi yapılmamıştır (Yılmaz-Usta, 2022).

Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık

Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılığı değerlendirmek için etkin madde içermeyen ve EKM yüklü SEDDS, distile su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında 1:50, 1:100, 1:250 ve 1:500 oranında dilüe edilmiştir (Nasr ve diğerleri, 2016). pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarının içerikleri Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Oluşan damlacıkların boyutu ve PDI ölçümleri Malvern Zetasizer kullanılarak yapılmıştır. Ek olarak seyreltmeler etkin madde çökmesi, bulanma ve faz ayrışması gözlenmesine göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.10. pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları

pH 1,2 tamponu	
NaOH	2 g
Derişik HCl	7 mL
Distile su	ym 1000 mL
pH 6,8 tamponu	
KH_2PO_4 çözeltisi (0,2M)	250 mL
NaOH çözeltisi (0,2M)	112 mL
Distile su	ym 1000 mL

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği

SEDD sistemin disperse olabilme çalışması olarak da bilinen kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği için, etkin madde içermeyen ve EKM yüklü formülasyonlar hafif karıştırma altında 37°C distile suya 1:500 oranında ilave edilmiştir. Hafif karıştırma 50 rpm'de dönen manyetik karıştırıcı ile sağlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar emülsiyonun son görünümüne göre görsel olarak değerlendirilmiştir. Görsel değerlendirme için aşağıdaki sınıflandırma sistemi kullanılmıştır (Khoo, Humberstone, Porter, Edwards ve Charman, 1998):

- Sınıf A: Berrak veya mavimsi bir görünüme sahip olan ve 1 dakika içinde hızla oluşan emülsiyonlar.
- Sınıf B: Hızla oluşan, biraz daha az berrak veya mavimsi beyaz bir görünüme sahip emülsiyonlar

- Sınıf C: Homojen sütsü görünüşe sahip 2 dakika içinde oluşan emülsiyonlar
- Sınıf D: 2 dakikadan uzun emülsifikasyon süresi ve hafif yağlı görünüme sahip, donuk, grimsi beyaz renkteki emülsiyonlar
- Sınıf E: Zayıf veya minimum seviyede emülsifikasyona sergilemesi nedeniyle yüzeyinde büyük yağ damlacıkları bulunan formülasyonlar

Kendiliğinden emülsifikasyon zamanı

SEDD sistemlerde şeffaf homojen sistem elde edilinceye kadar geçen süre kendiliğinden emülsifikasyon zamanı olarak tanımlanmaktadır. Etkin madde içermeyen ve EKM yüklü formülasyonlar 50 rpm karıştırma hızında 37°C distile suya 1:250 oranında ilave edilmiştir. Emülsiyon oluşumu için geçen süre kronometre yardımı ile tespit edilmiştir (Basalious, Shawky ve Badr-Eldin, 2010).

%Transmittans

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği ile formülasyonların görsel değerlendirmesine ek olarak %Transmittans ölçümü yapılmıştır. SEDDS formülasyonları 50 rpm'de 37°C distile su ile 250 kat seyreltilmiştir. Oluşan sistemin %Transmittansı köre (distile su) karşı 650 nm dalga boyunda UV spektrofotometre ile ölçülmüştür (Yeom ve diğerleri, 2015).

Morfoloji

Distile su ile 1:250 oranında seyreltilmiş 10 µL formülasyon ve 10 µL %1 a/h fosfotungstik asit çözeltisi 25°C'de 5 dakika bakır grid üzerine bırakılmış ve en az 5 dakika boyunca kurutulmuştur. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının morfolojisi FEI, Tecnai, G2 Spirit transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntülerdeki emülsiyon damlacıklarının boyutları ImageJ® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Malvern Zeta Sizer damlacık boyutu ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Viskozite

SEDDS formülasyonların viskozite ölçümleri Brookfield DV3 rotasyonel dönen mil viskozimetresi kullanarak 25°C'de artan kayma hızlarında yapılmıştır. Cihazın yazılım programı Rheocalc V2.4 ile kayma hızına karşı kayma gerilimi grafikleri çizilmiştir (Çelik-Tekeli, 2020). Grafiklerin eğiminden viskozite değerleri mPa.s (centiPoise) olarak hesaplanmıştır. Ölçüm için su ile seyretilmemiş 0,5 mL SEDD sistem ve spindle CPE-52 kullanılmıştır.

FT-IR analizi

Saf EKM'nin, formülasyonda kullanılan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan/kosolvanın, etkin madde içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonların FT-IR analizi elmas yüzeye damlatarak 4000-650 cm^{-1} aralığında Perkin Elmer Spectrum spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir (Bravo-Alfaro ve diğerleri, 2022).

Termodinamik stabilite çalışmaları

SEDD sistemlerin termodinamik stabilitesini araştırmak için EKM yüklü formülasyonlar üç döngü boyunca ısıtma-soğutma, santrifüj ve üç döngü boyunca donma-çözme işlemlerine maruz bırakılmıştır.

Isıtma-soğutma döngüsü için formülasyonlar her sıcaklıkta 48 saat olmak üzere 4°C ve 45°C sıcaklıklara 3 döngü olarak maruz bırakılmıştır. Isıtma-soğutma döngüsünden geçen formülasyonlar 3500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Donma-çözme döngüsü için formülasyonlar her sıcaklıkta 48 saat olmak üzere -20°C ve 25°C sıcaklıklara 3 döngü olarak maruz bırakılmıştır (Reddy ve Gubbiyappa, 2022).

Formülasyonlar ısıtma-soğutma döngüsü, santrifüj ve donma-çözme döngüsü sonunda faz ayrımı ve ilaç çökmesi gibi görsel olarak, damlacık boyutu ve PDI açısından değerlendirilmiştir. Damlacık boyutu ve PDI ölçümleri Bölüm 3.2.4. Damlacık boyutu ve PDI ara başlığında anlatıldığı şekilde 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Uzun dönem stabilite çalışmaları

EKM yüklü SEDDS formülasyonları 5 ± 3°C/ortam nemi, 25 ± 2°C/%60 ± 5 bağıl nem (BN) ve 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN olmak üzere 3 farklı koşulda 12 ay saklanarak kimyasal ve fiziksel stabilite açısından değerlendirilmiştir. Başlangıç ve saklama süresi boyunca 1, 3, 6 ve 12. ayda görünüş, etkin madde miktar tayini, damlacık boyutu ve PDI açısından incelenmiştir. Damlacık boyutu ve PDI ölçümleri Bölüm 3.2.4. Damlacık boyutu ve PDI ara başlığında anlatıldığı şekilde 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Etkin madde miktar tayini için 3 farklı saklama koşulunda bulunan SEDDS formülasyonlarından 100 µL örnek alınarak tartılmıştır. Örnekler kalibrasyon aralığına göre metanol ile seyreltmiş ve vortekslenmiştir. Hazırlanan örnekler 0,45 µm membran filtreden viallere süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir. Etkin madde miktar tayini çalışması 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. İn vitro çözünme hızı çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları referans tablet (Aromasin® 25 mg kaplı tablet), bileşimleri Çizelge 3.9'da sunulan F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları ile EKM için FDA çözünme hızı veri tabanında önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi (sepet yöntemi) ve koşullarında, %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında Agilent 708-DS çözünme hızı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme hızı yöntemi ve koşulları Çizelge 3.11'de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. İn vitro çözünme hızı yöntemi

Yöntem	USP Cihaz I (Sepet yöntemi)
Hız	100 rpm
Çözünme ortamı	%0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF, FeSSIF
Ortam hacmi	900 mL
Örnek alma noktaları	5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dk
Sıcaklık	37 ± 0,5°C
Analiz yöntemi	HPLC
Dalga boyu	250 nm
Tablet - kapsül sayısı	3

Biyouyumlu ortamların hazırlanması üretici firma Biorelevant'ın talimatları doğrultusunda yapılmıştır (Biorelevant, 2023). Çözünme hızı çalışmasında kullanılan ortamlar ve hazırlama koşulları Çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. Çözünme hızı çalışmasında kullanılan ortamlar ve hazırlanışları

Ortam ve içeriği		**Hazırlanış**
%0,5 SLS çözeltisi		Gerekli miktar SLS 1000 mL distile su içerisinde çözününceye kadar karıştırılmıştır.
SLS	5 g	
Distile su	ym 1000 mL	
FaSSIF		Sodyum hidroksit, sodyum fosfat monobazik dihidrat, sodyum klorür gerekli miktarda tartılmış ve 900 mL distile su içerisinde çözünmüştür. Bu çözeltinin pH'ı ölçülerek gerekli ise 1 M sodyum hidroksit veya 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlanmıştır. Tampon hacmi 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. SIF tozundan gerekli miktar tartılarak FaSSIF tamponunda çözünmüştür. İki saat bekleme süresinden sonra kullanılmıştır.
NaOH	0,42 g	
$NaH_2PO_4.2H_2O$	2,47 g	
NaCl	6,19 g	
SIF tozu	2,24 g	
Distile su	ym 1000 mL	
FeSSIF		Sodyum hidroksit, glasiyel asetik asit, sodyum klorür gerekli miktarda tartılmış ve 900 mL distile su içerisinde çözünmüştür. Bu çözeltinin pH'ı ölçülerek gerekli ise 1 M sodyum hidroksit veya 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH 5'e ayarlanmıştır. Tampon hacmi 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. SIF tozundan gerekli miktar tartılarak FeSSIF tamponunda çözünmüştür. İki saat bekleme süresinden sonra kullanılmıştır.
NaOH	4,04 g	
Glasiyel CH_3COOH	8,65 g	
NaCl	11,87 g	
SIF tozu	11,2 g	
Distile su	ym 1000 mL	

Çözünme hızı ortamları cihaza ait cam kaplara doldurulmuş ve 37 ± 0,5°C sıcaklığa cihaz tarafından ısıtılmıştır. F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları 1 g tartılarak 00el sert jelatin kapsüllere (Capsugel®) mikropipet yardımıyla konulmuştur. Referans tablet ve kapsüller sepetlere yerleştirilmiş ve sepetler cam kabın tabanından 2,5 cm yüksekte olacak şekilde ayarlanarak çalışma başlatılmıştır. Çalışma süresince 5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda çözünme ortamından 5 mL örnek 0,45 µm membran filtreden viallere süzülerek alınmıştır. Alınan her örnek için 5 mL çalışılan çözünme ortamı ilave edilmiştir. Örnekler Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak HPLC'de analiz edilmiştir. Zamana karşı %kümülatif çözünen EKM miktarı grafiklenmiştir.

Geliştirilen formülasyonların referans tablet ile çözünme hızı profillerinin benzerliği benzerlik etkeni (f_2 testi) kullanılarak değerlendirilmiştir. Benzerlik etkeni aşağıda verilen Eş. 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$f_2 = 50.\log\frac{100}{\sqrt{1+(\frac{1}{n}\sum_{t=1}^{n}(R_t - T_t)^2)}} \quad (3.4)$$

R_t: Referans ürün için %çözünen EKM

T_t: Geliştirilen formülasyon için %çözünen EKM

n: Örnek alma zaman noktası sayısı (n=7)

3.2.6. İn vitro lipoliz çalışmaları

İn vitro lipoliz çalışması termostatlı bir cam deney haznesi, karıştırıcı, pH elektrodu ile donatılmış ve Tiamo V2 yazılımı ile kontrol edilen pH-stat ototitratör Titrando 902, Metrohm® cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İn vitro lipoliz çalışması ile referans tablet, içerikleri Çizelge 3.9'da verilen F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonlarının sindirimi incelenmiştir. İn vitro lipoliz çalışmasına ait koşullar Çizelge 3.13'te sunulmuştur.

Çizelge 3.13. İn vitro lipoliz çalışma koşulları

Yöntem	pH-stat lipoliz yöntemi
Hız	100 rpm
Ortam	Lipoliz ortamı
Ortam hacmi	40 mL
Örnek alma noktaları	0, 15, 30, 45, 60 ve 90. dk
Sıcaklık	37 ± 0,5°C
Analiz yöntemi	HPLC
Dalga boyu	250 nm

Lipoliz ortamı, SIF tozunun 3 mM sodyum taurokolat ve 0,75 mM fosfolipit içerecek şekilde lipoliz tamponu içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır (Yılmaz-Usta ve diğerleri, 2022). Lipoliz ortam bileşimi Çizelge 3.14'te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Lipoliz ortamı bileşenleri

Lipoliz ortamı		Hazırlanış
NaOH	10,5 mM	Sodyum hidroksit, sodyum fosfat monobazik dihidrat, sodyum klorür ve kalsiyum klorür dihidrat gerekli miktarda tartılmış ve hazırlanmak istenen hacimdeki distile suyun bir kısmında çözünmüştür. Bu çözeltinin pH'ı ölçülerek gerekli ise 1 M sodyum hidroksit veya 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlanmıştır. Lipoliz tamponu distile su ile istenen hacme tamamlanmıştır. SIF tozundan gerekli miktar tartılarak lipoliz tamponunda çözünmüştür. İki saat bekleme süresinden sonra kullanılmıştır.
$NaH_2PO_4.2H_2O$	29 mM	
NaCl	106 mM	
$CaCl_2.2H_2O$	1,4 mM	
Sodyum taurokolat	3 mM	
Fosfolipit	0,75 mM	
pH	6,5	

Pankreatik lipaz için domuz pankreasından elde edilen pankreatin, denatürasyonu engellemek adına deneyden hemen önce 800 USP/mL aktiviteye sahip olacak şekilde hazırlanmıştır (Christophersen ve diğerleri, 2014). Pankreatinden 2 gram tartılarak 6 mL SIF tozu içermeyen lipoliz tamponunda süspande edilmiştir. Süspande karışım 4°C sıcaklık 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Lipoliz çalışmasında kullanmak üzere süpernatandan 4 mL alınmıştır.

36 mL lipoliz ortamı cihaza ait cam deney haznesine doldurulmuş ve cihaz tarafından 37 ± 0,5°C sıcaklığa ısıtılmıştır. 15 mg EKM içeren 1 g F1, F2, F3, F4, F5 formülasyonları ve referans tablet lipoliz ortamına ilave edilmiş ve 15 dakika boyunca disperse edilmiştir. Lipoliz ortamına 4 mL pankreatin çözeltisi eklenerek lipoliz başlatılmıştır. Formülasyonun lipolizi sonucu açığa çıkan yağ asitleri ototitratör tarafından 0,4 M NaOH ile otomatik titre edilerek ortam pH'ı 6,5'te tutulmuştur. Harcanan NaOH miktarı kaydedilmiş ve lipoliz oranının hesaplanmasında kullanılmıştır. Lipoliz oranı aşağıda verilen Eş. 3.5'e göre hesaplanmıştır.

$$Lipoliz\ oranı\ (\%) = \frac{V_{NaOH}\ x\ M_{NaOH}}{Formülasyondaki\ teorik\ yağ\ asidi} \qquad (3.5)$$

V_{NaOH}: Lipoliz boyunca harcanan NaOH hacmi (mL)
M_{NaOH}: Kullanılan NaOH molaritesi

Formülasyondaki teorik yağ asidi, kullanılan yardımcı maddeye ait teknik veri dosyasında belirtilen ortalama sabunlaşma değeri kullanılarak hesaplanmıştır (Arnold, Imanidis ve Kuentz, 2012).

Lipoliz ortamından 0. dakikada (lipoliz başlangıcından hemen önce), 15, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda 1 mL örnek alınmıştır. Örneklere 10 µL enzim inhibitörü olan 1 M 4-bromobenzilboronik asit (4-BPB) eklenerek ileri lipoliz engellenmiştir (William ve diğerleri, 2012a). 1 M 4-BPB çözeltisi 0,5 g 4-BPB'nin 5 mL metanol içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Örnekler, formülasyon sindirimi sırasında oluşan fazların analizi (sulu faz ve pellet faz) ve ilaç geri kazanımının incelenmesi için kullanılmıştır. Alınan örneklerin hazırlanması ve analizi 'Faz dağılımı ve örnek analizi' ara başlığında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Lipoliz ortamındaki sodyum taurokolat ve fosfolipitten kaynaklanan arka plan lipolitik aktiviteyi belirlemek için formülasyon olmadan in vitro lipoliz çalışması yürütülmüştür (Christophersen ve diğerleri, 2014). Tüm çalışmalar 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Faz dağılımı ve örnek analizi

İleri lipolizi inhibe edilmiş örnekler 15000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu örnek üstte kalan sulu faz (AP) ve çöken pellet faza (PP) ayrılmıştır. AP başka bir eppendorf tüpte toplanarak PP'den uzaklaştırılmıştır. AP kalibrasyon aralığına göre asetonitril ile seyretlmiş ve vorteklenmiştir. Dilüe AP tekrar 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve ardından 0,45 µm membran filtreden viallere süzülmüştür. AP'deki EKM miktarı Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak HPLC'de analiz edilmiştir. Zamana karşı sulu faz %EKM miktarı ve lipoliz sonunda sulu faz EKM miktarı grafiklenmiştir.

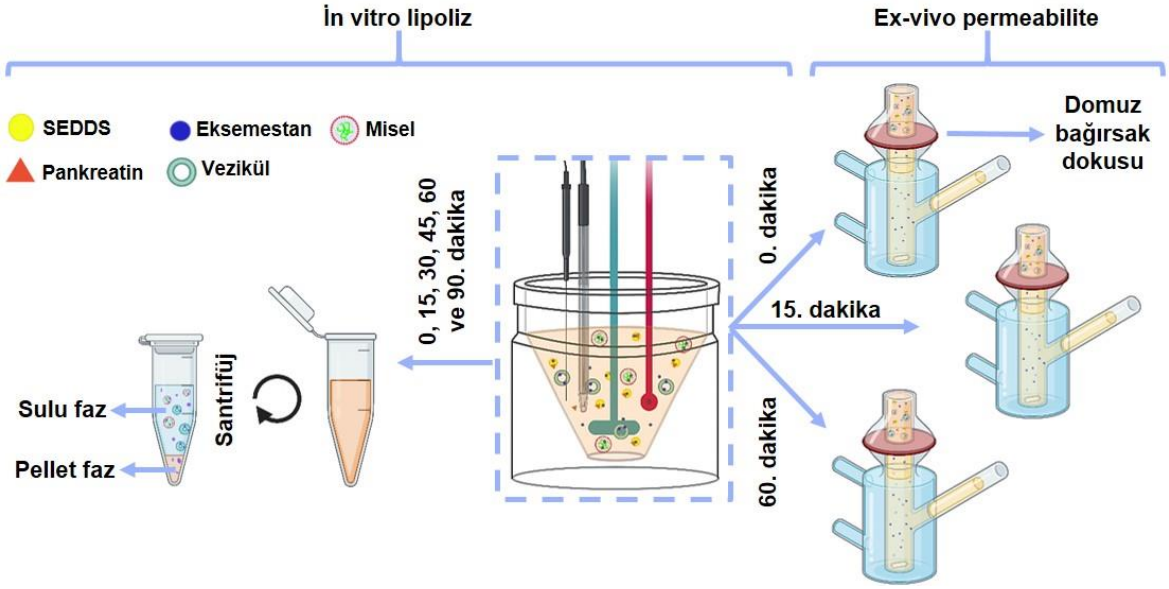
AP'nin eppendorf tüpten uzaklaştırılması PP'deki EKM miktarının analizi için önemlidir. AP dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan PP'ye 1,4 mL asetonitril eklenmiştir. PP'de çökmüş halde bulunan EKM'i tam olarak çözmek için tüp vortekslenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. EKM hariç çözünmeyen maddeleri uzaklaştırmak için 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatan 0,45 µm membran filtreden viallere süzülmüş ve HPLC ile Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak analiz edilmiştir. SEDDS formülasyonları için lipoliz sonunda pellet faz %EKM miktarı grafiklenmiştir.

3.2.7. Ex-vivo permeabilite çalışması

İn vitro lipoliz çalışmasında absorpsiyon basamağı bulunmamaktadır. Yapılan son çalışmalar permeabilite adımı ile birleştirilen lipoliz çalışmalarının LTF'lerin geliştirilmesi ve absorpsiyon tahmini için daha tutarlı veriler sağlayan sistemler olduğunu göstermiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının, permeabilite adımı içeren lipoliz düzeneğinde incelenmesi için in vitro lipoliz çalışması, ex-vivo permeabilite yöntemiyle birleştirilmiştir (Timur ve diğerleri, 2022).

İn vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışması, in vitro lipoliz adımı ve franz hücresinin kullanıldığı permeabilite adımı olarak iki basamaktan oluşmaktadır. Modelin şematik gösterimi Şekil 3.1'de sunulmuştur.

İn vitro lipoliz basamağı Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Birleşik in vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışması ile referens tablet, bileşimleri Çizelge 3.9'da sunulan F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları incelenmiştir. Birleşik in vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışmasına ait koşullar Çizelge 3.15'te sunulmuştur.



Şekil 3.1. İn vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışmasının şematik gösterimi

Çizelge 3.15. İn vitro lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışma koşulları

Yöntem	Franz difüzyon hücresi, domuz bağırsağı
Verici hücre ortamı	0. dk, 15. dk ve 60. dk 750 µL lipoliz ortamı
Alıcı hücre ortamı	%0,5 SLS içeren pH 7,4 PBS tamponu
Ortam hacmi	2,5 mL
Örnek alma noktaları	0, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600 ve 1440. dk
Sıcaklık	37 ± 0,5°C
Analiz yöntemi	HPLC
Dalga boyu	250 nm
Franz hücresi sayısı	3

Ex-vivo permeabilite adımında alıcı hücre ortamı olarak in vivo ortama benzerliği sağlamak için 290 ± 5 mOsmol/L sahip %0,5 SLS içeren pH 7,4 PBS tamponu (16,8 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4, 95,8 mM NaCl) kullanılmıştır. Ek olarak alıcı hücre ortamı osmolaritesi ozmozun neden olduğu su transportunu önlemek için 290 ± 5 mOsmol/L olarak ayarlanmıştır (Klitgaard ve diğerleri, 2021). pH 7,4 fosfat tamponunda EKM'nin çözünürlüğü 73 µg/mL olarak belirtilmiştir (FDA, 1999(b)). EKM'nin düşük çözünürlüğü nedeniyle sink koşul sağlamak için alıcı hücre ortamına %0,5 SLS eklenmiştir (Sawant, Pandey ve Patel, 2016). Alıcı hücre ortamı ve hazırlanışı Çizelge 3.16'da sunulmuştur.

Çizelge 3.16. Alıcı hücre ortamı ve hazırlanışı

Alıcı hücre ortamı		**Hazırlanış**
Na_2HPO_4	2,38 g	Sodyum fosfat dibazik, potasyum fosfat monobazik ve sodyum klorür gerekli miktarda tartılmış ve 450 mL distile su içerisinde çözünmüştür. SLS gerekli miktarda tartılmış ve 450 mL distile su içerisinde çözünmüştür. İki çözelti karıştırıldıktan sonra 2 M HCl ile pH 7,4'e ayarlanmıştır. Çözelti distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
KH_2PO_4	0,19 g	
NaCl	5,6 g	
SLS	5 g	
Distile su	ym 1000 mL	
pH	7,4	
Osmolarite	290 ± 5 mOsmol/L	

Alıcı hücre ortamında EKM çözünürlüğünün belirlenmesi

Ex-vivo permeabilite adımında sink koşul sağlandığından emin olmak ve verici hücreye eklenecek lipoliz ortamı miktarını belirlemek için çalışmaya başlamadan önce alıcı hücre ortamında çözünürlük çalışması yapılmıştır.

Flakon içinde bulunan %0,5 SLS içeren pH 7,4 PBS tamponuna fazla miktarda EKM ilave edilmiştir. Vortekslendikten ve sonikasyona tabi tutulduktan sonra flakon, 37 ± 0,5°C'de 72 saat karıştırılmıştır. 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek elde edilen süpernatan 0,45 µm membran filtreden viallere süzülmüş ve HPLC ile Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Ex-vivo permeabilite adımı

Permeabilite basamağı, 37 ± 0,5°C'de 1 cm^2 difüzyon kesit alanına sahip Franz difüzyon hücresi kullanılarak 24 saat süresince yürütülmüştür. Çalışma, domuz bağırsak dokusu ile gerçekleştirilmiştir. Ön çalışmalarda pankreatinin keçi bağırsağı dokusunu parçalaması nedeniyle domuz bağırsak dokusu kullanılmıştır. Domuz bağırsak dokusu kesimhaneden alınmış, temizlenerek kullanılmıştır. Alıcı hücre ile verici hücre arasına domuz bağırsak dokusu yerleştirilmiş ve sabitlenmiştir. 2,5 mL hacme sahip alıcı hücre bölmesi %0,5 SLS içeren pH 7,4 PBS tamponu ile doldurulmuştur. 0. dakika, 15. dakika ve 60. dakikada lipoliz ortamından alınarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş 1 mL örneğin 750 µL hacimdeki fraksiyonu verici hücre bölmesine eklenmiştir. Örneklerin verici hücre bölmesine eklenmesi çalışmanın başlangıcı olarak kabul edilmiştir. 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600 ve 1440. dakikalarda sürekli karıştırılan alıcı hücre bölmesinden 2,5 mL örnek alınıp hücreye aynı hacimde taze ortam eklenmiştir. Örnekler 0,45 µm membran filtre ile süzüldükten sonra Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak HPLC ile analiz edilmiştir. Zamana karşı alıcı hücreye difüze olan %EKM miktarı grafiklenmiştir. Her bir örnek için çizilen grafiğin AUC değeri GraphPad Prism V8 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Klitgaard ve diğerleri, 2021).

Verici hücreye eklenen EKM miktarının belirlenmesi

Lipoliz başlamadan hemen önce, 15. dakika ve 60. dakikada lipoliz ortamından alınarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş 1 mL örneğin 750 µL hacimdeki fraksiyonu franz difüzyon hücresine eklenmiş 50 µL hacimdeki fraksiyonu ise verici hücreye eklenen EKM miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Alınan örneğin 50 µL fraksiyonuna 1 mL asetonitril eklenmiştir. EKM'nin asetonitrile ekstraksiyonu için tüp vortekslenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatan 0,45 µm membran filtreden viallere süzülmüş ve HPLC ile Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.1'de sunulan koşullar kullanılarak analiz edilmiştir.

Akı (J) ve görünür permeabilite katsayısının (P_{app}) hesaplanması

Birim zamanda birim alandan geçen EKM miktarı olan akı (J, $\mu g.cm^{-2}.s^{-1}$) aşağıdaki Eş. 3.6'ya göre zamana karşı alıcı hücreye nüfuz eden EKM miktarı grafiğinde doğrusal kısmın eğiminden hesaplanmıştır.

$$J = \frac{dQ}{A\,.\,dt} \tag{3.6}$$

Q: Bağırsaktan difüze olan EKM miktarı (µg)
A: Difüzyonun gerçekleştiği yüzey alanı (cm^2)
t: Zaman (saat)

Görünür permeabilite katsayısı (P_{app}, $cm.s^{-1}$), akının, verici hücre bölmesine eklenen başlangıç EKM konsantrasyonuna bölünmesiyle hesaplanmıştır. P_{app} için, yalnızca sulu faz EKM konsantrasyonu değil, pellet faz dahil tüm fazlarda bulunan EKM konsantrasyonu hesaplamaya dahil edilmiştir (Tanaka ve diğerleri, 2021). P_{app} aşağıdaki Eş. 3.7 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$P_{app} = \frac{J}{Verici\ hücre\ başlangıç\ EKM\ konsantrasyonu} \tag{3.7}$$

3.2.8. Hücre kültürü çalışmaları

Tez çalışması kapsamında geliştirilen EKM yüklü SEDD sistemlerin insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki antiproliferatif etkinliği in vitro hücre kültürü çalışması ile değerlendirilmiştir. MCF-7 hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (American Tissue Culture Collection, ATCC) temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Aşı Enstitüsü Ar-Ge Laboratuvarı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

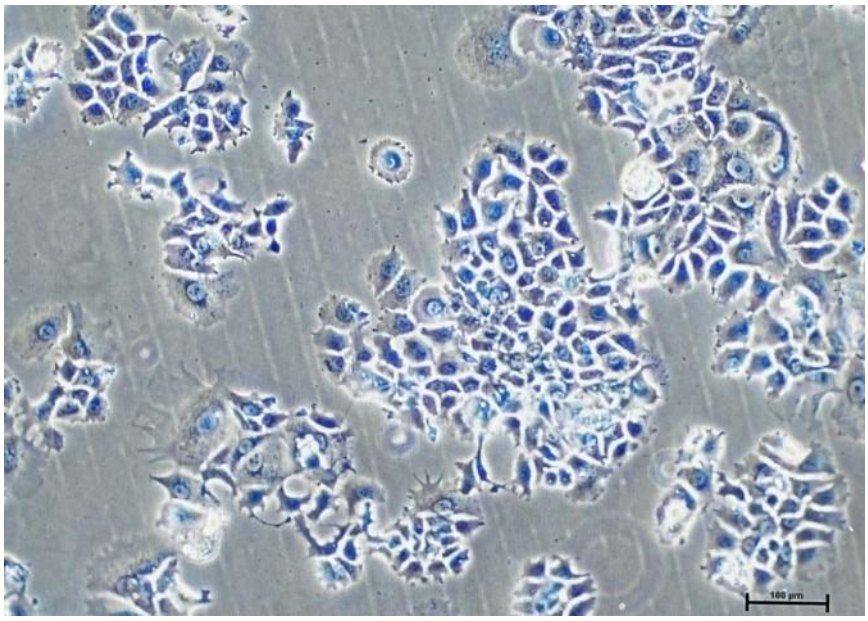
EKM yüklü SNEDDS formülasyonlarının ve EKM'nin MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliği, 2 farklı konsantrasyon ve 2 farklı inkübasyon süresinde karşılaştırmalı olarak 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) kullanılarak kolorimetrik olarak belirlenmiştir (Hernandez-Juarez ve diğerleri, 2023). WST-1, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) gibi tetrazolyum tuzudur. MTT ve WST-1 gibi boyaların kullanıldığı kolorimetrik yöntemler canlı hücrelerin seçici olarak boyanması ve bunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017). WST-1 yönteminin kullanıldığı hücre kültürü çalışmaları 5 aşamada gerçekleştirilmiştir.

- MCF-7 hücrelerinin 25 cm^2 ve ardından 75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılması
- Çoğalan hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi ve inkübe edilmesi
- EKM için yarı inhibisyonu konsantrasyonunun (IC_{50}) belirlenmesi
- F1, F2 F3, F4, F5 ve EKM çözeltisinin IC_{50} değerinde MCF-7 hücrelerine uygulanması
- Hücre canlılığının WST-1 yöntemi ile kolorimetrik olarak belirlenmesi

<u>MCF-7 hücrelerinin flaskta çoğaltılması ve 96 kuyucuklu plakaya ekimi</u>

MCF-7 hücreleri çoğalmaları için besiyeri içeren 25 cm^2 alana sahip flaska eklenerek 37°C'de %5 CO_2'li etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Besiyeri olarak hücrelerin gelişimi için gerekli olan aminoasitleri barındıran %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) ve kontaminasyonu önlemek için %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri (DMEM) kullanılmıştır.

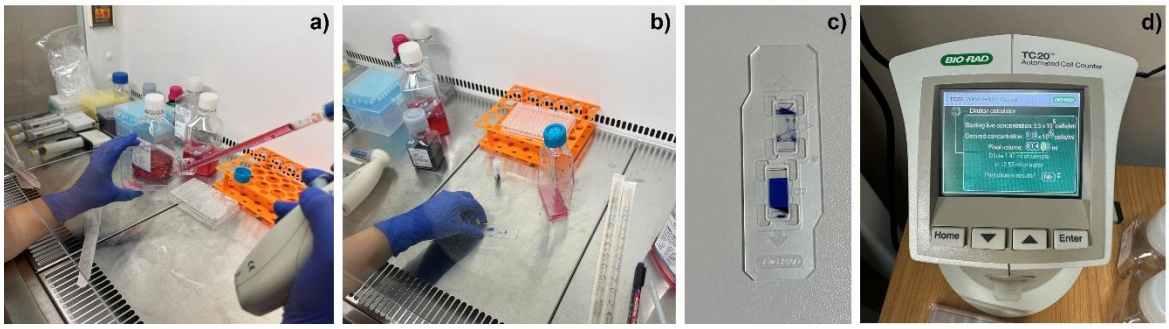
Yeterli sayıda hücre çoğaldığında hücresel atıkları ve tutunmayan hücreleri içeren flasktaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler mikroskop ile incelenmiştir (Resim 3.1). Yüzeyde tutunan hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır.



Resim 3.1. MCF-7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü

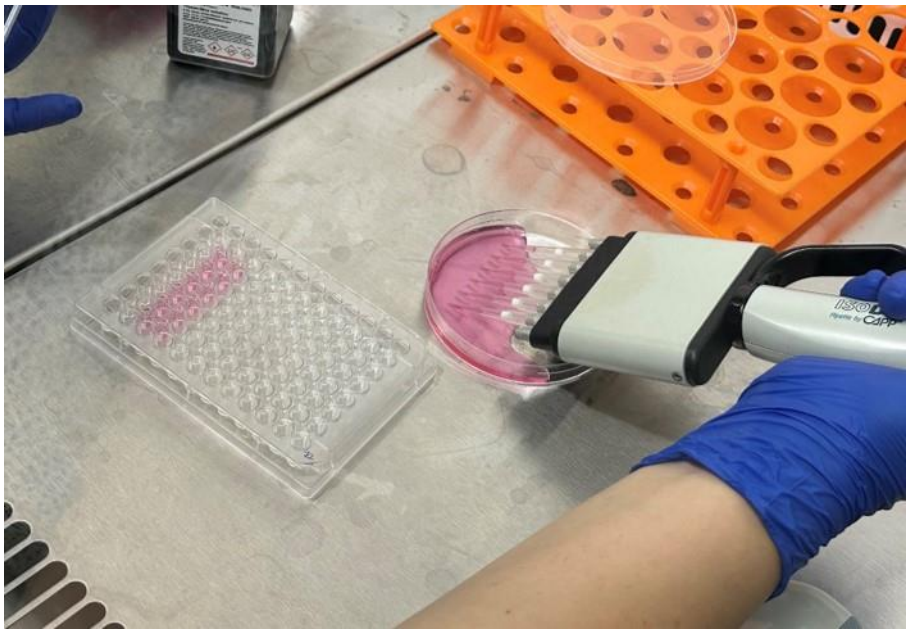
Tripsinizasyon işlemi uygulanarak hücreler tutunduğu yüzeyden enzimatik olarak kaldırılmıştır. Tripsinizasyon için flask içerisine 1 mL tripsin-EDTA ilave edilmiş ve flask 37°C'deki inkübatörde 2 dakika bekletilmiştir. Tripsin hacminin en az 2 katı kadar FBS içeren besiyeri flaska ilave edilerek tripsin aktivitesi inhibe edilmiştir. İçerik 75 cm^2 alana sahip flaska alınmış ve besiyeri ilavesi yapılmıştır (Resim 3.2). Hücrelerin çoğalıp tutunması sağlanmıştır. Yeterli sayıda hücre çoğalmasını takiben PBS ile yıkama ve tripsinizasyon işlemi tekrarlanmıştır.

75 cm^2'lik flasktaki hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi canlı hücre membranından geçemeyen, ölü hücre membranından geçerek maviye boyayan bir boyadır. Boyama sonrası canlı hücreler şeffaf halde görünmektedir. Tripan mavisi ve 75 cm^2 flasktaki hücreler 1:1 oranında karıştırılmış ve karışım hücre sayım plakasına tamamen dolacak şekilde eklenmiştir. Plaka, Bio-Rad TC20™ hücre sayım cihazına yerleştirilmiş ve mL'deki hücre sayısı cihazdan okunmuştur (Resim 3.2).



Resim 3.2. Hücre kültürü çalışmaları a) 75 cm^2'lik flaska besiyeri ilavesi b) Hücre sayım plakasına dolum yapılması c) Hücre sayım plakası d) Hücre sayımının yapılması.

Hesaplama yapılarak 75 cm^2 flasktan kaç mL hücre alınması ve DMEM besiyeri ile kaç mL hacme tamamlanması gerektiği bulunmuştur. Hazırlanan stok hücre çözeltisinden 100 µL alınarak, MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 10^4 hücre/100 µL olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.3).



Resim 3.3. MCF-7 hücrelerinin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi

<u>IC_{50} değerinin belirlenmesi</u>

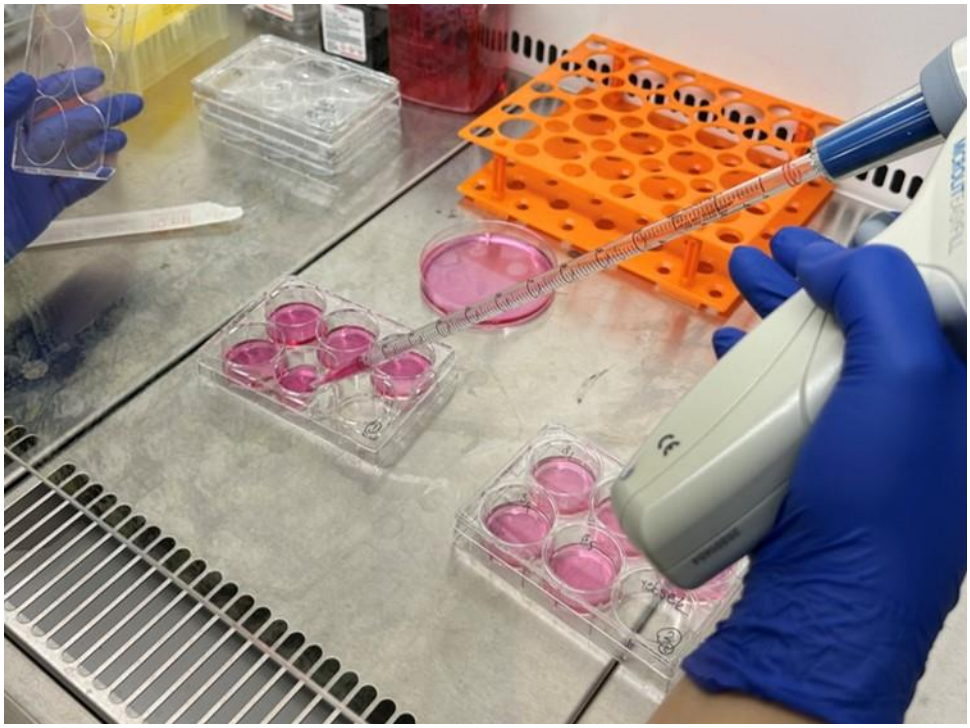
IC_{50} değerinin belirlenmesi için çalışmalara devam edilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plakaya 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,3 µM, 15,6 µM ve 7,80 µM olacak şekilde 8 farklı konsantrasyonda EKM

çözeltisi ve kontrol olarak DMEM-etanol (5000:1) ve DMEM eklenmiştir (n=6). IC_{50} değeri için iki farklı inkübasyon süresi (48 saat ve 72 saat) çalışılmıştır.

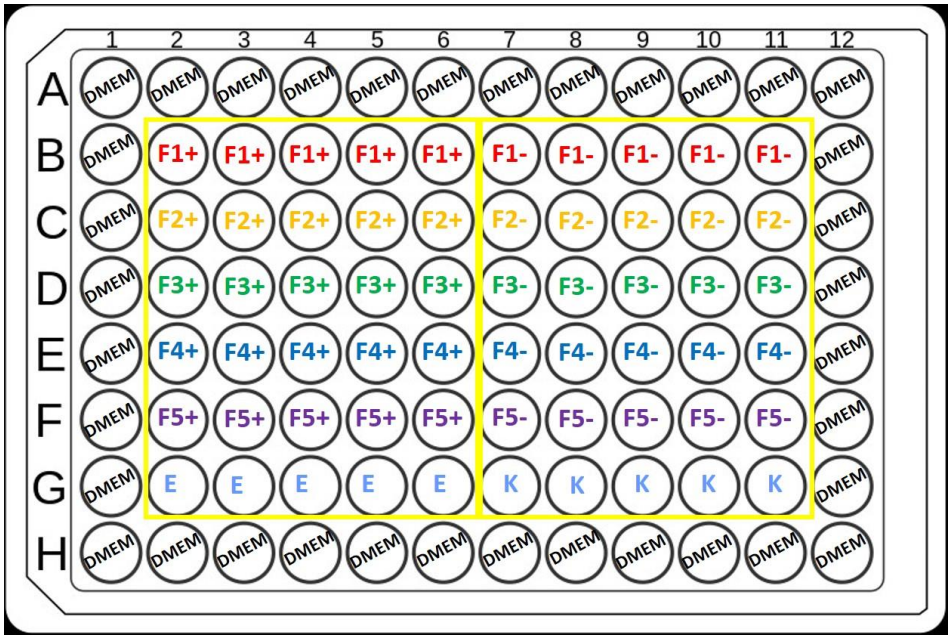
48 ve 72 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığını belirlemek için WST-1 boyası, DMEM ile 1:9 oranında seyreltilerek öncesinde ilaç içeren besiyeri uzaklaştırılmış kuyucuklara 100 µL hacimde uygulanmıştır. Bu işlem boyanın ışıktan etkilenmesi nedeniyle karanlıkta yapılmıştır. Plakalar 4 saat inkübe edilmiştir. Plakaların absorbansı 450 nm'de SpectraMax® iD3 plaka okuyucu cihaz ile okunmuştur. Kontrol grubuna karşı %hücre canlılığı ve GraphPad Prism V8 kullanılarak 2 farklı inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Hücre canlılığının WST-1 yöntemi ile kolorimetrik olarak belirlenmesi

Bileşimleri Çizelge 3.9'da verilen F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları 1:250 distile su ile seyreltilerek nanoemülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Nanoemülsiyonlar DMEM ile seyreltilerek IC_{50} konsantrasyonlarında (38,5 µM ve 58 µM) EKM içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Seyreltme işlemi 6 kuyucuklu plakada gerçekleştirilmiştir (Resim 3.4). Ek olarak 38,5 µM ve 58 µM konsantrasyonda saf EKM çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı işlemler etkin madde içermeyen SEDD sistemler için tekrarlanmıştır. 2 farklı konsantrasyonda saf EKM çözeltisi, etkin madde içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonları 2 farklı 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir (n=5). Kontrol grubu olarak DMEM:etanol (5000:1) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaka şablonu Şekil 3.2'de sunulmuştur. Hücre canlılığını değerlendirmek için 48 ve 72 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi çalışılmıştır.



Resim 3.4. 6 kuyucuklu plakada seyreltme işlemi

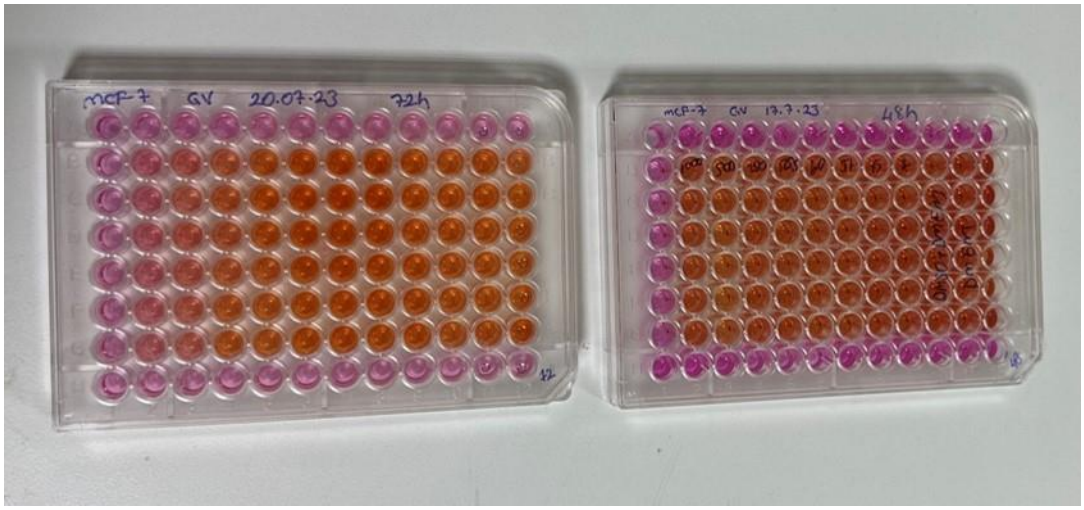


Şekil 3.2. 96 kuyucuklu plaka şablonu

48 ve 72 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığını belirlemek için WST-1 boyası, DMEM ile 1:9 oranında seyreltilerek besiyeri öncesinde uzaklaştırılmış kuyucuklara 100 µL hacimde uygulanmıştır. Bu işlem boyanın ışıktan etkilenmesi nedeniyle karanlıkta yapılmıştır.

Plakalar 4 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.5). Plakaların absorbansı 450 nm'de SpectraMax® iD3 plaka okuyucu cihaz ile okunmuştur. Kontrol grubuna karşı %hücre canlılığı 48 ve 72 saat inkübasyon süresi için 38,5 µM ve 58 µM EKM konsantrasyonunda hesaplanmış ve grafiklenmiştir. Hücre canlılığı aşağıda verilen Eş. 3.8 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Hücre\ canlılığı = \frac{SEDDS\ uygulanan\ hücrelerin\ absorbansı}{Kontrol\ grubunun\ absorbansı}\ x\ 100 \quad (3.8)$$



Resim 3.5. WST-1 boyası ile inkübe edilen plakalar

3.2.9. İn situ intestinal perfüzyon çalışması

İn vitro ve ex-vivo çalışmalardan elde edilen bulgulardan hareketle F1 ve F5 SEDDS formülasyonu seçilerek perfüzyon çalışmasına başlanmıştır. F1 formülasyonu düşük lipoliz oranı ve sulu fazda yüksek EKM miktarı sağlarken, F5 formülasyonu yüksek lipoliz oranı ve sulu fazda düşük EKM miktarına sahiptir. Lipoliz oranı ve sulu fazda çözünmüş halde bulunan EKM miktarı farklılıklarına rağmen ex-vivo permeabilite çalışmasında iki formülasyon için %difüze olan EKM miktarları benzer bulunmuştur. Lipoliz çalışmasının sulu fazda çözünmüş halde bulunan EKM'nin absorbe edileceği hipotezine ters düşen bu durumun, birleştirilmiş in vitro lipoliz - in situ perfüzyon çalışması ile incelenmesi için, F1 ve F5 formülasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

İn situ intestinal perfüzyon deneyleri Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan 15.03.2023 tarih ve G.Ü.ET-23.027 sayılı (Evrak Tarih ve Sayısı 15.03.2023-E-66332047-604.01.02-612251) onay ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesi'nde (GÜEDAM) yapılmıştır (Bkz. EK1).

Deney hayvanı seçimi

Perfüzyon çalışması için literatür araştırmaları doğrultusunda çalışmalarda sıklıkla tercih edilmeleri ve büyüklüğünün uygun olması nedeniyle 200-320 g ağırlığında sağlıklı erkek Sprague-Dawley ırkı sıçanlar kullanılmıştır (Crum ve diğerleri, 2016; Suys ve diğerleri, 2021). Temin edildikten sonra çalışmalara başlamak için hayvanlar GÜEDAM'da bir hafta adaptasyon süreci geçirmiştir. Hayvanlar 12 saat gece/gündüz periyodunda, 21-24 ºC hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmiştir.

Perfüzyon çalışması EKM yüklü F1 ve F5 SEDDS formülasyonları, saf EKM ve ANT için dört çalışma grubu ve her bir çalışma grubunda 6 sıçan olacak şekilde toplam 4 grup ile planlanmıştır. Çalışma grupları Çizelge 3.17'de sunulmuştur. Çalışmanın örneklem büyüklüğü, deney gruplarında grup içi ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak %95'lik güven aralığında ($p<0,05$) değerlendirilebilmesi için perfüzyon çalışma gruplarındaki hayvan sayıları olası kayıplar da göz önünde bulundurularak n=6 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.17. Perfüzyon çalışması için uygulama grupları

Sıçan grupları	**Uygulama**	**Denek sayısı**
Grup 1	EKM yüklü F1	6
Grup 2	EKM yüklü F5	6
Grup 3	Saf EKM	6
Grup 4	Antipirin	6

Kullanılan kimyasal maddeler

Fenol kırmızısı

Perfüzyon sırasında mukozal bölgeden serozal bölgeye ya da serozal bölgeden mukozal bölgeye su geçişi nedeniyle efektif permeabilite katsayısının (P_{eff}) doğru bir şekilde hesaplanması için emilmeyen bir belirteç olarak 200 µg/mL konsantrasyonda fenol kırmızısı kullanılmıştır (Ateş, 2013; Patel ve Barve, 2012).

Antipirin

ANT BCS Sınıf I madde olup, yüksek çözünürlük ve permeabiliteye sahiptir. Oral uygulamayı takiben gastrointestinal sistemde hızla emildiği ve oral biyoyararlanımının %100'e çok yakın olduğu gösterilmiştir (Danhof, Van Zuilen, Boeijinga ve Breimer, 1982). Perfüzyon çalışmasında FK, ANT ve pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamı perfüzyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. SEDD sistemler ve in vitro lipoliz ortamı içeriğinin perfüzyonu sırasında; perfüze segmentin doku bütünlüğünün korunduğundan emin olmak, formülasyon karşılaştırmasına yardımcı olmak ve yöntemin uygunluğunu değerlendirmek için pasif permeabilite belirteci olarak 500 µg/mL konsantrasyonda ANT kullanılmıştır (Suys ve diğerleri, 2018).

Tubing çapının belirlenmesi

Perfüzyon çözeltisinin belirlenen segmentten peristaltik pompa yardımıyla 0,2 mL/dk hızda geçirilmesi planlanmıştır (Incecayir, Ilbasmis-Tamer, Tirnaksiz ve Degim, 2016). Ayrı rezervuarlardan gelen iki farklı perfüzyon çözeltisinin (formülasyon içeren lipoliz ortamı ve pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamı) kullanılması nedeniyle her bir tubing için 0,1 mL/dk akış hızının sağlanması gereklidir. Bu akış hızını sağlayan tubing çapı ve peristaltik pompa dakikada devir hızı (rpm) belirlenmiştir.

4 mm x 2 mm (iç çap x dış çap) ve 4 mm x 0,5 mm (iç çap x dış çap) iki farklı silikon tubing denenmiştir. Bu amaçla her iki tubing ile farklı rpm'lerde çalışılmıştır. Tubingin giriş ucu perfüzyon çözeltisinde çıkış ucu mezür içerisinde tutularak 10 mL perfüzyon çözeltisinin mezürde toplanması için geçen süre kronometre ile

belirlenmiştir. Aşağıda verilen Eş. 3.9 yardımıyla iki farklı tubing ve farklı rpm'ler için akış hızı belirlenmiştir. Akış hızının 0,1 mL/dk'ya en yakın olduğu rpm ve tubing boyutu perfüzyon çalışmasında kullanılmıştır.

$$Q = {}^{V}/_{t} \tag{3.9}$$

Q: Perfüzyon çözeltisinin akış hızı (mL/dk)
V: Çıkış tubinginden toplanan çözelti hacmi (mL)
t: Zaman (dk)

Tubing ile etkileşimin incelenmesi

Hayvan çalışmasına geçmeden önce EKM ile tubing etkileşimin varlığı incelenmiştir. Çalışmada kullanılan silikon tubing ile EKM'nin non-spesifik bağlanması bağırsak segmetine ulaşan ilaç miktarında ve daha önemlisi ilaç absorpsiyonu olarak yorumlanabilecek perfüzattaki ilaç konsantrasyonunda bir azalmaya neden olabilir (Stappaerts ve diğerleri, 2015). Bu amaçla belirli konsantrasyonda EKM içeren lipoliz ortamı peristaltik pompa aracılığıyla sabit hızda tubingden geçirilerek 60. dakikada örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler ACN ile 1:9 dilüe edilerek 0,22 µm PVDF membran filtreden viallere süzülmüştür. Lipoliz ortamı başlangıç EKM konsantrasyonu ve toplanan örnekler HPLC ile Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te sunulan koşullar kullanılarak analiz edilmiştir. Başlangıç ve çıkış tubinginden toplanan örneklerdeki EKM konsantrasyonu istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Perfüzyon çözeltisi

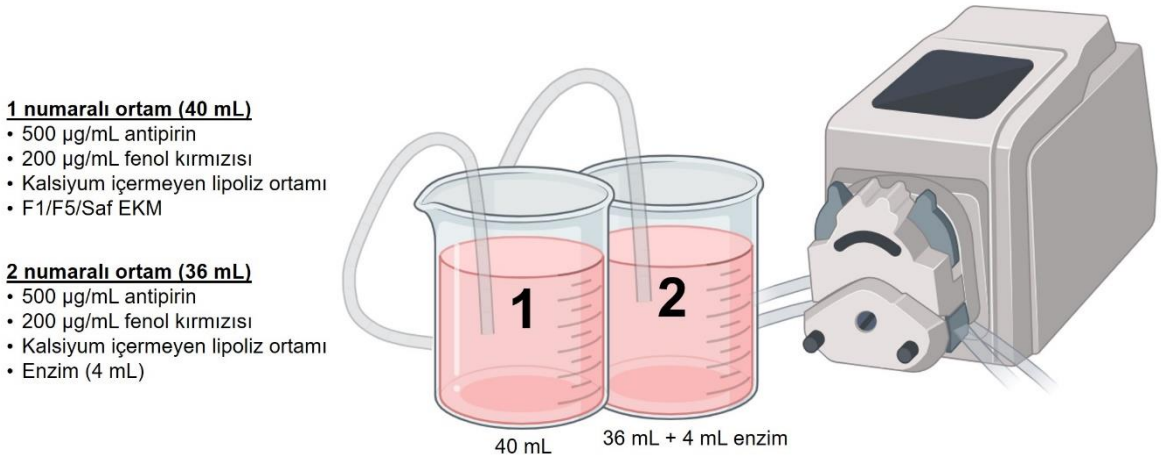
Tez kapsamında lipoliz ve permeabilitenin eş zamanlı olarak gerçekleşebileceği in vitro lipoliz çalışması ile in situ intestinal perfüzyon yönteminin birleştirilmesi ve birleşik yöntemle SEDD sistemlerde lipolizin EKM absorpsiyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.2.6 Çizelge 3.14'te sunulan lipoliz ortamı kullanılmıştır. Ancak yöntemde absorpsiyon basamağının varlığı nedeniyle yağ asitlerinin kalsiyum tuzu halinde çöktürülmesine gerek kalmadığı için kalsiyum eklenmemiştir. Ek olarak FK ve ANT perfüzyon belirteçleri, lipoliz ortamına sırasıyla

200 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonda eklenmiştir. Bu lipoliz ortamında disperse edilmiş formülasyonlar ile pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamının ayrı rezervuarlardan gelerek perfüze segmente girmeden hemen önce üç yollu musluk kullanarak karışmaları sağlanmıştır.

Formülasyon içeren lipoliz ortamı ve pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamının karışması durumunda FK ve ANT konsantrasyonunda azalma olmaması için pankreatik lipaz, FK ve ANT içeren lipoliz tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Domuz pankreasından elde edilen pankreatin, denatürasyonu engellemek için perfüzyon çalışmasından hemen önce 150 USP/mL nihai aktiviteye sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. İnsan bağırsak aspirasyon sıvısında pankreatin aktivitesinin minimum 150 USP/mL olduğu belirtilmiştir (Sassene ve diğerleri, 2014). Ancak lipoliz çalışmasında pankreatinin yağ asitleri ile inhibe olmaması için yüksek aktivitede kullanılmaktadır (Larsen ve diğerleri, 2011). İn situ perfüzyon çalışmasında sindirim sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin emilebileceği ve yüksek aktivitenin jejunum bütünlüğünü bozma ihtimaline karşı minimum seviye tercih edilmiştir. Pankreatinden gerekli tartılarak 6 mL FK ve ANT içeren SIF tozu ve kalsiyum içermeyen lipoliz tamponunda süspande edilmiştir. Süspande karışım 4°C sıcaklık 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Perfüzyon çalışmasında kullanmak üzere süpernatandan 4 mL alınmıştır. Perfüzyon çözeltisinin bileşimi Çizelge 3.18'te, kullanılan çözeltilerin şematik gösterimi Şekil 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.18. Perfüzyon çözeltisinin bileşenleri

Perfüzyon çözeltisi		**Hazırlanış**
Fenol kırmızı	200 µg/mL	Sodyum hidroksit, sodyum fosfat monobazik dihidrat ve sodyum klorür gerekli miktarda tartılmış ve hazırlanmak istenen hacimdeki distile suyun bir kısmında çözünmüştür. Bu çözeltinin pH'ı ölçülerek gerekli ise 1 M sodyum hidroksit veya 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlanmıştır. Lipoliz tamponu distile su ile hacme tamamlanmıştır. SIF tozundan gerekli miktar tartılarak lipoliz tamponunda çözünmüştür. İki saat bekleme süresinden sonra 200 µg/mL fenol kırmızısı ve 500 µg/mL ANT konsantrasyonu elde edecek şekilde FK ve ANT eklenerek karıştırılmıştır.
Antipirin	500 µg/mL	
Enzim	150 USP/mL	
Lipoliz ortamı	ym 40 mL	
Perfüzyon için lipoliz ortamı		
NaOH	10,5 mM	
$NaH_2PO_4.2H_2O$	29 mM	
NaCl	106 mM	
Sodyum taurokolat	3 mM	
Fosfolipit	0,75 mM	



Şekil 3.3. Perfüzyon çalışmasında kullanılan çözeltiler

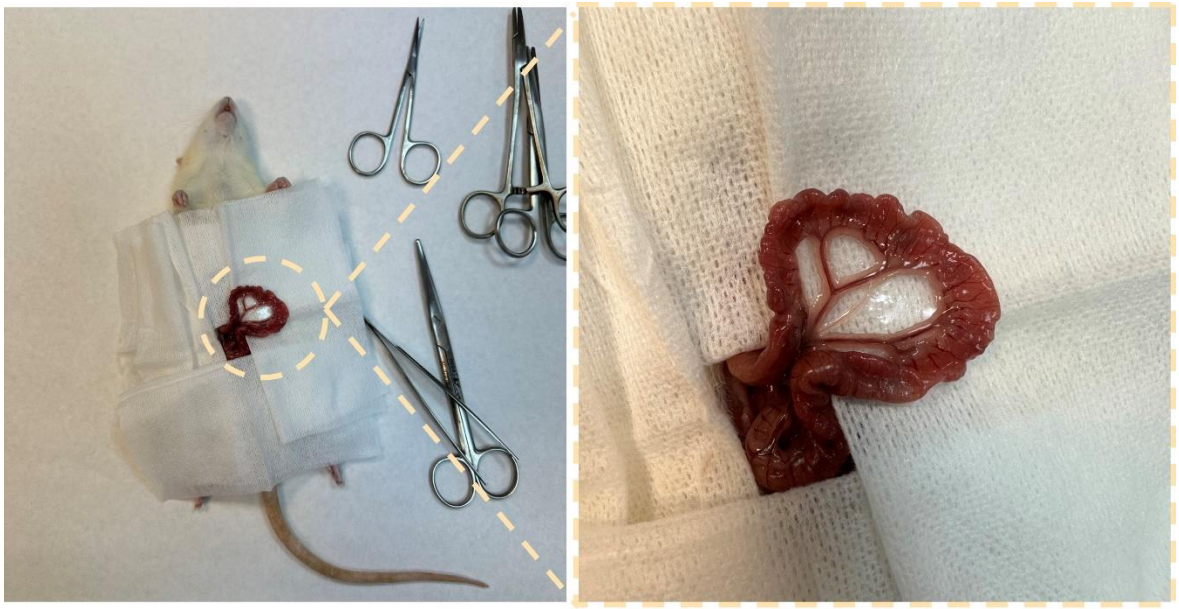
Cerrahi işlemler

Çalışmaya başlamadan 12 saat önce Sprague-Dawley sıçanlar aç bırakılmış ancak suya erişimleri devam etmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm hayvanların ağırlıkları GÜEDAM'a ilk gelişlerinde ve çalışmadan hemen önce tartılarak kaydedilmiştir. Perfüzyon işlemi için sıçanlar ksilazin (8 mg/kg/i.p.) ve ketamin (75 mg/kg/i.p.) genel anestezisi sonrası supin pozisyonda yatırılmış ve abdominal bölge geniş bir şekilde tıraşlanmıştır (Resim 3.6). Anestezi derinliği pedal refleksin kaybolması ile kontrol edilmiştir. Tüm çalışmalar 37°C'ye ayarlanmış hot plate üzerinde yapılarak sıçanların vücut ısılarının düşmesi engellenmiştir.



Resim 3.6. Ksilazin ve ketamin uygulanması

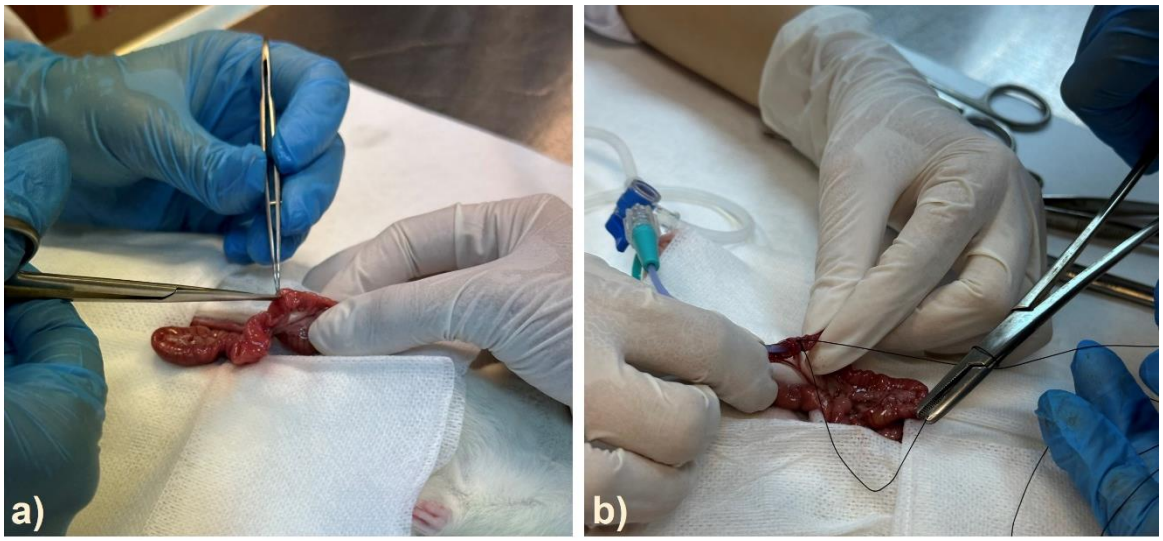
Linea alba üzerinde yaklaşık 2 cm'lik bir insizyon yapılarak abdominal boşluğa ulaşılmış ve jejunum açığa çıkarılmıştır (Resim 3.7). Tez kapsamında perfüze edilecek bağırsak segmenti duodenum ve ileuma göre emilim için yüksek yüzey alanına sahip olması ve safra tuzlarının emiliminden sorumlu olması nedeniyle jejunum olarak belirlenmiştir (Kothari ve Rajagopalan, 2020). Perfüze edilecek doku jejunumun orta segmentinde olacak şekilde yaklaşık 10 cm uzunlukta belirlenmiştir (Resim 3.8). Perfüze segmentin proksimal ucu küçük bir kesi ile üç yollu musluğa bağlı 2 mm iç çapa sahip besleme kateteri hortumu ve distal ucu ise 2,8 mm iç çapa sahip serum hortumu ile kanüle edilmiştir. Her iki hortum 5/0 numaralı cerrahi sütür ipliği ile sabitlenmiştir (Resim 3.9). Hasarı en aza indirmek ve kan dolaşımını devam ettirmek için bu işlemler nazikçe yapılmıştır. Çalışma boyunca perfüze edilen jejunum segmentinde kurumayı engellemek amacıyla yüzeyler serum fizyolojik ile ıslatılmış ve işlem süresince üzerine ıslak gazlı bez yerleştirilmiştir.



Resim 3.7. Perfüze edilecek jejunum segmenti



Resim 3.8. Perfüze edilecek jejunum segmentinin uzunluğunun belirlenmesi



Resim 3.9. Cerrahi işlemler a) Jejunum segmentine küçük bir kesi atılması b) Cerrahi iplik ile kataterin sabitlenmesi

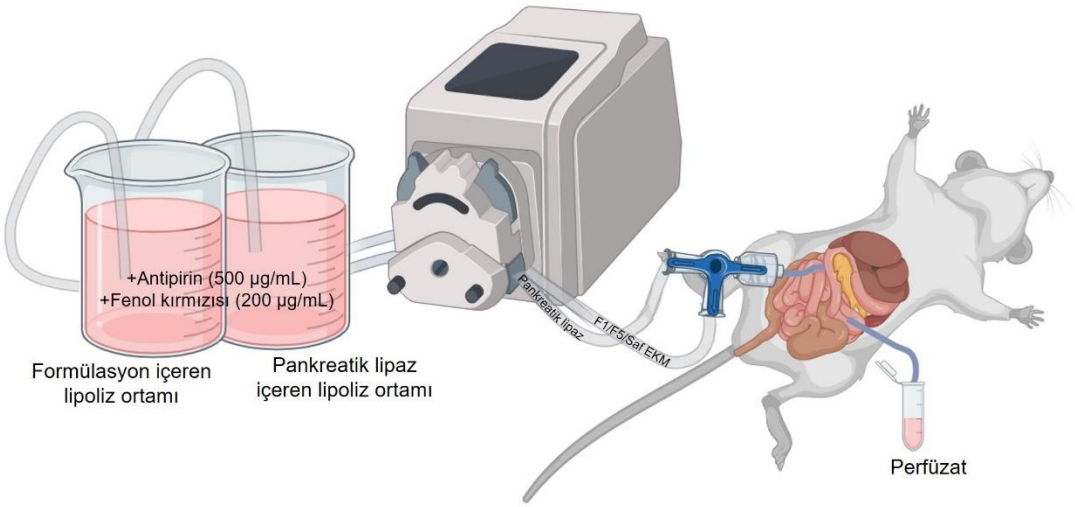
Perfüzyon çalışması

Çalışmada kullanılan tubinglerin bir uçları serum fizyolojik çözeltisine diğer uçları ise perfüze segmentin proksimaline sabitlenmiş üç yollu musluğa yerleştirilmiştir. Üç yollu musluğa bağlanan tubingler serum fizyolojik ile perfüzyonu sağlamak amacıyla

peristaltik pompaya bağlanmıştır. Cerrahi işlemlerden sonra perfüze edilen segment serum fizyolojik çözeltisinin (37°C) peristaltik pompa yardımıyla 0,26 mL/dk hızda geçirilmesiyle yıkanmıştır (Incecayir ve diğerleri, 2016). Bu yıkama işlemine distal uçtan berrak renkte çözelti elde edilinceye kadar devam edilmiştir. Yıkama boyunca örnek toplanmamıştır. Çalışmalar 4 grup olarak gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon çalışmasının akış şeması Şekil 3.4'te, şematik gösterimi Şekil 3.5'de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Perfüzyon çalışması akış şeması



Şekil 3.5. Perfüzyon çalışmasının şematik gösterimi

Grup 1

15 mg EKM içeren 1 g F1 formülasyonu FK ve ANT içeren 40 mL lipoliz ortamında disperse edilmiştir. FK ve ANT içeren 36 mL lipoliz ortamını barındıran diğer beher içerisine 4 mL enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Segment temizlendikten sonra giriş tubingleri, serum fizyolojikten F1 formülasyonunu içeren lipoliz ortamı ve pankreatik

lipaz içeren lipoliz ortamına geçirilmiştir. Perfüze segmentin distaline yerleştirilen hortum ucuna ise örnek toplamak için eppendorf tüp yerleştirilmiştir. Üç yollu musluğun bir girişinden F1 formülasyonunu içeren lipoliz ortamı diğer girişinden pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamı 0,13 mL/dk hızda geçecek şekilde akış sağlanmıştır. Jejunumun dengeye gelmesi için 30 dakika boyunca perfüzyon devam ettirilmiştir. Denge süresi yapılan ön çalışmalardan ve önceki çalışmalardan hareketle 30 dakika olarak belirlenmiştir (Gülsün-İnal, 2016). Bu süreçte örnek toplanmamıştır. Denge sonrasında perfüzat örnekleri 5 dakika aralıklarla 1 saat boyunca (5. dk, 10. dk, 15. dk, 20. dk, 25. dk, 30. dk, 35. dk, 40. dk, 45. dk, 50. dk, 55. dk, 60. dk) eppendorf tüplere toplanmıştır (Gulsun ve Sahin, 2016).

Grup 2

15 mg EKM içeren 1 g F5 formülasyonu FK ve ANT içeren 40 mL lipoliz ortamında disperse edilmiştir. FK ve ANT içeren 36 mL lipoliz ortamını barındıran diğer beher içerisine 4 mL enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Segment temizlendikten sonra giriş tubingleri serum fizyolojikten F5 formülasyonunu içeren lipoliz ortamı ve pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamına geçirilmiştir. Perfüze segmentin distaline yerleştirilen hortum ucuna ise örnek toplamak için eppendorf tüp yerleştirilmiştir. Üç yollu musluğun bir girişinden F5 formülasyonunu içeren lipoliz ortamı diğer girişinden pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamı 0,13 mL/dk hızda geçecek şekilde akış sağlanmıştır. Jejunumun dengeye gelmesi için 30 dakika boyunca perfüzyon devam ettirilmiştir. Denge sonrasında perfüzat örnekleri 5 dakika aralıklarla 1 saat süre boyunca (5. dk, 10. dk, 15. dk, 20. dk, 25. dk, 30. dk, 35. dk, 40. dk, 45. dk, 50. dk, 55. dk, 60. dk) eppendorf tüplere toplanmıştır.

Grup 3

Ön çalışmalarda saf EKM'nin lipoliz ortamında çözünmediği gözlenmiştir. EKM'yi çözmek için yardımcı çözücü metanol kullanılmıştır. 15 mg EKM metanolde çözülerek 40 mL'ye FK ve ANT içeren lipoliz ortamıyla tamamlanmıştır. Segment temizlendikten sonra giriş tubingleri serum fizyolojikten saf EKM içeren lipoliz ortamı ve pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamına geçirilmiştir. Perfüze segmentin distaline yerleştirilen hortum ucuna ise örnek toplamak için eppendorf tüp yerleştirilmiştir.

Perfüzyon çalışması için üç yollu musluğun bir girişinden saf EKM içeren lipoliz ortamı diğer girişinden pankreatik lipaz içeren lipoliz ortamı 0,13 mL/dk hızda geçecek şekilde akış sağlanmıştır. Jejunumun dengeye gelmesi için 30 dakika boyunca perfüzyon devam ettirilmiştir. Denge sonrasında perfüzat örnekleri 5 dakika aralıklarla 1 saat süre boyunca (5. dk, 10. dk, 15. dk, 20. dk, 25. dk, 30. dk, 35. dk, 40. dk, 45. dk, 50. dk, 55. dk, 60. dk) eppendorf tüplere toplanmıştır.

Grup 4

Doku bütünlüğüne pankreatik lipaz varlığının etkisini incelemek için EKM ve enzim içermeyen perfüzyon çözeltisi kullanılarak perfüzyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Serum fizyolojik ile yıkama işlemi tamamlandıktan sonra giriş tubingleri serum fizyolojikten FK ve ANT içeren lipoliz ortamına geçirilmiştir. Perfüze segmentin distaline yerleştirilen hortum ucuna ise örnek toplamak için eppendorf tüp yerleştirilmiştir. Üç yollu musluğun her iki girişinden EKM ve enzim içermeyen lipoliz ortamı 0,13 mL/dk hızda geçecek şekilde akış sağlanmıştır. Jejunumun dengeye gelmesi için 30 dakika boyunca perfüzyon devam ettirilmiştir. Denge sonrasında perfüzat örnekleri 5 dakika aralıklarla 1 saat süre boyunca (5. dk, 10. dk, 15. dk, 20. dk, 25. dk, 30. dk, 35. dk, 40. dk, 45. dk, 50. dk, 55. dk, 60. dk) eppendorf tüplere toplanmıştır.

<u>Örneklerin analizi ve çalışmanın sonlandırılması</u>

Alınan örnekler asetonitril ile 1:9 oranında seyreltilmiş ve vortekslenmiştir. Örnekler 0,22 µm PVDF membran filtreden viallere süzülmüştür. Örneklerdeki EKM, FK ve ANT miktarları HPLC ile Bölüm 3.2.2 Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te sunulan koşullar kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir örnekteki EKM, FK ve ANT konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Deney sonunda sıçanların jejunum dokuları çıkarılarak çapları ve uzunlukları ölçülmüştür. Daha sonra hayvanlar eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir.

Veri analizi

Her bir grup için zaman noktalarında toplanan perfüzat örneklerindeki EKM konsantrasyonu, perfüzyon çözeltisindeki EKM konsantrasyonuna oranlanarak EKM konsantrasyonu normalize edilmiştir. Normalize konsantrasyonlar zaman karşı grafiklenerek EKM absorpsiyonunun incelendiği grafikler elde edilmiştir (Gülsün-İnal, 2016). Her bir grup için normalize konsantrasyon grafiğinin AUC değeri GraphPad Prism V8 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Her bir grubun perfüzyon çalışması için EKM, FK ve ANT'ye ait effektif permeabilite katsayısı (P_{eff}, $cm.dk^{-1}$) aşağıdaki Eş. 3.10 kullanılarak hesaplanmıştır (Gao ve diğerleri, 2017; Liu ve diğerleri, 2022). P_{eff} için perfüzattaki EKM, FK ve ANT'nin kararlı durum konsantrasyonları kullanılmıştır (Patel ve Barve, 2012).

$$P_{eff} = -\frac{\ln\left(\frac{C_{out,düzeltilmiş}}{C_{in}}\right) Q}{2\pi r l} \tag{3.10}$$

P_{eff}: Effektif permeabilite katsayısı (cm/dk)
Q: Perfüzyon çözeltisinin akış hızı (mL/dk)
C_{out}: Segmentten çıkan perfüzattaki ilaç konsantrasyonu (µg/mL)
C_{in}: Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu (µg/mL)
r: Perfüze jejunum segmentinin yarıçapı (cm)
l: Perfüze jejunum segmentinin uzunluğu (cm)

Perfüzyon süresince segmentte meydana gelen su absorpsiyonu veya su effluksuna göre, C_{out} parametresinin absorbe ve metabolize edilmeyen fenol kırmızısı konsantrasyonu kullanılarak düzeltilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (López-Yerena ve diğerleri, 2020). Bu amaçla Eş. 3.11 kullanılmıştır.

$$C_{out,düzeltmiş} = \left(\frac{C_{FKin}}{C_{FKout}}\right) x\ C_{out} \tag{3.11}$$

C_{out}: Segmentten çıkan perfüzattaki ilaç konsantrasyonu (µg/mL)
C_{FKout}: Segmentten çıkan perfüzattaki fenol kırmızısı konsantrasyonu (µg/mL)
C_{FKin}: Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyonu (µg/mL)

İntestinal perfüzyon yöntemi ile sıçanlardan elde edilen $P_{eff,sıçan}$ değeri kullanılarak insandaki $P_{eff,insan}$ değeri ve absorbe edilen doz fraksiyonu (F_a) sırasıyla Fagerholm ve ark. tarafından önerilen Eş. 3.12 ve Zakeri ve ark. tarafından önerilen Eş. 3.13 ile hesaplanmıştır (Fagerholm, Johansson ve Lennernäs, 1996; Zakeri-Milani ve diğerleri, 2007).

$$P_{eff,insan} = 3{,}6\ x\ P_{eff,sıçan} + 0{,}03\ x\ 10^{-4} \quad (3.12)$$

$P_{eff,insan}$: İnsandaki effektif permeabilite katsayısı (cm/dk)
$P_{eff,sıçan}$: Sıçandan elde edilen effektif permeabilite katsayısı (cm/dk)

$$F_a = 1 - e^{(-38450\ x\ P_{eff,sıçan})} \quad (3.13)$$

F_a: İnsanda absorbe edilen doz fraksiyonu
$P_{eff,sıçan}$: Sıçandan elde edilen effektif permeabilite katsayısı (cm/sn)

3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism V8 kullanılarak yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen verilerde iki grubun karşılaştırılması için Student t testi ve daha çok grubun karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Gruplar arasında fark olduğunu tespit etmek amacıyla Tukey HSD post-hoc testi yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak $\alpha = 0{,}05$ alınmış ve $p<0{,}05$ olduğu durumlarda gruplar arası fark olduğuna karar verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Eksemestanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Çözünürlük çalışması

Eksemestanın (EKM) çözünürlük çalışması Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde 25 ± 0,5°C ve 37 ± 0,5°C sıcaklıkta distile su ve %0,5 SLS çözeltisi, 37 ± 0,5°C sıcaklıkta %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında sink koşulun belirlenmesi için gerçekleştirilen çözünürlük çalışmasının sonuçları Bölüm 4.7'de de sunulmuştur.

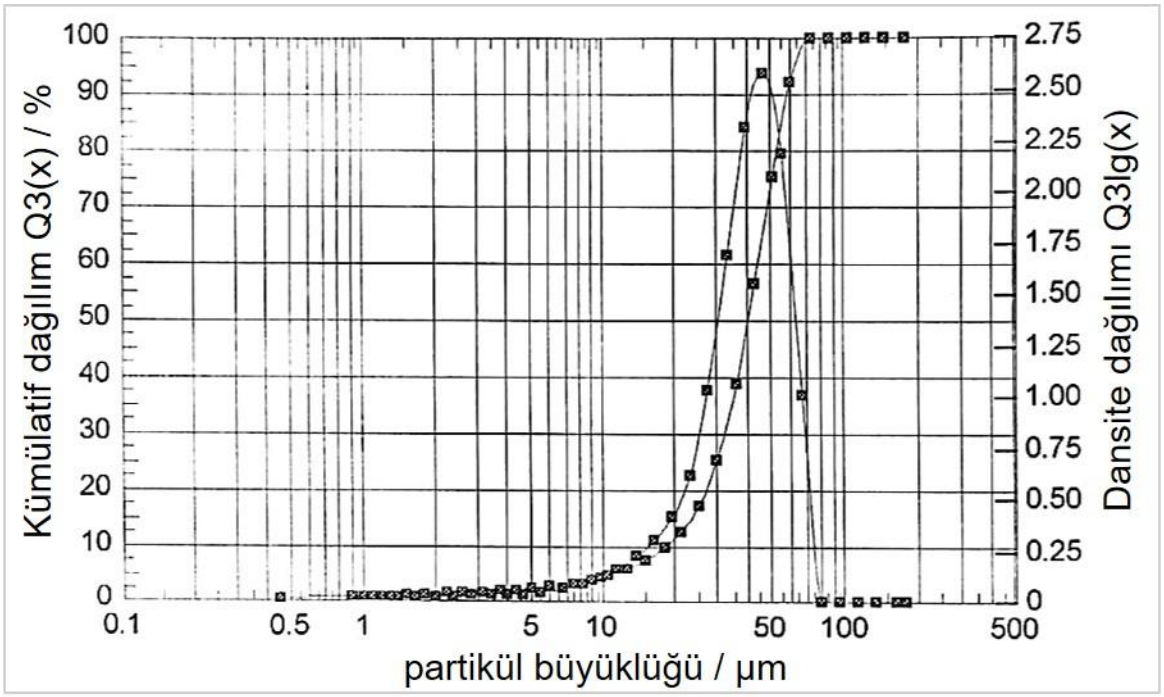
Çizelge 4.1. EKM'ye ait çözünürlük sonuçları

Sıcaklık (°C)	Distile su (µg/mL)	%0,5 SLS çözeltisi (µg/mL)	%0,5 SLS içeren PBS tamponu (µg/mL)
25 ± 0,5	27,8 ± 2,5	662,1 ± 2,3	-
37 ± 0,5	28,7 ± 0,5	695,4 ± 3,1	778,4 ± 11,4

(Ort ± SS, n=3)

4.1.2. Partikül büyüklüğü ölçümü

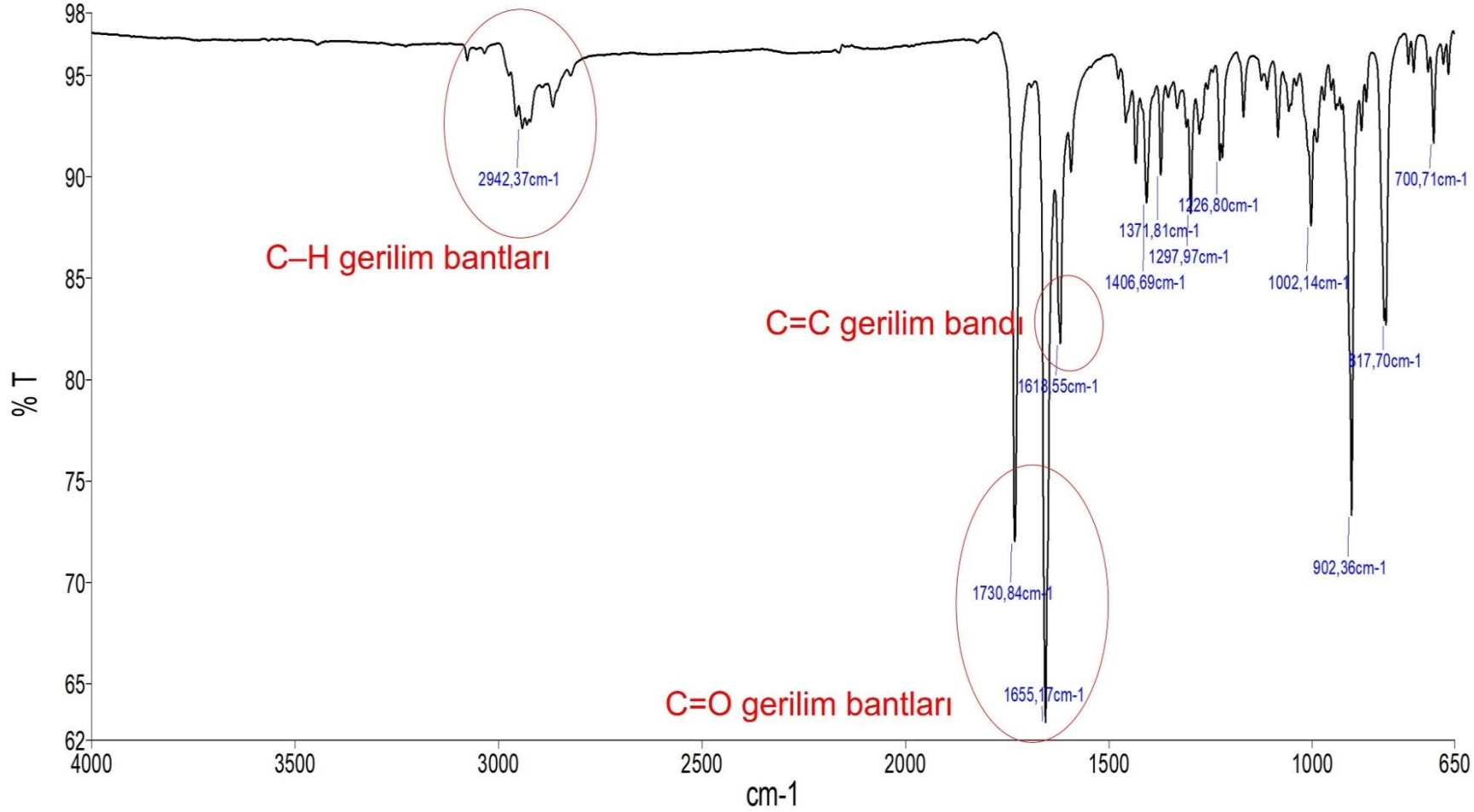
EKM için partikül büyüklüğü ölçümleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde Sympatec Helos cihazı ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda EKM'nin ortalama partikül büyüklüğü 41,7 ± 5,6 µm olarak belirlenmiştir. EKM'nin partikül büyüklüğü ve dağılımına ait grafik Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. EKM'nin partikül büyüklüğü dağılım grafiği

4.1.3. FT-IR analizi

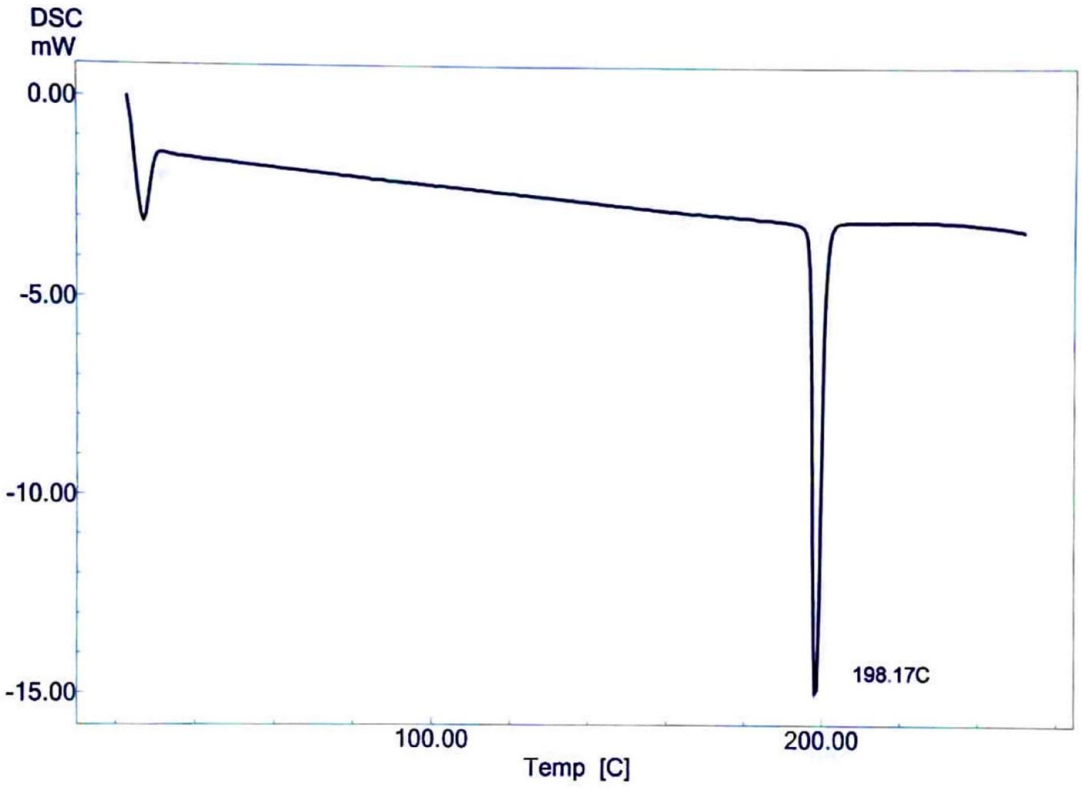
EKM'nin Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen FT-IR analizine ait spektrumu Şekil 4.2'de sunulmuştur. EKM'nin CH_3 fonksiyonel grubuna ait karakteristik C–H gerilim bantları 3079-2825 cm^{-1}'de, C=O fonksiyonel grubuna ait gerilim bantları 1731 cm^{-1} ve 1655 cm^{-1}'de, C=C fonksiyonel grubuna ait gerilim bandı 1618 cm^{-1}'de gözlenmiştir. EKM'nin ana iskeletine ait etkileşimler ise 1371-654 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir.



Şekil 4.2. EKM'nin FT-IR spektrumu

4.1.4. Erime derecesi tayini

EKM'nin Bölüm 3.2.1'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen DSC analizine ait termogramı Şekil 4.3'te verilmiştir. EKM'ye ait endotermik pik gözlenmiş ve EKM'nin erime derecesi 198,2°C olarak bulunmuştur.

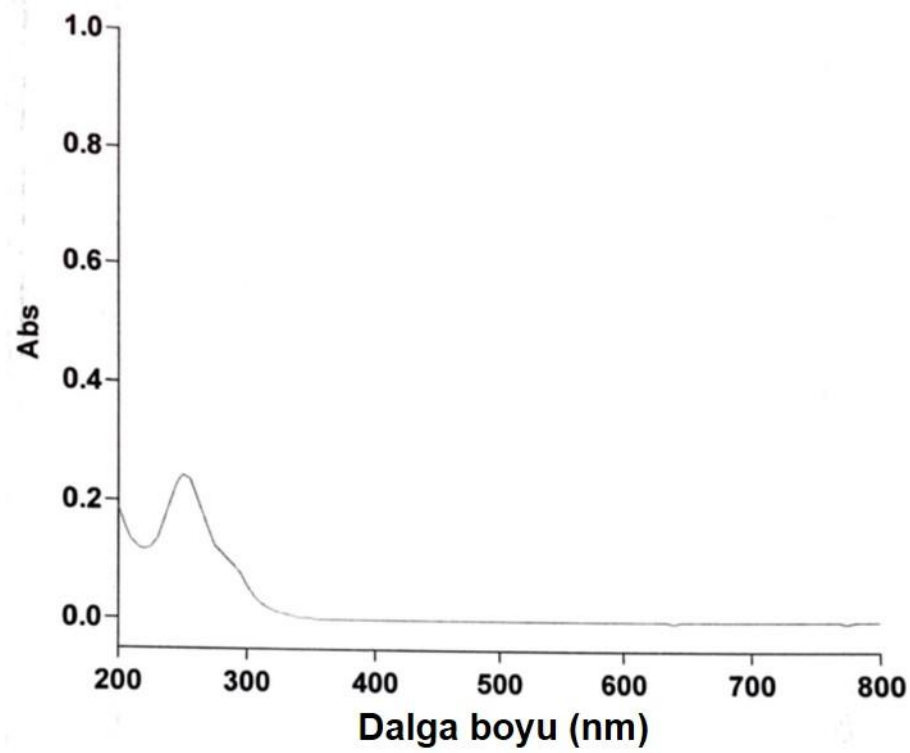


Şekil 4.3. EKM'nin DSC termogramı

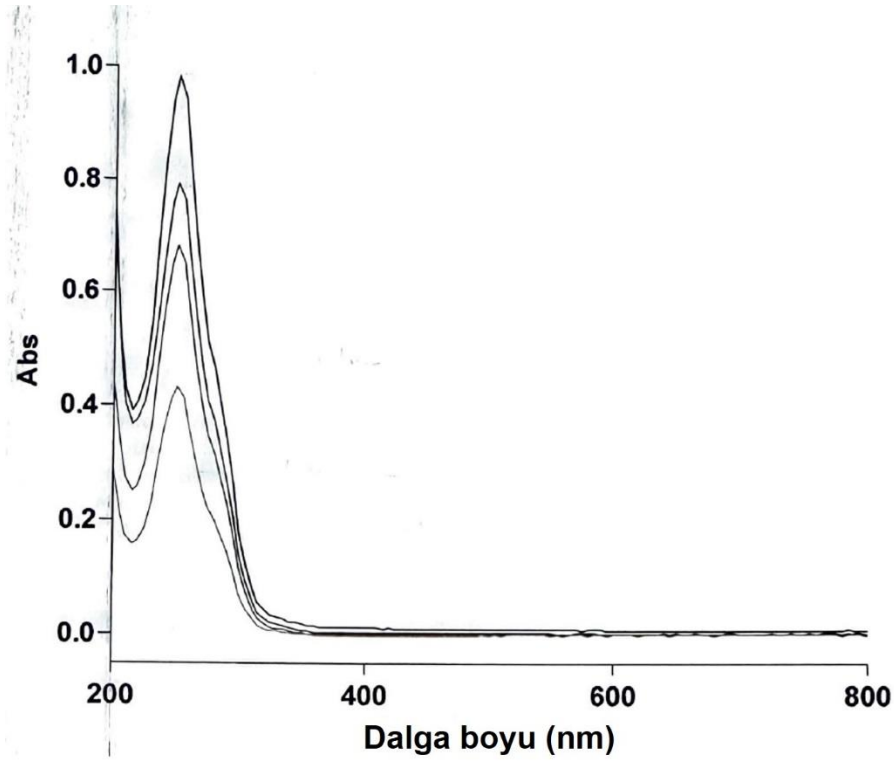
4.2. Eksemestanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonu

4.2.1. Eksemestanın UV spektrofotometresi ile dalga boyu taraması

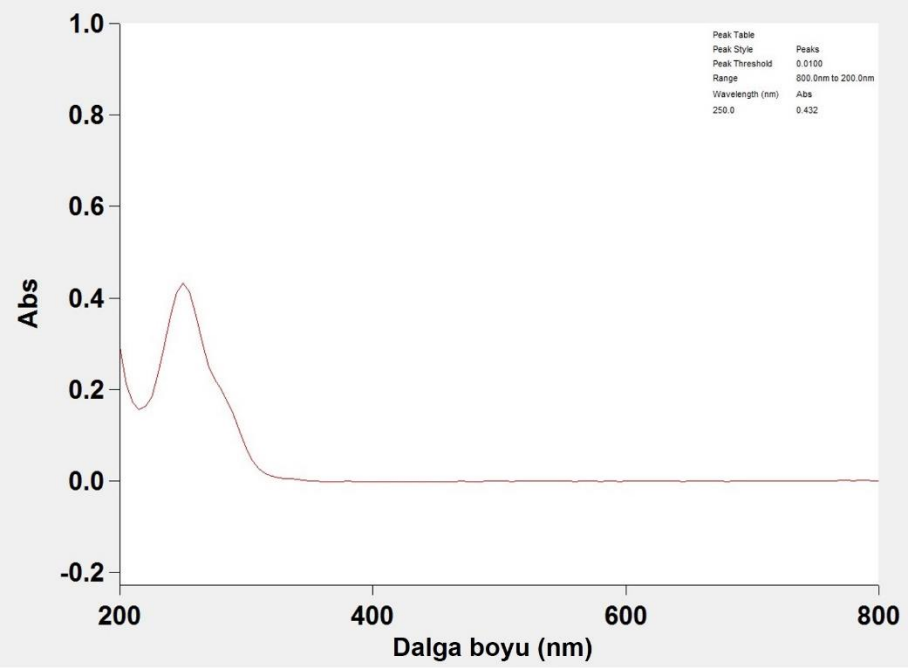
EKM'nin Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen dalga boyu taramaları sonucunda 10 µg/mL distile su, 4 µg/mL %0,5 SLS çözeltisi, 50 µg/mL asetonitril ve 50 µg/mL metanol ortamlarında belirtilen konsantrasyonlarına ait UV spektrumları Şekil 4.4 - Şekil 4.7'de verilmiştir. λ_{maks} değeri distile su, %0,5 SLS çözeltisi ve asetonitril ortamları için 250 nm, metanol ortamı için 245 nm olarak tespit edilmiştir.



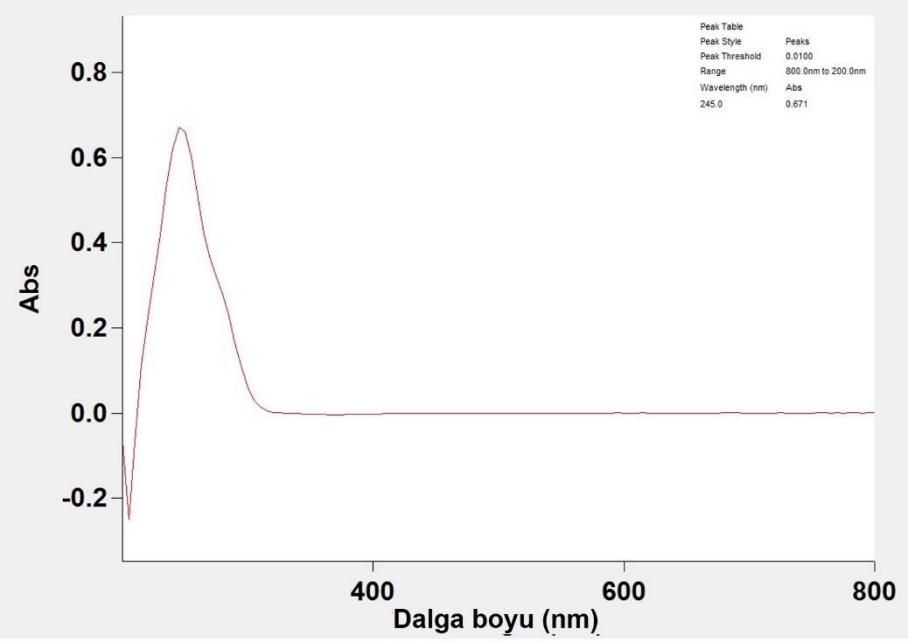
Şekil 4.4. EKM'nin distile su ortamındaki UV spektrumu



Şekil 4.5. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisindeki UV spektrumu



Şekil 4.6. EKM'nin asetonitril ortamındaki UV spektrumu



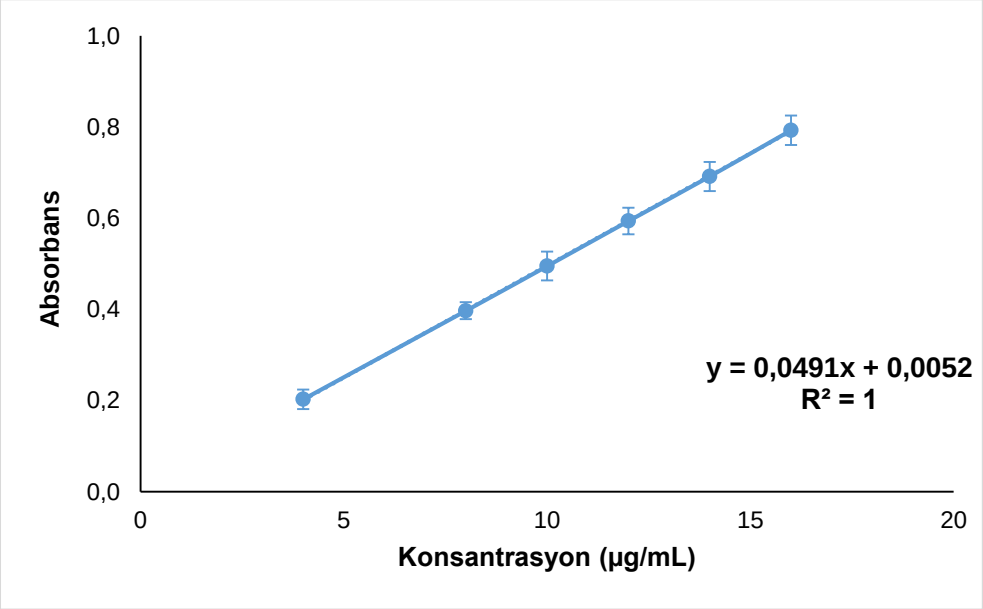
Şekil 4.7. EKM'nin metanol ortamındaki UV spektrumu

4.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi ve validasyonu

EKM'nin distile su ortamındaki spektrofotometrik miktar tayini için validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlattığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması distile su ortamında 4 µg/mL - 20 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 7 farklı konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri 250 nm'de ölçülmüş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) Şekil 4.8'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. EKM'nin distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=6)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin distile su ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin absorbansı 250 nm'de art arda 10 kez ölçülmüştür. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin distile su ortamında 6 µg/mL, 10 µg/mL ve 14 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinin absorbansı takip eden 3 gün içerisinde 250 nm'de 3 kez ölçülmüştür. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. EKM'nin distile su ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,2
2	10	10,2
3	10	10,2
4	10	10,3
5	10	10,3
6	10	10,3
7	10	10,3
8	10	10,3
9	10	10,3
10	10	10,3
Ort		10,2
SS		0,1
VK		0,6

Çizelge 4.3. EKM'nin distile su ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
6	6,07	5,92	6,13	6,04	0,11	1,8
10	10,0	10,1	10,1	10,1	0,1	0,6
14	14,0	14,0	14,0	14,0	0,0	0,2

Doğruluk ve geri elde

Kullanılan yöntemin doğruluğunu göstermek için EKM'nin distile su ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinin absorbansı ölçülerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

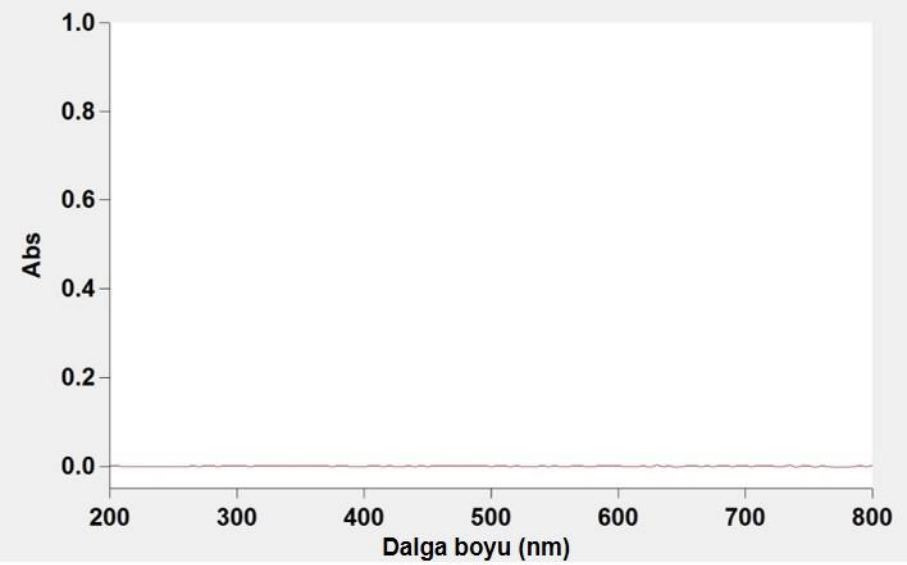
Çizelge 4.4. EKM'nin distile su ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	8,09 ± 0,07	101,0	0,9
10	10,2 ± 0,0	102,4	0,4
12	12,3 ± 0,1	102,7	0,6

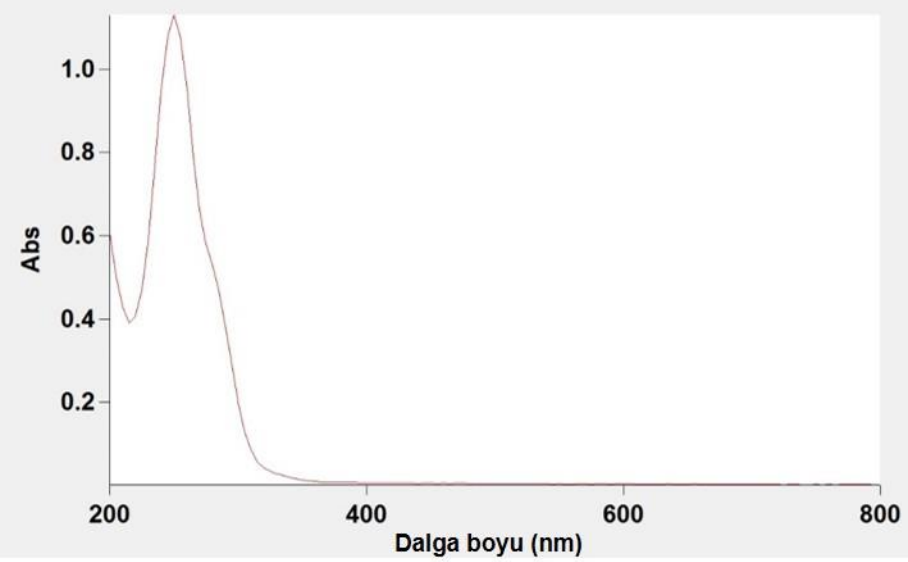
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için distile su ortamının EKM ile aynı dalga boyunda absorbansa sahip olup olmadığı kontrol edilmiştir. Elde edilen UV spektrumları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. EKM içermeyen distile su ortamına ait UV spektrumu



Şekil 4.10. EKM içeren distile su ortamına ait UV spektrumu

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin distile su ortamındaki spektrofotometrik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,86 µg/mL LOQ değeri 2,60 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin distile su ortamında stabilitesini göstermek için 10 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. EKM'nin distile su ortamında stabilite sonuçları

Sıcaklık (°C)	**Zaman (Saat)**	**EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**
25 ± 0,5	0	10	9,70 ± 0,01
	24	10	10,2 ± 0,0
37 ± 0,5	0	10	9,70 ± 0,01
	24	10	10,3 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

4.2.3. Kromatografik miktar tayini yöntemi ve validasyonu

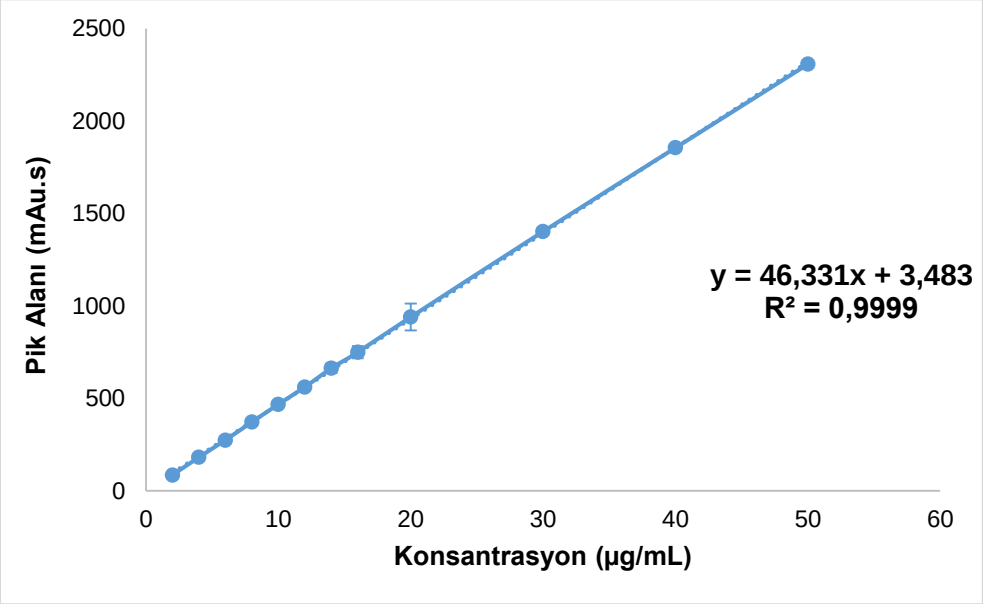
EKM'nin metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu, FaSSIF, FeSSIF ve ACN:Perfüzat (9:1) ortamlarındaki kromatografik miktar tayini için validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlattığı gibi gerçekleştirilmiştir.

EKM'nin metanol ortamındaki validasyonu

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması metanol ortamında 2 µg/mL - 50 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 12 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 245 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve

grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.11. EKM'nin metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin metanol ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin metanol ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. EKM'nin metanol ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,0
2	10	10,0
3	10	10,0
4	10	10,0
5	10	10,0
6	10	10,0
7	10	10,0
8	10	10,0
9	10	10,0
10	10	10,0
Ort		10,0
SS		0,0
VK		0,1

Çizelge 4.7. EKM'nin metanol ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	7,85	7,97	7,85	7,89	0,07	0,9
10	10,1	10,1	10,2	10,1	0,0	0,4
12	12,4	12,4	12,4	12,4	0,1	0,4

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin metanol ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

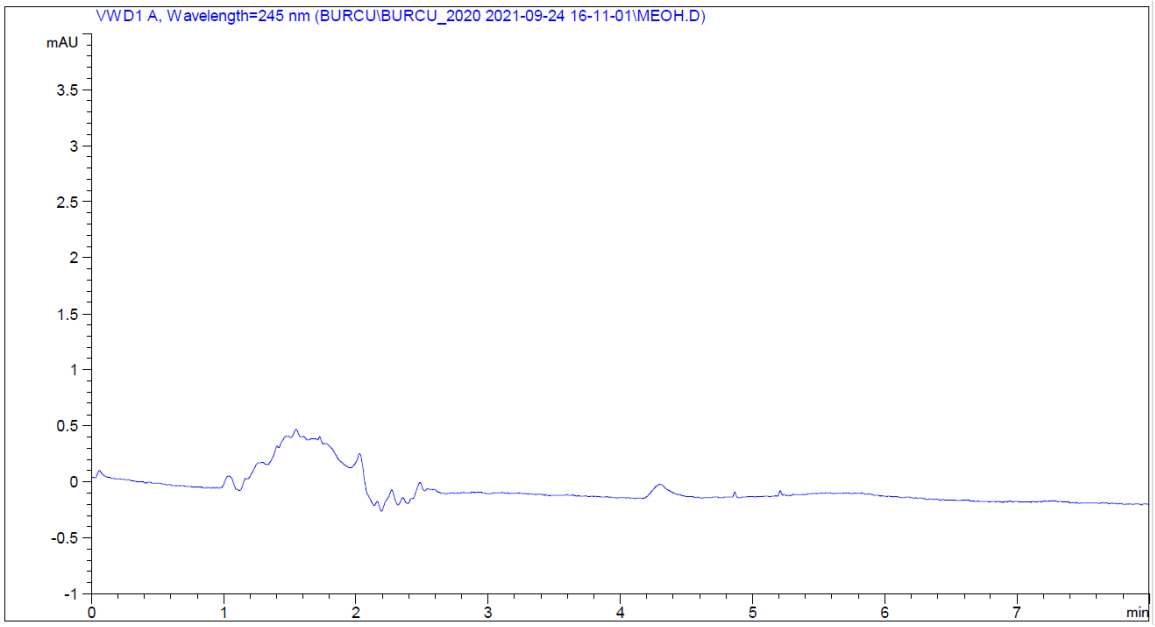
Çizelge 4.8. EKM'nin metanol ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	7,85 ± 0,03	98,1	0,4
10	10,1 ± 0,0	100,7	0,2
12	12,4 ± 0,0	102,9	0,0

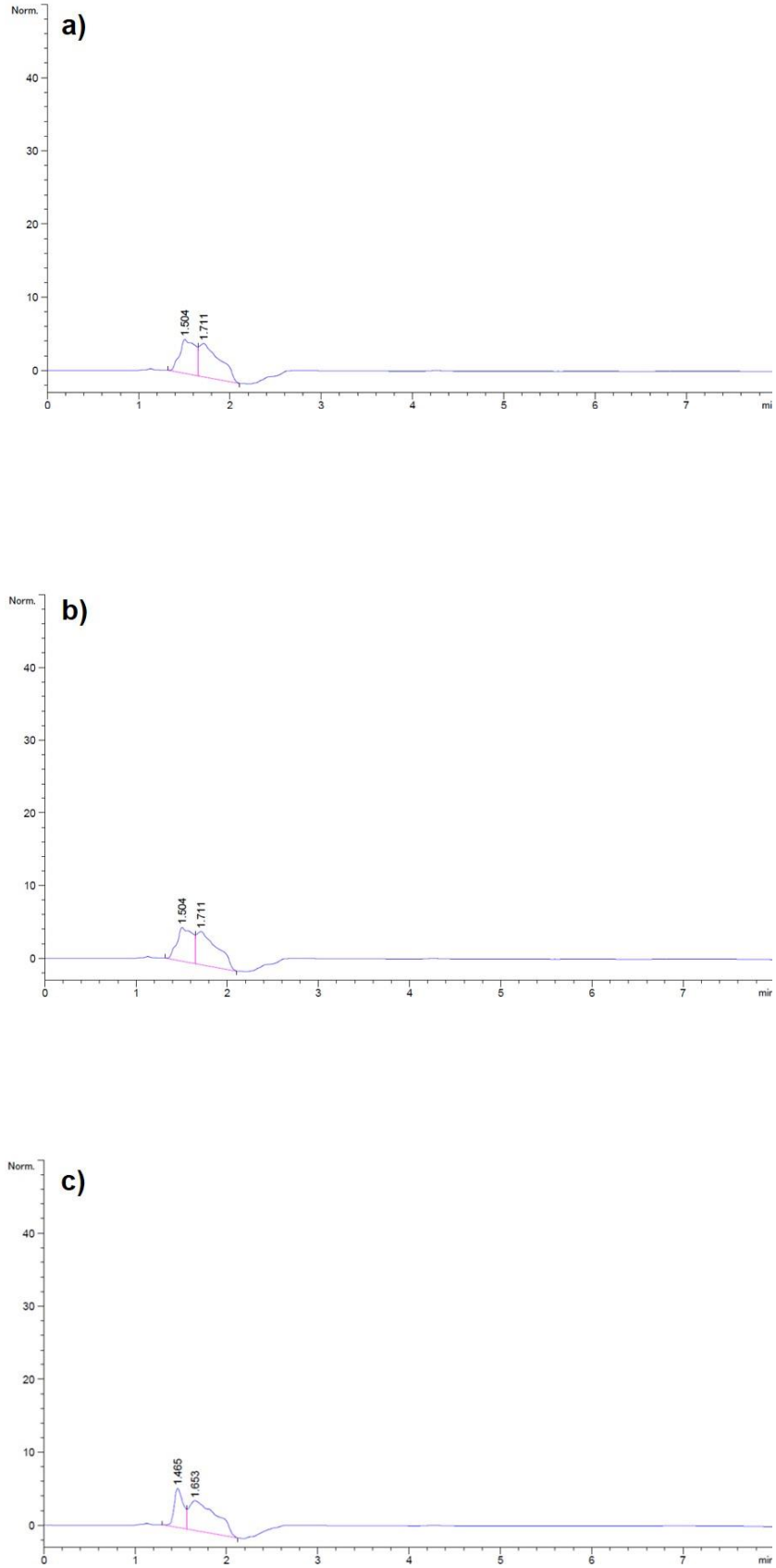
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

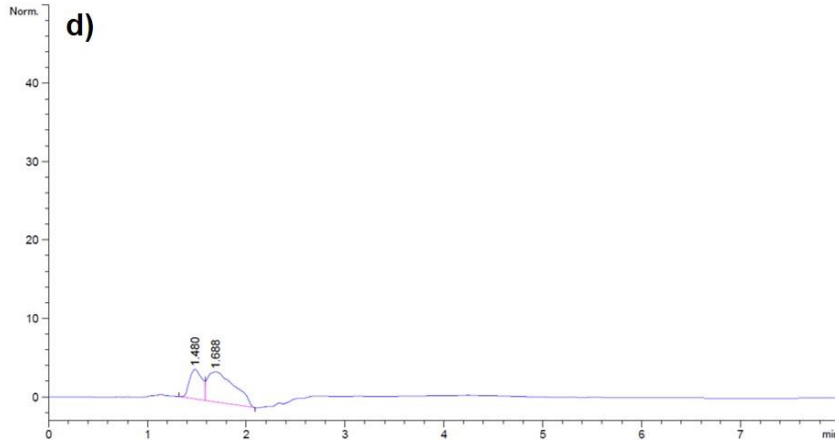
Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. Metanol ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin metanol ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.12 - Şekil 4.14'te sunulmuştur.

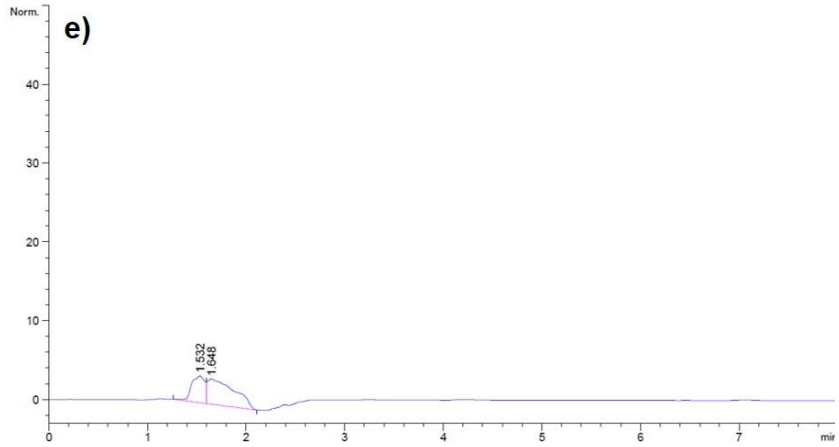


Şekil 4.12. Metanol ortamına ait kromatogram

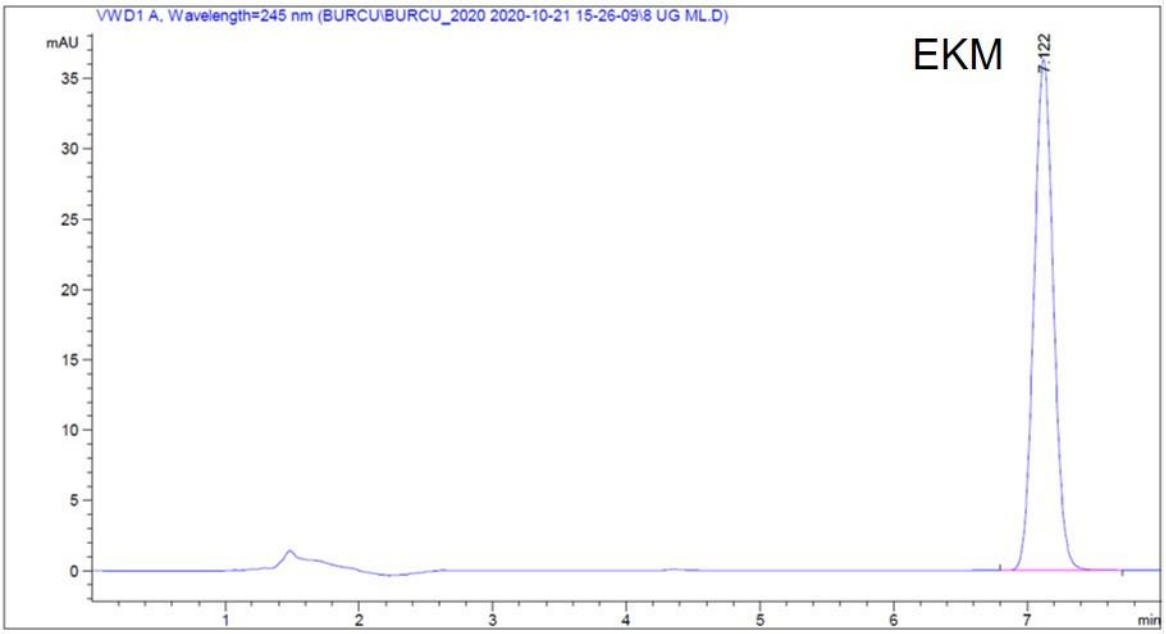


Şekil 4.13. (devam) EKM içermeyen formülasyonların metanol ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu





Şekil 4.13. (devam) EKM içermeyen formülasyonların metanol ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.14. 8 µg/mL EKM'nin metanol ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin metanol ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,09 µg/mL LOQ değeri 0,27 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin metanol ortamında stabilitesini göstermek için 10 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. EKM'nin metanol ortamında stabilite sonuçları

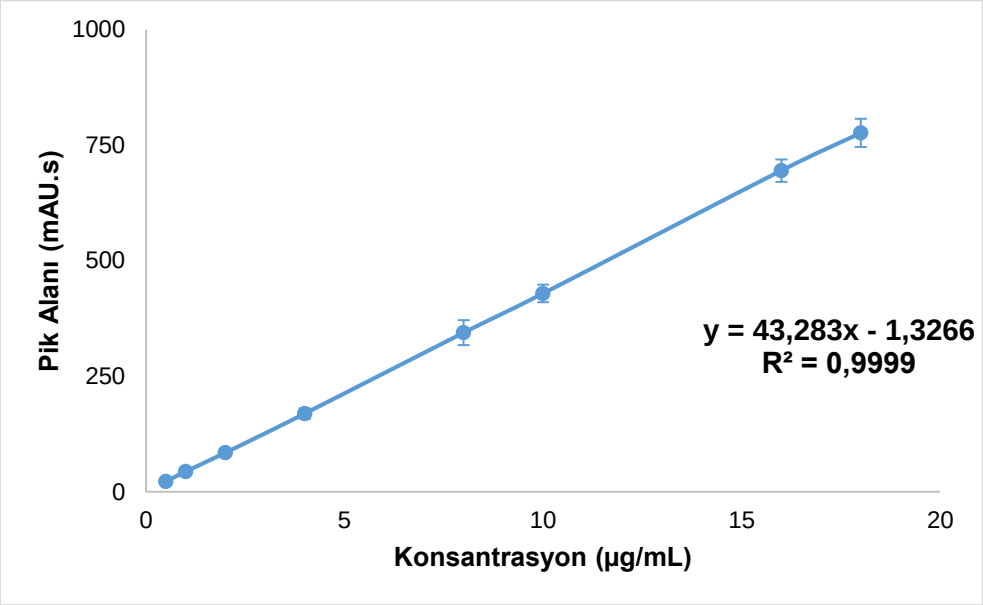
Sıcaklık (°C)	**Zaman (Saat)**	**EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**
25 ± 0,5	0	10	10,1 ± 0,0
	24	10	10,1 ± 0,0
37 ± 0,5	0	10	10,1 ± 0,0
	24	10	10,2 ± 0,1

(Ort ± SS, n=3)

EKM'nin asetonitril ortamındaki validasyonu

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması asetonitril ortamında 0,5 µg/mL - 18 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 8 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.15'te sunulmuştur.



Şekil 4.15. EKM'nin asetonitril ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=8)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin asetonitril ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin asetonitril ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. EKM'nin asetonitril ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,0
2	10	10,0
3	10	10,0
4	10	10,0
5	10	10,0
6	10	10,0
7	10	10,0
8	10	10,0
9	10	10,0
10	10	10,0
Ort		10,0
SS		0,0
VK		0,1

Çizelge 4.11. EKM'nin asetonitril ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	8,00	8,05	8,10	8,05	0,05	0,6
10	9,93	9,98	10,0	9,97	0,0	0,4
12	12,0	12,2	12,2	12,2	0,1	0,8

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin asetonitril ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 15 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.12'de sunulmuştur.

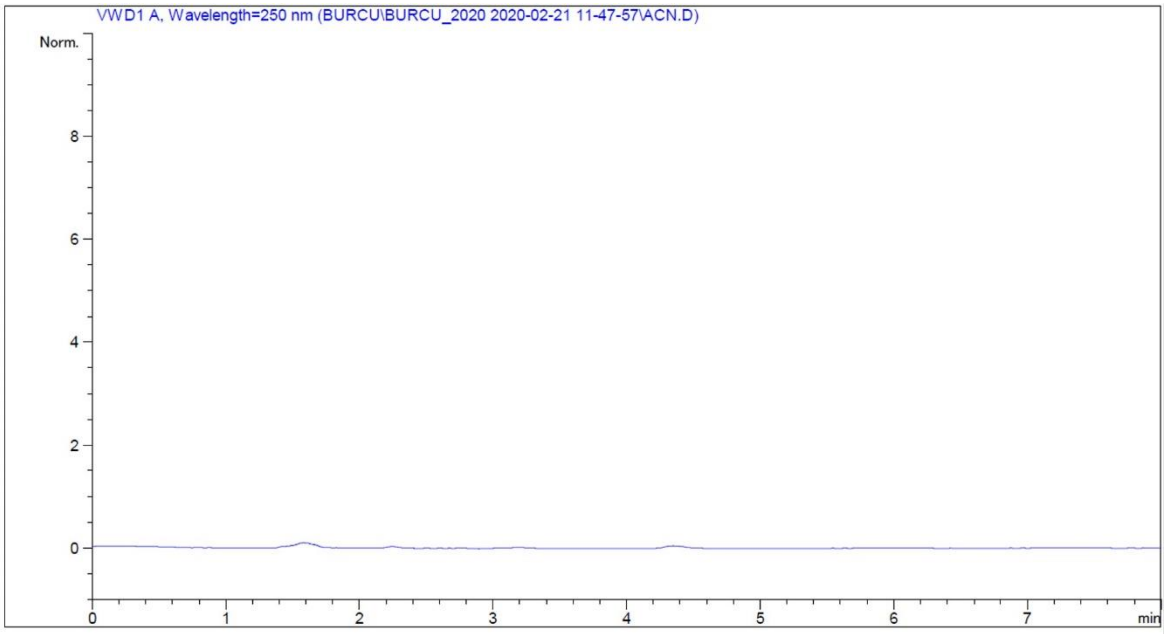
Çizelge 4.12. EKM'nin asetonitril ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
5	4,97 ± 0,01	99,4	0,3
10	10,1 ± 0,1	101,4	1,6
15	15,3 ± 0,0	102,0	0,1

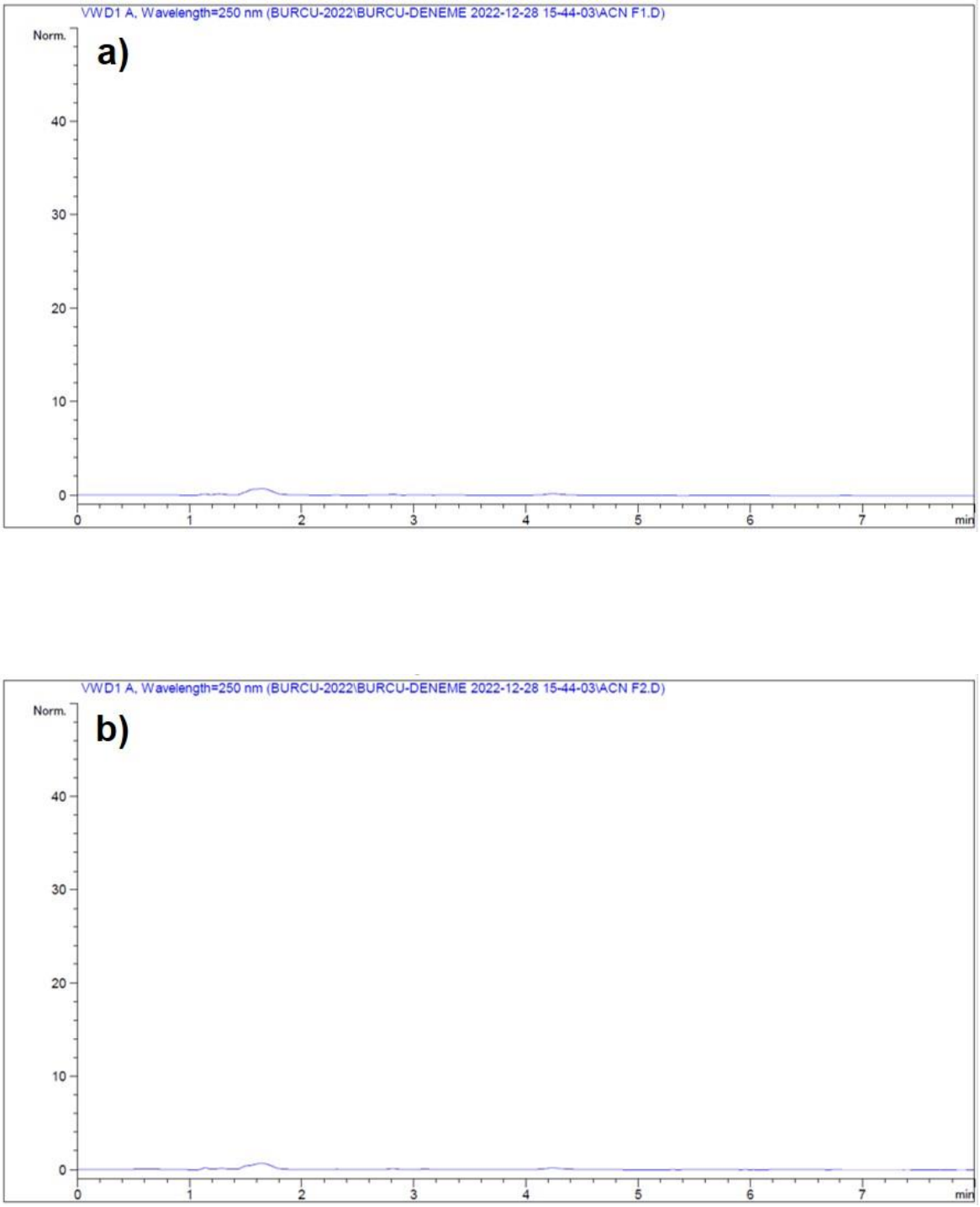
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

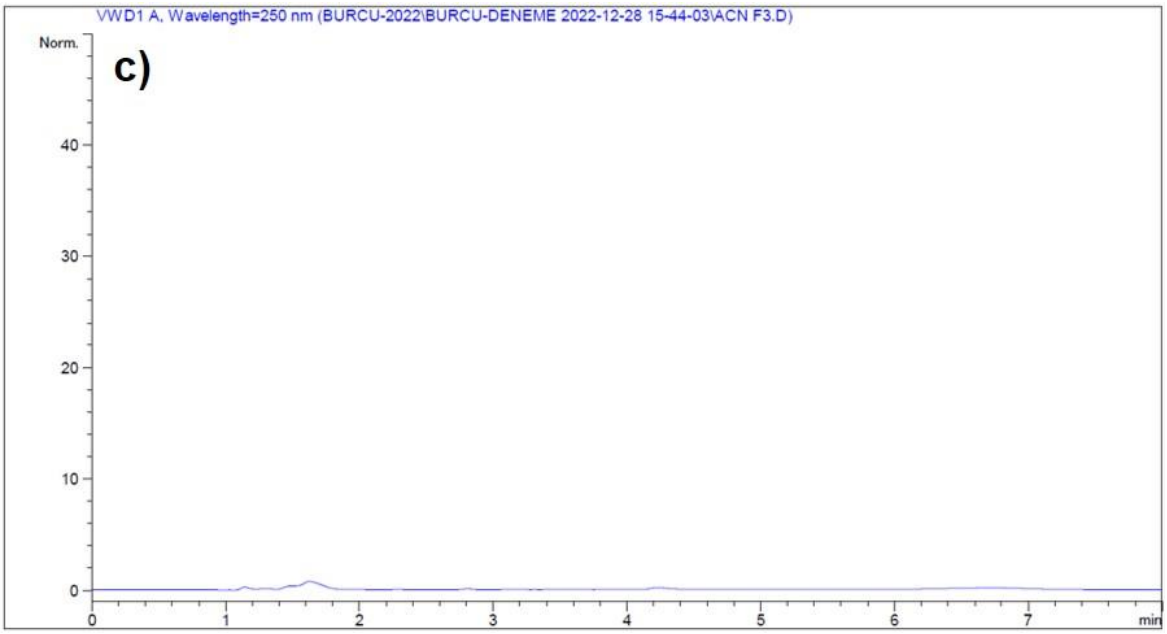
Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. Asetonitril ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin asetonitril ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.16 - Şekil 4.18'de sunulmuştur.

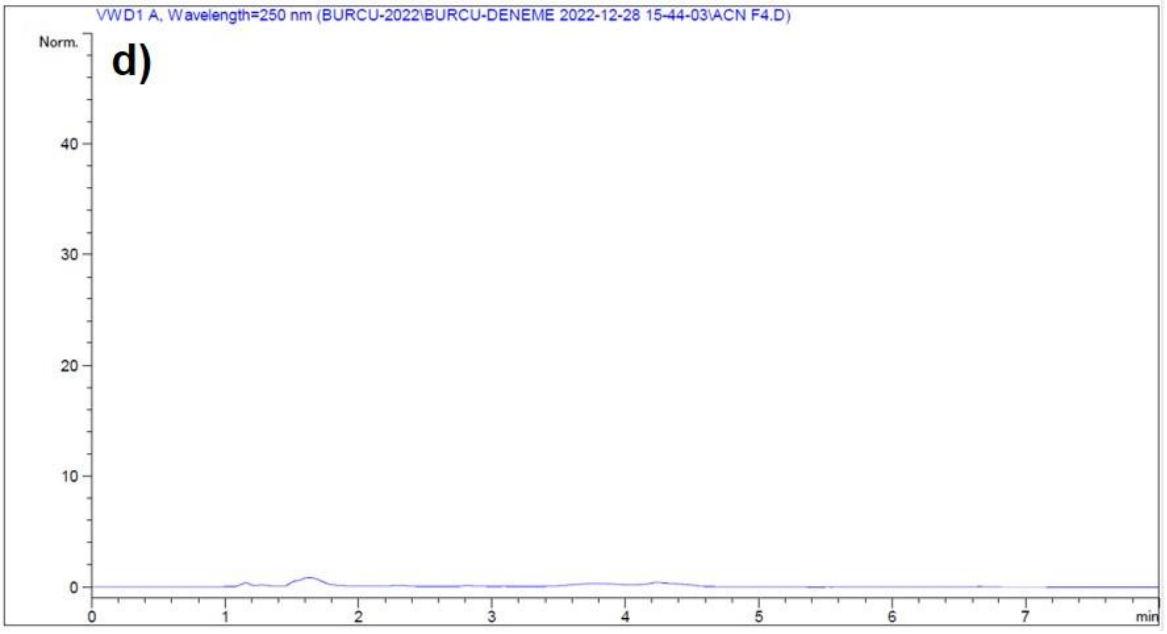


Şekil 4.16. Asetonitril ortamına ait kromatogram

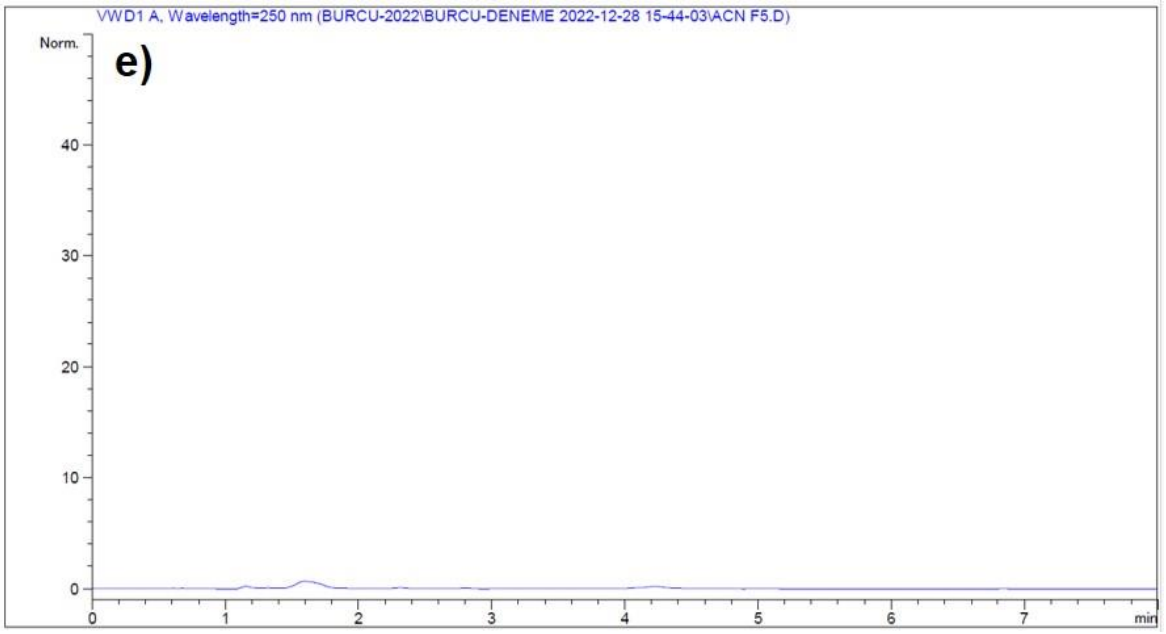


Şekil 4.17. EKM içermeyen formülasyonların asetonitril ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

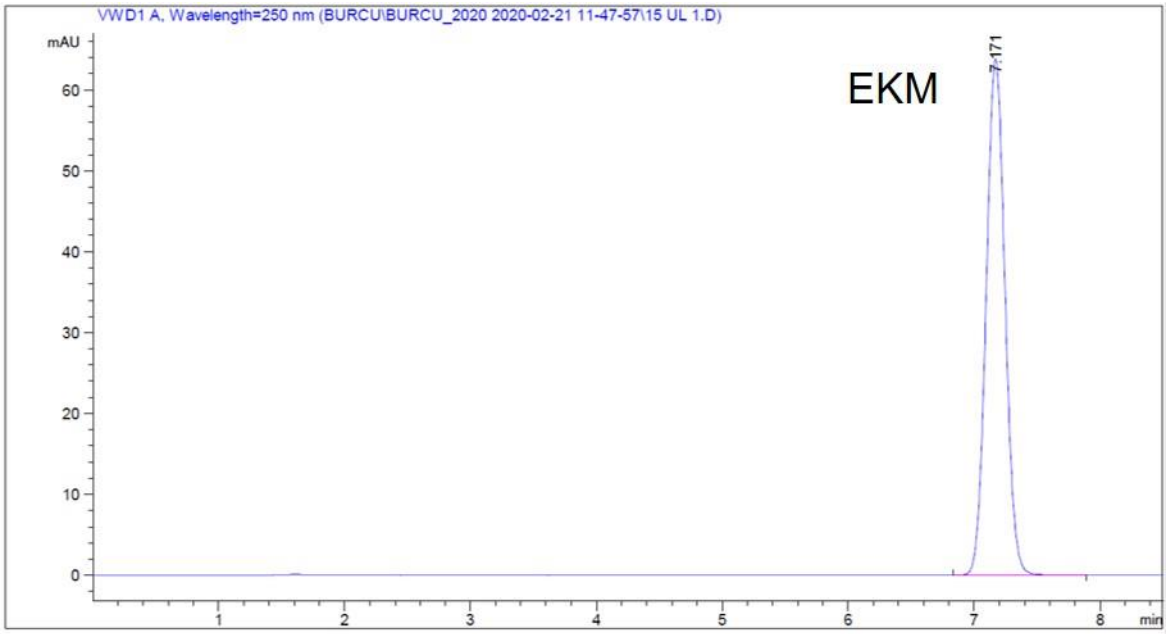




Şekil 4.17. (devam) EKM içermeyen formülasyonların asetonitril ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



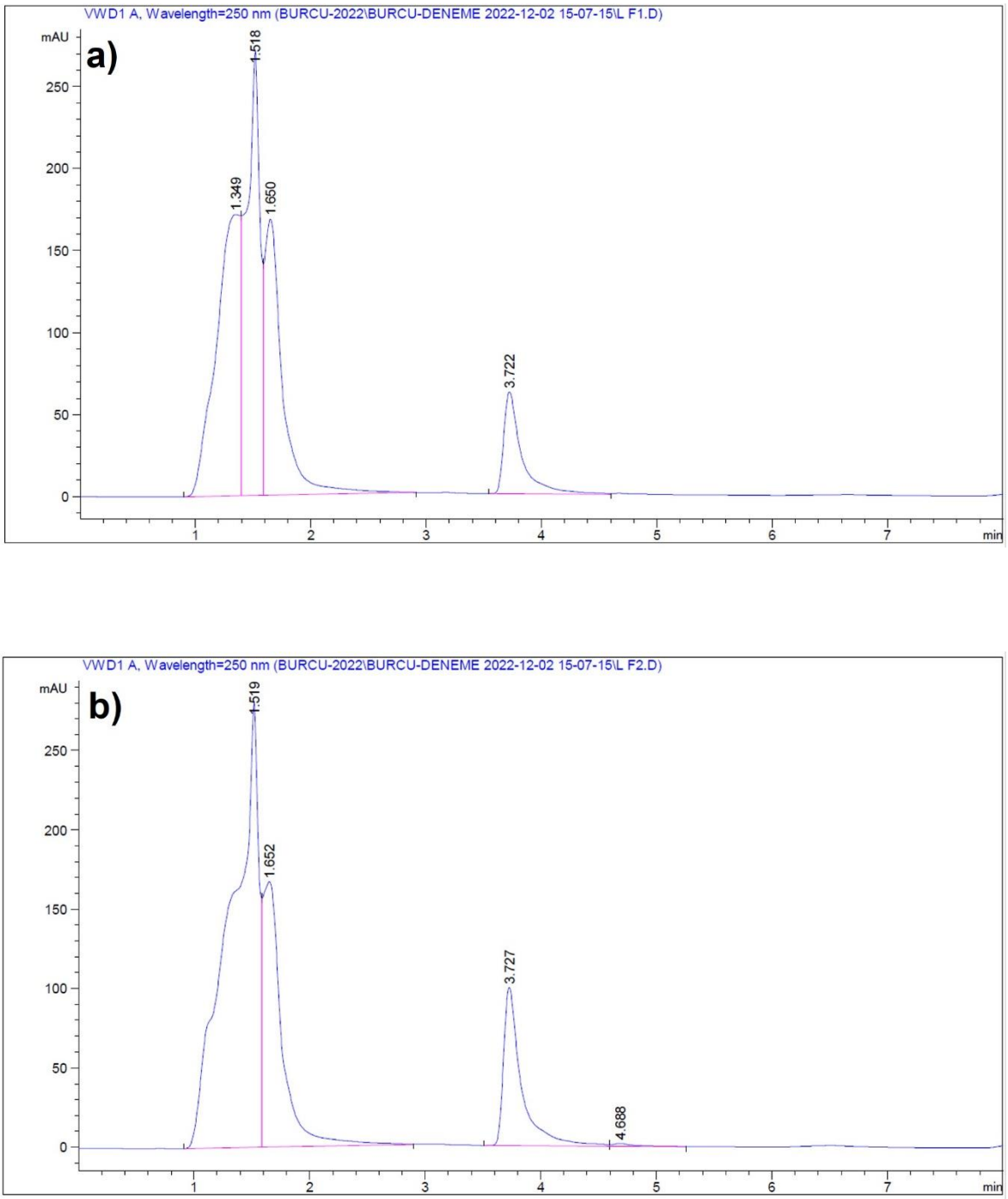
Şekil 4.17. (devam) EKM içermeyen formülasyonların asetonitril ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



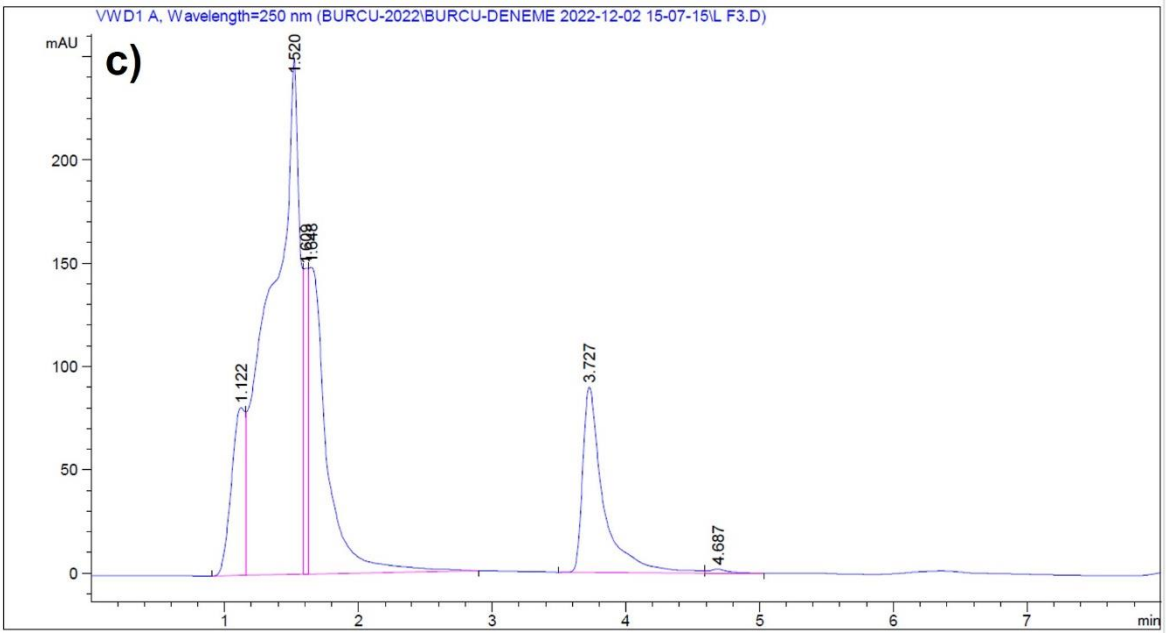
Şekil 4.18. 15 µg/mL EKM'nin asetonitril ortamındaki kromatogramı

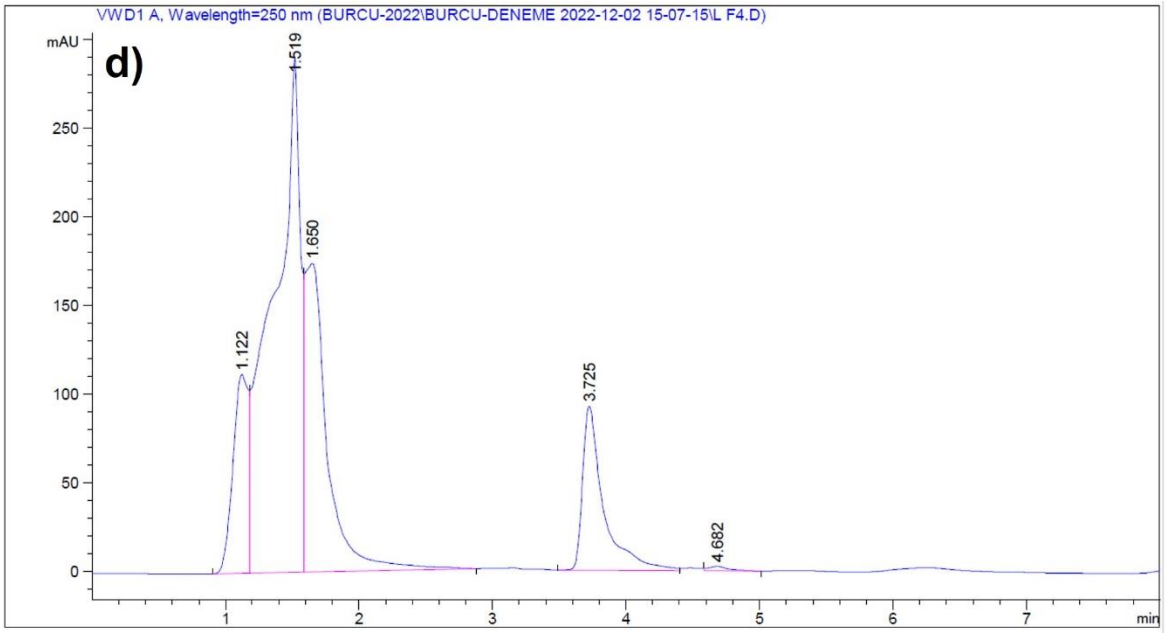
İn vitro lipoliz çalışmasında belirli dakikalarda alınan örnekler asetonitril ile seyreltildiği için lipoliz ortamında kullanılan maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin de kontrolü yapılmıştır. EKM içermeyen

formülasyonların ve EKM'nin enzim içeren lipoliz ortamındaki özgünlük seçicilik kromatogramları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de sunulmuştur.

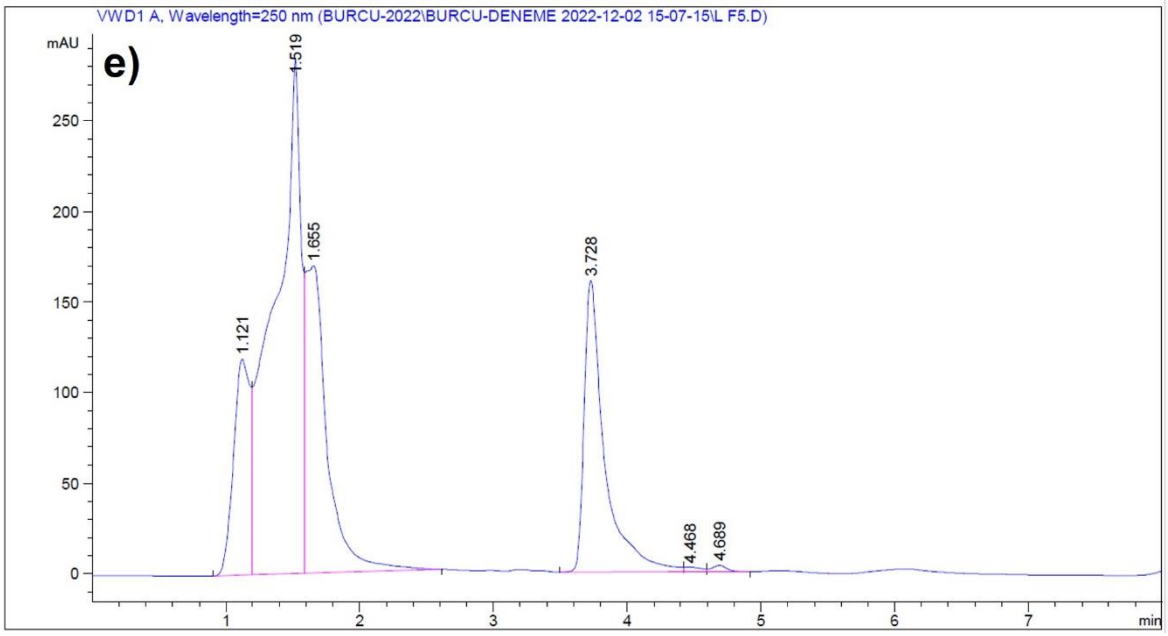


Şekil 4.19. EKM içermeyen formülasyonların lipoliz ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

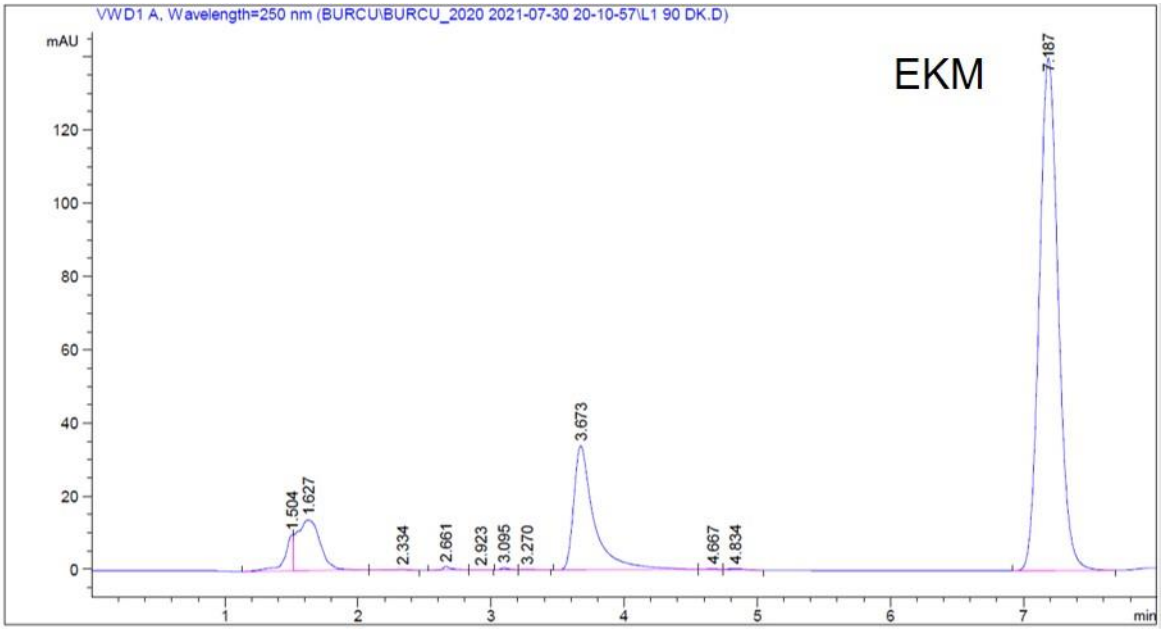




Şekil 4.19. (devam) EKM içermeyen formülasyonların lipoliz ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.19. (devam) EKM içermeyen formülasyonların lipoliz ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.20. EKM'nin lipoliz ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin asetonitril ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,07 µg/mL LOQ değeri 0,21 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin asetonitril ortamında stabilitesini göstermek için 10 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. EKM'nin asetonitril ortamında stabilite sonuçları

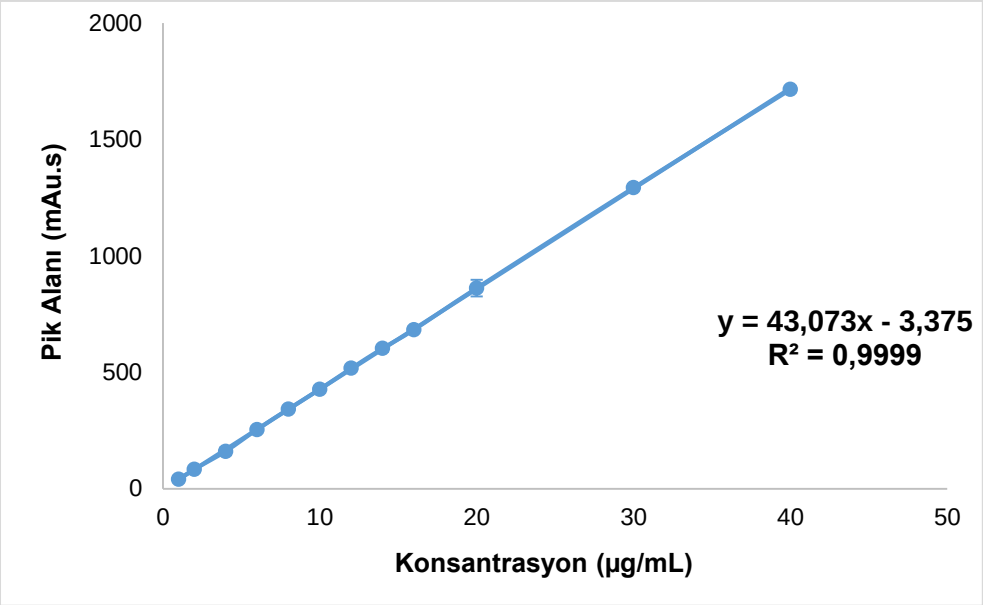
Sıcaklık (°C)	**Zaman (Saat)**	**EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**
25 ± 0,5	0	10	10,0 ± 0,0
	24	10	10,2 ± 0,0
37 ± 0,5	0	10	10,0 ± 0,0
	24	10	10,2 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

<u>EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki validasyonu</u>

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması %0,5 SLS çözeltisi ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 12 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,0
2	10	10,0
3	10	10,0
4	10	10,0
5	10	10,0
6	10	10,0
7	10	10,0
8	10	10,0
9	10	10,0
10	10	10,0
Ort		10,0
SS		0,0
VK		0,2

Çizelge 4.15. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	8,11	8,10	8,10	8,11	0,00	0,1
10	10,2	10,2	10,7	10,2	0,0	0,2
12	12,1	12,2	12,2	12,2	0,0	0,2

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur.

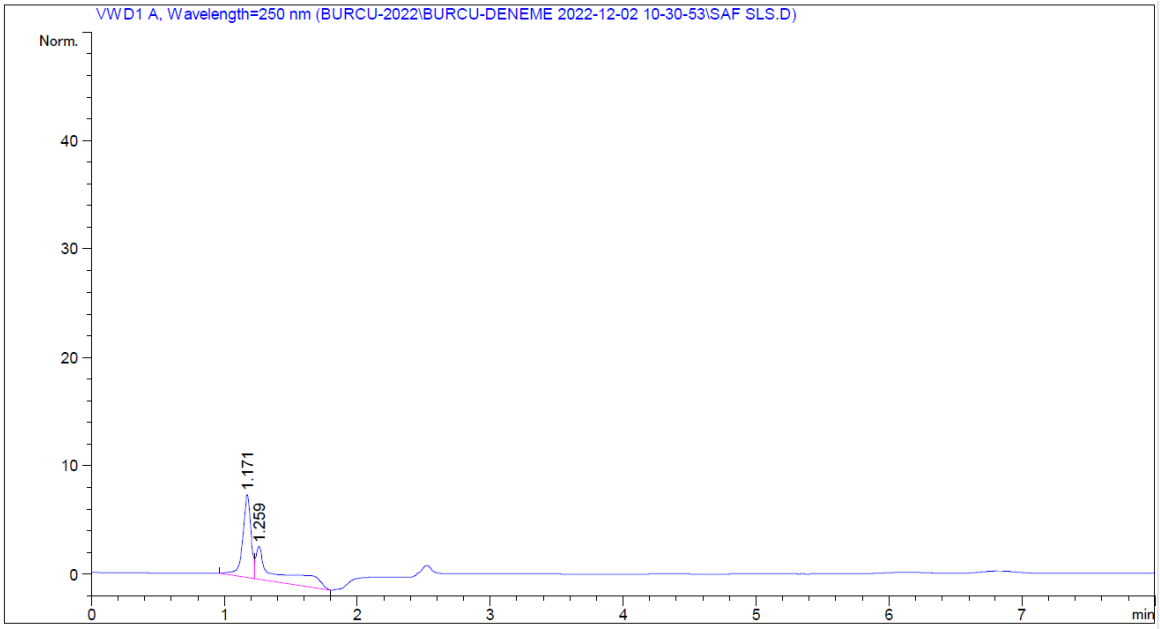
Çizelge 4.16. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	8,09 ± 0,01	101,1	0,2
10	10,1 ± 0,0	101,4	0,1
12	11,9 ± 0,0	99,4	0,1

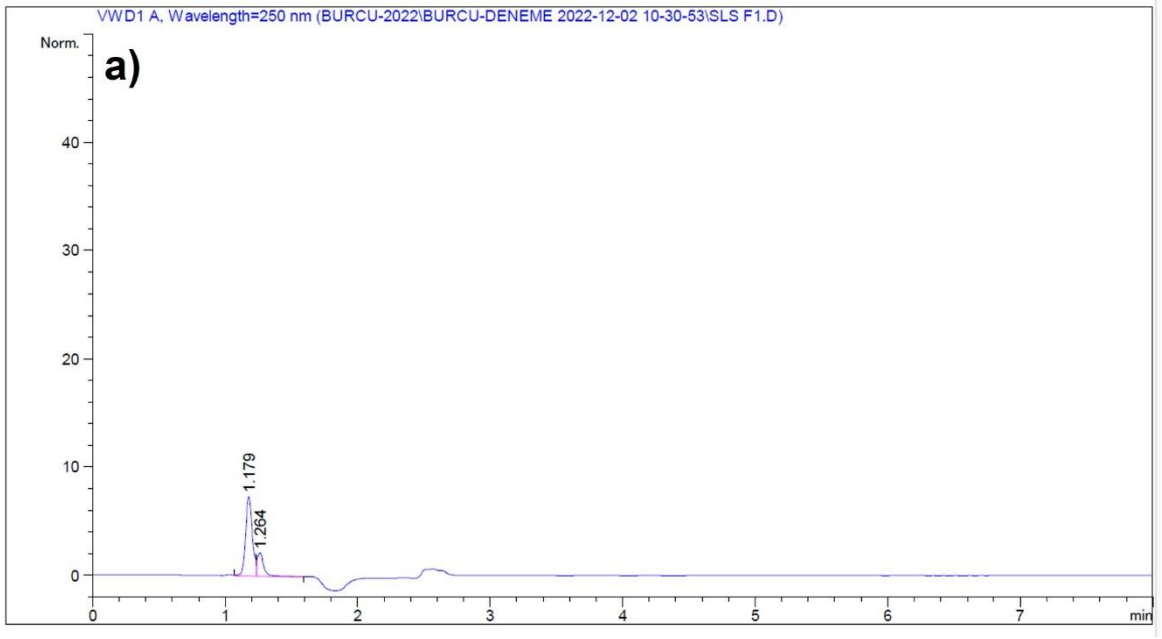
(Ort ± SS, n=3)

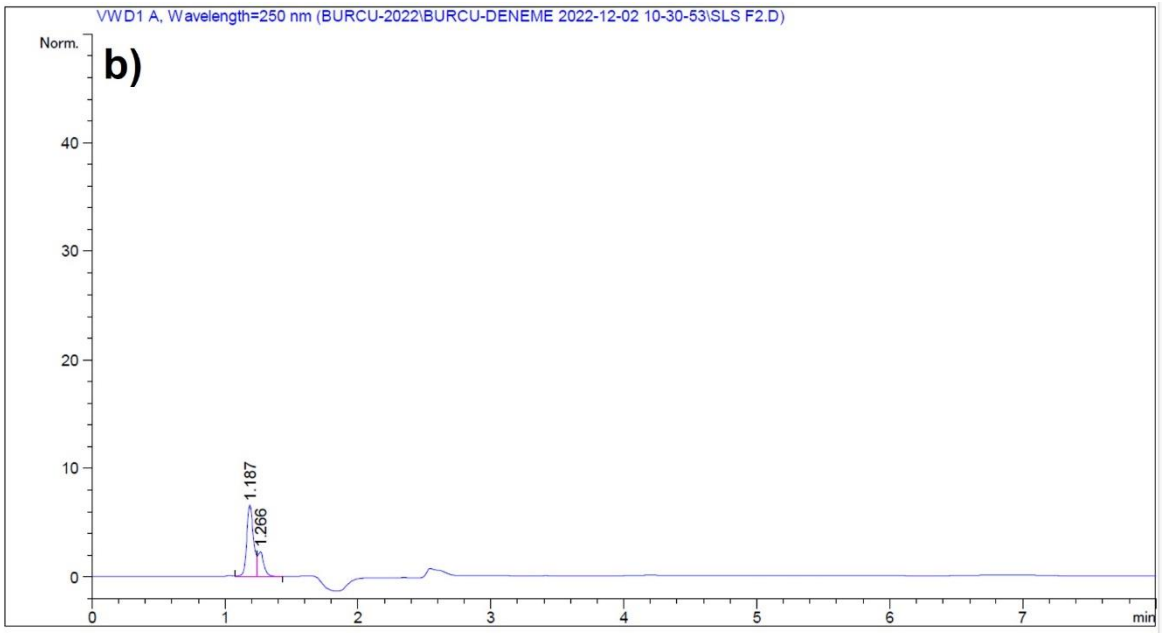
Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. %0,5 SLS çözeltisi ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.22 - Şekil 4.24'te sunulmuştur.

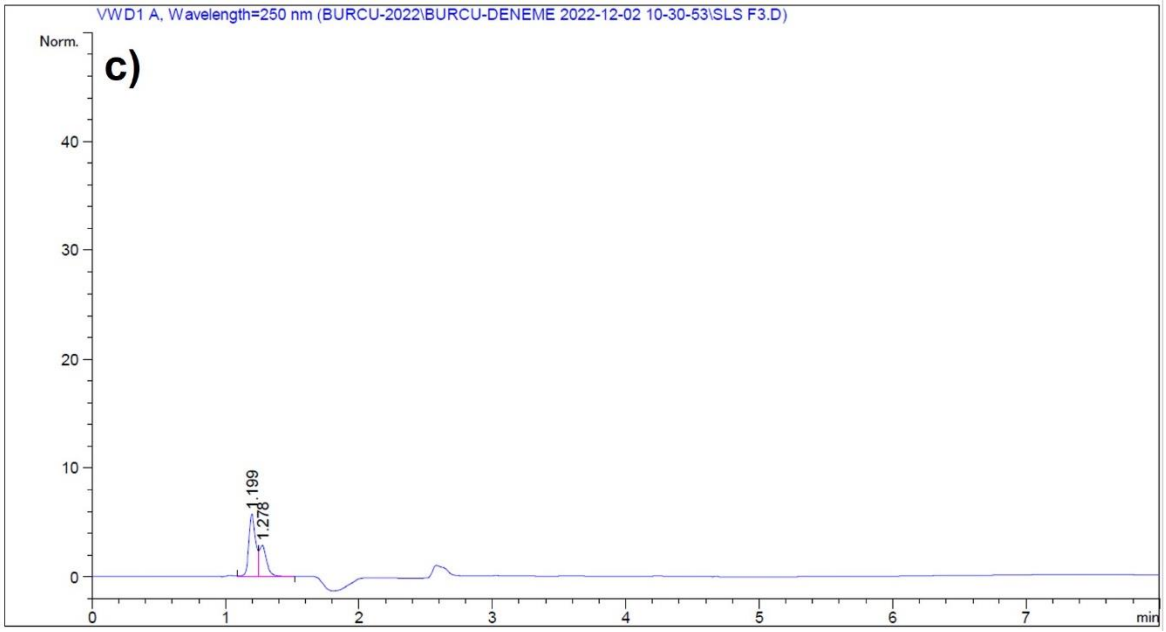


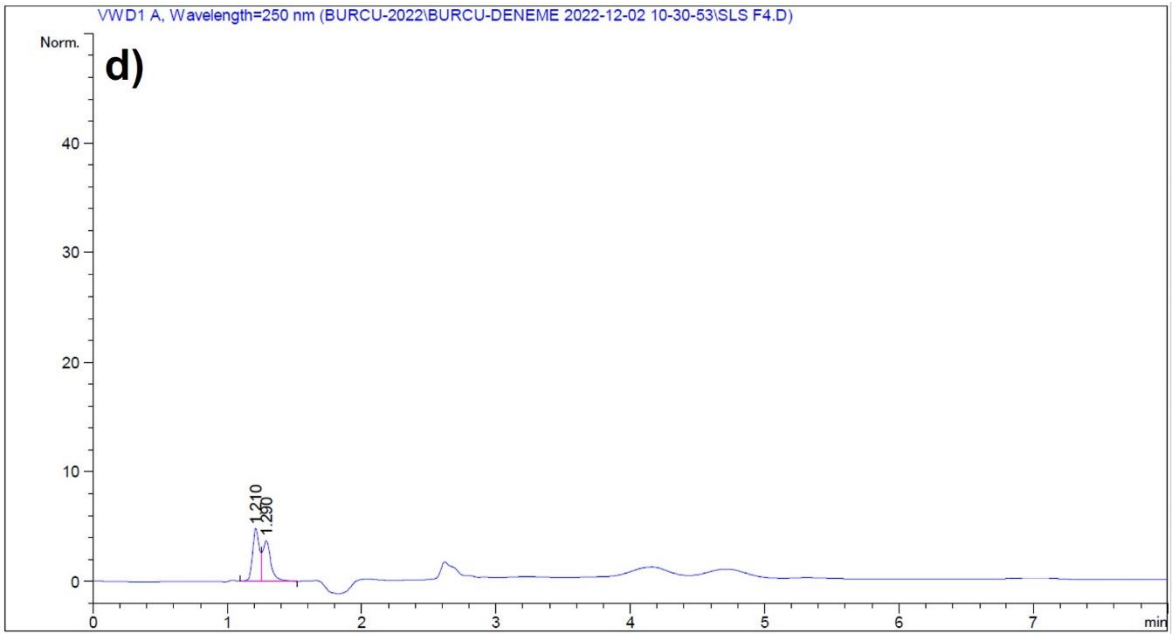
Şekil 4.22. %0,5 SLS çözeltisi ortamına ait kromatogram



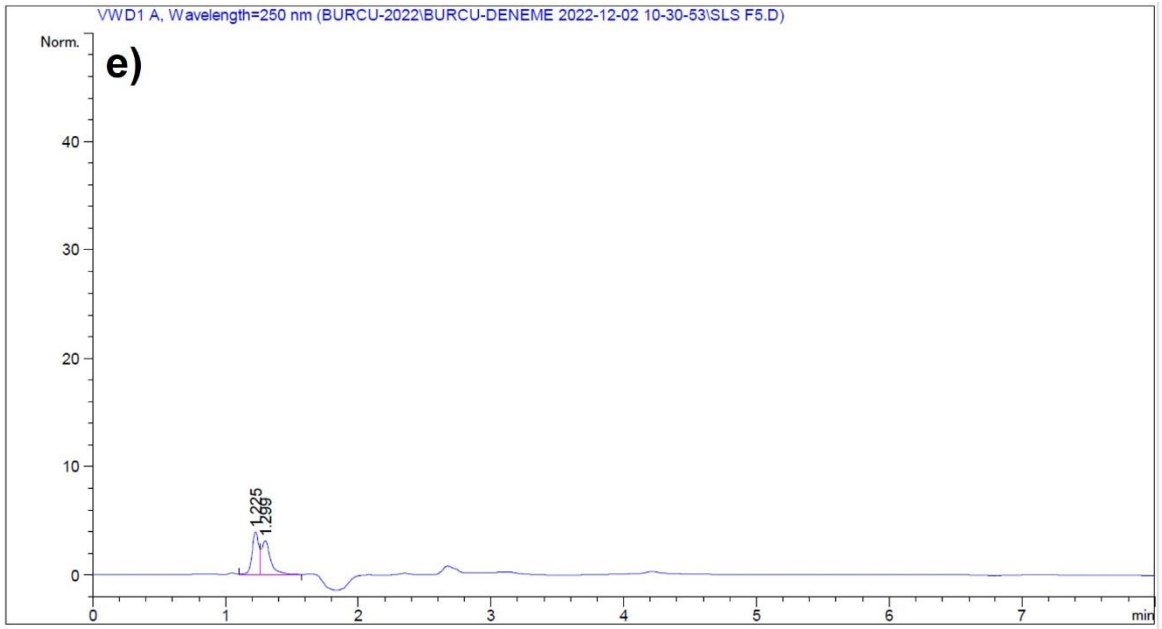


Şekil 4.23. EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

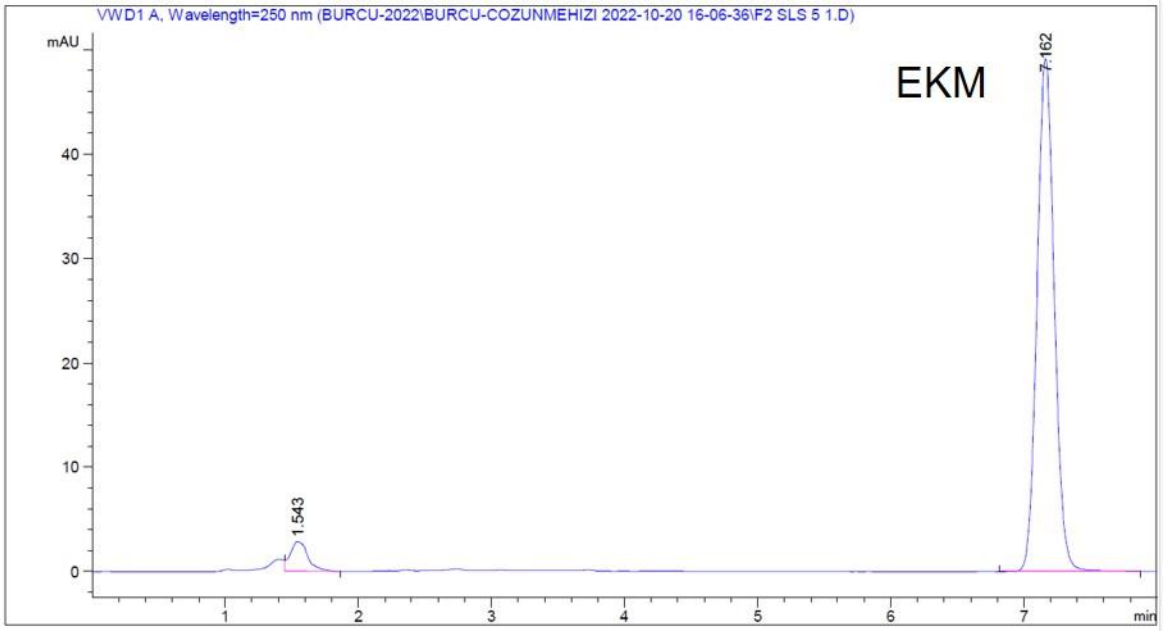




Şekil 4.23. (devam) EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.23. (devam) EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.24. 10 µg/mL EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,08 µg/mL LOQ değeri 0,25 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında stabilitesini göstermek için 10 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. EKM'nin %0,5 SLS çözeltisi ortamında stabilite sonuçları

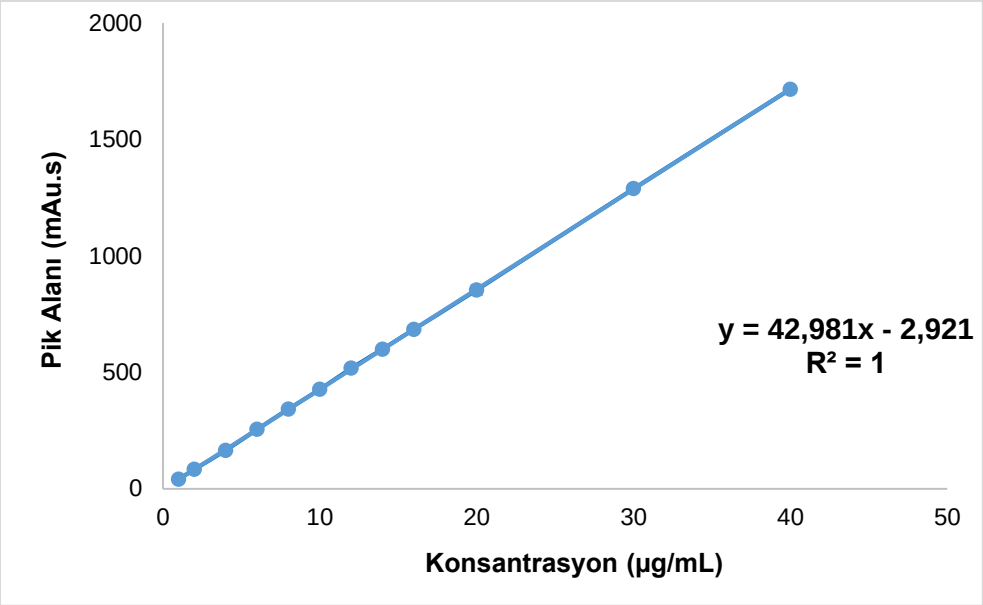
Sıcaklık (°C)	**Zaman (Saat)**	**EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**
25 ± 0,5	0	10	9,98 ± 0,01
	24	10	10,2 ± 0,0
37 ± 0,5	0	10	10,0 ± 0,0
	24	10	10,2 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

<u>EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki validasyonu</u>

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 12 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.25'te sunulmuştur.



Şekil 4.25. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.19'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,1
2	10	10,0
3	10	10,0
4	10	10,0
5	10	10,0
6	10	10,0
7	10	10,0
8	10	10,0
9	10	10,0
10	10	10,0
Ort		10,0
SS		0,0
VK		0,2

Çizelge 4.19. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	8,12	8,11	8,11	8,11	0,00	0,1
10	10,3	10,3	10,3	10,3	0,0	0,0
12	12,1	12,2	12,2	12,2	0,0	0,2

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.20'de sunulmuştur.

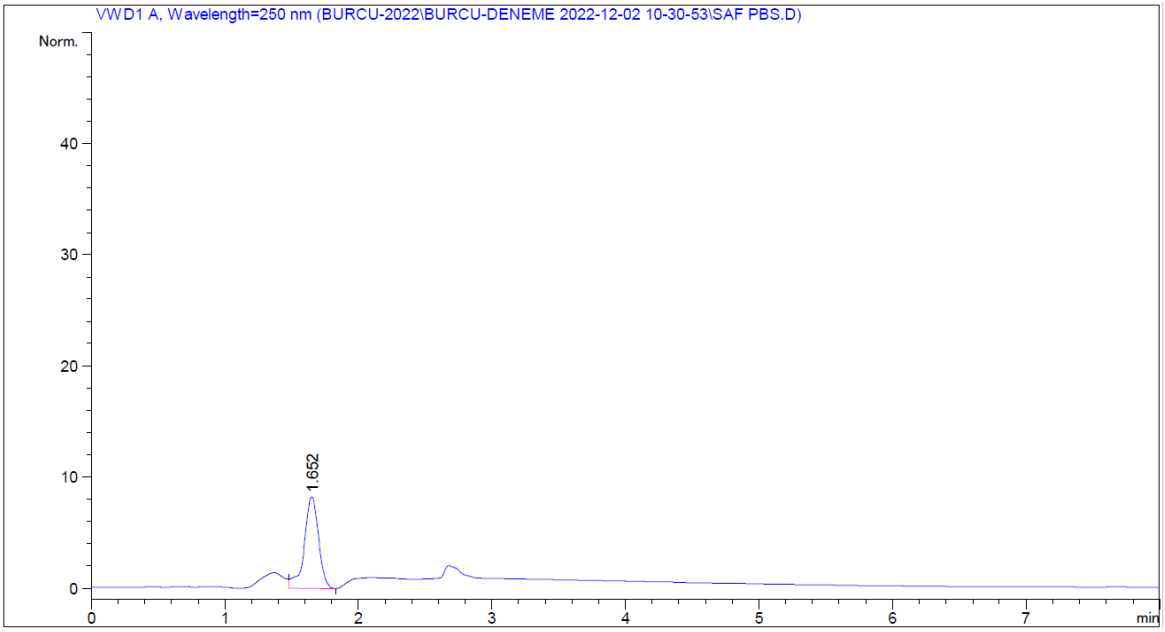
Çizelge 4.20. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	8,13 ± 0,02	101,6	0,2
10	10,3 ± 0,0	102,5	0,2
12	12,1 ± 0,0	101,2	0,2

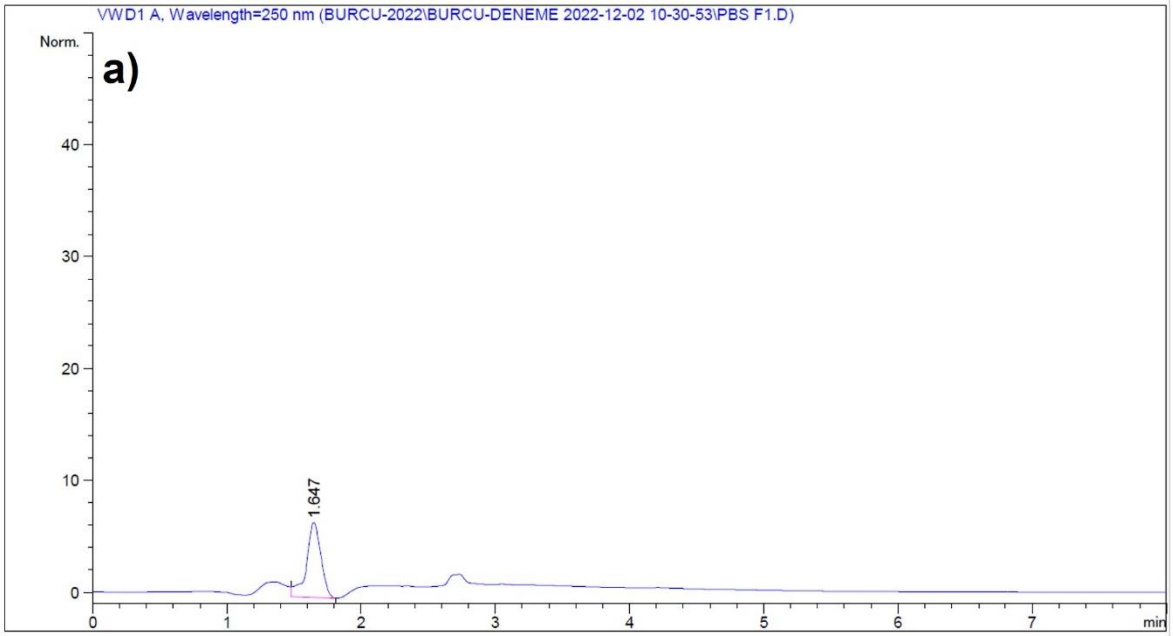
(Ort ± SS, n=3)

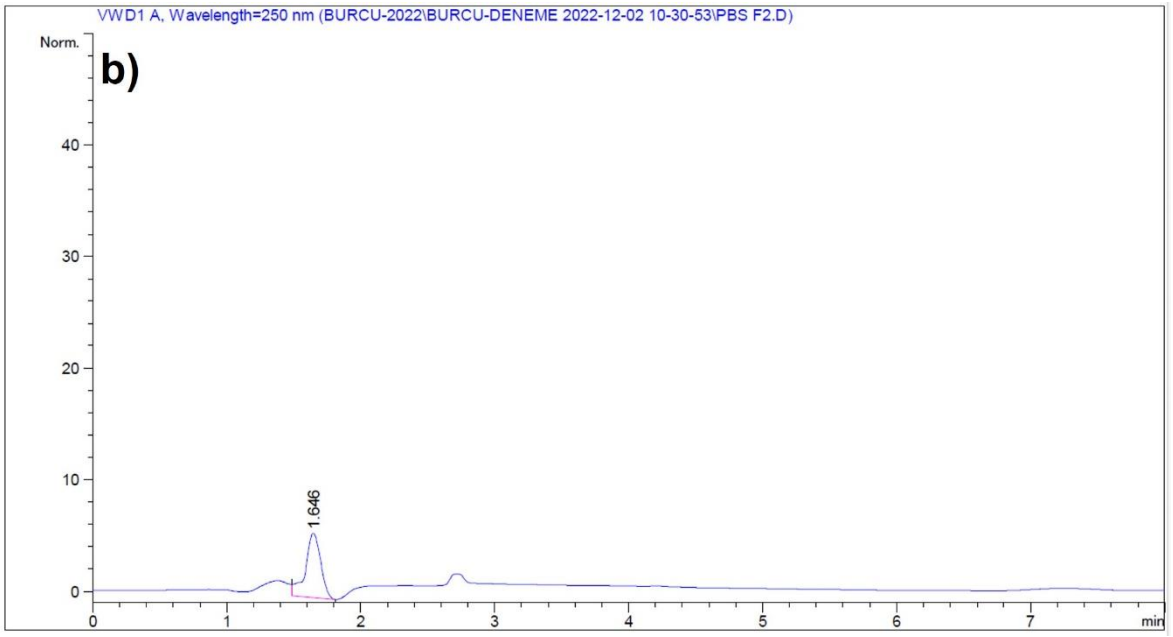
Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. Ex-vivo permeabilite çalışmasında kullanılmak üzere valide edilen yöntemde kullanılan verici hücre ortamı ve domuz bağırsağının da EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.26 - Şekil 4.28'de sunulmuştur.

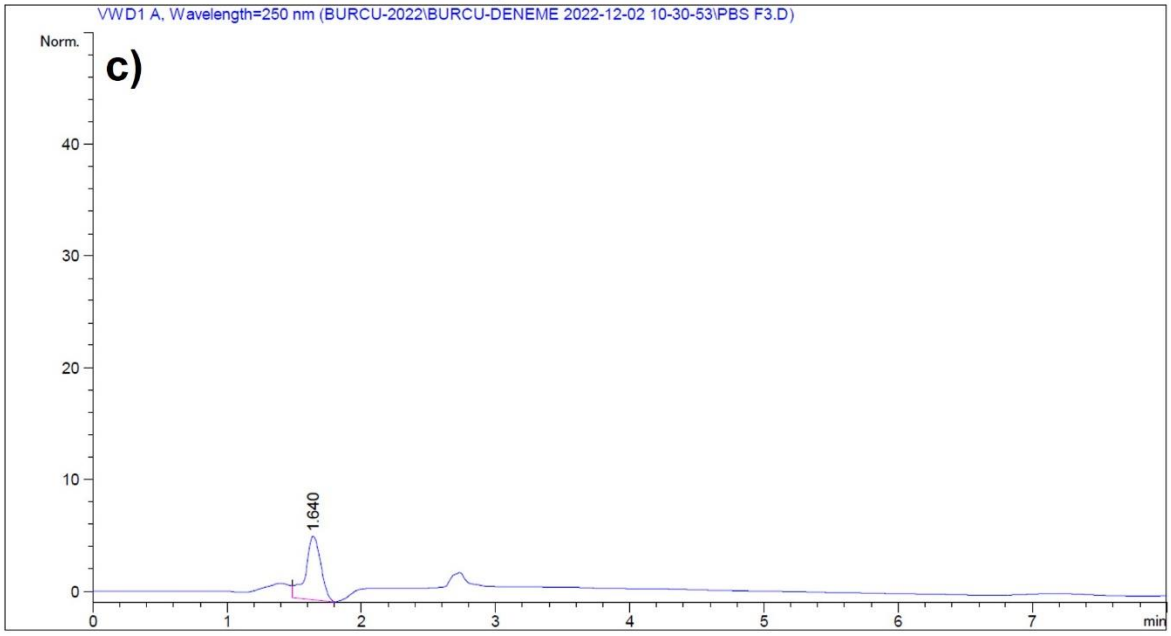


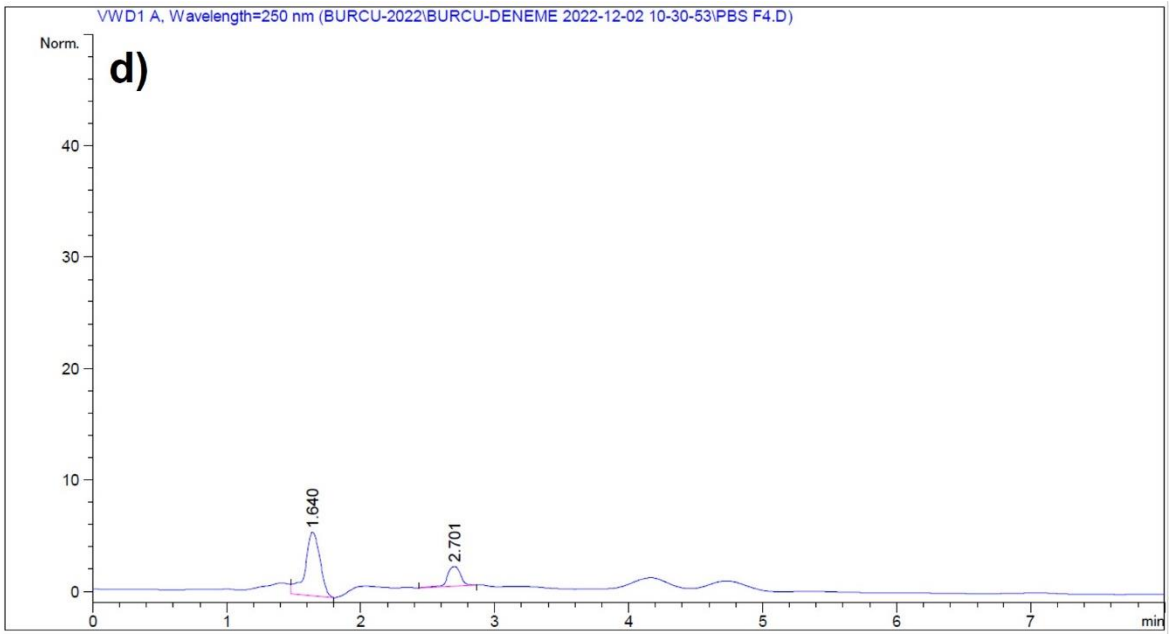
Şekil 4.26. %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamına ait kromatogram



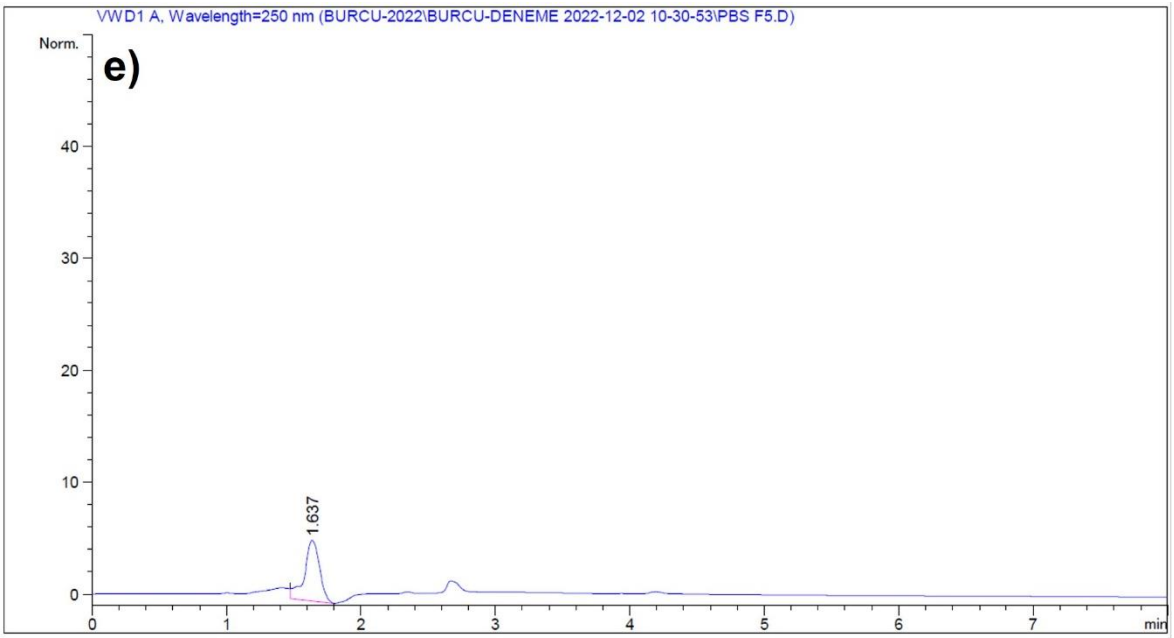


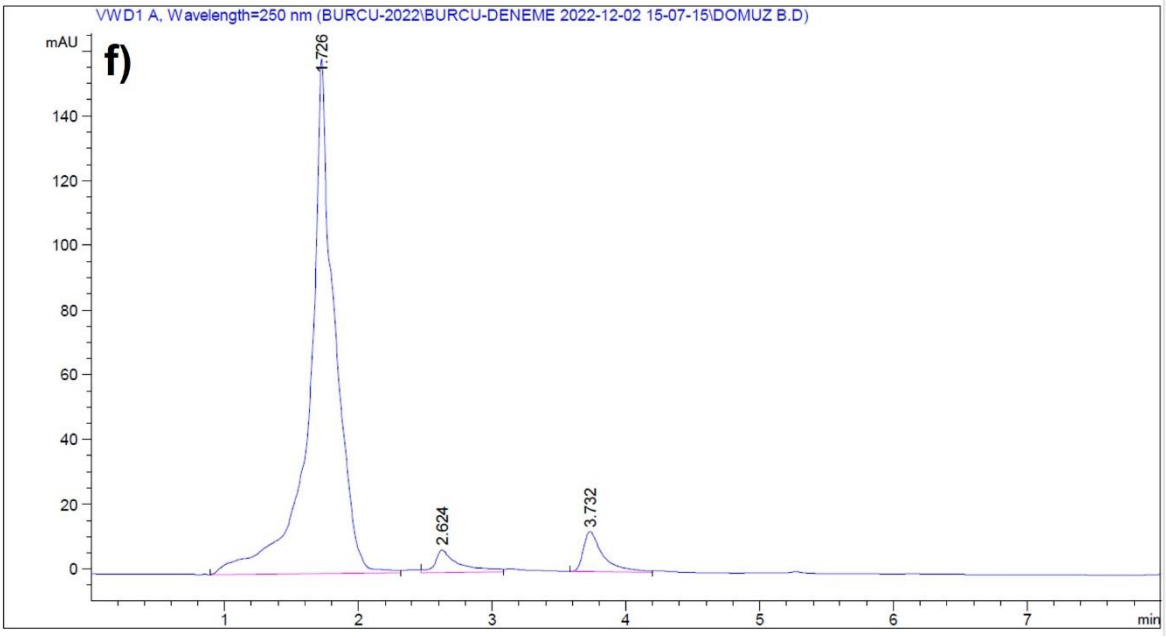
Şekil 4.27. EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Verici hücre ortamı ve domuz bağırsağı



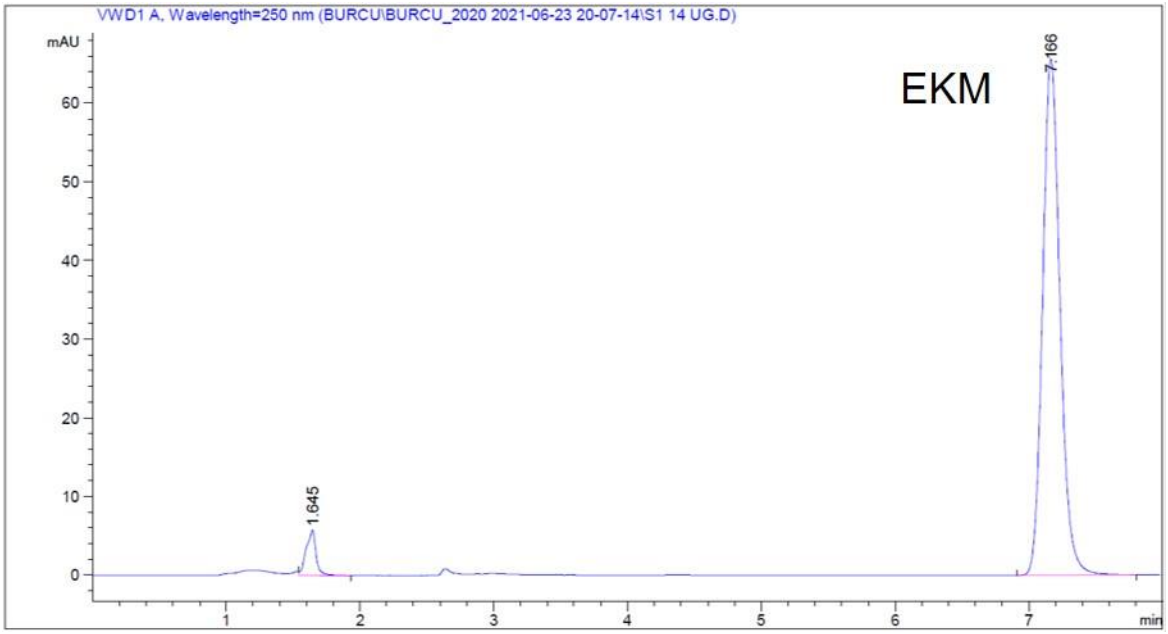


Şekil 4.27. (devam) EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Verici hücre ortamı ve domuz bağırsağı





Şekil 4.27. (devam) EKM içermeyen formülasyonların %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Verici hücre ortamı ve domuz bağırsağı



Şekil 4.28. 14 µg/mL EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,06 µg/mL LOQ değeri 0,19 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında stabilitesini göstermek için 10 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. EKM'nin %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında stabilite sonuçları

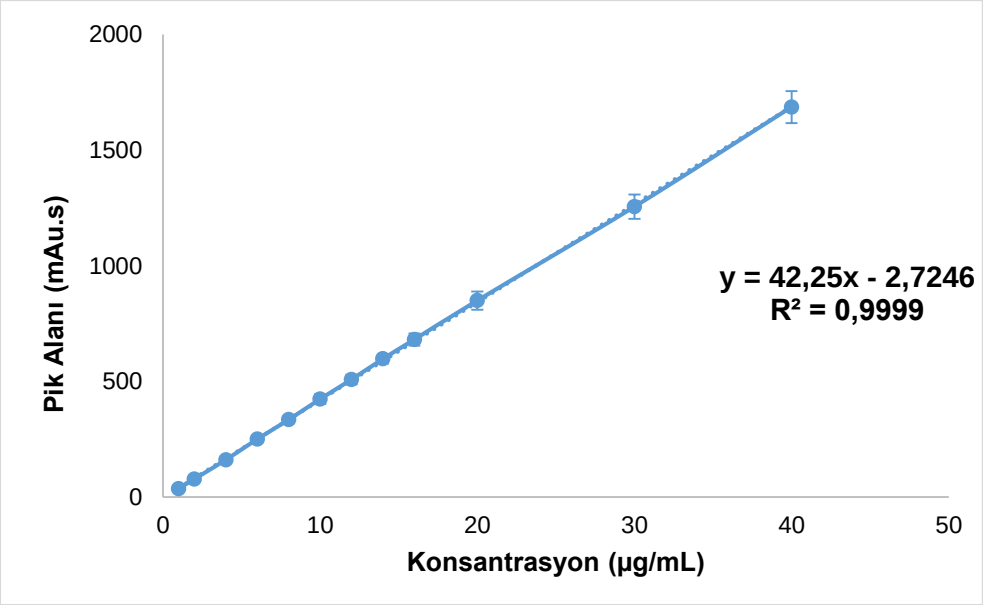
Sıcaklık (°C)	Zaman (Saat)	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
25 ± 0,5	0	10	10,3 ± 0,0
	24	10	10,3 ± 0,0
37 ± 0,5	0	10	10,0 ± 0,0
	24	10	10,3 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

EKM'nin FaSSIF tamponu ortamındaki validasyonu

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması FaSSIF ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 12 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.29'da sunulmuştur.



Şekil 4.29. EKM'nin FaSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin FaSSIF ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.22'de gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin FaSSIF ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.23'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. EKM'nin FaSSIF ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,1
2	10	10,6
3	10	10,7
4	10	10,6
5	10	10,7
6	10	10,7
7	10	10,7
8	10	10,6
9	10	10,6
10	10	10,6
Ort		10,6
SS		0,2
VK		1,7

Çizelge 4.23. EKM'nin FaSSIF ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	7,96	7,96	8,01	7,97	0,03	0,3
10	10,3	10,4	10,8	10,5	0,3	2,6
12	12,3	12,4	12,5	12,4	0,1	0,8

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin FaSSIF ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.24'te sunulmuştur.

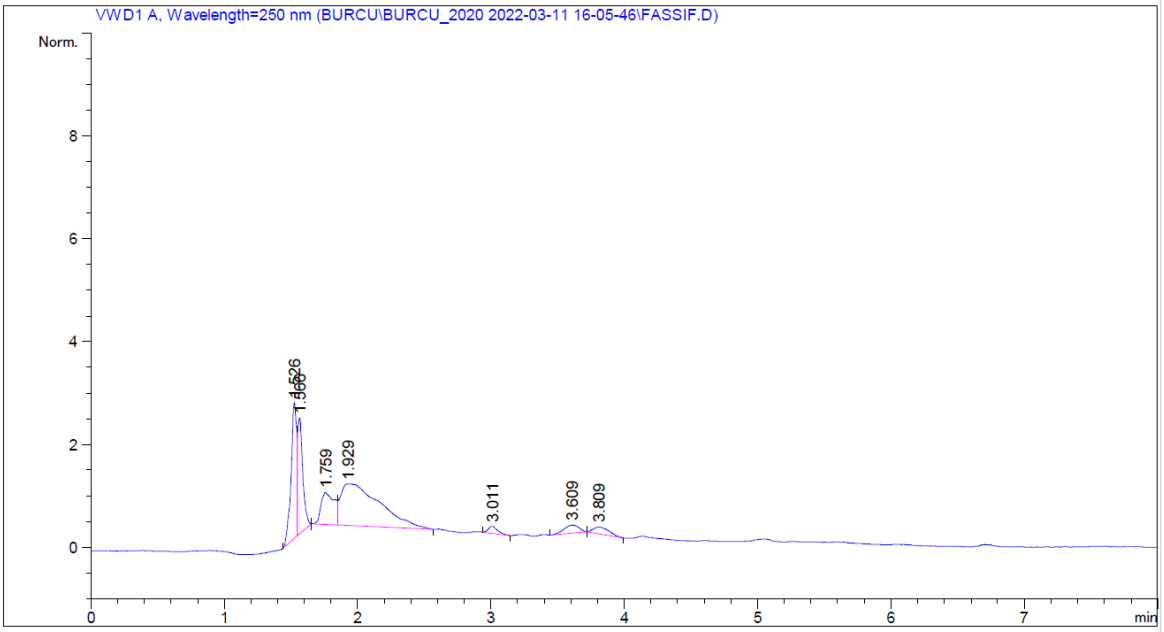
Çizelge 4.24. EKM'nin FaSSIF ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**%Geri elde**	**VK**
8	7,98 ± 0,02	99,8	0,3
10	10,1 ± 0,1	101,2	1,1
12	12,2 ± 0,0	101,6	0,3

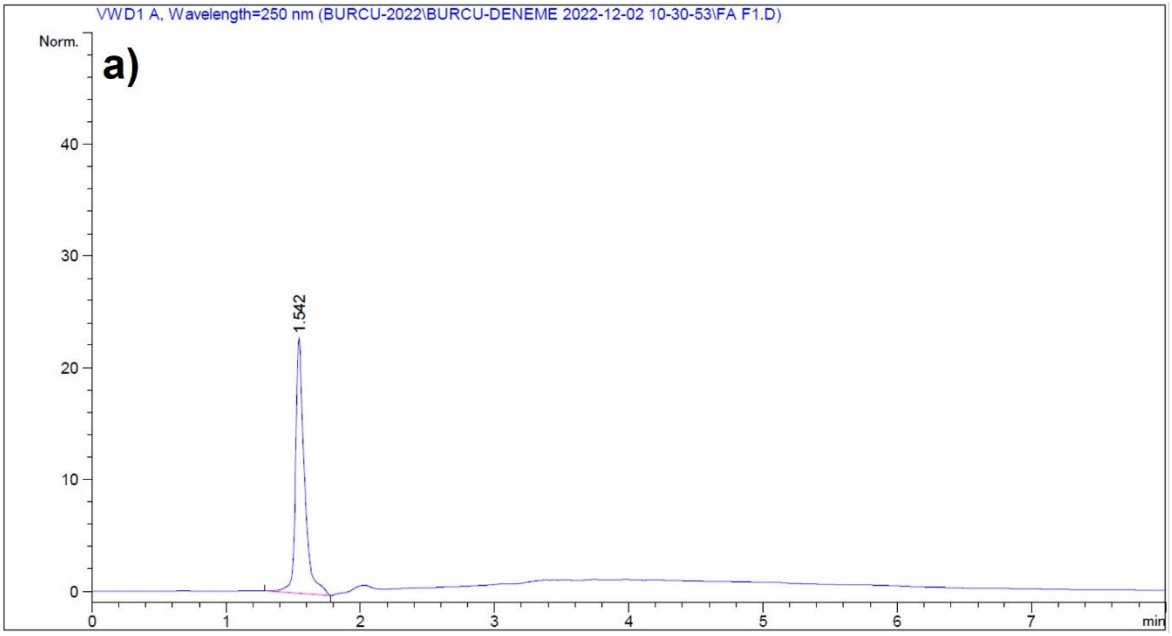
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

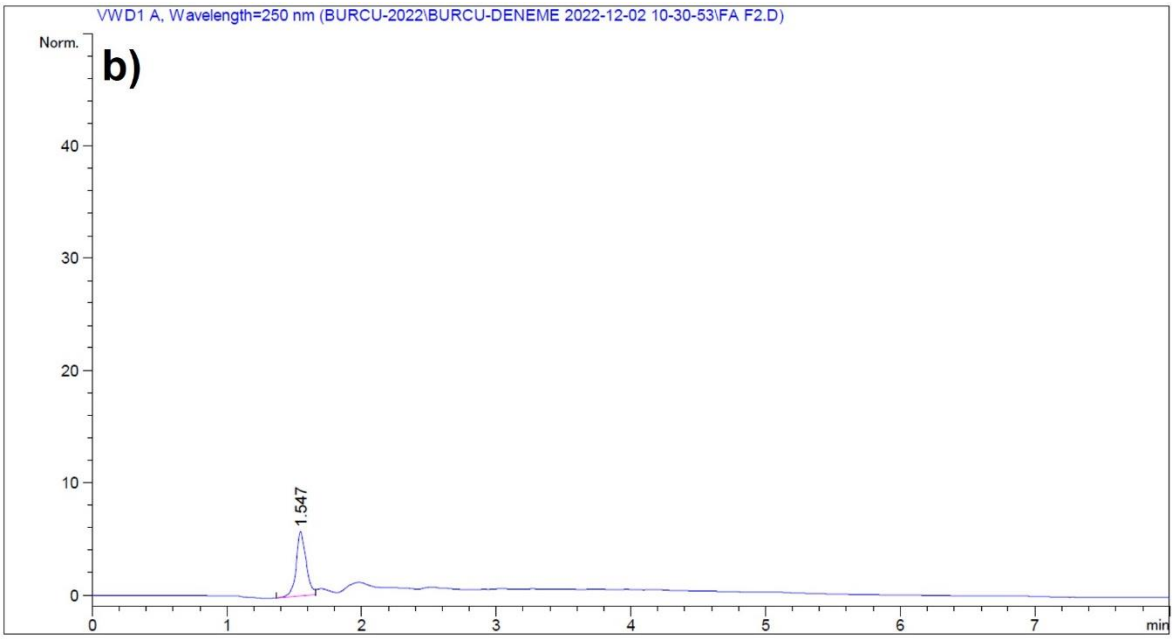
Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. FaSSIF ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin FaSSIF ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.30 - Şekil 4.32'de sunulmuştur.

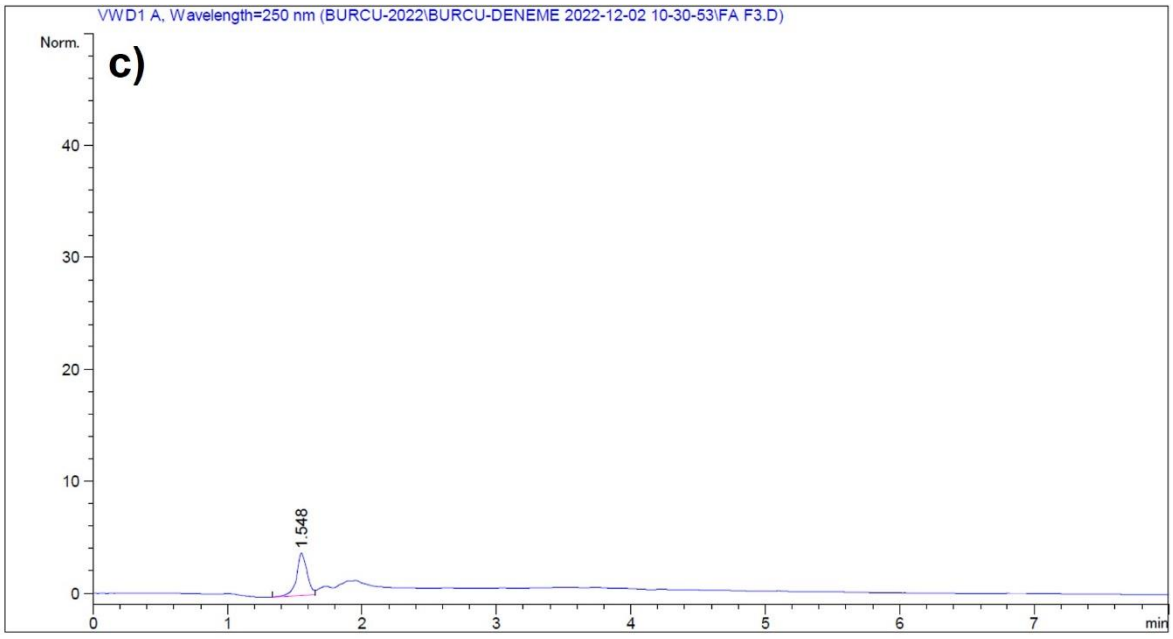


Şekil 4.30. FaSSIF ortamına ait kromatogram

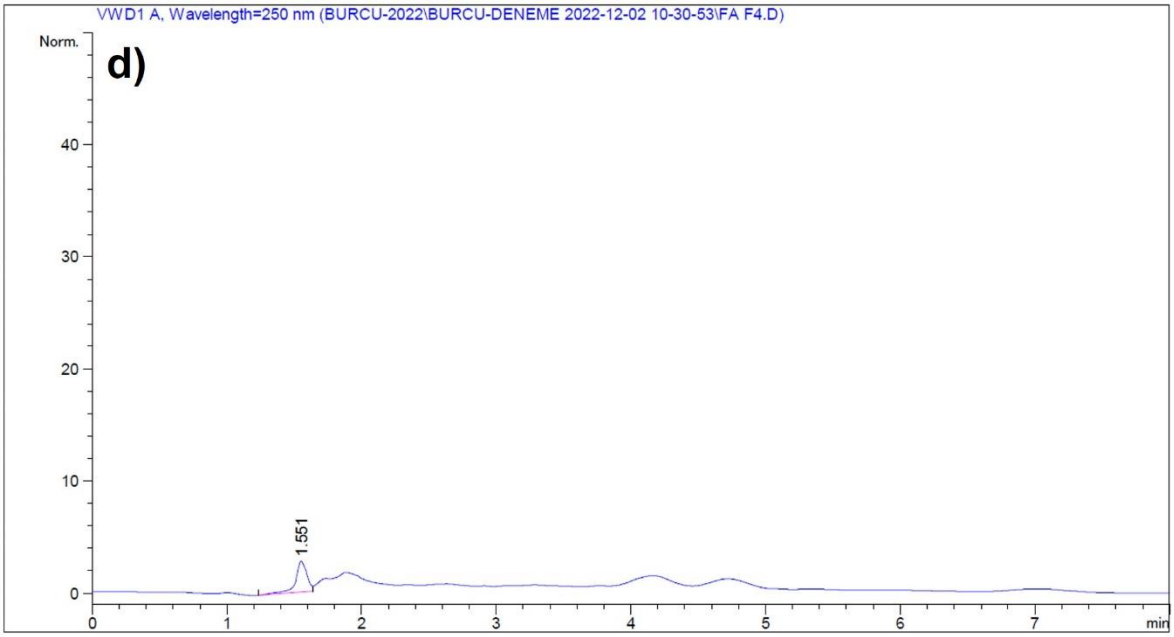


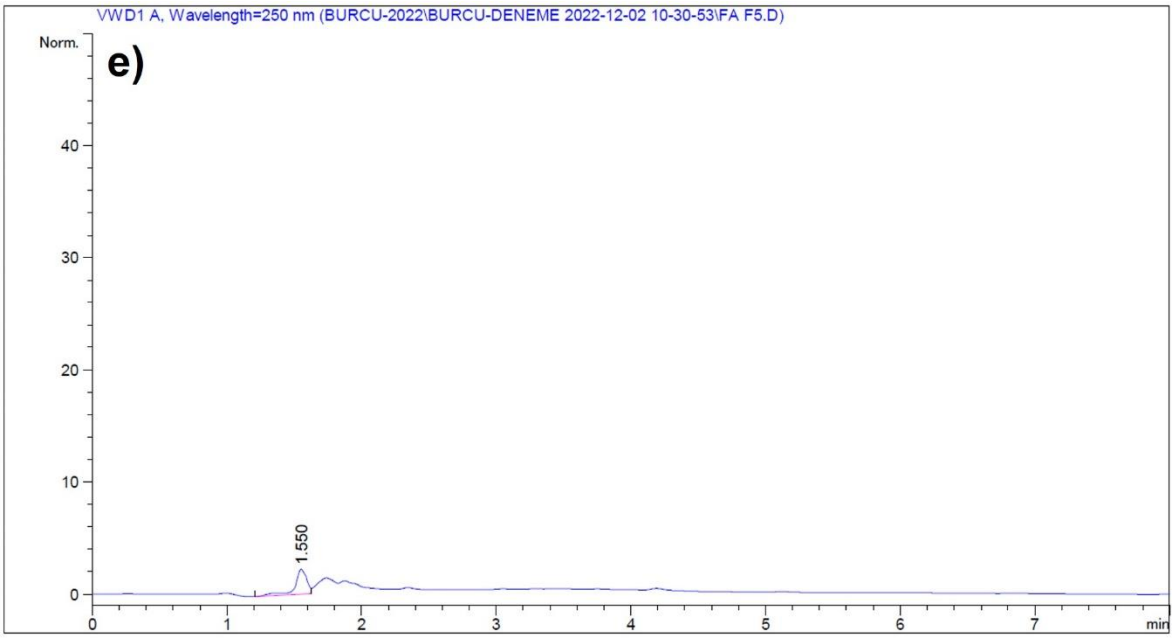
Şekil 4.31. EKM içermeyen formülasyonların FaSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



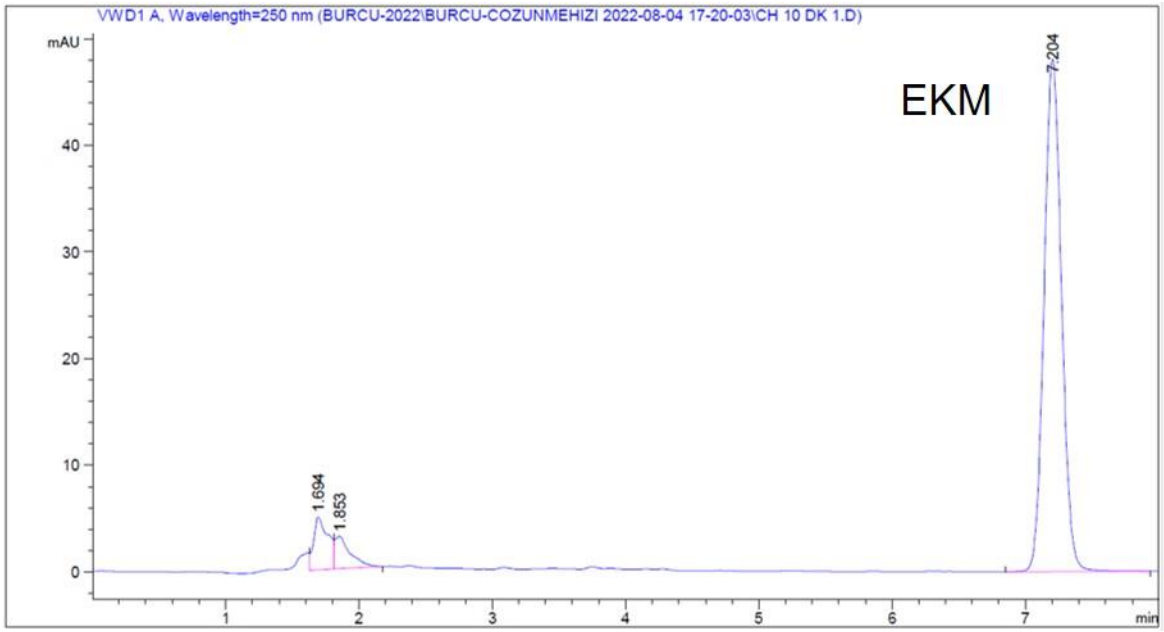


Şekil 4.31. (devam) EKM içermeyen formülasyonların FaSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu





Şekil 4.31. (devam) EKM içermeyen formülasyonların FaSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.32. 10 µg/mL EKM'nin FaSSIF ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin FaSSIF ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,15 µg/mL LOQ değeri 0,45 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin FaSSIF ortamında stabilitesini göstermek için 16 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. EKM'nin FaSSIF ortamında stabilite sonuçları

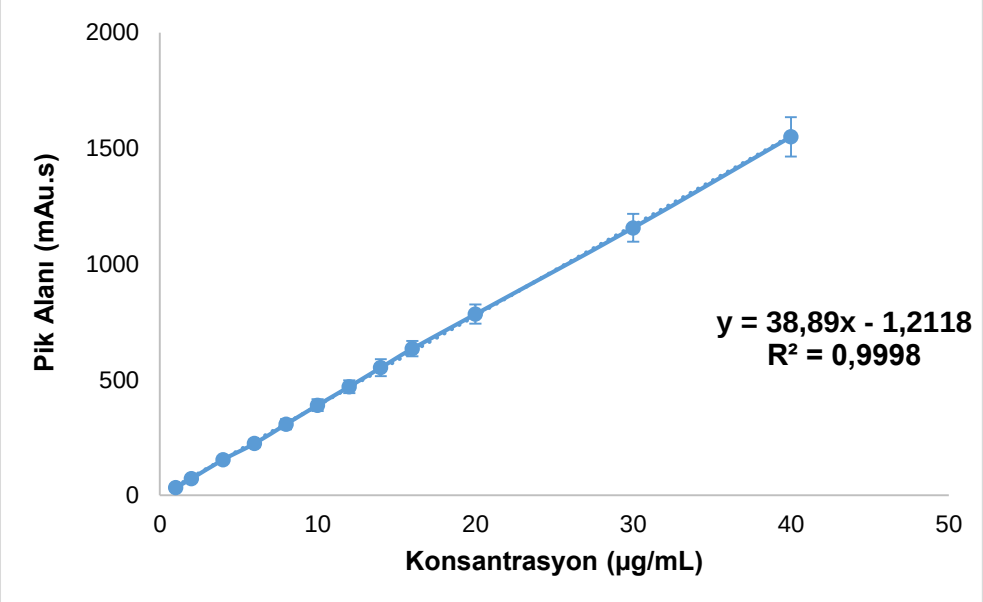
Sıcaklık (°C)	Zaman (Saat)	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
25 ± 0,5	0	16	16,2 ± 0,0
	24	16	16,5 ± 0,1
37 ± 0,5	0	16	16,2 ± 0,0
	24	16	16,8 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

EKM'nin FeSSIF tamponu ortamındaki validasyonu

Doğrusallık

EKM'nin doğrusallık çalışması FeSSIF ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 12 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.33'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. EKM'nin FeSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ort ± SS, n=12)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin FeSSIF ortamında 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.26'da gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM'nin FeSSIF ortamında 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM konsantrasyonu hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.27'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. EKM'nin FeSSIF ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	10	10,4
2	10	10,3
3	10	10,3
4	10	10,2
5	10	10,2
6	10	10,3
7	10	10,3
8	10	10,3
9	10	10,3
10	10	10,3
Ort		10,3
SS		0,1
VK		0,5

Çizelge 4.27. EKM'nin FeSSIF ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	7,84	8,00	8,19	8,01	0,17	2,2
10	10,1	10,3	10,6	10,3	0,2	2,2
12	12,2	12,2	12,4	12,2	0,1	0,9

Doğruluk ve geri elde

EKM'nin FeSSIF ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.28'de sunulmuştur.

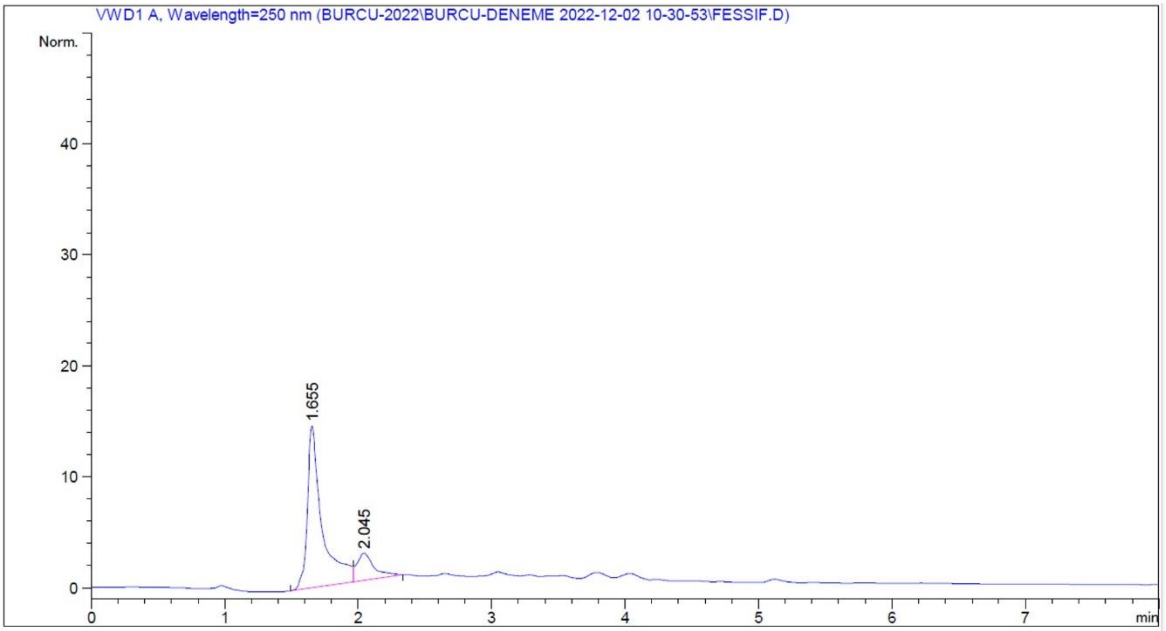
Çizelge 4.28. EKM'nin FeSSIF ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	7,98 ± 0,03	98,6	0,5
10	10,3 ± 0,0	102,9	0,2
12	12,0 ± 0,0	100,4	0,2

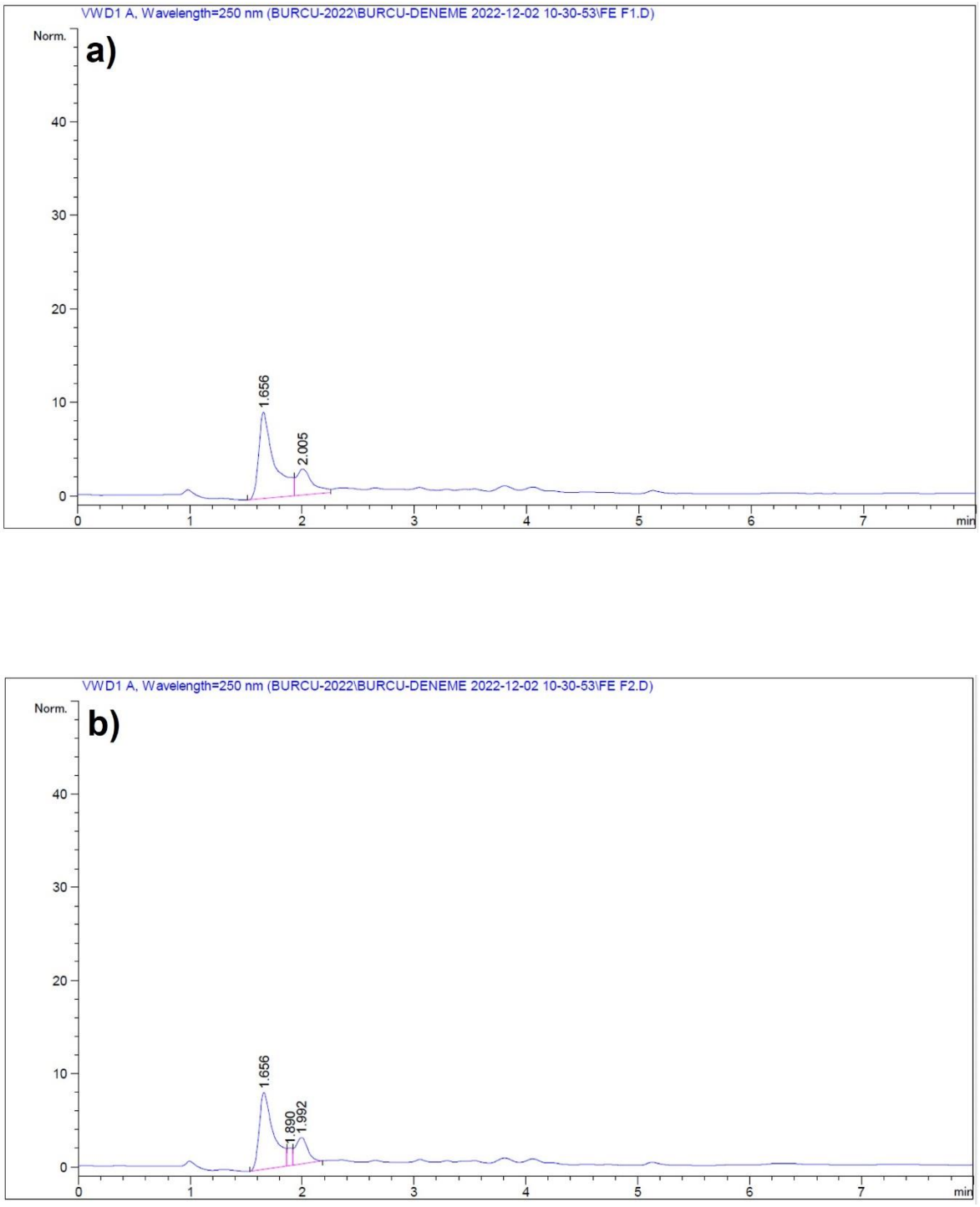
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

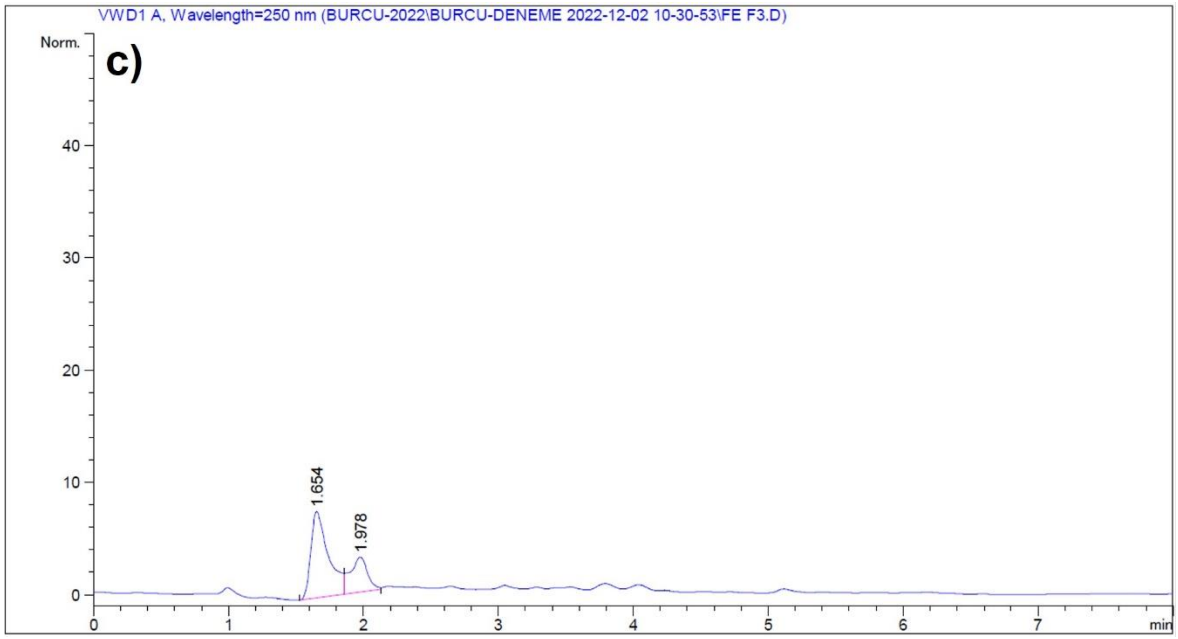
Kullanılan yöntemin EKM'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. FeSSIF ortamına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM'nin FeSSIF ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.34 - Şekil 4.36'da sunulmuştur.

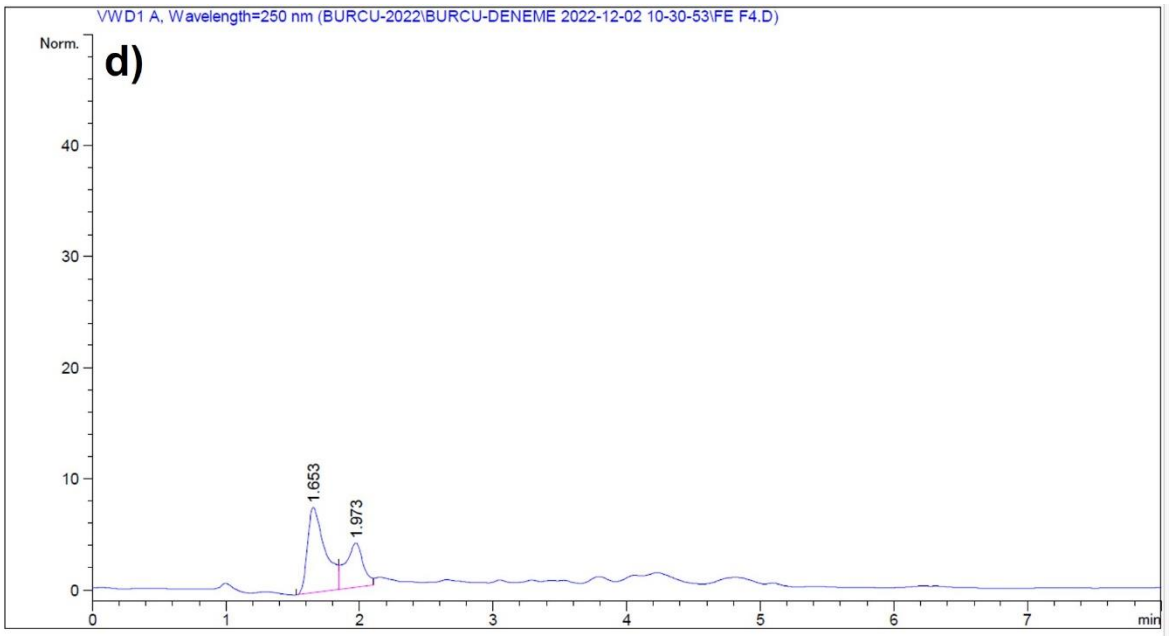


Şekil 4.34. FeSSIF ortamına ait kromatogram

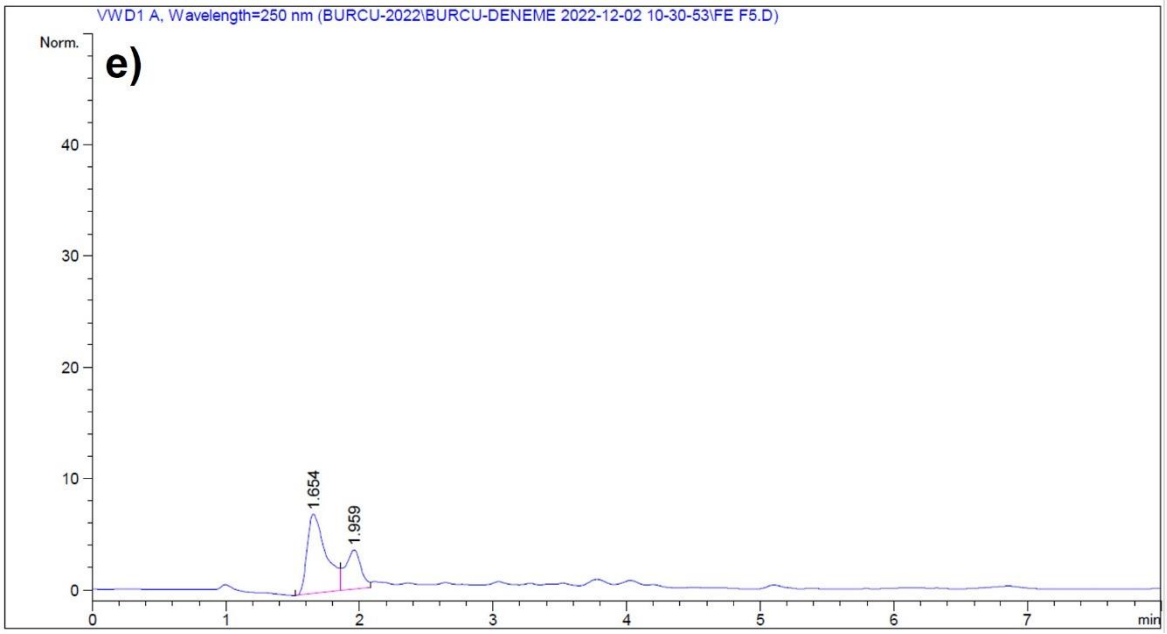


Şekil 4.35. EKM içermeyen formülasyonların FeSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

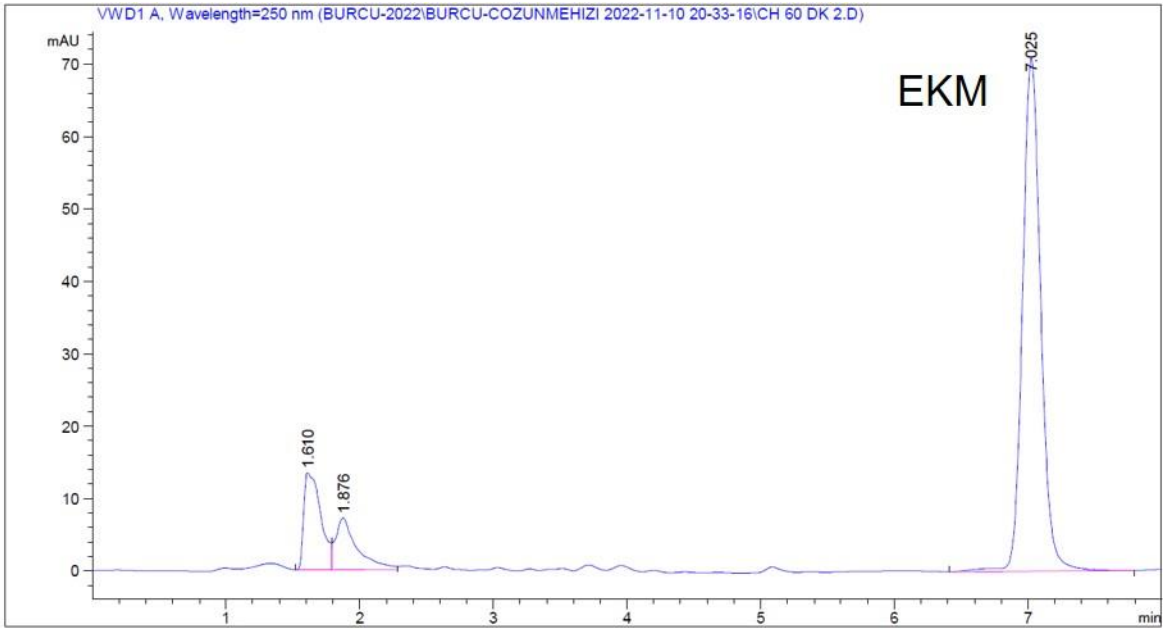




Şekil 4.35. (devam) EKM içermeyen formülasyonların FeSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.35. (devam) EKM içermeyen formülasyonların FeSSIF ortamındaki kromatogramları a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.36. 16 µg/mL EKM'nin FeSSIF ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM'nin FeSSIF ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır. Analitik yöntemin LOD değeri 0,58 µg/mL LOQ değeri 1,76 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

EKM'nin FeSSIF ortamında stabilitesini göstermek için 16 µg/mL konsantrasyondaki EKM çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM konsantrasyonu Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.29. EKM'nin FeSSIF ortamında stabilite sonuçları

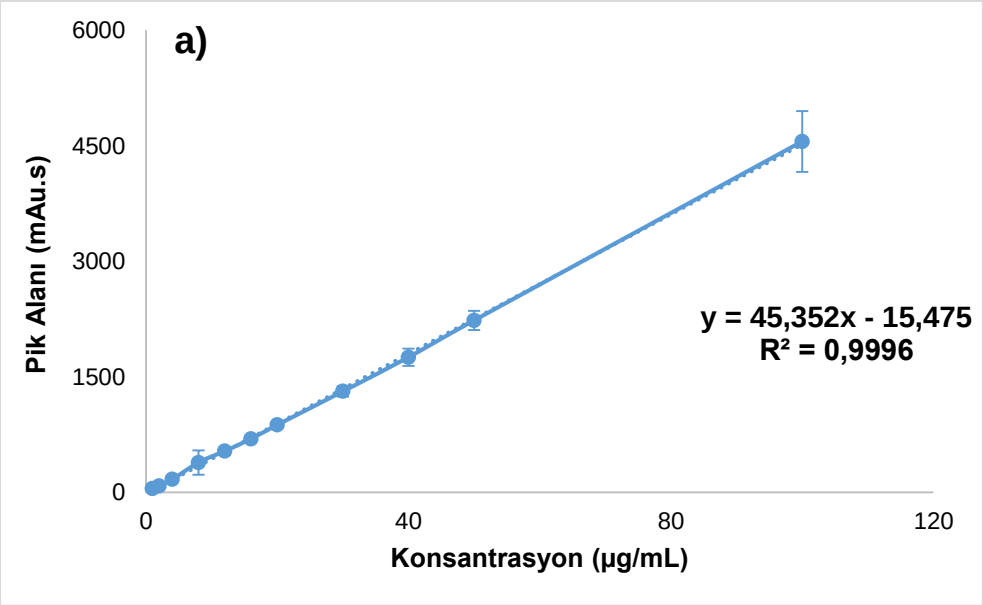
Sıcaklık (°C)	**Zaman (Saat)**	**EKM konsantrasyonu (µg/mL)**	**Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)**
25 ± 0,5	0	16	15,9 ± 0,1
	24	16	16,2 ± 0,0
37 ± 0,5	0	16	15,9 ± 0,1
	24	16	16,3 ± 0,0

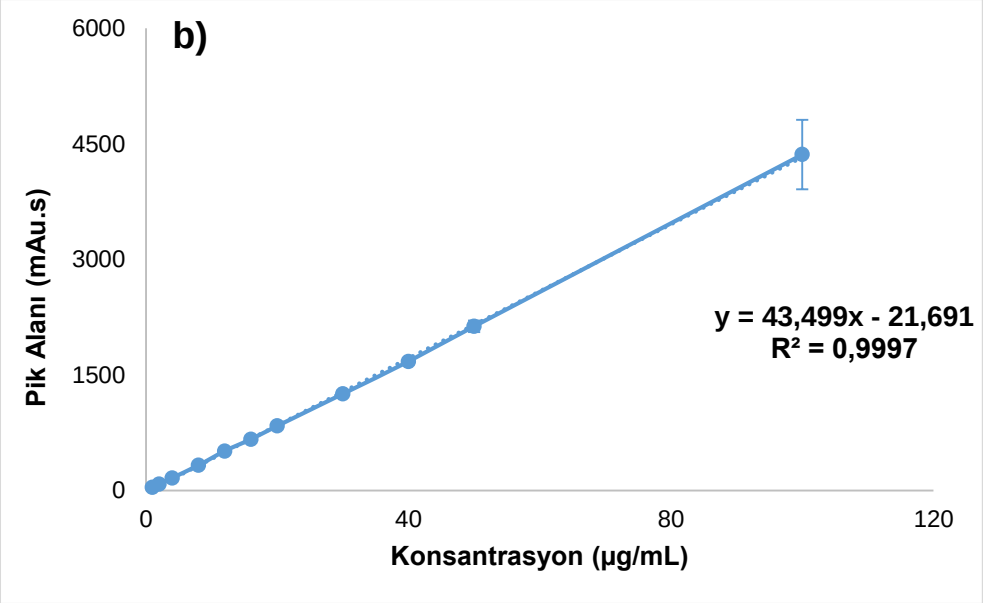
(Ort ± SS, n=3)

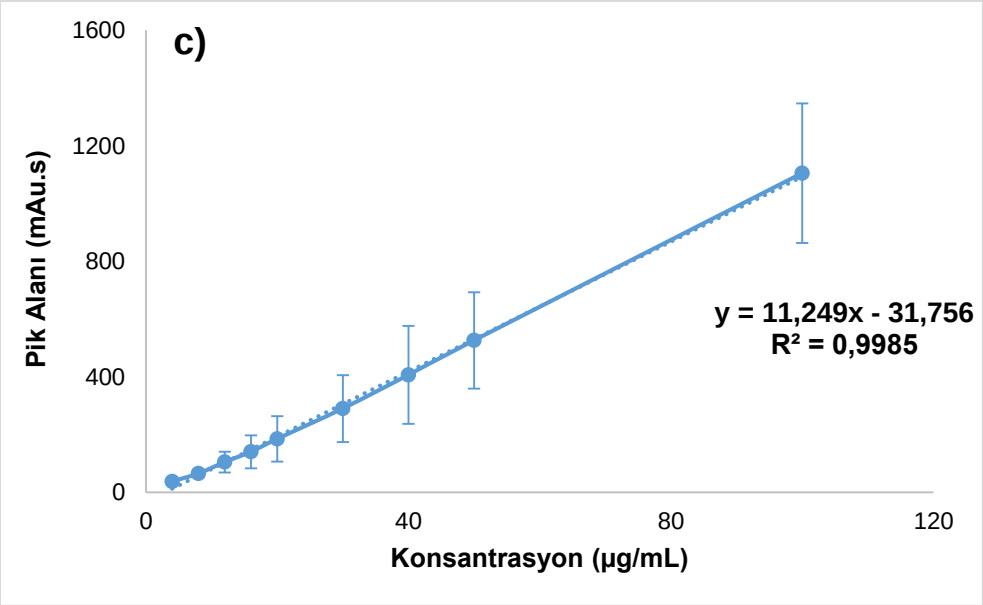
EKM, Antipirin ve Fenol kırmızısının ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki validasyonu

Doğrusallık

EKM, antipirin (ANT) ve fenol kırmızsının (FK) doğrusallık çalışması ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 1 µg/mL - 100 µg/mL konsantrasyon aralığında 3 paralel sürdürülmüştür. 11 farklı konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri 250 nm'de HPLC ile analiz edilmiş ve grafiklenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, kalibrasyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 4.37'de sunulmuştur.


a)
6000
4500
3000
1500
0
Pik Alanı (mAu.s)
0
40
80
120
Konsantrasyon (µg/mL)
y = 45,352x - 15,475
R² = 0,9996


b)
6000
4500
3000
1500
0
Pik Alanı (mAu.s)
0
40
80
120
Konsantrasyon (µg/mL)
y = 43,499x - 21,691
R² = 0,9997



Şekil 4.37. ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kalibrasyon doğruları ve denklemleri a) EKM (Ort ± SS, n=11) b) ANT (Ort ± SS, n=11) c) FK (Ort ± SS n=9)

Kesinlik

Deney içi kesinlik çalışmasında EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 30 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 8 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltileri art arda 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM, ANT ve FK konsantrasyonları hesaplanmıştır. Deney içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.30 - Çizelge 4.32'de gösterilmiştir. Deneyler arası kesinlik çalışmasında EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 8 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri takip eden 3 gün içinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon denkleminden hareketle EKM, ANT ve FK konsantrasyonları hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.33 - Çizelge 4.35'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)
1	30	30,3
2	30	30,3
3	30	31,3
4	30	31,3
5	30	31,0
6	30	30,9
7	30	30,9
8	30	31,0
9	30	31,0
10	30	31,0
Ort		30,9
SS		0,3
VK		1,0

Çizelge 4.31. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	ANT konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen ANT konsantrasyonu (µg/mL)
1	8	8,0
2	8	8,0
3	8	8,0
4	8	8,0
5	8	8,0
6	8	8,1
7	8	8,1
8	8	8,0
9	8	8,1
10	8	8,0
Ort		8,0
SS		0,0
VK		0,3

Çizelge 4.32. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deney içi kesinlik sonuçları

No	FK konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen FK konsantrasyonu (µg/mL)
1	8	8,3
2	8	8,3
3	8	8,3
4	8	8,3
5	8	8,3
6	8	8,4
7	8	8,1
8	8	8,2
9	8	8,3
10	8	8,3
Ort		8,3
SS		0,1
VK		0,9

Çizelge 4.33. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	7,94	8,02	8,06	8,01	0,06	2,8
20	20,7	20,6	20,7	20,7	0,1	0,4
40	40,7	40,6	40,5	40,6	0,1	0,3

Çizelge 4.34. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

ANT konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	8,22	8,22	8,23	8,22	0,01	0,1
20	19,9	19,7	19,7	19,8	0,1	0,5
40	40,2	39,5	39,5	39,7	0,4	1,1

Çizelge 4.35. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında deneyler arası kesinlik sonuçları

FK konsantrasyonu (µg/mL)	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort	SS	VK
8	8,08	8,15	8,27	8,17	0,10	1,2
20	19,7	19,8	20,1	19,9	0,2	1,0
40	38,9	39,3	39,4	39,2	0,3	0,6

Doğruluk ve geri elde

EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile 8 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri 3'er kez HPLC'de analiz edilerek kalibrasyon denklemi ile geri elde miktarları hesaplanmıştır. Doğruluk ve geri elde çalışmasına ait sonuçlar Çizelge 4.36 - Çizelge 4.38'de sunulmuştur.

Çizelge 4.36. EKM'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları

EKM konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	7,94 ± 0,01	99,2	0,1
20	20,7 ± 0,0	103,3	0,1
40	40,6 ± 0,1	101,6	0,3

(Ort ± SS, n=3)

Çizelge 4.37. ANT'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları

ANT konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen ANT konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	8,22 ± 0,02	102,7	0,3
20	19,9 ± 0,0	99,4	0,3
40	40,2 ± 0,1	100,6	0,1

(Ort ± SS, n=3)

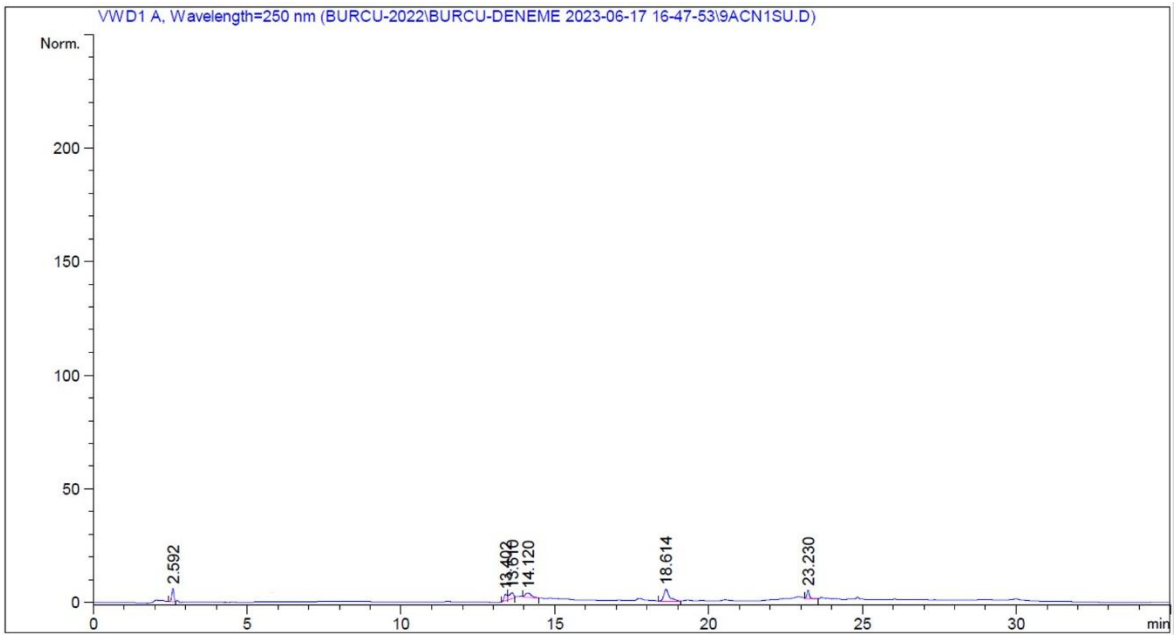
Çizelge 4.38. FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında geri elde sonuçları

FK konsantrasyonu (µg/mL)	Tayin edilen FK konsantrasyonu (µg/mL)	%Geri elde	VK
8	8,05 ± 0,04	100,6	0,7
20	19,7 ± 0,1	98,4	0,5
40	38,9 ± 0,0	97,2	0,1

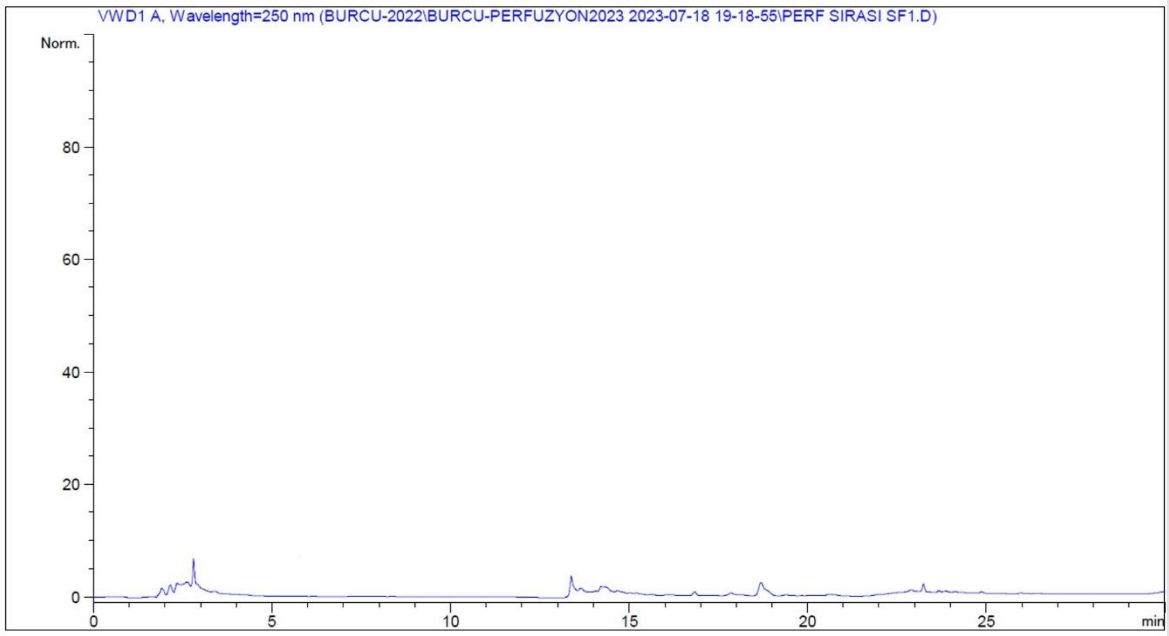
(Ort ± SS, n=3)

Özgünlük ve seçicilik

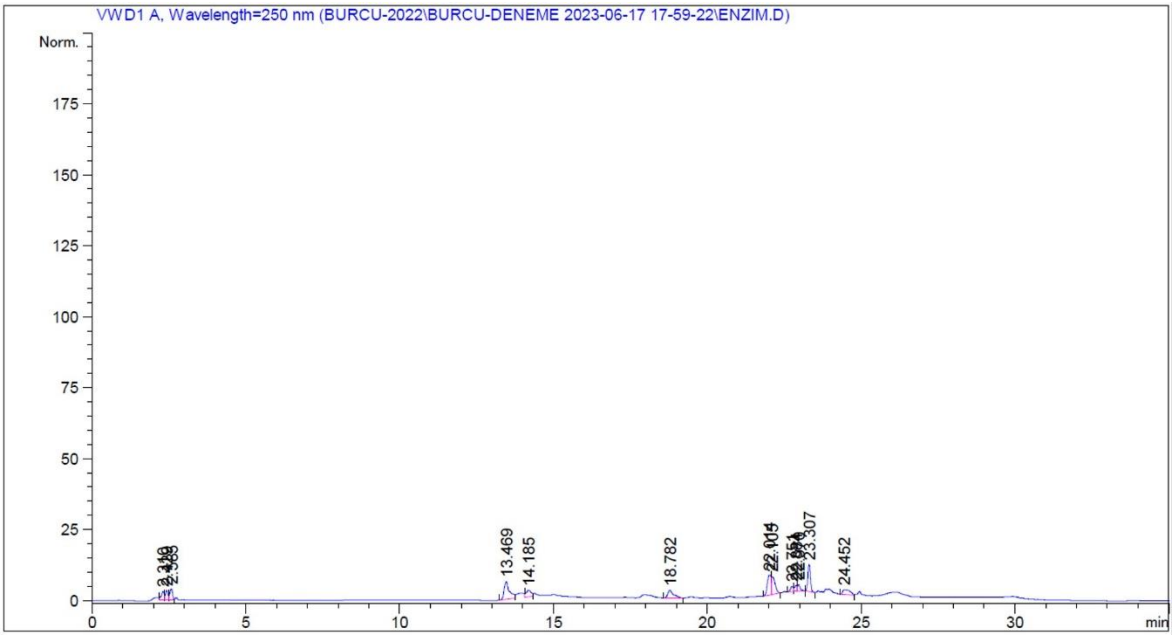
Kullanılan yöntemin EKM, ANT ve FK'ye özgün olduğunu belirlemek için diğer maddelerin EKM, ANT ve FK ile aynı alıkonma zamanında pik verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır. ACN:Perfüzat (9:1) ortamına, bağırsak segmentinden toplanan serum fizyolojik perfüzatına, EKM içermeyen formülasyonların ve EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki çözeltisine ait özgünlük ve seçicilik kromatogramları Şekil 4.38 - Şekil 4.41'de sunulmuştur.



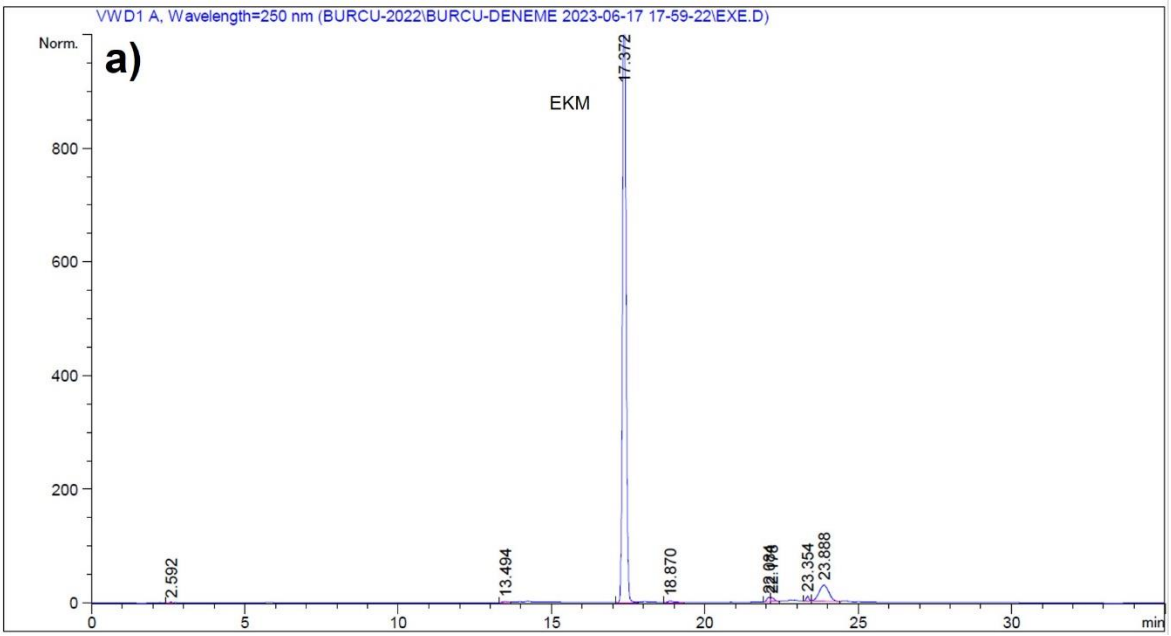
Şekil 4.38. ACN:Perfüzat (9:1) ortamına ait kromatogram

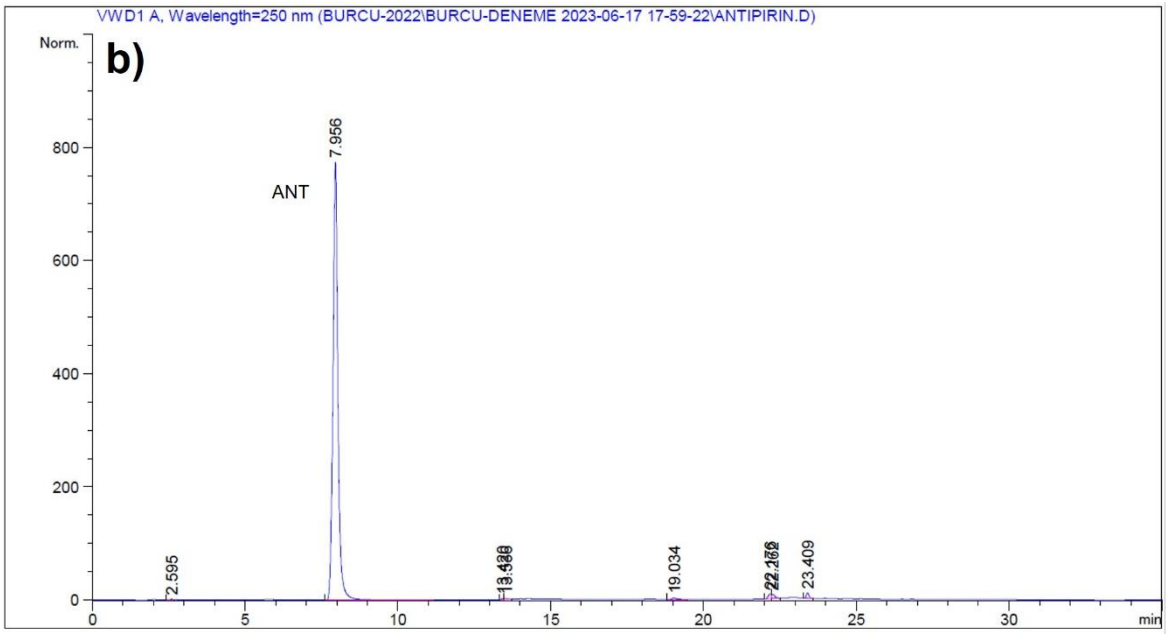


Şekil 4.39. Bağırsak segmentinden toplanan serum fizyolojik perfüzatına ait kromatogram

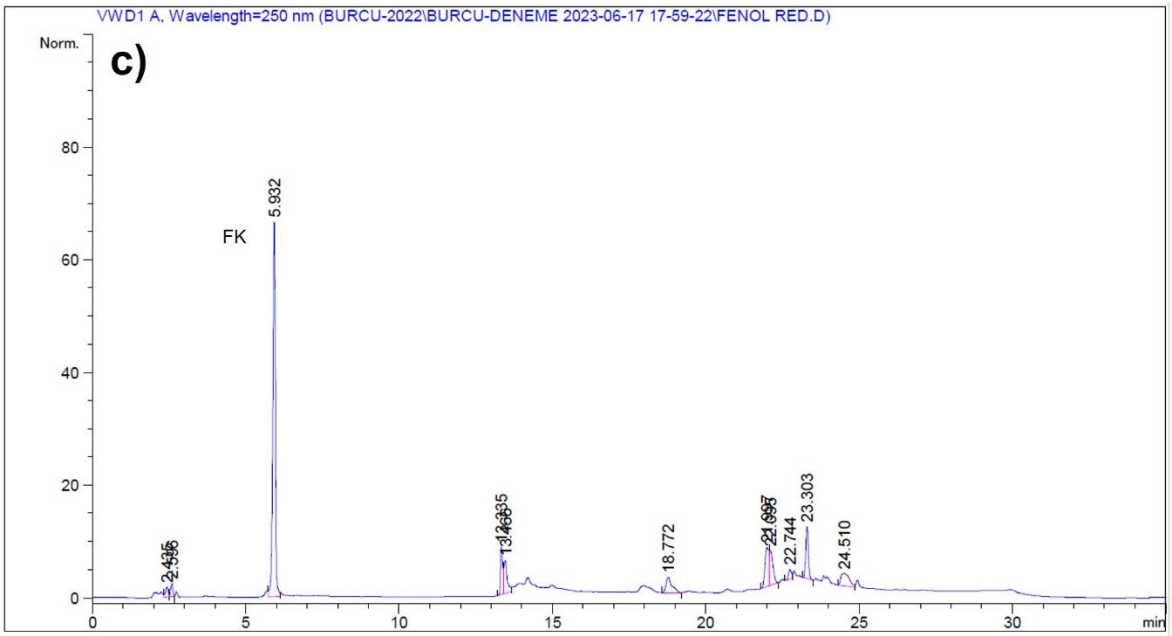


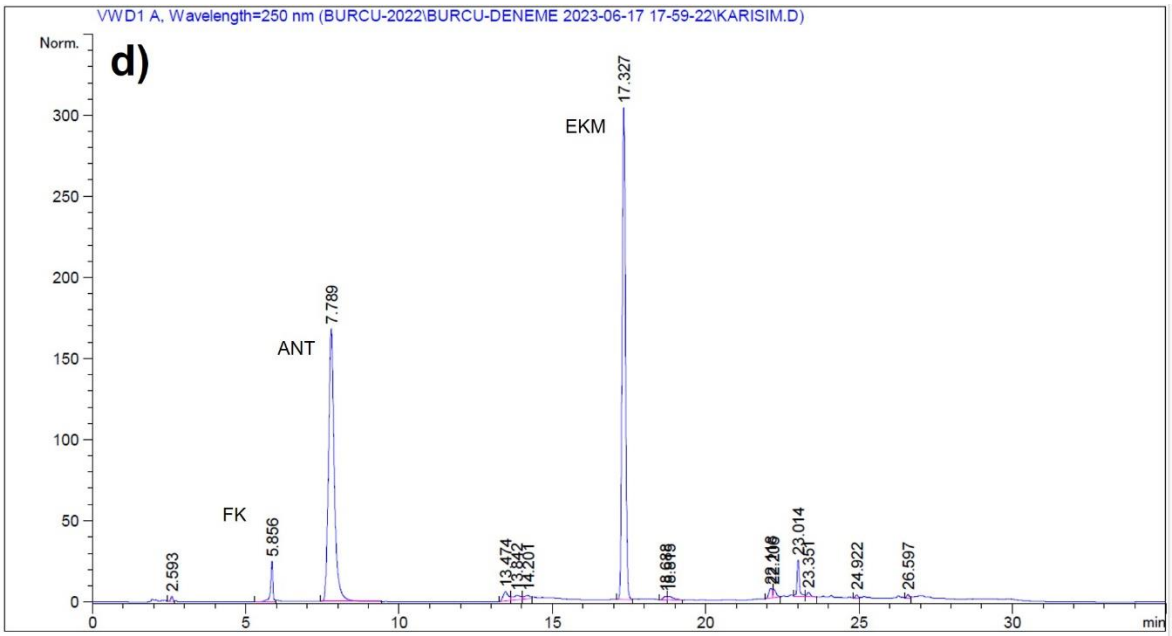
Şekil 4.40. EKM içermeyen formülasyonların ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatogramı





Şekil 4.41. EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatogramları a) 200 µg/mL EKM b) 200 µg/mL ANT c) 40 µg/mL FK d) 50 µg/mL EKM, 50 µg/mL ANT ve 14 µg/mL FK





Şekil 4.41. (devam) EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatogramları a) 200 µg/mL EKM b) 200 µg/mL ANT c) 40 µg/mL FK d) 50 µg/mL EKM, 50 µg/mL ANT ve 14 µg/mL FK

Duyarlılık ve saptama sınırı

EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamındaki kromatografik miktar tayin yöntemine ait LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplamıştır.

Analitik yöntemin her bir madde için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.39'da sunulmuştur.

Çizelge 4.39. ACN:Perfüzat (9:1) ortamında duyarlılık ve saptama sınırı değerleri

Duyarlılık ve saptama sınırı	EKM	ANT	FK
LOD (µg/mL)	0,45	0,15	0,39
LOQ (µg/mL)	1,37	0,46	1,17

Stabilite

EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında stabilitesini göstermek için 30 µg/mL konsantrasyondaki EKM, ANT ve FK çözeltilerinin hazırlandıktan hemen sonra ve 24. saat sonunda ölçülen pik alanı değerlerine karşılık gelen EKM, ANT ve FK konsantrasyonları Çizelge 4.40'ta verilmiştir.

Çizelge 4.40. EKM, ANT ve FK'nin ACN:Perfüzat (9:1) ortamında stabilite sonuçları

Madde	0. saat	24. saat
EKM konsantrasyonu (µg/mL)	30	30
Tayin edilen EKM konsantrasyonu (µg/mL)	29,6 ± 0,0	30,8 ± 0,0
ANT konsantrasyonu (µg/mL)	30	30
Tayin edilen ANT konsantrasyonu (µg/mL)	29,0 ± 0,0	30,2 ± 0,0
FK konsantrasyonu (µg/mL)	30	30
Tayin edilen FK konsantrasyonu (µg/mL)	29,2 ± 0,1	29,4 ± 0,1

(Ort ± SS, n=3)

Tez çalışması kapsamında yapılan spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlere ait validasyon sonuçları Çizelge 4.41'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.41. Kullanılan ortamlara ait validasyon sonuçları

Yöntem	***Ortam***	***Doğrusallık***		***Kesinlik***	***Doğruluk ve geri elde***			***LOD (µg/mL)***	***LOQ (µg/mL)***
		R^2	**Doğru denklemi**	**VK**	**VK**				
					Düşük	**Orta**	**Yüksek**		
Spektrofotometrik	Distile su	1	y = 0,0491x + 0,0052	0,6	0,9	0,4	0,6	0,9	2,6
Kromatografik (HPLC)	Metanol	0,9999	y = 46,331x + 3,483	0,1	0,4	0,2	0,0	0,1	0,3
	Asetonitril	0,9999	y = 43,283x + 1,3266	0,1	0,3	1,6	0,1	0,1	0,2
	%0,5 SLS çözeltisi	0,9999	y = 43,073x + 3,375	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3
	%0,5 SLS içeren PBS tamponu	1	y = 42,981x + 2,921	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
	FaSSIF	0,9999	y = 42,25x – 2,7246	1,7	0,3	1,1	0,3	0,2	0,5
	FeSSIF	0,9998	y = 38,99x – 1,2118	0,5	0,5	0,2	0,2	0,6	1,8
	ACN:Perfüzat (9:1)	0,9996	y = 45,352x – 15,475	1,0	0,1	0,1	0,3	0,5	1,4

y: Pik alanı/Absorbans, x: Konsantrasyon

4.3. SEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SEDDS) geliştirme çalışmalarına ait sonuçları aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

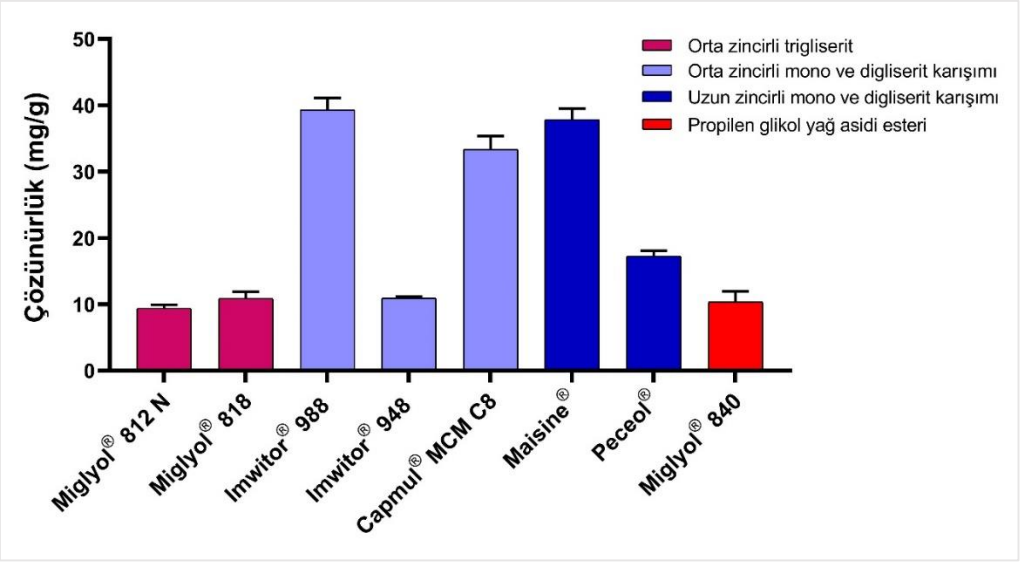
4.3.1. Çözünürlük çalışması

EKM'nin orta zincirli trigliserit, orta zincirli mono ve digliserit karışımı, uzun zincirli mono ve digliserit karışımı, propilen glikol yağ asidi esteri, sürfaktan ve kosolvan gruplarında çözünürlüğünün belirlenmesi Bölüm 3.2.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi sonucu elde edilen pik alanları metanol ortamındaki kalibrasyon denkleminde yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. EKM'nin yardımcı maddelerdeki çözünürlük sonuçları Çizelge 4.42'de ve EKM'nin yağ, sürfaktan ve kosolvan gruplarındaki çözünürlük sonuçları Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te sunulmuştur.

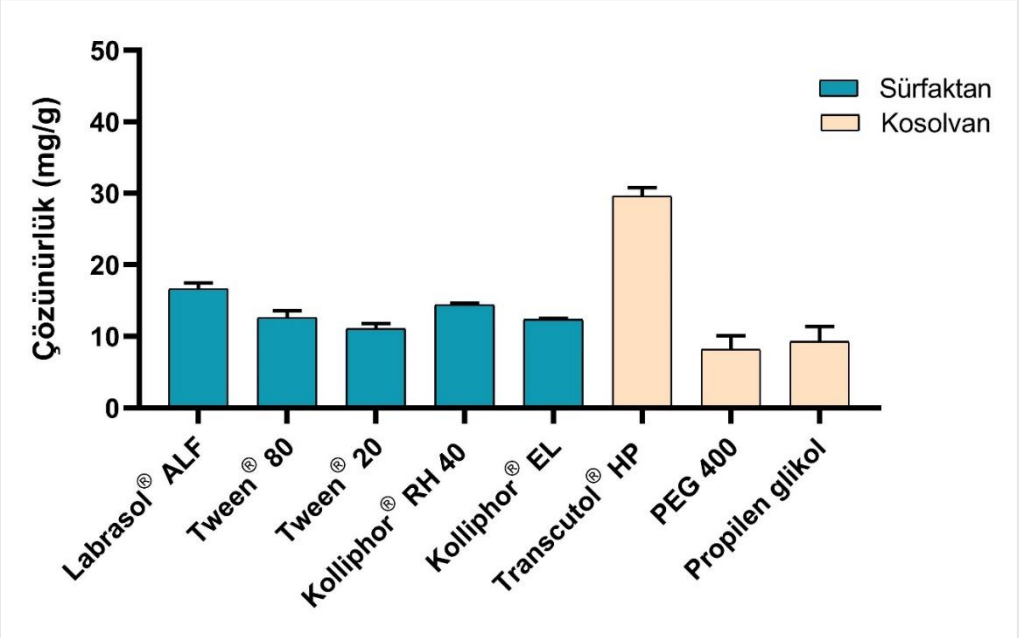
Çizelge 4.42. EKM'nin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü

Yardımcı madde	Çözünürlük (mg/g)
Miglyol® 812 N	9,39 ± 0,54
Miglyol® 818	10,9 ± 1,2
İmwitor® 988	39,3 ± 1,8
İmwitor® 948	10,9 ± 0,2
Capmul® MCM C8	33,4 ± 2,0
Maisine®	37,9 ± 1,7
Peceol®	17,3 ± 0,8
Miglyol® 840	10,4 ± 1,6
Labrasol® ALF	16,7 ± 0,8
Tween® 80	12,6 ± 1,0
Tween® 20	11,1 ± 0,8
Kolliphor® RH40	14,4 ± 0,2
Kolliphor® EL	12,3 ± 0,2
Transcutol® HP	29,6 ± 1,2
PEG 400	8,2 ± 1,9
Propilen glikol	9,3 ± 2,2

(Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.42. EKM'nin yağ grubundaki çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3)



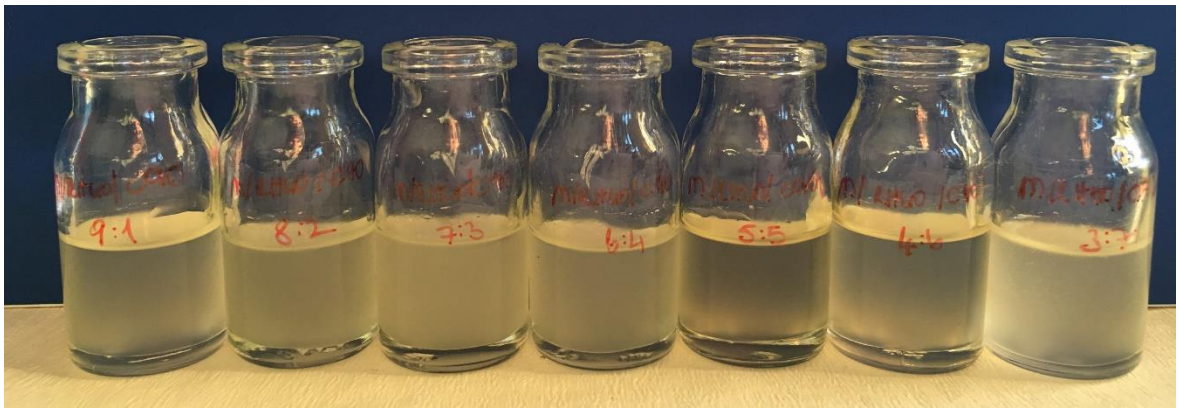
Şekil 4.43. EKM'nin sürfaktan ve kosolvan gruplarındaki çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3)

Çözünürlük çalışmasının sonucunda EKM'nin yüksek çözünürlük gösterdiği yağ, sürfaktan ve kosürfaktan belirlenmiştir. Yağ olarak İmwitor® 988, sürfaktan olarak Kolliphor® RH40 ve kosürfaktan olarak Labrasol® ALF seçilmiştir.

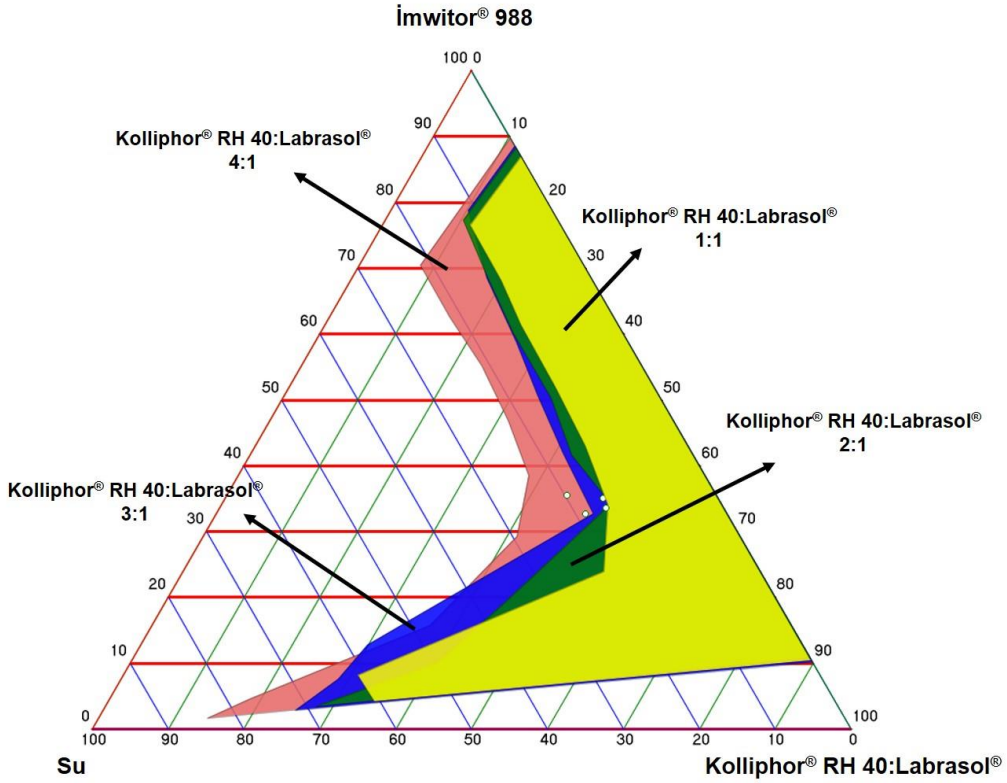
4.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

İmwitor® 988, Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF ile üçgen faz diyagramlarının çizilmesi Bölüm 3.2.3'te açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Üçgen faz

diyagramlarının oluşturulması için gerçekleştirilen titrasyon çalışmasına ait görsel Resim 4.1'de verilmiştir. 1:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 olmak üzere 4 farklı S_{mix} oranına ait faz diyagramları Şekil 4.44'te, berrak alan büyüklükleri Çizelge 4.43'te verilmiştir. En büyük emülsifikasyon bölgesi sağlayan oran 4:1 S_{mix} oranı olarak belirlenmiştir. İmwitor® 988, Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF'nin 4:1 S_{mix} oranı için oluşturulan üçgen faz diyagramı Şekil 4.45'te sunulmuştur.



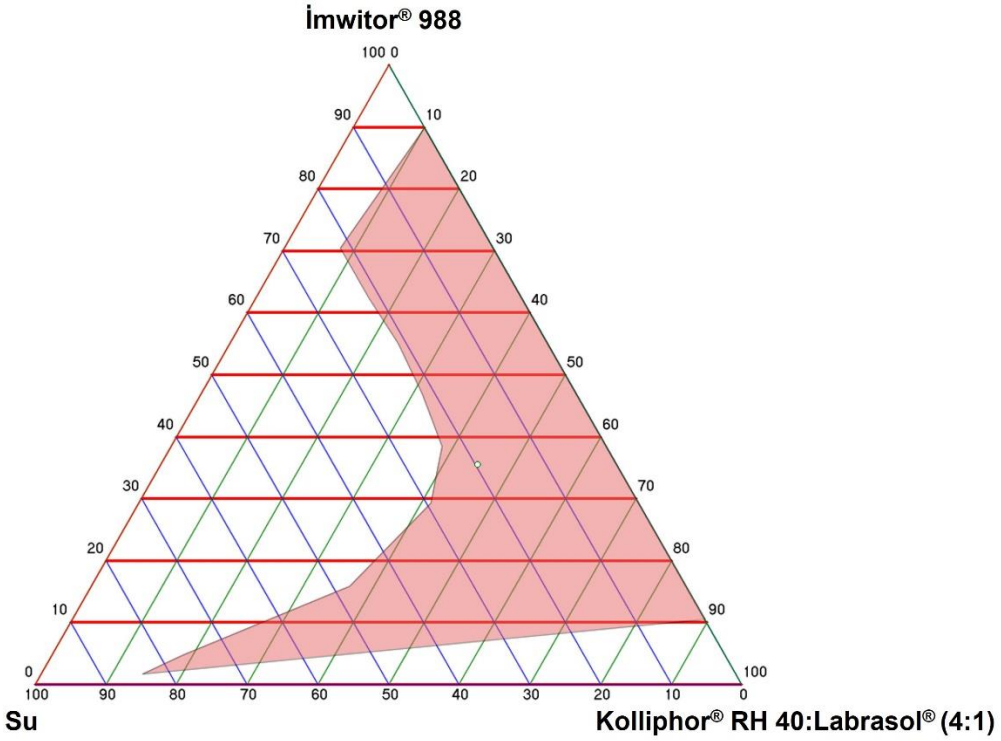
Resim 4.1. Titrasyon çalışmasına ait görsel



Şekil 4.44. Kolliphor® RH40: Labrasol® ALF'nin 4:1 Smix oranına (kırmızı bölge), 3:1 S_{mix} oranına (mavi bölge), 2:1 S_{mix} oranına (yeşil bölge) ve 1:1 S_{mix} oranına (sarı bölge) ait üçgen faz diyagramları

Çizelge 4.43. Üçgen faz diyagramlarına ait berrak alan büyüklükleri ve ağırlık merkezi oranları

S_{mix} oranı	**Berrak alan**	**Ağırlık merkezi oranları**		
		%yağ	**%sürfaktan:kosürfaktan**	**%su**
1:1	1291,8	33,6	50,9	15,6
2:1	1377,5	35,1	49,8	15,1
3:1	1620,1	32,7	48,6	18,7
4:1	1930,2	35,5	44,9	19,6



Şekil 4.45. Kolliphor® RH40: Labrasol® ALF'nin 4:1 S_{mix} oranına ait üçgen faz diyagramı

Şekil 4.45'te gösterilen kendiliğinden emülsifikasyon alanı içinde optimum formülasyona ait yağ, sürfaktan ve kosürfaktan oranlarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi deney tasarımı çalışmalarına geçilmiştir.

4.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyon bileşiminin belirlenmesi

Deney tasarımı çalışmaları Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı (BBD) için Design Expert® programı tarafından oluşturulan 15 formülasyona ait damlacık boyutu ve PDI bağımsız değişkenlerinin sonuçları Çizelge 4.44'te verilmiştir. 15 ölçüm sonucunda damlacık boyutu ve PDI sonuçlarına göre bağımsız ve bağımlı değişkenler arasında matematiksel denklemler oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkinin lineer, 2FI ve kuadratik modele uyumu incelenmiştir. Hangi modele uyduğunun saptanması için R^2 değeri ve uyum eksikliği testi (lack of fit) sonuçları Design Expert® tarafından belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.45'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.44. BBD için oluşturulan bağımsız ve bağımlı değişken değerleri

Formülasyon	İmwitor® 988 (A)	Kolliphor® RH40 (B)	Labrasol® ALF (C)	Damlacık boyutu (Y1)	PDI (Y2)
1	0,080	0,640	0,172	14,1	0,131
2	0,200	0,640	0,172	14,6	0,099
3	0,080	0,736	0,172	13,9	0,076
4	0,200	0,736	0,172	14,6	0,141
5	0,080	0,688	0,160	13,4	0,096
6	0,200	0,688	0,160	18,4	0,197
7	0,080	0,688	0,184	17,1	0,206
8	0,200	0,688	0,184	14,7	0,105
9	0,140	0,640	0,160	13,6	0,090
10	0,140	0,736	0,160	14,0	0,115
11	0,140	0,640	0,184	15,8	0,184
12	0,140	0,736	0,184	14,5	0,119
13	0,140	0,688	0,172	13,9	0,117
14	0,140	0,688	0,172	13,8	0,071
15	0,140	0,688	0,172	13,6	0,063

Çizelge 4.45. Damlacık boyutu ve PDI için model uyumu

Damlacık boyutu			
Model	**Uyum eksikliği testi p değeri**	**R^2**	**Ayarlanmış R^2**
Lineer	0,009	0,102	-0,143
2FI	0,015	0,625	0,343
Kuadratik	0,058	0,952	0,866
PDI			
Model	**Uyum eksikliği testi p değeri**	**R^2**	**Ayarlanmış R^2**
Lineer	0,266	0,078	-0,173
2FI	0,396	0,604	0,307
Kuadratik	0,769	0,902	0,725

Damlacık boyutu ve PDI yüksek R^2 değeri (damlacık boyutu ve PDI için sırasıyla 0,952 ve 0,902) ile kuadratik modele uyum sağlamaktadır. Ek olarak, iki bağımsız değişken için modele uyum eksikliği testi istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki matematiksel ilişki ve bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisinin anlamlılığını incelemeye yönelik ANOVA sonuçları Çizelge 4.46’da sunulmuştur.

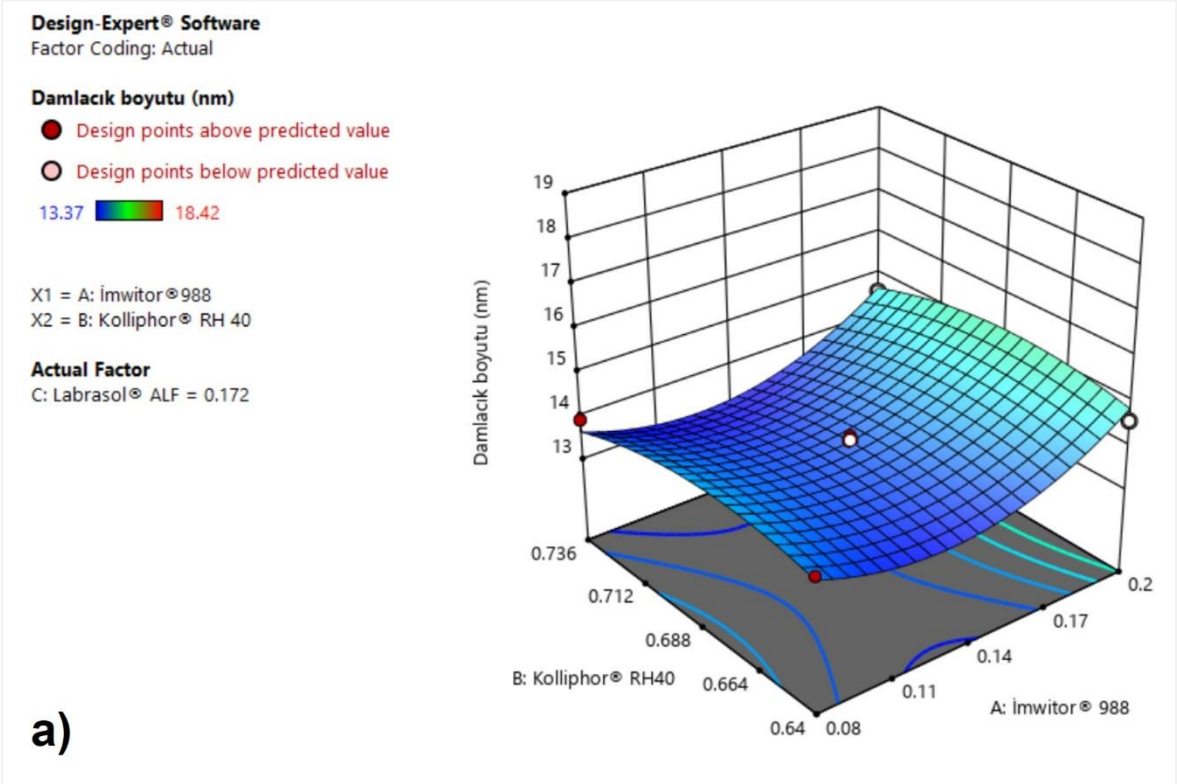
Çizelge 4.46. Damlacık boyutu ve PDI için istatistiksel analiz sonuçları ve matematiksel denklemler

Bağımlı değişken	Bağımsız değişken	df	SS	MS	F değeri	p değeri	Model ANOVA
Damlacık boyutu (Y1)	A	1	1,78	1,78	6,56	0,0506	F değeri = 11,02 R^2 = 0,9520 p = 0,0083
	B	1	0,157	0,157	0,579	0,4811	
	C	1	0,945	0,945	3,49	0,1208	
	AB	1	0,005	0,005	0,018	0,8983	
	AC	1	14,03	14,03	51,76	0,0008	
	BC	1	0,723	0,723	2,67	0,1634	
	A^2	1	3,53	3,53	13,03	0,0154	
	B^2	1	0,746	0,746	2,75	0,1579	
	C^2	1	4,95	4,95	18,27	0,0079	
$Y1 = 13,76 + 0,4713A - 0,14B + 0,3437C + 0,035AB - 1,87AC - 0,425BC + 0,9779A^2 - 0,4496B^2 + 1,16C^2$							
PDI (Y2)	A	1	0,0001	0,0001	0,25	0,6385	F değeri = 5,10 R^2 = 0,9017 p = 0,0438
	B	1	0,0004	0,0004	0,64	0,4587	
	C	1	0,0017	0,0017	3,09	0,1394	
	AB	1	0,0024	0,0024	4,31	0,0924	
	AC	1	0,0102	0,0102	18,71	0,0075	
	BC	1	0,0020	0,0020	3,71	0,1119	
	A^2	1	0,0025	0,0025	4,59	0,0850	
	B^2	1	0,0000	0,0000	0,03	0,8732	
	C^2	1	0,0063	0,0063	11,55	0,0193	
$Y2 = 0,0837 + 0,0041A - 0,0066B + 0,0145C + 0,0243AB - 0,0505AC - 0,0225BC + 0,0260A^2 + 0,002B^2 + 0,0413C^2$							

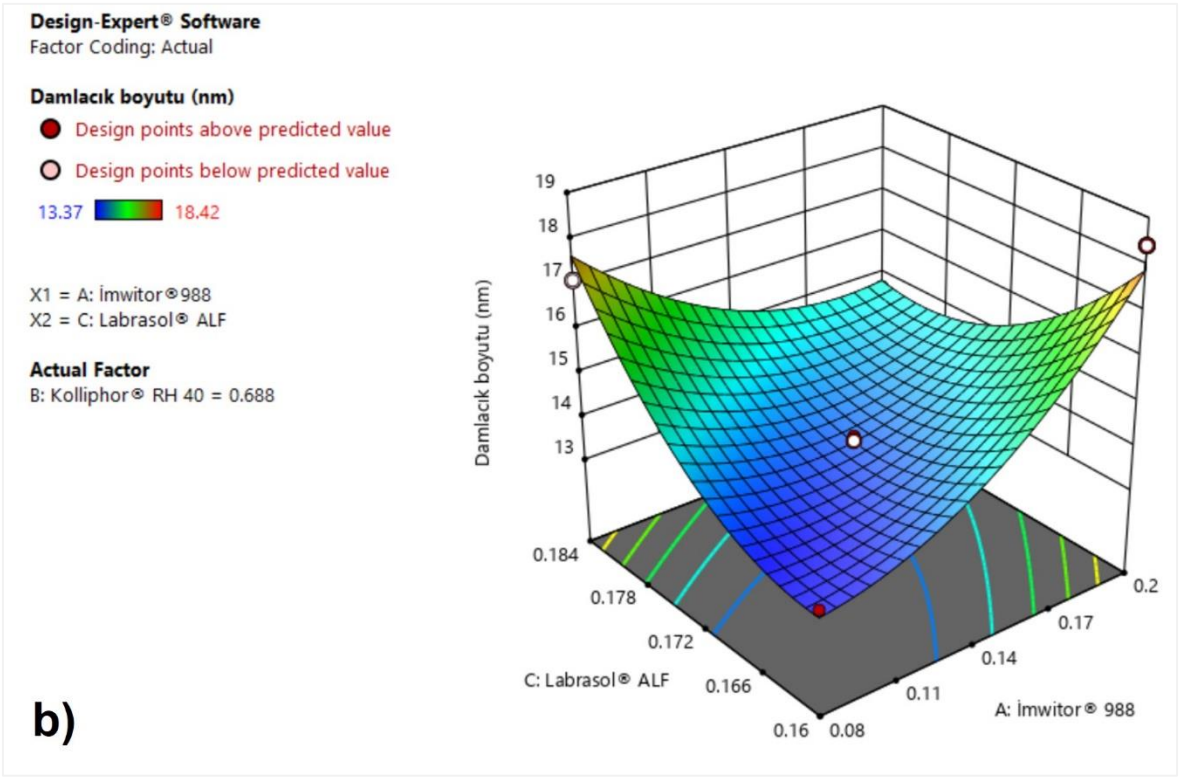
Modele göre damlacık boyutu üzerine İmwitor® 988'in Labrasol® ALF ile etkileşiminin (AC), İmwitor® 988'in kendisiyle ve Labrasol® ALF'nin kendisiyle etkileşiminin (A^2 ve C^2) istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

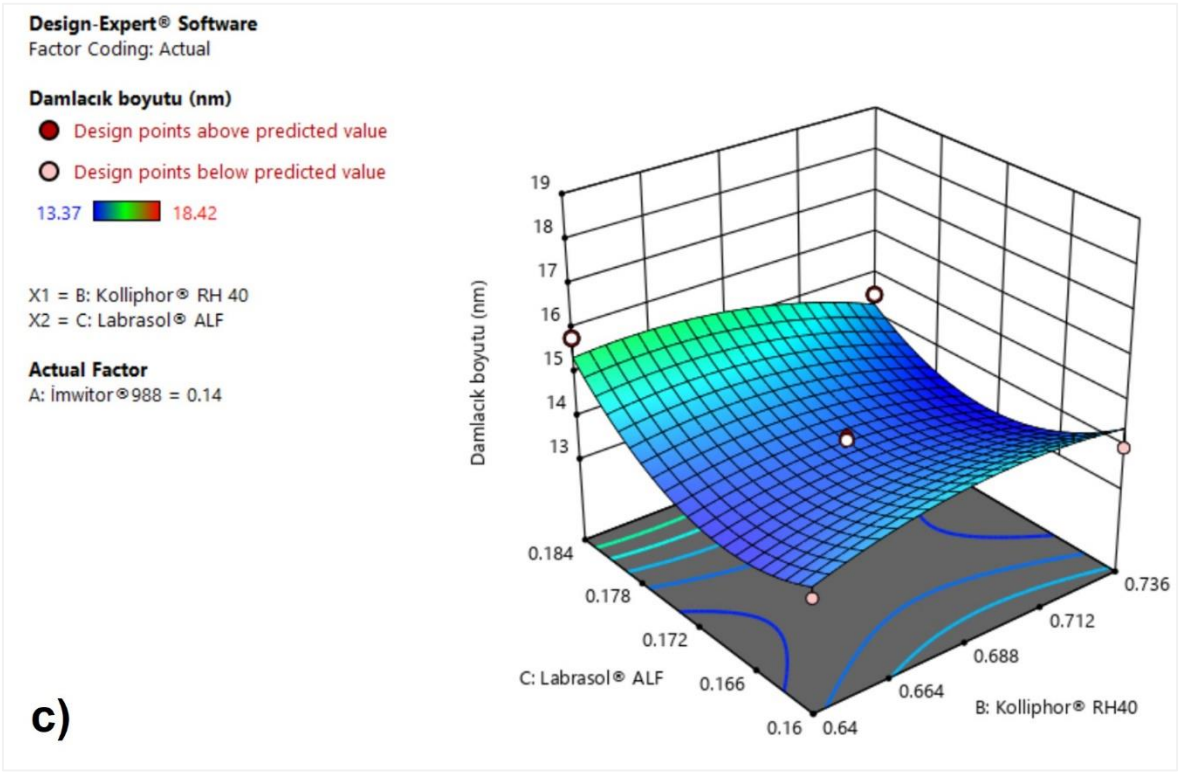
Modele göre PDI üzerine İmwitor® 988'in Labrasol® ALF ile etkileşiminin (AC) ve Labrasol® ALF'nin kendisiyle etkileşiminin (C^2) istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Kuadratik modele göre damlacık boyutu bağımlı değişkeni için yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.46 ve Şekil 4.47'de sunulmuştur.

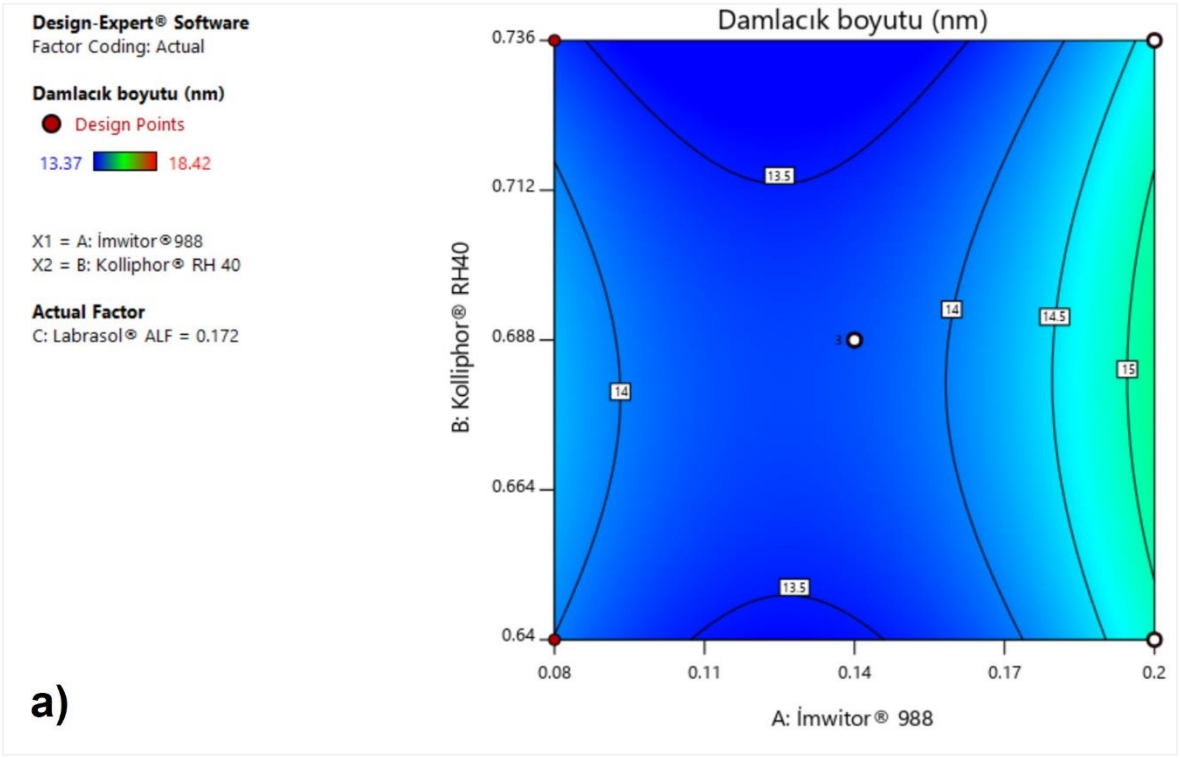


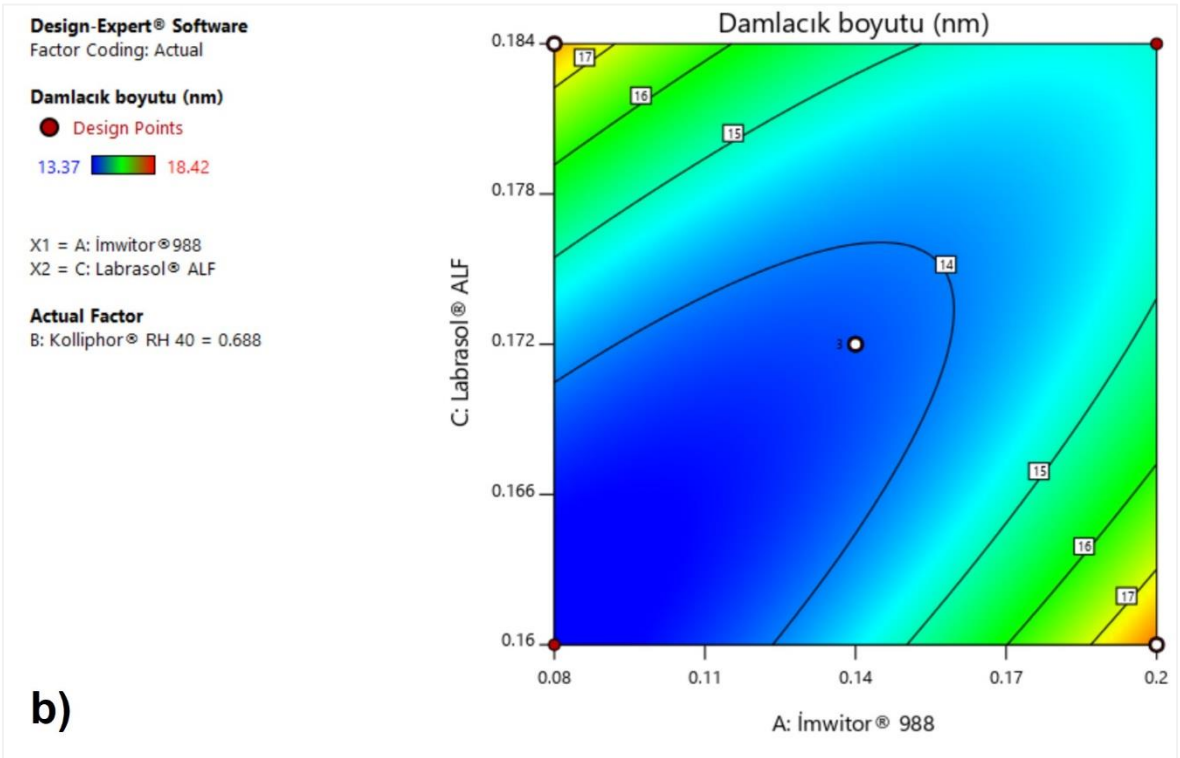
Şekil 4.46. Damlacık boyutu için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için



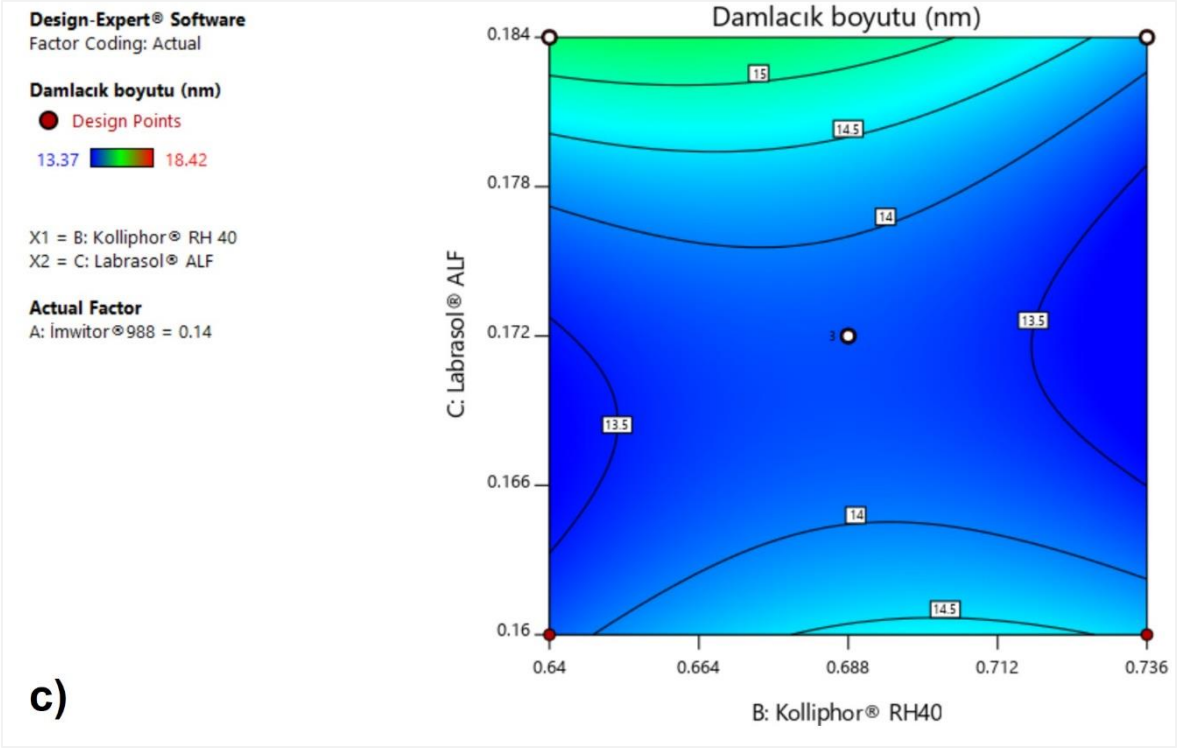


Şekil 4.46. (devam) Damlacık boyutu için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için



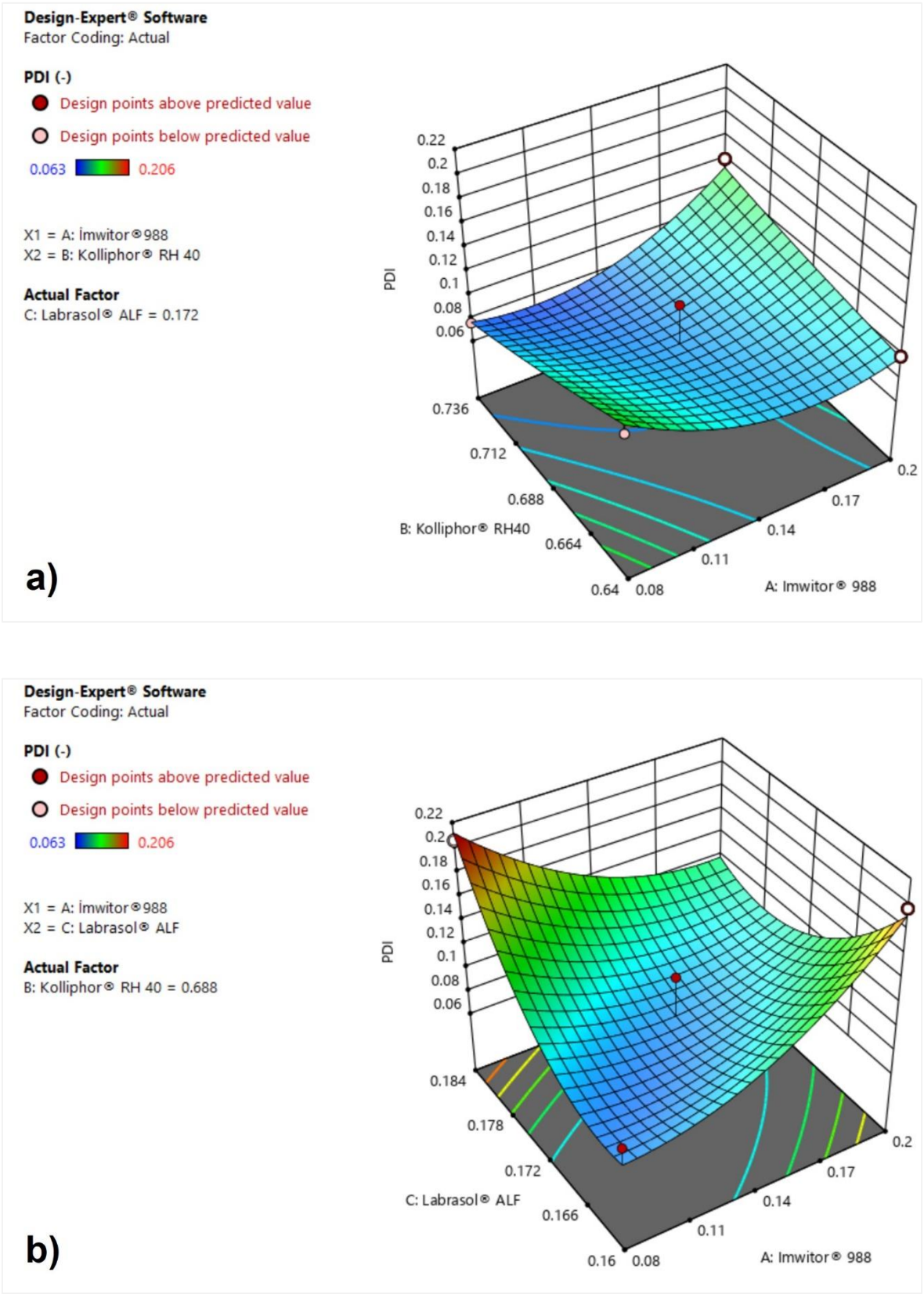


Şekil 4.47. Damlacık boyutu için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için

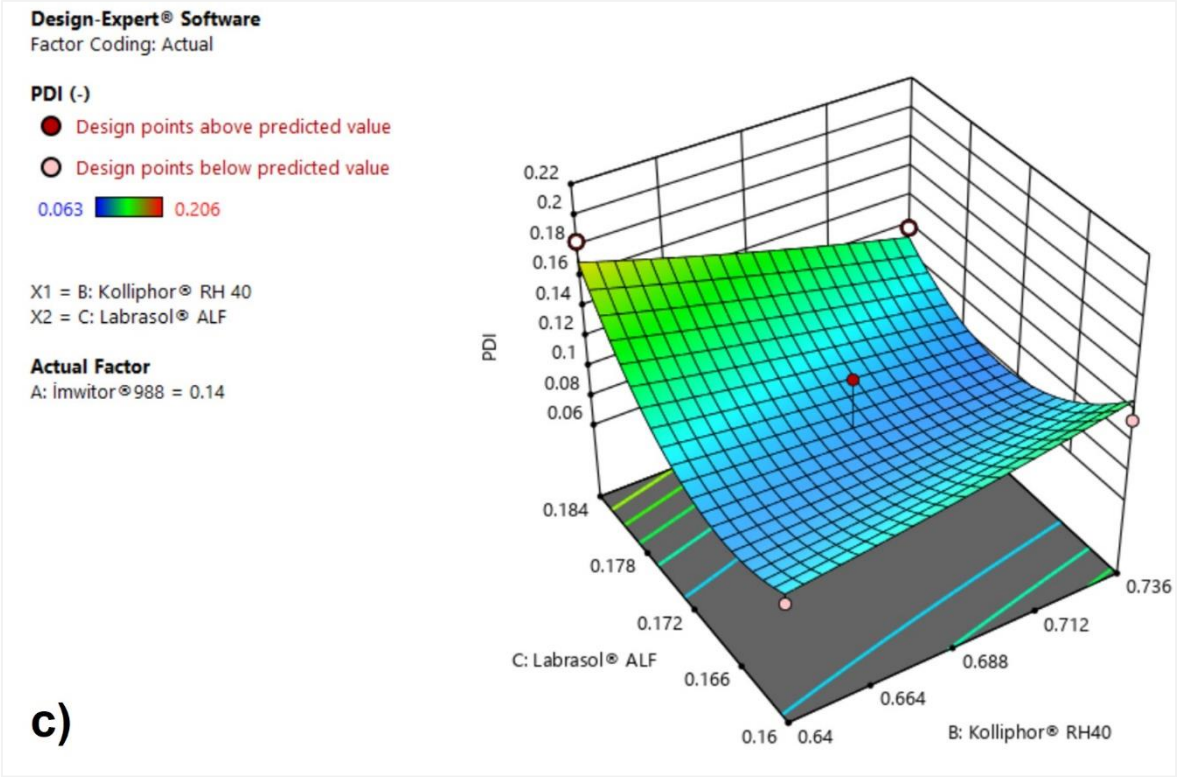


Şekil 4.47. (devam) Damlacık boyutu için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için

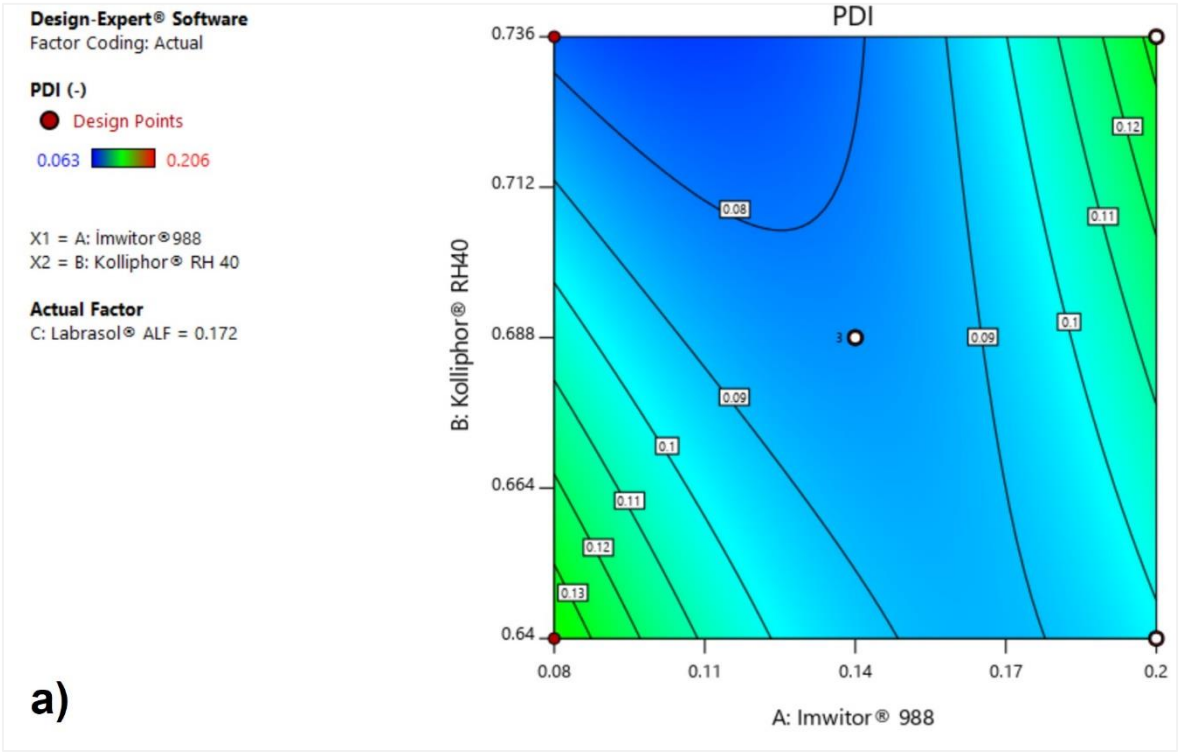
Kuadratik modele göre PDI bağımlı değişkeni için yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.48 ve Şekil 4.49'da sunulmuştur.

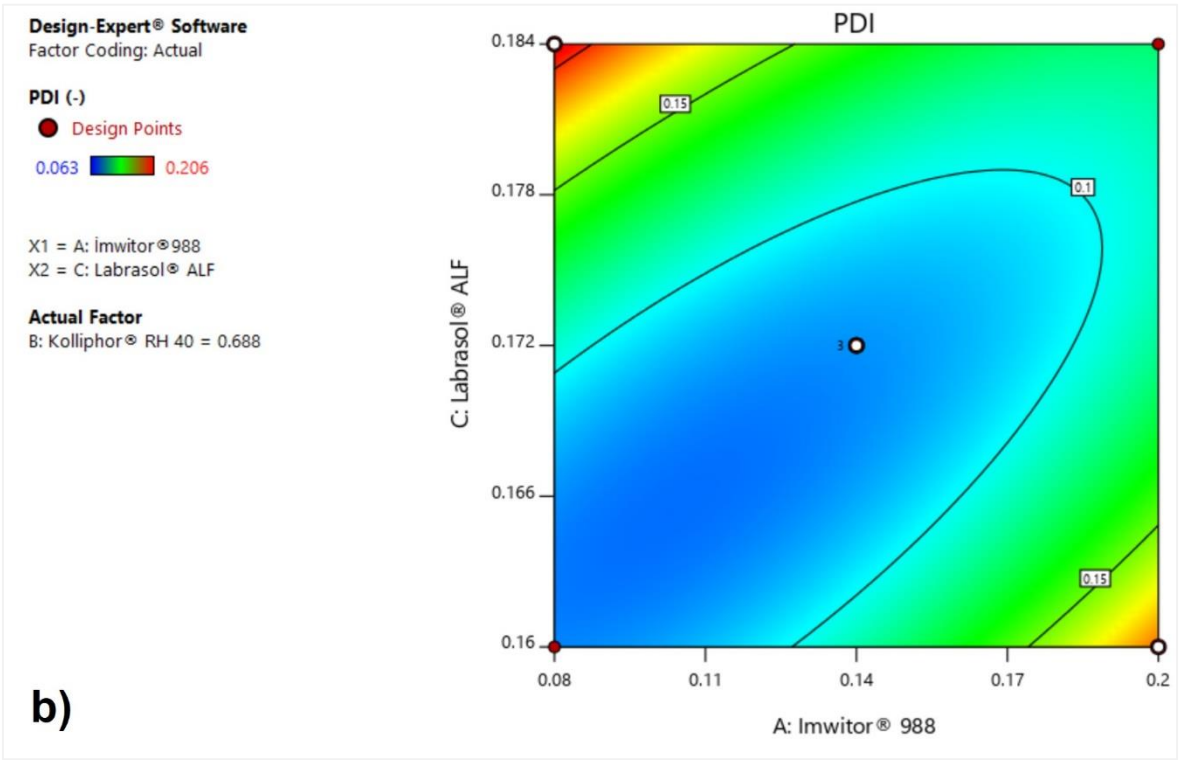


Şekil 4.48. PDI için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için

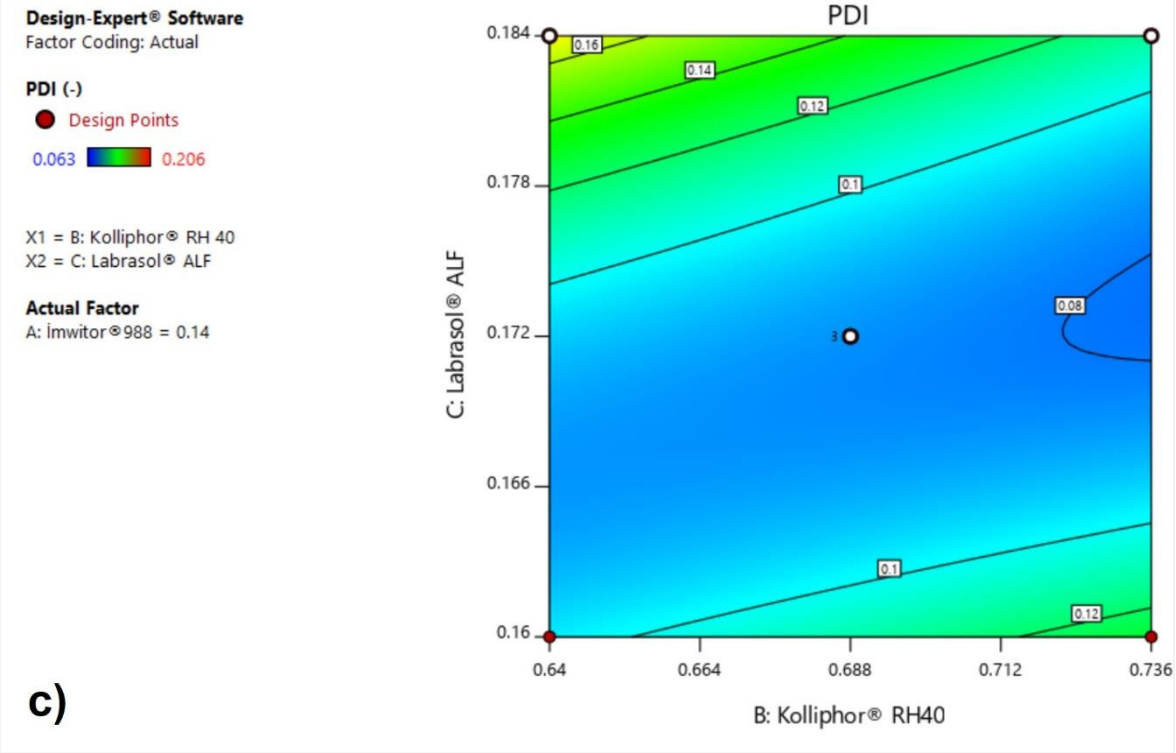


Şekil 4.48. (devam) PDI için yanıt yüzey grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için





Şekil 4.49. PDI için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için



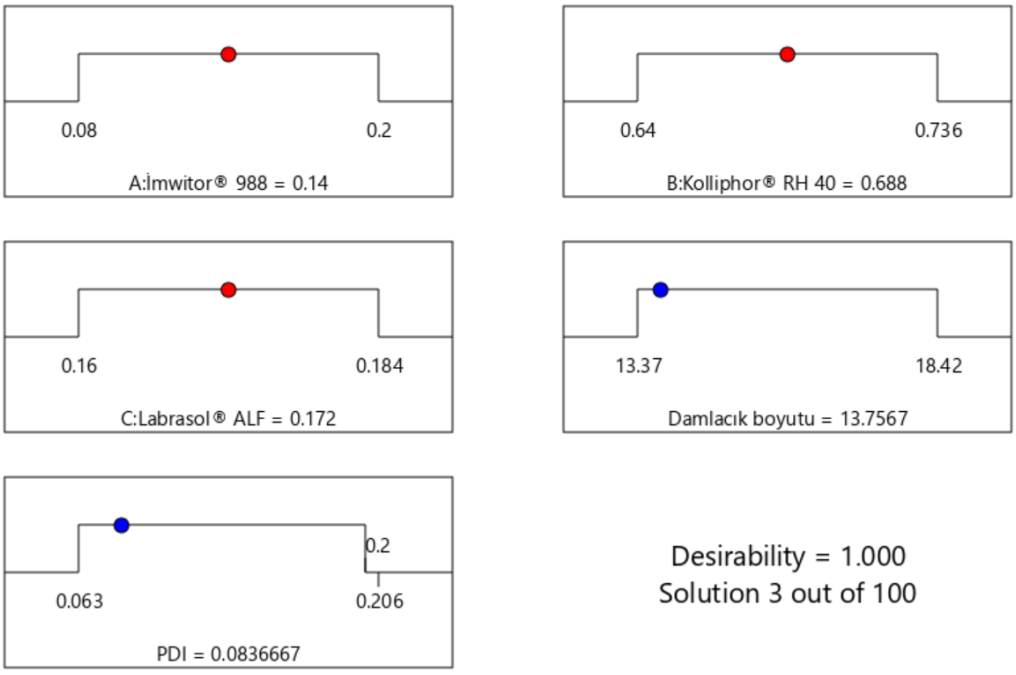
Şekil 4.49. (devam) PDI için kontur grafikleri a) İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40 bağımsız değişkenleri için b) İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için c) Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri için

Optimum SEDDS formülasyon bileşiminin belirlenmesinde Design Expert® programının sayısal optimizasyon özelliği kullanılmıştır. İmwitor® 988, Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF bağımsız değişkenleri ve damlacık boyutu ve PDI bağımlı değişkenleri için hedef özellikler programa girilmiştir. Bağımsız değişkenler için hedef özellikler emülsifikasyon alanının alt ve üst değerleri olarak belirlenmiştir. Geliştirilen SEDDS formülasyonu için damlacık boyutunun 100 nm'den PDI'nın 0,2'den küçük olması amaçlanmaktadır. Damlacık boyutu ve PDI için hedef özellik sırasıyla 100 nm ve 0,2'den küçük olduğu için Design Expert® programı tarafından oluşturulan 15 formülasyona ait damlacık boyutu ve PDI ölçüm sonuçlarının maksimum ve minimum değerleri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.44). Bağımsız ve bağımlı değişkenler için hedef özellikler Çizelge 4.47'de sunulmuştur.

Çizelge 4.47. Bağımsız ve bağımlı değişkenler için hedef özellikler

Değişken	Hedef özellik	Alt değer	Üst değer	Birim
İmwitor® 988	Belirtilen aralık	0,080	0,200	g
Kolliphor® RH40	Belirtilen aralık	0,640	0,736	g
Labrasol® ALF	Belirtilen aralık	0,160	0,184	g
Damlacık boyutu	Belirtilen aralık	13,4	18,4	nm
PDI	Belirtilen aralık	0,063	0,200	-

SEDD sistemin hedef özelliklerinden hareketle Design Expert® programı tarafından belirlenen çözümlerden 1 arzedilebilirlik değerini (istenilen hedefe ulaşma) ve 4:1 S_{mix} oranını sağlayan bağımsız değişken miktarları optimum bileşim olarak değerlendirmek üzere seçilmiştir. Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS bileşimi, tahmin edilen damlacık boyutu ve PDI özellikleri Şekil 4.50'de gösterilmiştir.



Şekil 4.50. Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS formülasyonun bileşimi ve özellikleri

Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS formülasyon bileşimi için tahmin edilen damlacık boyutu ve PDI değerleri %95 güven aralığında belirlenmiş ve Çizelge 4.48'de sunulmuştur. Design Expert® programı tarafından damlacık boyutu 13,8 nm, PDI 0,083 olarak tahmin edilmiştir. %95 güven aralığı sonuçlarına göre damlacık boyutunun 13,0 nm - 14,5 nm aralığında, PDI'nın 0,050 - 0,120 aralığında olması gereklidir.

Çizelge 4.48. Kesinleştirilmemiş optimum SEDDS'in %95 güven aralığında damlacık boyutu ve PDI değerleri

Bağımlı Değişken	Tahmin edilen ortalama değer	Medyan	SS	n	Alt güven aralığı	Üst güven aralığı
Damlacık boyutu (nm)	13,8	13,8	0,52	1	13,0	14,5
PDI	0,084	0,083	0,02	1	0,049	0,118

Bileşimi Şekil 4.50'de sunulan kesinleştirilmemiş optimum SEDDS formülasyonun deneysel sonuçlara göre damlacık boyutu 14,3 ± 0,2 nm ve PDI 0,113 ± 0,036 olarak ölçülmüştür. Ölçüm değerleri Çizelge 4.48'de sunulan %95 güven aralığında çıkmıştır. Formülasyon kesinleştirilmiş ve optimum formülasyon bileşimi İmwitor® 988, Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF için sırasıyla 0,140 g, 0,688 g ve 0,172 g olarak belirlenmiştir. Optimum SEDDS formülasyon bileşimi ve ölçülen damlacık boyutu ve PDI değerleri Çizelge 4.49'da sunulmuştur.

Çizelge 4.49. Optimum SEDDS formülasyon bileşimi ve ölçülen damlacık boyutu ve PDI değerleri

Bağımsız değişken	Miktar (g)
İmwitor® 988	0,140
Kolliphor® RH40	0,688
Labrasol® ALF	0,172
Bağımlı değişken	**Ölçülen değer**
Damlacık boyutu (nm)	14,2 ± 0,2
PDI	0,113 ± 0,036

(Ort ± SS, n=3)

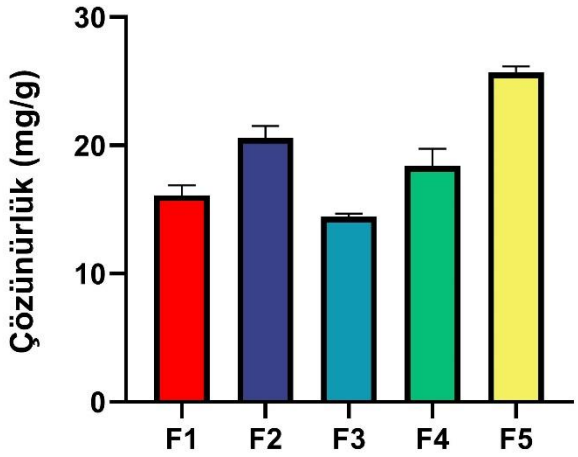
4.3.4. SEDD sistemlere eksemestan yüklenmesi

F1, F2, F3, F4 ve F5 kodlu formülasyonların tez kapsamında ne amaçla geliştirildiği Bölüm 3.2.3'te anlatılmış olup formülasyon bileşenleri Çizelge 3.9'da sunulmuştur. Bu formülasyonlara EKM yükleme çalışmaları yine Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için belirlenen EKM çözünürlüğü Çizelge 4.50 ve Şekil 4.51'de sunulmuştur. Tüm formülasyonların 1 g'ına 15 mg EKM yüklenmesine karar verilmiştir. EKM yüklü formülasyonlar Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.50. Geliştirilen SEDDS formülasyonlarında EKM çözünürlüğü

Formülasyon	EKM çözünürlüğü (mg/g)
F1	16,1 ± 0,8
F2	20,6 ± 0,9
F3	14,9 ± 0,6
F4	18,4 ± 1,3
F5	25,7 ± 0,5

(Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.51. SEDDS fomülasyonlarında EKM çözünürlüğü (Ort ± SS, n=3)

4.4. Geliştirilen SEDD Sistemlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

F1, F2, F3, F4 ve F5 nolu formülasyonlarda gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

4.4.1. Damlacık boyutu ve PDI

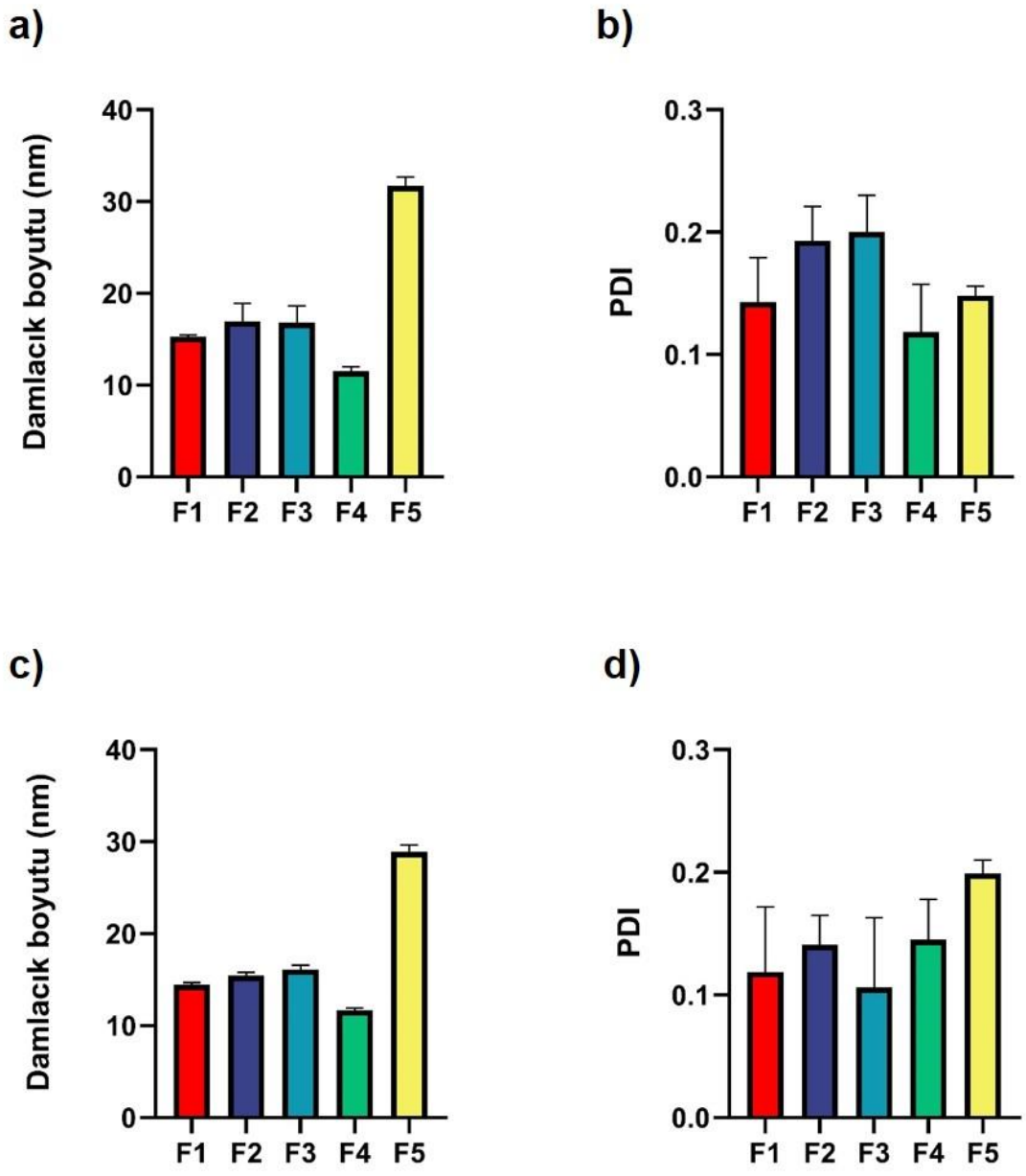
EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDD sistemlere ait damlacık boyutu ve PDI sonuçları Çizelge 4.51 ve Şekil 4.52'de, damlacık büyüklüğü dağılımları Şekil 4.53 ve Şekil 4.54'te sunulmuştur.

Çizelge 4.51. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait damlacık boyutu ve PDI sonuçları

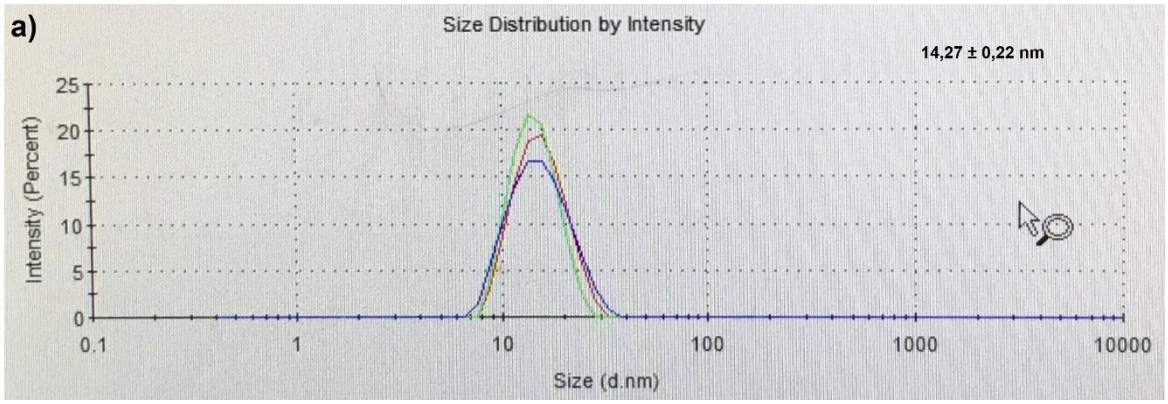
Formülasyon	Damlacık boyutu (nm)	PDI
	EKM içermeyen	
F1	14,3 ± 0,2	0,113 ± 0,036
F2	17,0 ± 2,0	0,193 ± 0,028
F3	16,3 ± 0,5	0,140 ± 0,044
F4	11,5 ± 0,5	0,118 ± 0,039
F5	31,7 ± 1,0	0,148 ± 0,008
	EKM yüklü	
F1	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
F2	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
F3	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
F4	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
F5	28,9 ± 0,8[a]	0,199 ± 0,011

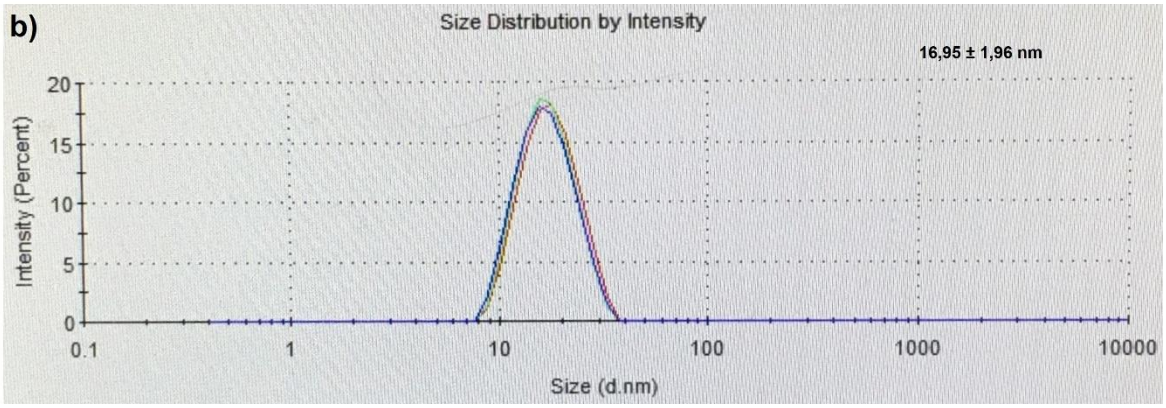
(Ort ± SS, n=3)

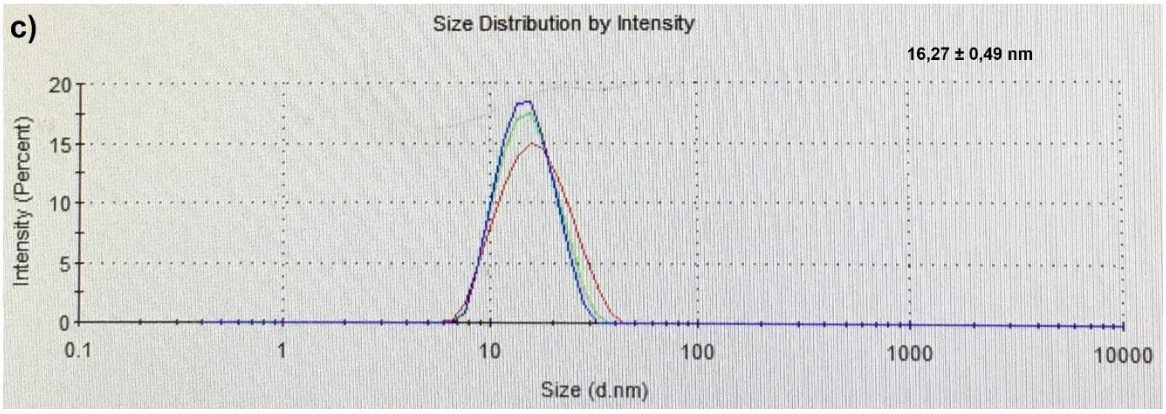
[a]: p<0,05 EKM içermeyen ve EKM yüklü F5 formülasyonu karşılaştırıldığında



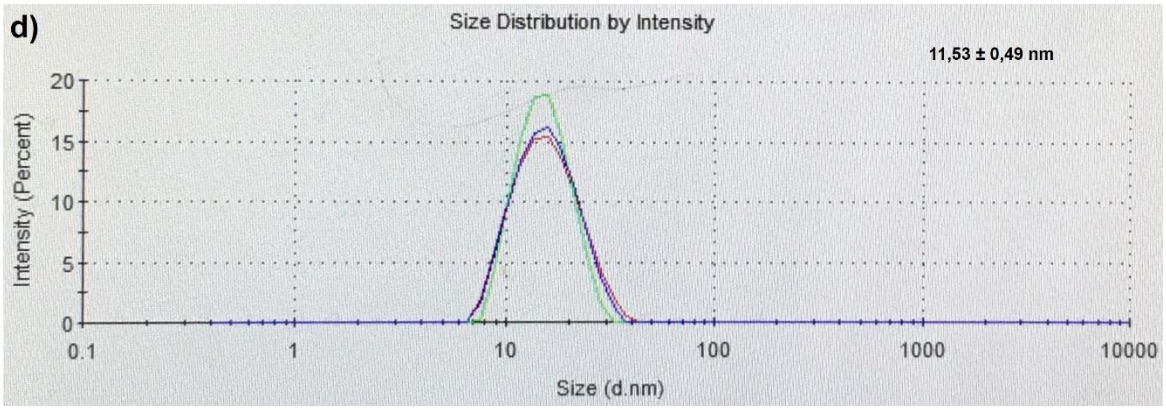
Şekil 4.52. SEDDS formülasyonların damlacık boyutu ve PDI sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) EKM içermeyen SEDDS'lerin damlacık boyutları b) EKM içermeyen SEDDS'lerin PDI'ları c) EKM yüklü SEDDS'lerin damlacık boyutları d) EKM yüklü SEDDS'lerin PDI'ları

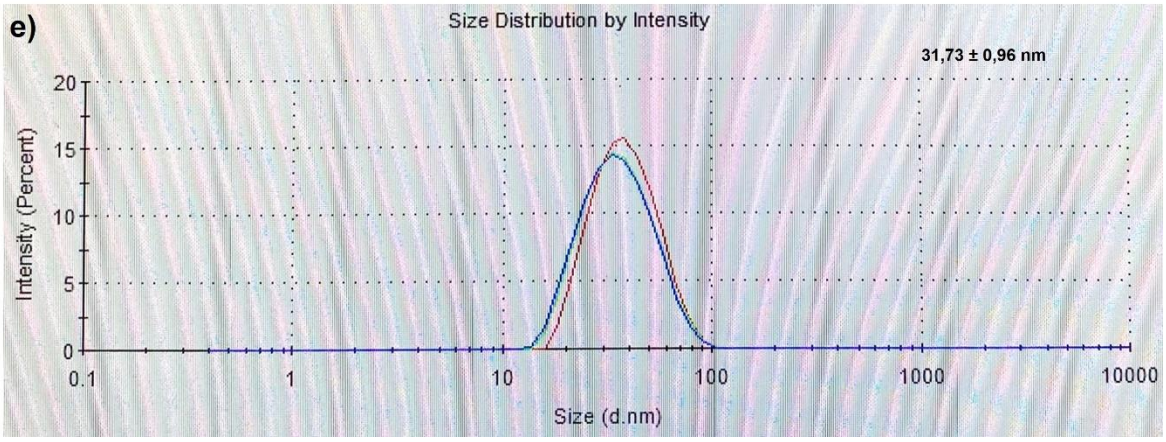




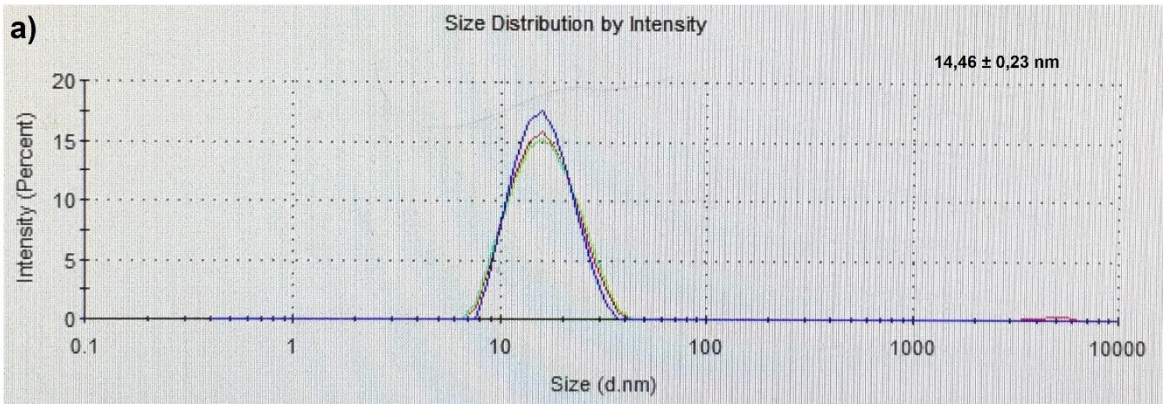


Şekil 4.53. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

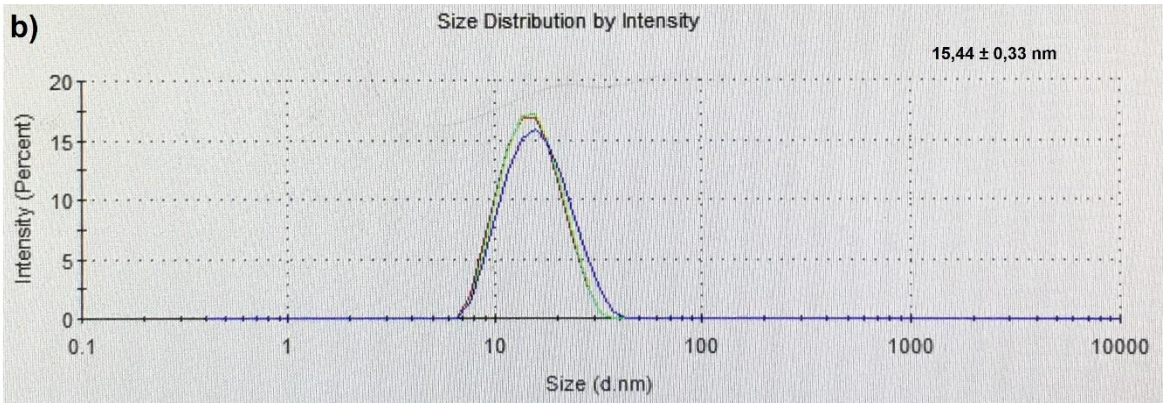


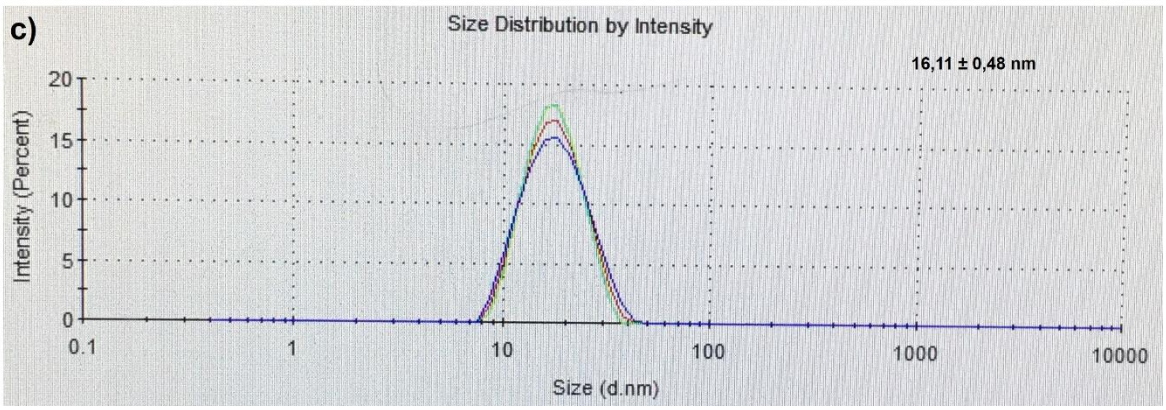


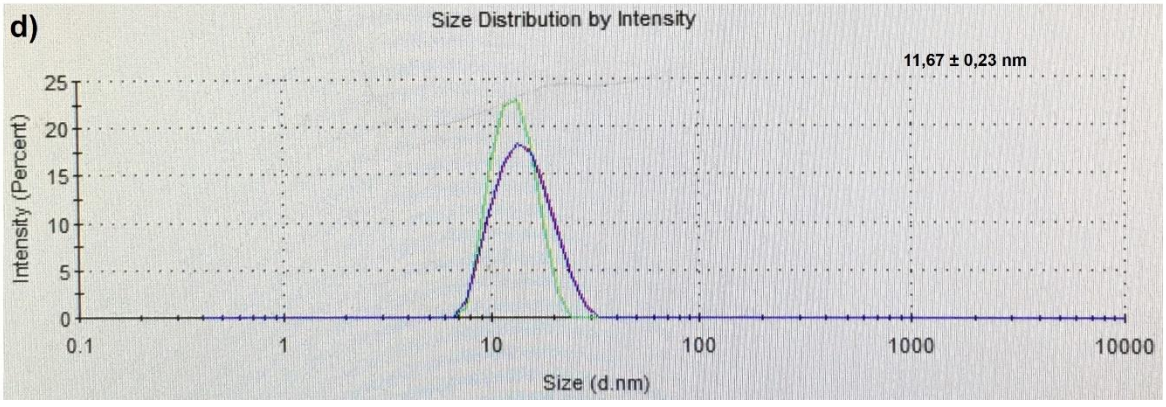
Şekil 4.53. (devam) EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



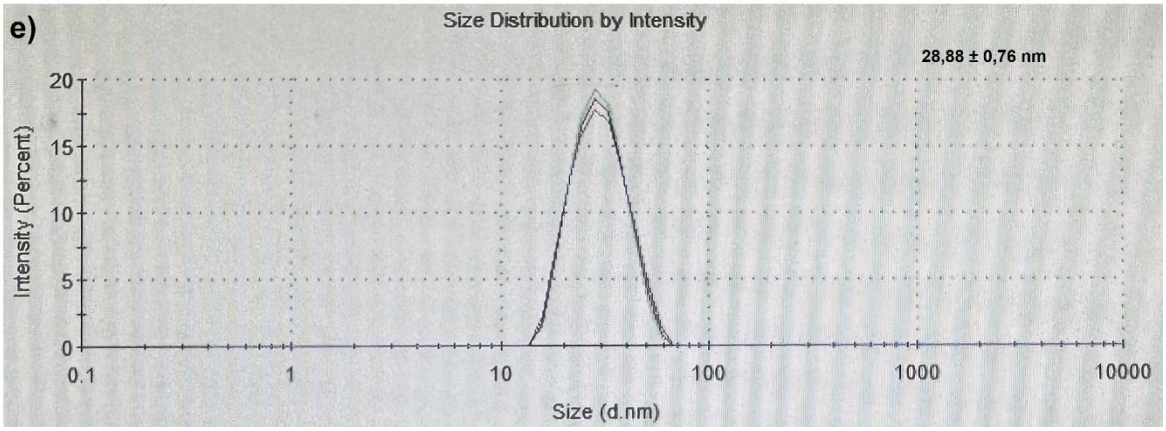
Şekil 4.54. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu







Şekil 4.54. (devam) EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu



Şekil 4.54. (devam) EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının damlacık boyutu dağılımları (Ort ± SS, n=3) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

4.4.2. Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonları için farklı seyreltme oranları ve pH'nın damlacık boyutu ve PDI değerlerine etkisi Çizelge 4.52 - Çizelge 4.56'da sunulmuştur.

Çizelge 4.52. EKM içermeyen ve EKM yüklü F1 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları

EKM içermeyen F1						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	13,2 ± 0,2	0,050 ± 0,009	20,3 ± 0,3	0,188 ± 0,004	14,1 ± 0,5	0,042 ± 0,010
1:100	14,0 ± 0,3	0,048 ± 0,014	14,8 ± 0,4	0,092 ± 0,007	15,0 ± 0,2	0,090 ± 0,015
1:250	14,3 ± 0,2	0,143 ± 0,036	15,5 ± 0,1	0,126 ± 0,034	14,8 ± 0,4	0,073 ± 0,014
1:500	15,7 ± 0,7	0,171 ± 0,039	15,5 ± 0,1	0,198 ± 0,036	16,0 ± 0,3	0,209 ± 0,017
EKM yüklü F1						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	14,2 ± 0,5	0,089 ± 0,007	14,3 ± 0,2	0,102 ± 0,016	14,2 ± 0,3	0,058 ± 0,015
1:100	14,6 ± 0,4	0,111 ± 0,018	14,9 ± 0,1	0,086 ± 0,001	14,9 ± 0,2	0,059 ± 0,016
1:250	14,6 ± 0,1	0,112 ± 0,002	21,7 ± 1,0	0,219 ± 0,024	15,8 ± 0,5	0,146 ± 0,039
1:500	14,9 ± 0,2	0,146 ± 0,017	18,0 ± 0,4	0,220 ± 0,018	14,6 ± 0,2	0,101 ± 0,001

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

Çizelge 4.53. EKM içermeyen ve EKM yüklü F2 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları

EKM içermeyen F2						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	14,59 ± 0,79	0,070 ± 0,008	14,83 ± 0,37	0,087 ± 0,035	14,77 ± 0,77	0,094 ± 0,040
1:100	14,84 ± 0,74	0,087 ± 0,021	14,94 ± 0,45	0,077 ± 0,014	15,41 ± 0,71	0,129 ± 0,019
1:250	16,80 ± 0,63	0,173 ± 0,037	15,42 ± 0,65	0,156 ± 0,059	16,92 ± 1,44	0,199 ± 0,014
1:500	16,32 ± 0,50	0,188 ± 0,025	15,27 ± 0,26	0,156 ± 0,029	14,97 ± 0,62	0,155 ± 0,041
EKM yüklü F2						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	14,2 ± 0,3	0,055 ± 0,011	14,9 ± 0,4	0,058 ± 0,010	Bulanma	-
1:100	14,5 ± 0,5	0,071 ± 0,009	14,8 ± 0,5	0,078 ± 0,020	Bulanma	-
1:250	14,6 ± 0,5	0,071 ± 0,012	14,9 ± 0,4	0,113 ± 0,011	Bulanma	-
1:500	15,1 ± 1,0	0,119 ± 0,027	17,9 ± 2,7	0,160 ± 0,059	Bulanma	-

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

Çizelge 4.54. EKM içermeyen ve EKM yüklü F3 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları

EKM içermeyen F3						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	16,1 ± 0,2	0,050 ± 0,013	16,8 ± 0,6	0,100 ± 0,010	16,1 ± 0,5	0,042 ± 0,010
1:100	17,5 ± 1,7	0,163 ± 0,050	16,9 ± 0,7	0,124 ± 0,032	16,7 ± 0,5	0,109 ± 0,026
1:250	16,3 ± 0,5	0,140 ± 0,044	17,5 ± 0,3	0,144 ± 0,034	17,3 ± 0,9	0,143 ± 0,054
1:500	18,4 ± 1,3	0,212 ± 0,019	17,6 ± 1,2	0,161 ± 0,045	25,0 ± 1,6	0,210 ± 0,017
EKM yüklü F3						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	15,2 ± 0,1	0,085 ± 0,008	16,8 ± 0,8	0,099 ± 0,007	16,3 ± 0,7	0,102 ± 0,020
1:100	16,6 ± 0,1	0,149 ± 0,003	16,7 ± 0,7	0,075 ± 0,050	16,5 ± 0,3	0,113 ± 0,019
1:250	16,3 ± 0,6	0,076 ± 0,021	16,8 ± 0,9	0,129 ± 0,015	16,9 ± 1,0	0,105 ± 0,038
1:500	15,5 ± 0,2	0,102 ± 0,024	22,4 ± 2,5	0,215 ± 0,002	20,9 ± 1,3	0,201 ± 0,048

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

Çizelge 4.55. EKM içermeyen ve EKM yüklü F4 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları

EKM içermeyen F4						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	18,8 ± 2,0	0,265 ± 0,046	12,2 ± 0,1	0,104 ± 0,013	13,7 ± 0,2	0,157 ± 0,017
1:100	12,7 ± 0,6	0,155 ± 0,034	12,8 ± 0,3	0,188 ± 0,006	11,8 ± 0,1	0,106 ± 0,009
1:250	11,2 ± 0,3	0,139 ± 0,031	13,2 ± 0,5	0,210 ± 0,011	12,3 ± 0,4	0,189 ± 0,006
1:500	14,3 ± 1,3	0,213 ± 0,024	25,1 ± 9,1	0,256 ± 0,143	13,2 ± 0,5	0,264 ± 0,020
EKM yüklü F4						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	12,8 ± 0,3	0,173 ± 0,014	12,7 ± 0,2	0,098 ± 0,002	Bulanma	-
1:100	12,2 ± 0,2	0,173 ± 0,008	11,7 ± 0,3	0,077 ± 0,017	12,4 ± 0,4	0,111 ± 0,001
1:250	12,1 ± 1,0	0,147 ± 0,039	12,2 ± 0,3	0,146 ± 0,042	11,7 ± 0,1	0,140 ± 0,002
1:500	13,0 ± 0,9	0,240 ± 0,030	13,3 ± 0,8	0,205 ± 0,009	13,4 ± 0,9	0,202 ± 0,010

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

Çizelge 4.56. EKM içermeyen ve EKM yüklü F5 formülasyonu için seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık sonuçları

EKM içermeyen F5						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	120,1 ± 2,4	0,678 ± 0,017	114,4 ± 1,2	0,647 ± 0,120	211,6 ± 6,5	0,583 ± 0,043
1:100	34,0 ± 1,8	0,368 ± 0,011	30,9 ± 1,2	0,337 ± 0,003	46,3 ± 1,9	0,709 ± 0,005
1:250	31,4 ± 1,1	0,151 ± 0,007	32,8 ± 0,8	0,165 ± 0,008	34,0 ± 1,4	0,209 ± 0,003
1:500	38,0 ± 1,4	0,206 ± 0,007	38,2 ± 1,9	0,201 ± 0,010	39,1 ± 2,9	0,232 ± 0,054
EKM yüklü F5						
Seyreltme oranı	**Distile su**		**pH 1,2**		**pH 6,8**	
	DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
1:50	208,2 ± 0,5	0,462 ± 0,019	163,2 ± 1,7	0,538 ± 0,023	201,6 ± 3,5	0,483 ± 0,040
1:100	45,0 ± 1,9	0,791 ± 0,009	38,5 ± 1,7	0,602 ± 0,020	36,3 ± 1,2	0,205 ± 0,040
1:250	28,3 ± 0,1	0,192 ± 0,006	29,6 ± 1,2	0,192 ± 0,007	31,5 ± 1,6	0,218 ± 0,001
1:500	32,1 ± 0,2	0,196 ± 0,012	32,7 ± 0,2	0,193 ± 0,010	35,2 ± 1,7	0,187 ± 0,006

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

4.4.3. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonları için kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği sonuçları Çizelge 4.57'de sunulmuştur. EKM içermeyen ve EKM yüklü F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları berrak görünüme sahip emülsiyonlar

oluştururken, EKM içermeyen ve EKM yüklü F5 formülasyonu biraz daha az berrak görünüme sahip emülsiyonlar oluşturmuştur.

Çizelge 4.57. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği sonuçları

Formülasyon	EKM içermeyen		EKM yüklü	
	Görünüm	***Sınıf***	***Görünüm***	***Sınıf***
F1	Berrak	A	Berrak	A
F2	Berrak	A	Berrak	A
F3	Berrak	A	Berrak	A
F4	Berrak	A	Berrak	A
F5	Daha az berrak	B	Daha az berrak	B

4.4.4. Kendiliğinden emülsifikasyon zamanı

Etkin madde içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonları için 50 rpm karıştırma hızında 37°C distile suya 1:250 oranında ilave edildikten sonra berrak veya daha az berrak, homojen sistem elde edilinceye kadar geçen süre Çizelge 4.58'de sunulmuştur.

Çizelge 4.58. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifikasyon zamanı sonuçları

Formülasyon	Süre (sn)	
	EKM içermeyen	***EKM yüklü***
F1	65,8 ± 3,3	58,2 ± 7,3
F2	53,9 ± 3,1	51,8 ± 3,8
F3	58,2 ± 3,2	59,1 ± 2,1
F4	79,4 ± 3,8	75,6 ± 1,7
F5	112,4 ± 9,0	110,7 ± 6,6

(Ort ± SS, n=3)

4.4.5. %Transmittans

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının %Transmittans ölçüm sonuçları Çizelge 4.59'da sunulmuştur.

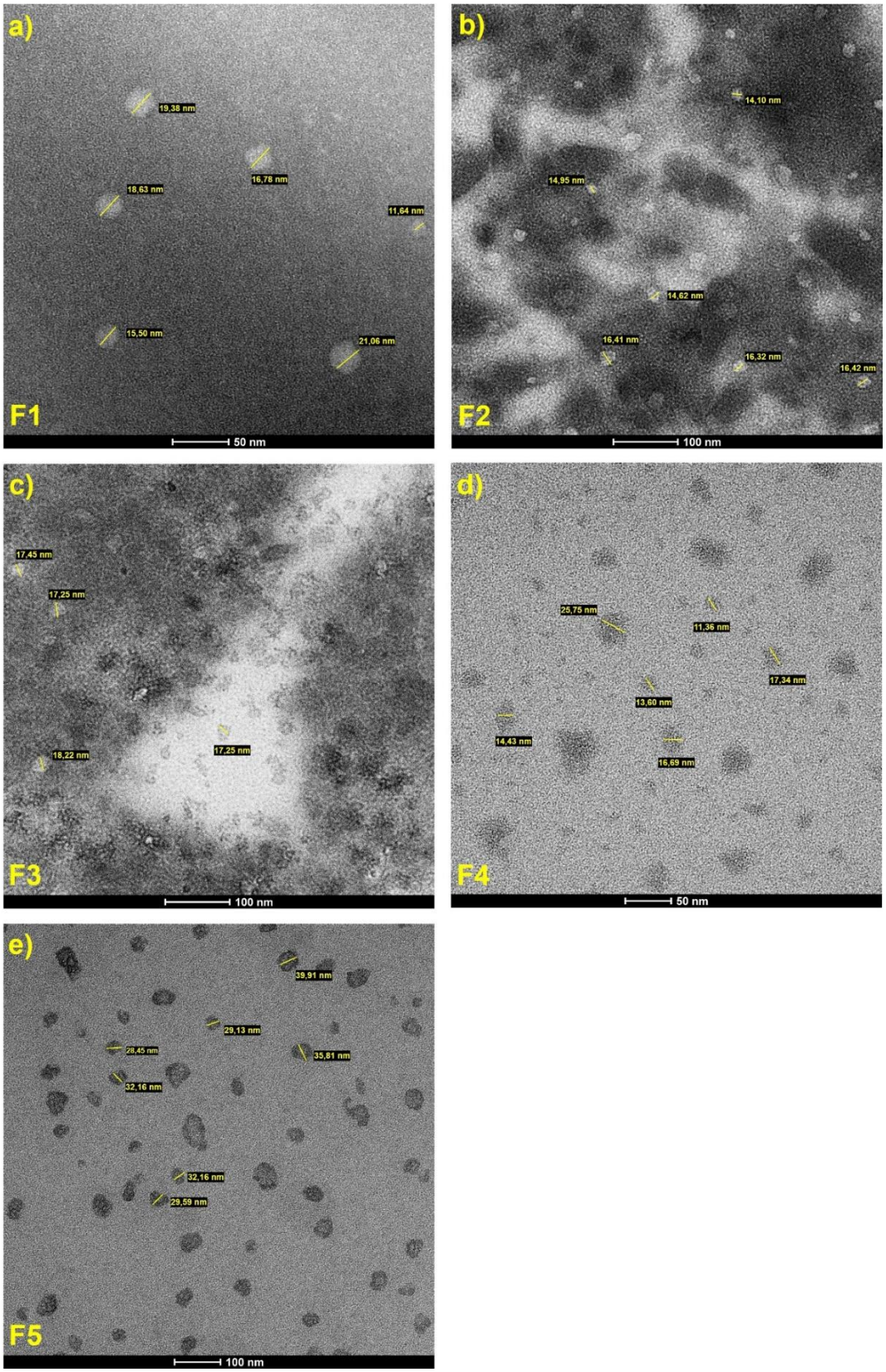
Çizelge 4.59. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının %Transmittans sonuçları

Formülasyon	**%Transmittans**	
	EKM içermeyen	***EKM yüklü***
F1	100,0 ± 0,0	99,9 ± 0,0
F2	99,9 ± 0,0	101,4 ± 0,0
F3	99,9 ± 0,0	99,9 ± 0,0
F4	100,1 ± 0,0	100,4 ± 0,0
F5	99,8 ± 0,0	99,9 ± 0,0

(Ort ± SS, n=3)

4.4.6. Morfoloji

EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait TEM görüntüleri Resim 4.2'de sunulmuştur. ImageJ® programı ile belirlenen emülsiyon damlacıklarının boyutları resimler üzerinde gösterilmiştir. Emülsiyon damlacıklarının küresel olduğu ve boyutlarının Malvern Zeta Sizer ölçüm sonuçlarıyla örtüştüğü gözlenmiştir.



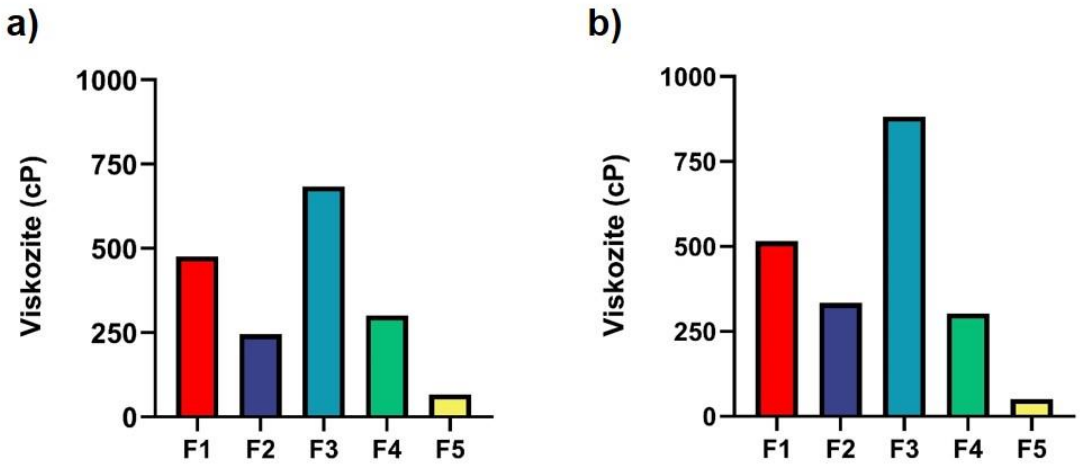
Resim 4.2. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait TEM görüntüleri a) F1 formülasyonuna ait TEM görüntüsü b) F2 formülasyonuna ait TEM görüntüsü c) F3 formülasyonuna ait TEM görüntüsü d) F4 formülasyonuna ait TEM görüntüsü e) F5 formülasyonuna ait TEM görüntüsü

4.4.7. Viskozite

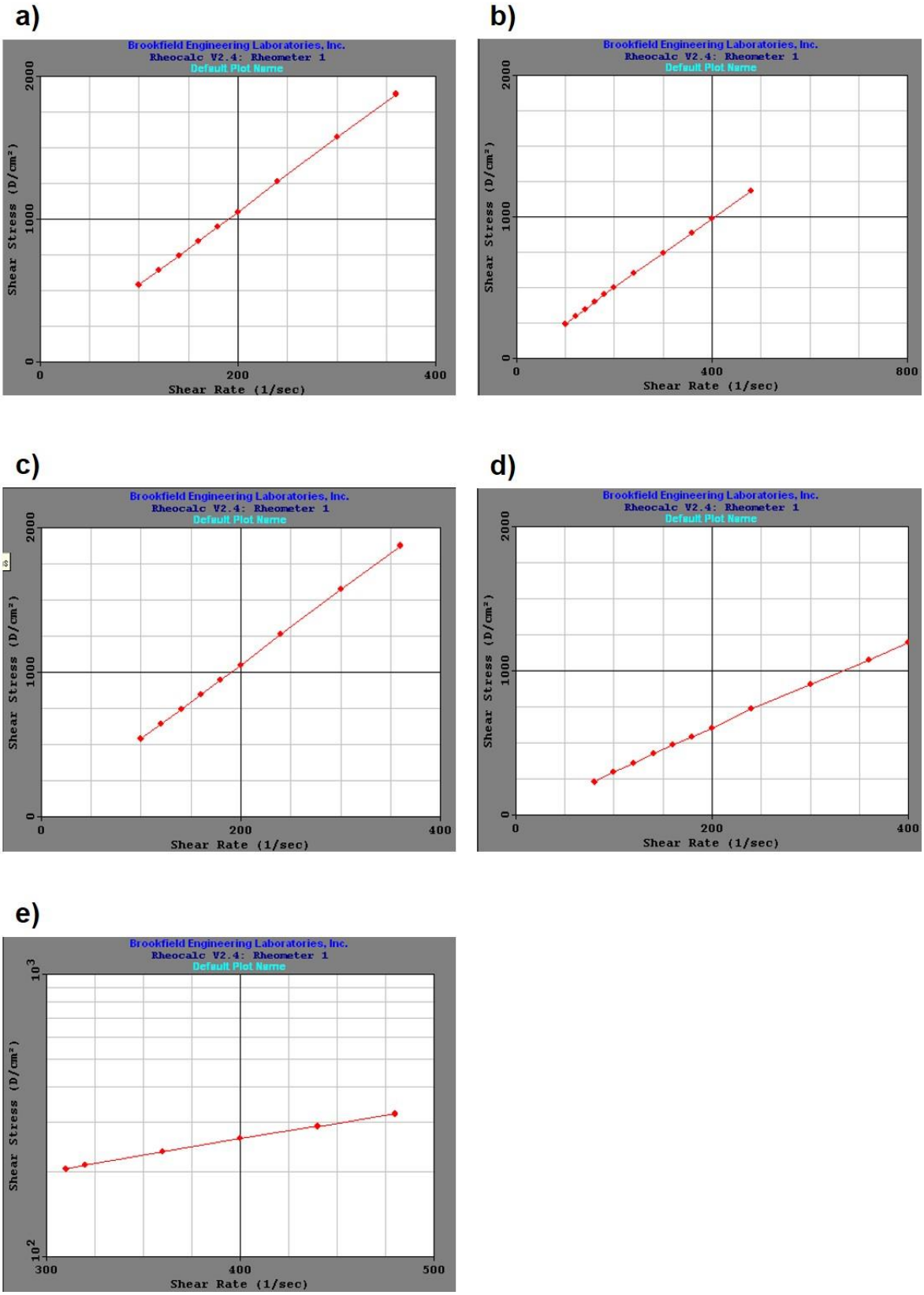
EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının viskozite ölçüm sonuçları Çizelge 4.60 ve Şekil 4.55'te, EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait reogramlar Şekil 4.56'da sunulmuştur.

Çizelge 4.60. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının viskozite sonuçları

Formülasyon	Viskozite (cP)	
	EKM içermeyen	***EKM yüklü***
F1	476	515,8
F2	245,5	334
F3	684	882
F4	301,4	302,7
F5	66,8	51,6



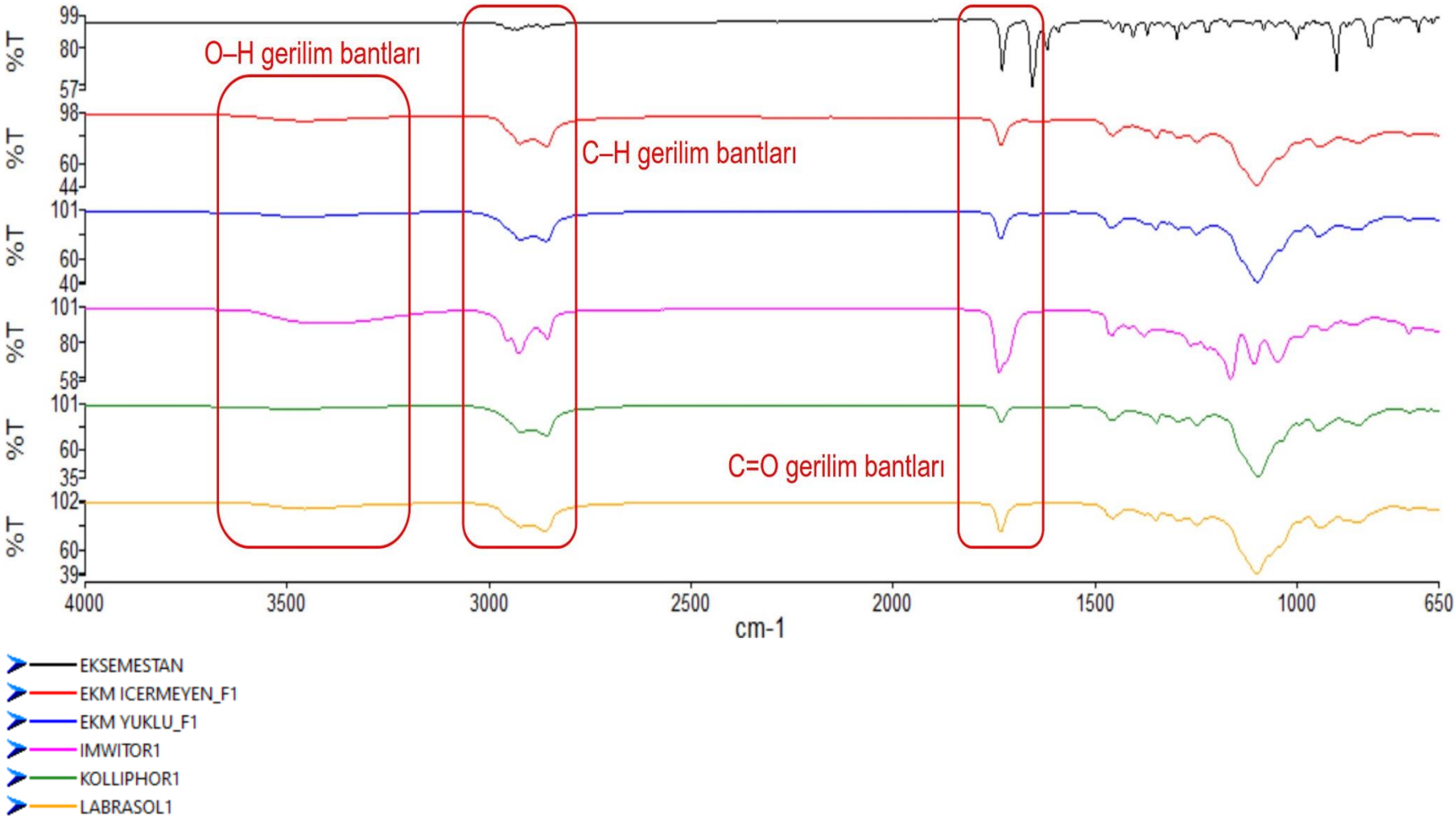
Şekil 4.55. SEDDS formülasyonlarına ait viskozite sonuçları a) EKM içermeyen formülasyonlara ait viskozite sonuçları b) EKM yüklü formülasyonlara ait viskozite sonuçları



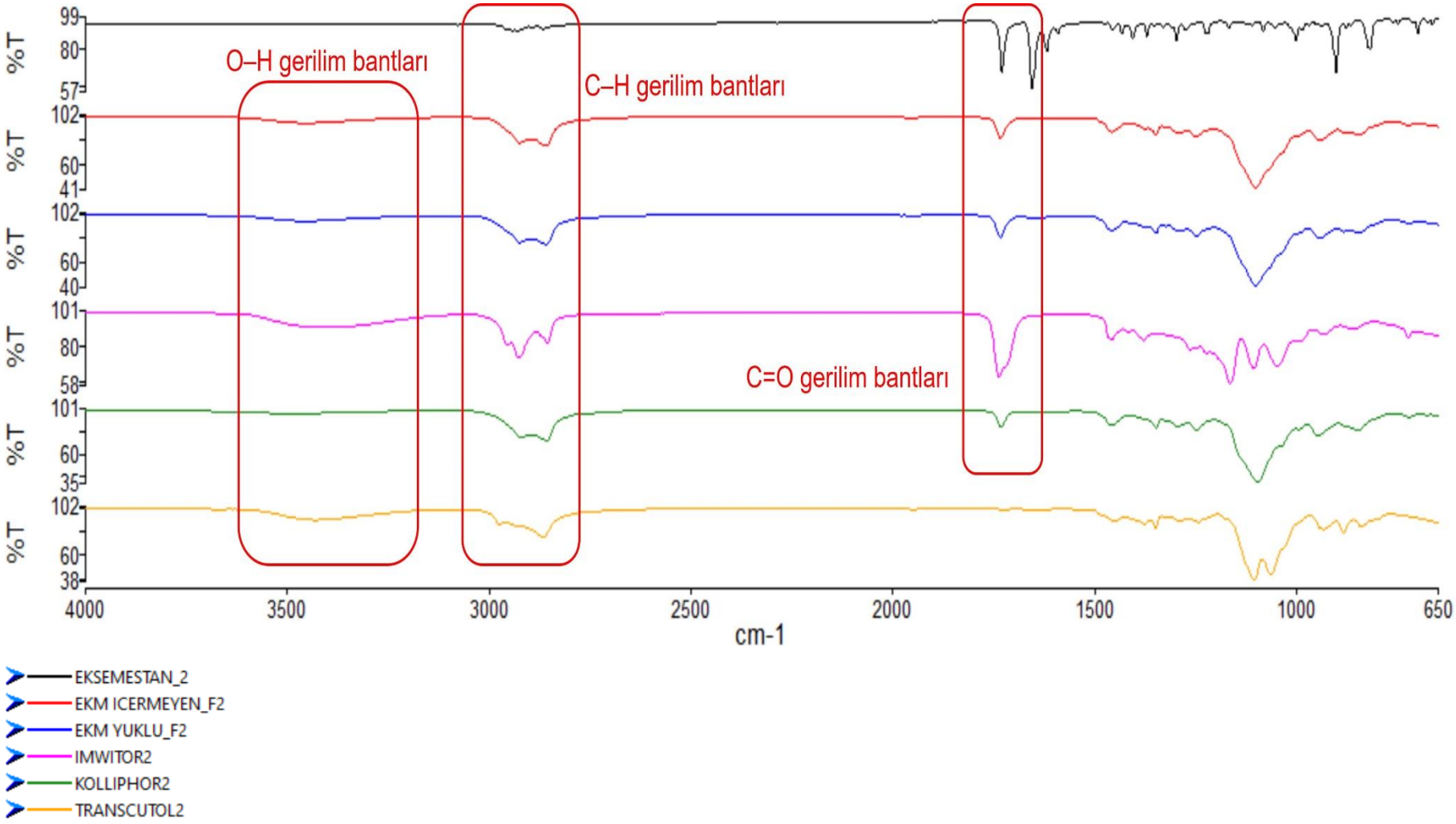
Şekil 4.56. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait reogramlar a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu

4.4.8. FT-IR analizi

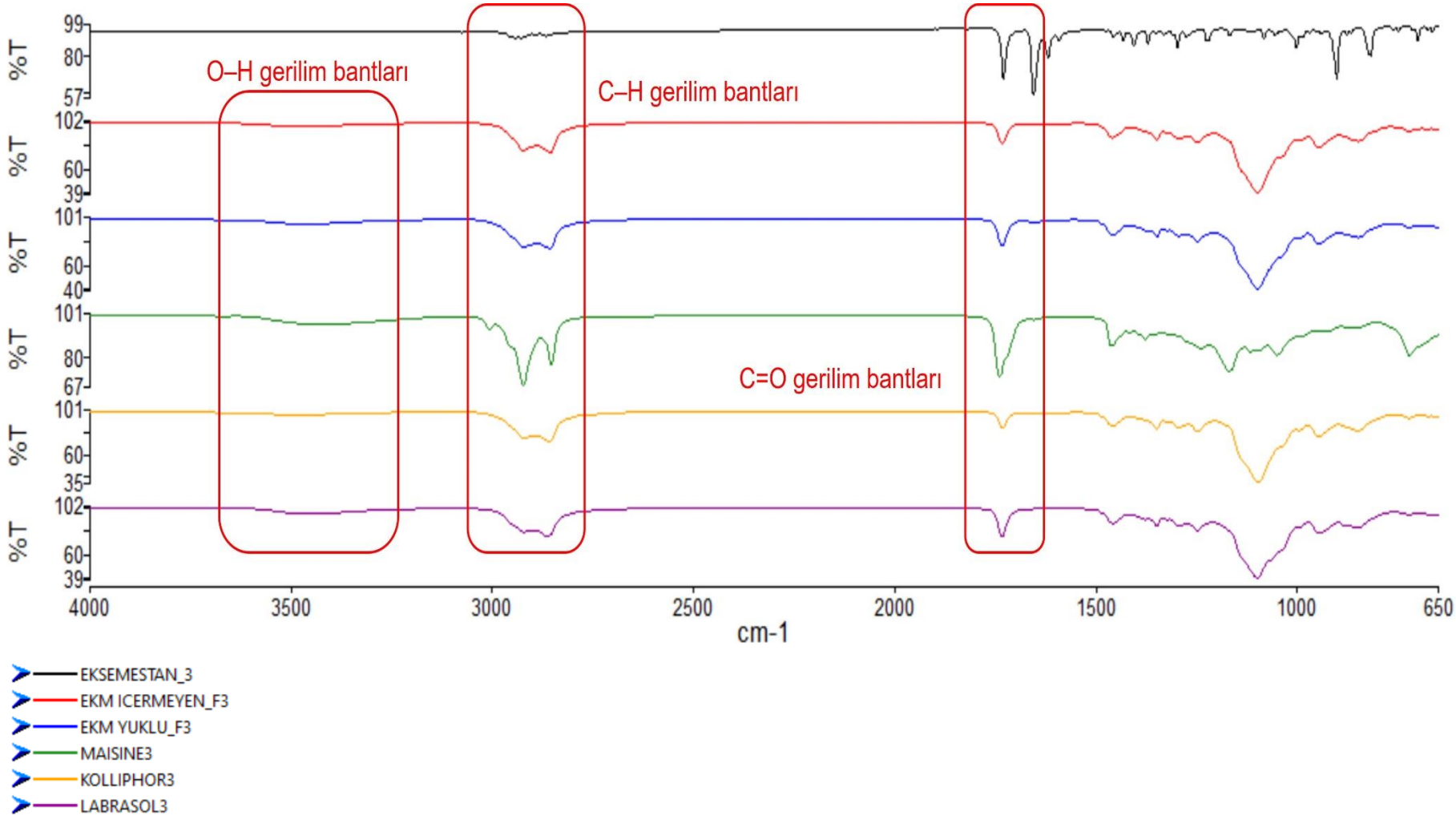
Saf EKM, etkin madde içermeyen SEDDS formülasyonları, EKM yüklü SEDDS formülasyonları ve formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelere ait spektrumlar Şekil 4.57 - Şekil 4.61'de sunulmuştur.



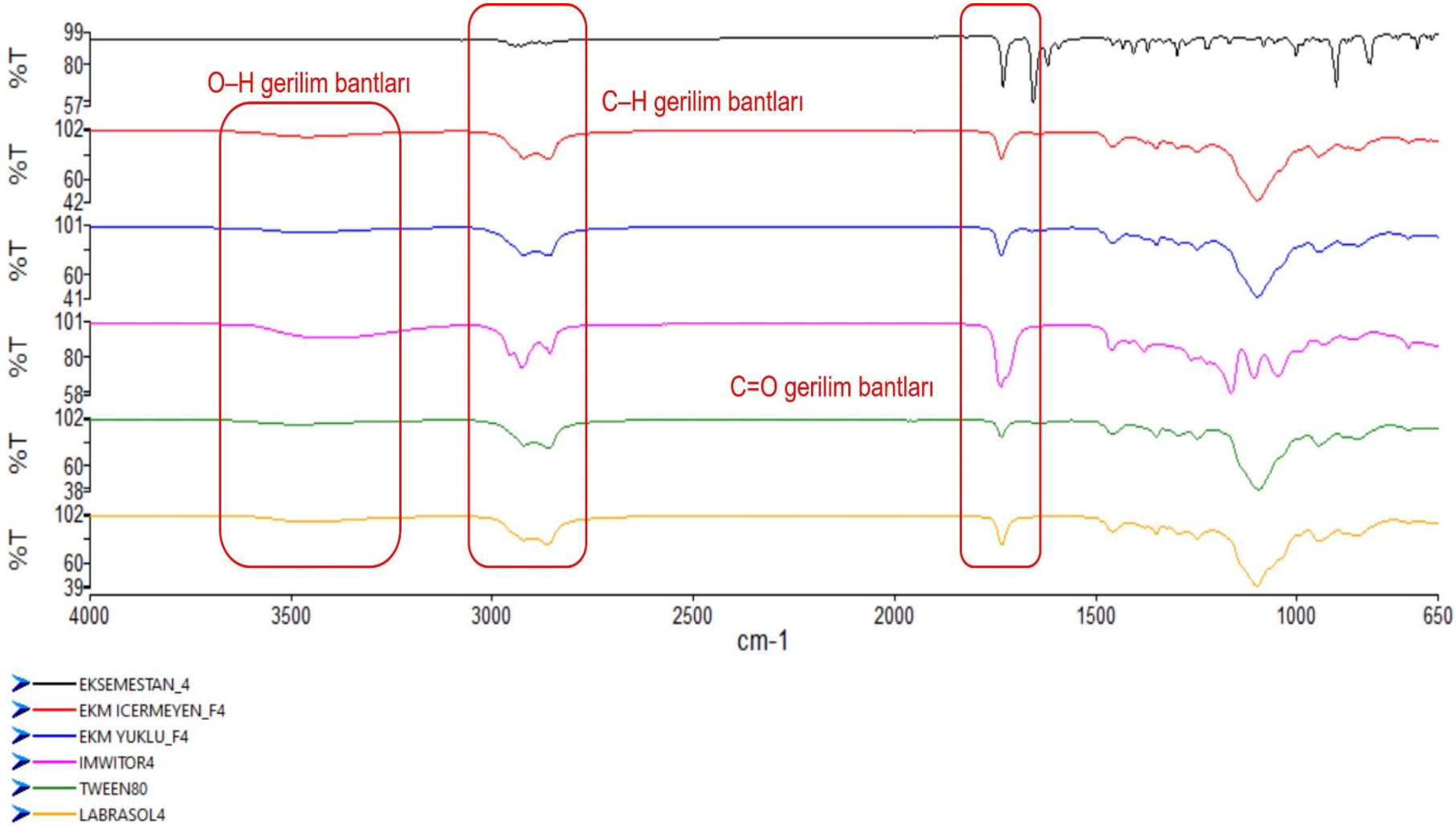
Şekil 4.57. EKM, etkin madde içermeyen F1, EKM yüklü F1, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu



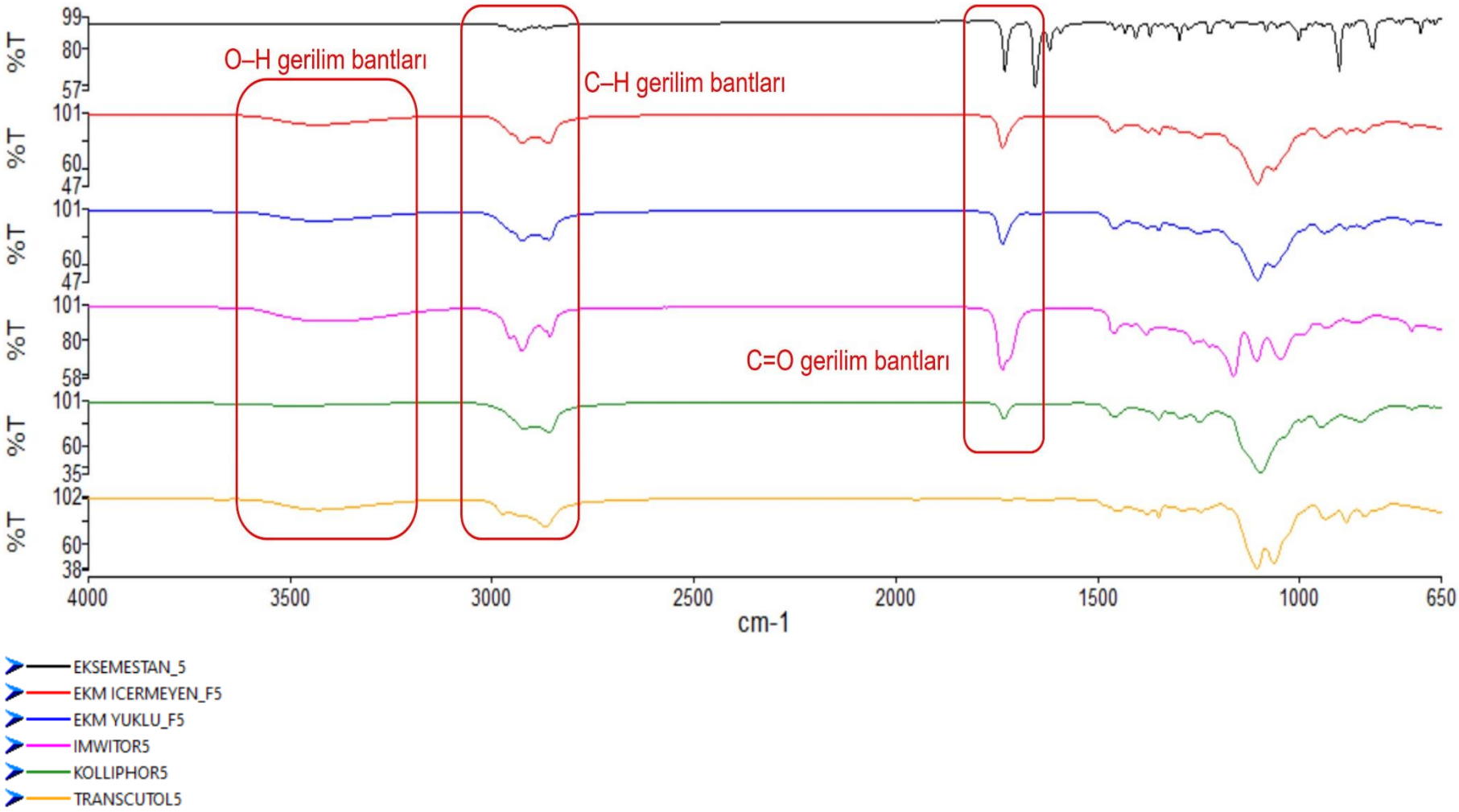
Şekil 4.58. EKM, etkin madde içermeyen F2, EKM yüklü F2, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Transcutol® HP'ye ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.59. EKM, etkin madde içermeyen F3, EKM yüklü F3, Maisine®, Kolliphor® RH40, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.60. EKM, etkin madde içermeyen F4, EKM yüklü F4, İmwitor® 988, Tween® 80, Labrasol® ALF'ye ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.61. EKM, etkin madde içermeyen F5, EKM yüklü F5, İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Transcutol® HP'ye ait FT-IR spektrumu

4.4.9. Termodinamik stabilite çalışmaları

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonların ısıtma-soğutma döngüsü, santrifüj ve donma-çözme olmak üzere üç basamakta gerçekleştirilen termodinamik stabilite çalışmalarına ait damlacık boyutu ve PDI ölçüm sonuçları Çizelge 4.61 - Çizelge 4.62 ve Şekil 4.62 - Şekil 4.63'te, faz ayrımı ve ilaç çökmesi açısından görsel olarak değerlendirilmesi Resim 4.3 ve Resim 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.61. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının ısıtma-soğutma döngüsü sonrası damlacık boyutu ve PDI sonuçları

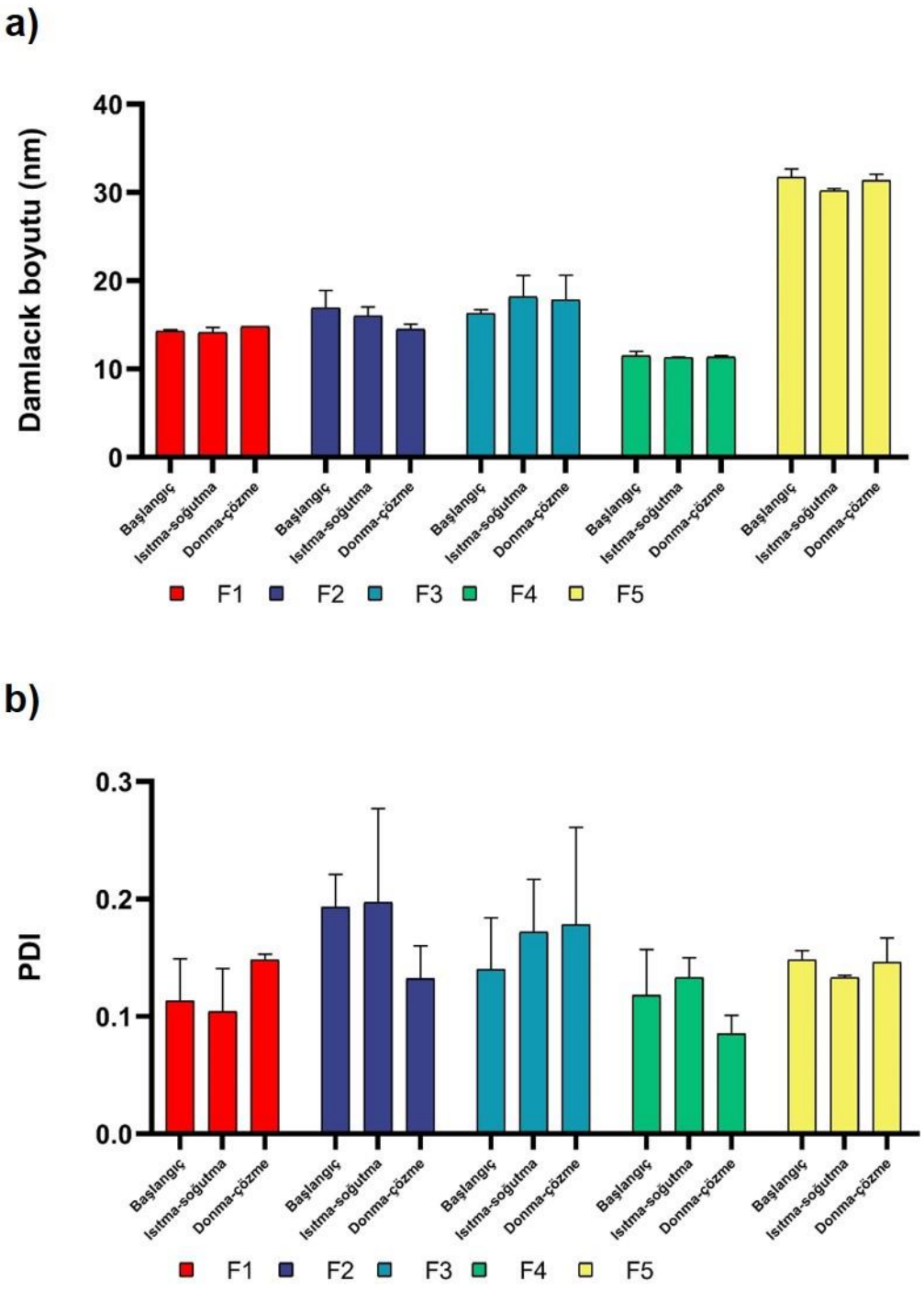
Formülasyon		**EKM içermeyen**		**EKM yüklü**	
		DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
F1	*Başlangıç*	14,3 ± 0,2	0,113 ± 0,036	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
	Döngü sonrası	14,2 ± 0,6	0,104 ± 0,037	14,2 ± 0,6	0,079 ± 0,031
F2	*Başlangıç*	17,0 ± 2,0	0,193 ± 0,028	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
	Döngü sonrası	16,0 ± 1,0	0,197 ± 0,080	15,7 ± 1,0	0,143 ± 0,063
F3	*Başlangıç*	16,3 ± 0,5	0,140 ± 0,044	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
	Döngü sonrası	18,2 ± 2,4	0,172 ± 0,045	17,3 ± 0,6	0,117 ± 0,031
F4	*Başlangıç*	11,5 ± 0,5	0,118 ± 0,039	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
	Döngü sonrası	11,3 ± 0,1	0,113 ± 0,017	11,4 ± 0,6	0,107 ± 0,021
F5	*Başlangıç*	31,7 ± 1,0	0,148 ± 0,008	28,9 ± 0,8	0,199 ± 0,011
	Döngü sonrası	30,2 ± 0,2	0,133 ± 0,002	31,2 ± 1,1	0,180 ± 0,011

(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu

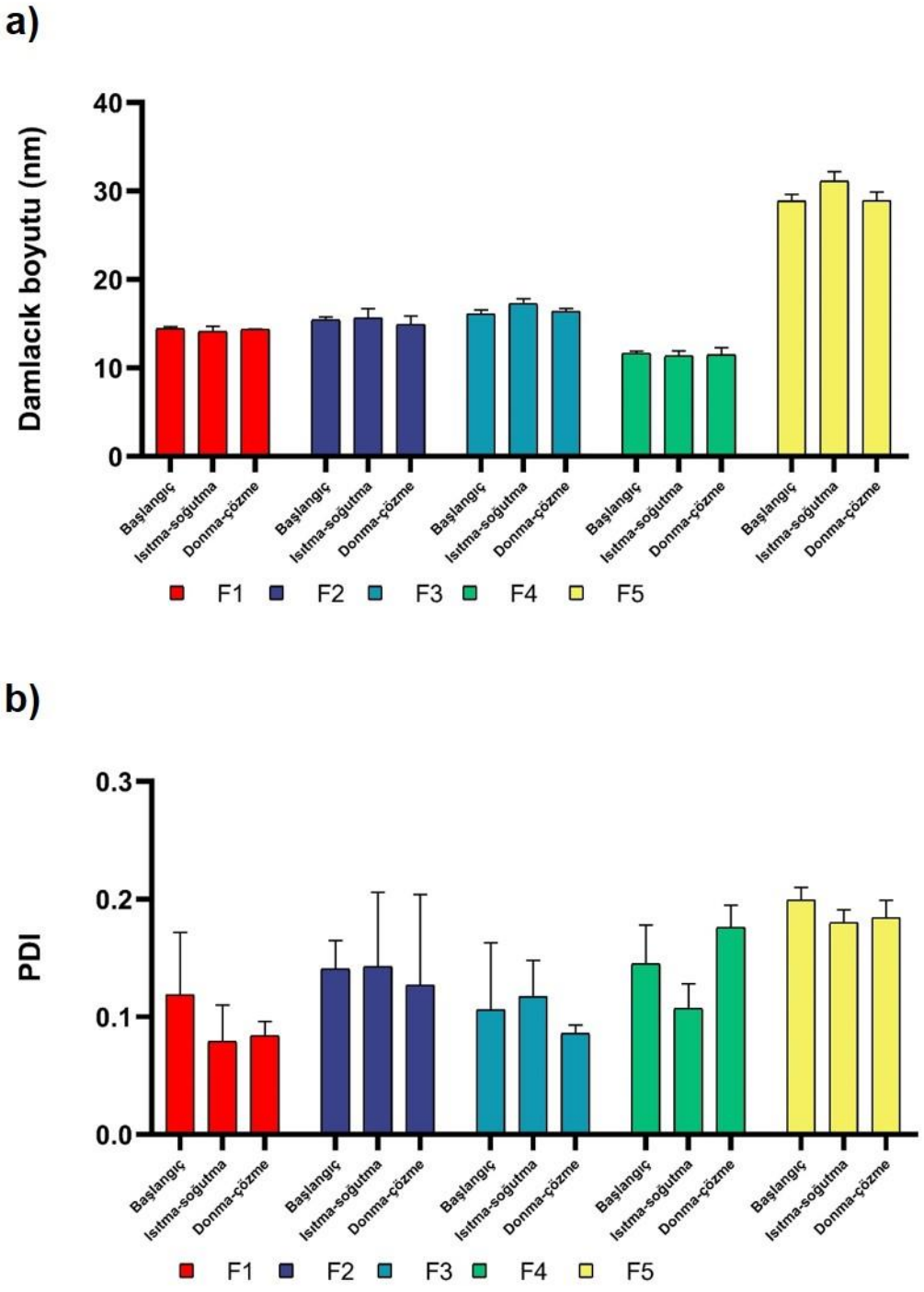
Çizelge 4.62. EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının donma-çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ve PDI sonuçları

Formülasyon		EKM içermeyen		EKM yüklü	
		DB (nm)	***PDI***	***DB (nm)***	***PDI***
F1	*Başlangıç*	14,3 ± 0,2	0,113 ± 0,036	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
	Döngü sonrası	14,8 ± 0,0	0,148 ± 0,005	14,4 ± 0,0	0,084 ± 0,012
F2	*Başlangıç*	17,0 ± 2,0	0,193 ± 0,028	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
	Döngü sonrası	14,5 ± 0,6	0,132 ± 0,028	15,0 ± 0,9	0,127 ± 0,077
F3	*Başlangıç*	16,3 ± 0,5	0,140 ± 0,044	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
	Döngü sonrası	17,8 ± 2,8	0,178 ± 0,083	16,4 ± 0,3	0,086 ± 0,007
F4	*Başlangıç*	11,6 ± 0,5	0,118 ± 0,039	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
	Döngü sonrası	11,4 ± 0,2	0,085 ± 0,016	11,5 ± 0,8	0,176 ± 0,019
F5	*Başlangıç*	31,7 ± 1,0	0,148 ± 0,008	28,9 ± 0,8	0,199 ± 0,011
	Döngü sonrası	31,4 ± 0,7	0,146 ± 0,021	29,0 ± 1,0	0,184 ± 0,015

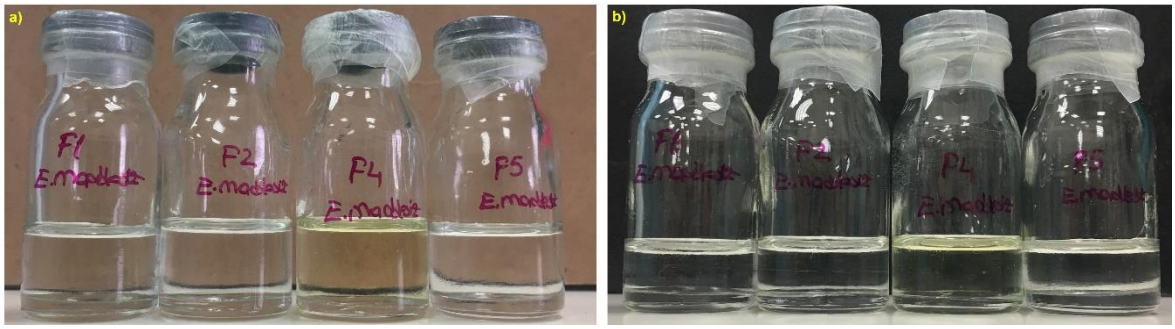
(Ort ± SS, n=3), DB: Damlacık boyutu



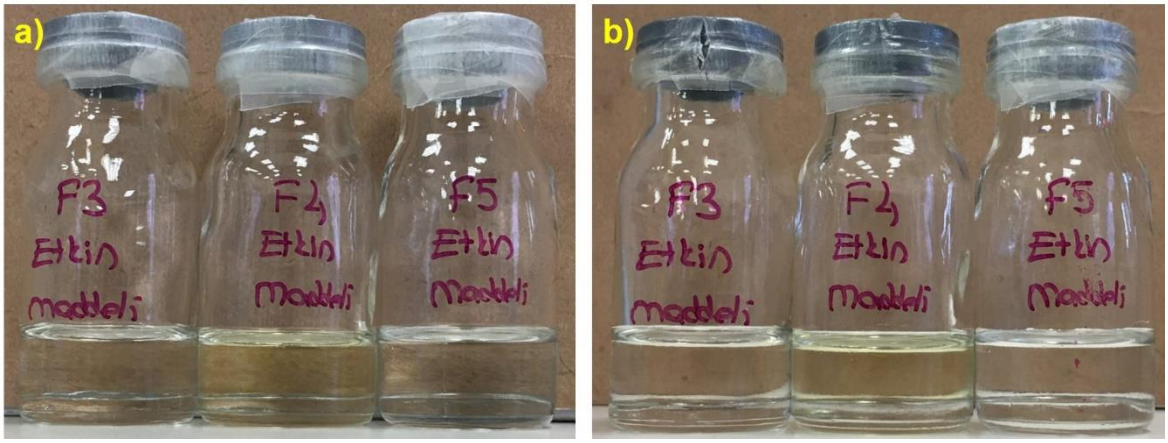
Şekil 4.62. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ölçümleri b) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası PDI ölçümleri



Şekil 4.63. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) a) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası damlacık boyutu ölçümleri b) Isıtma-soğutma ve donma çözme döngüsü sonrası PDI ölçümleri



Resim 4.3. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite çalışmasına ait görseller a) Isıtma-soğutma döngüsü sonrası b) Donma çözme döngüsü sonrası



Resim 4.4. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilite çalışmasına ait görseller a) Isıtma-soğutma döngüsü sonrası b) Donma çözme döngüsü sonrası

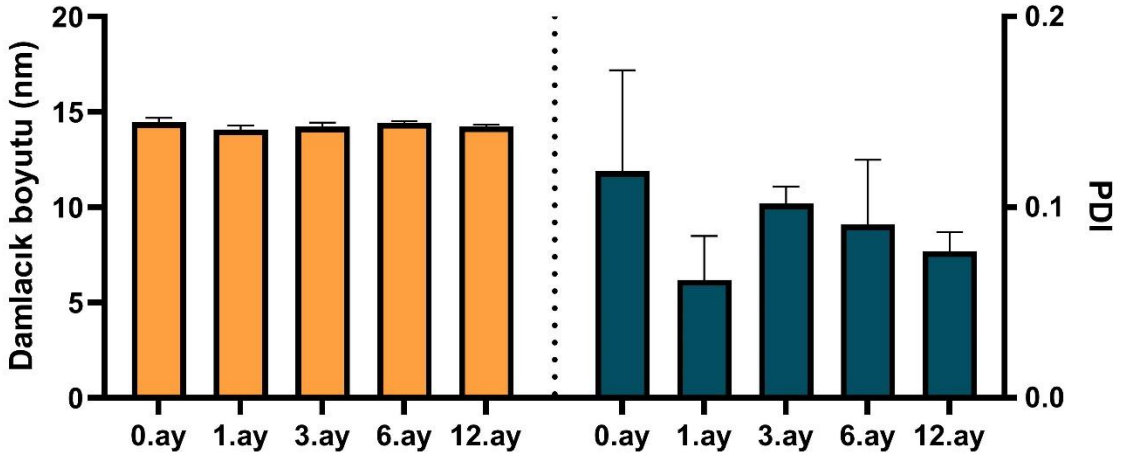
4.4.10. Uzun dönem stabilite çalışmaları

EKM yüklü SEDDS formülasyonlar uzun dönem stabilite çalışmaları kapsamında 5 ± 3°C/ortam nemi, 25 ± 2°C/%60 ± 5 bağıl nem (BN) ve 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN olmak üzere 3 farklı koşulda 12 ay saklanmıştır. Başlangıç ve saklama süresi boyunca 1, 3, 6 ve 12. ayda etkin madde miktar tayini, damlacık boyutu ve PDI ölçüm sonuçları Çizelge 4.63 - Çizelge 4.67'de ve Şekil 4.64 - Şekil 4.78'de gösterilmiştir. Başlangıç ve saklama süresi boyunca 1, 3, 6 ve 12. ayda faz ayrımı ve ilaç çökmesi açısından görsel olarak değerlendirilmesi Resim 4.5 - Resim 4.9'da sunulmuştur.

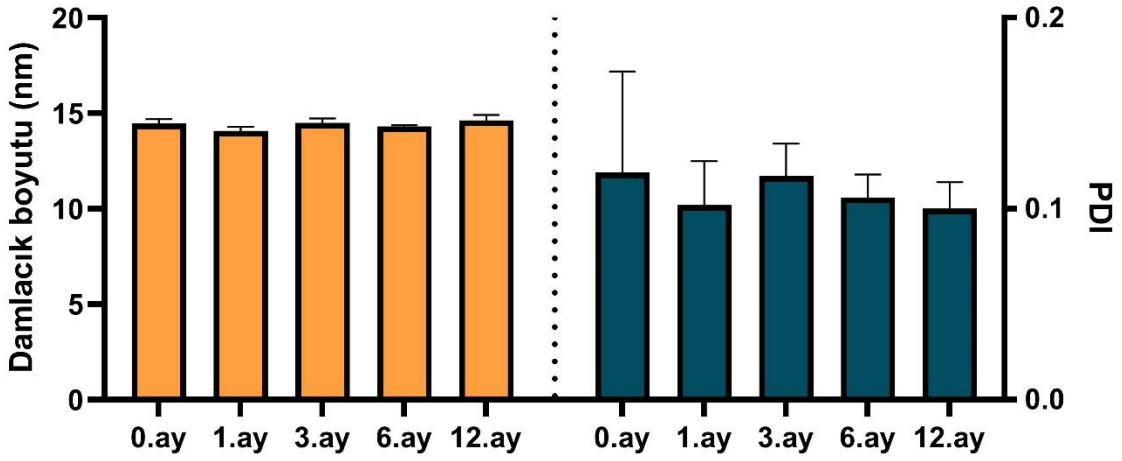
Çizelge 4.63. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları

Saklama koşulu	Zaman (ay)	EKM miktarı (%)	DB (nm)	PDI
5 ± 3°C	0	100,0 ± 0,0	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
	1	100,3 ± 0,4	14,1 ± 0,2	0,062 ± 0,023
	3	99,8 ± 0,7	14,2 ± 0,2	0,102 ± 0,009
	6	99,5 ± 1,3	14,4 ± 0,1	0,091 ± 0,034
	12	101,5 ± 2,2	14,2 ± 0,1	0,077 ± 0,010
25 ± 2°C *%60 ± 5 BN*	0	100,0 ± 0,0	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
	1	99,7 ± 1,1	14,1 ± 0,2	0,102 ± 0,023
	3	99,8 ± 2,3	14,5 ± 0,2	0,117 ± 0,017
	6	100,1 ± 2,1	14,3 ± 0,1	0,106 ± 0,012
	12	98,8 ± 3,7	14,6 ± 0,3	0,100 ± 0,014
40 ± 2°C *%75 ± 5 BN*	0	100,0 ± 0,0	14,5 ± 0,2	0,119 ± 0,053
	1	100,2 ± 1,9	14,2 ± 0,4	0,099 ± 0,012
	3	99,8 ± 2,7	14,6 ± 0,3	0,092 ± 0,011
	6	99,1 ± 6,5	14,1 ± 0,0	0,062 ± 0,001
	12	95,9 ± 1,9	14,3 ± 0,1	0,078 ± 0,010

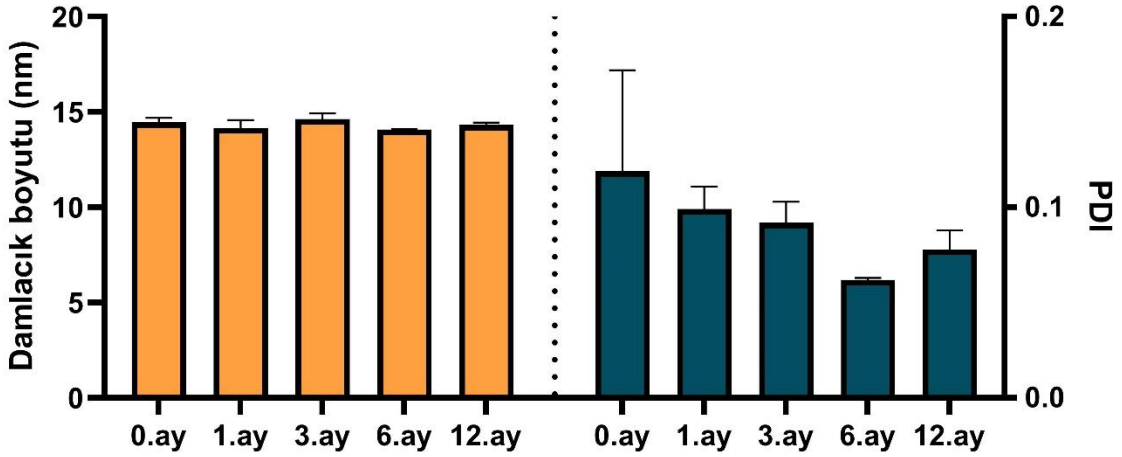
(Ort ± SS, n=3), BN: Bağıl nem, DB: Damlacık boyutu



Şekil 4.64. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.65. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

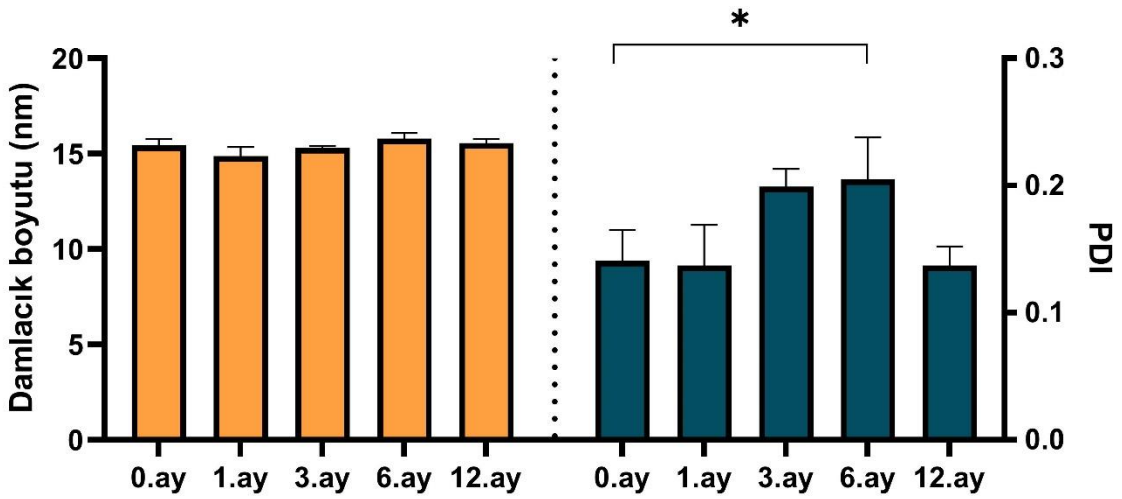


Şekil 4.66. EKM yüklü F1 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

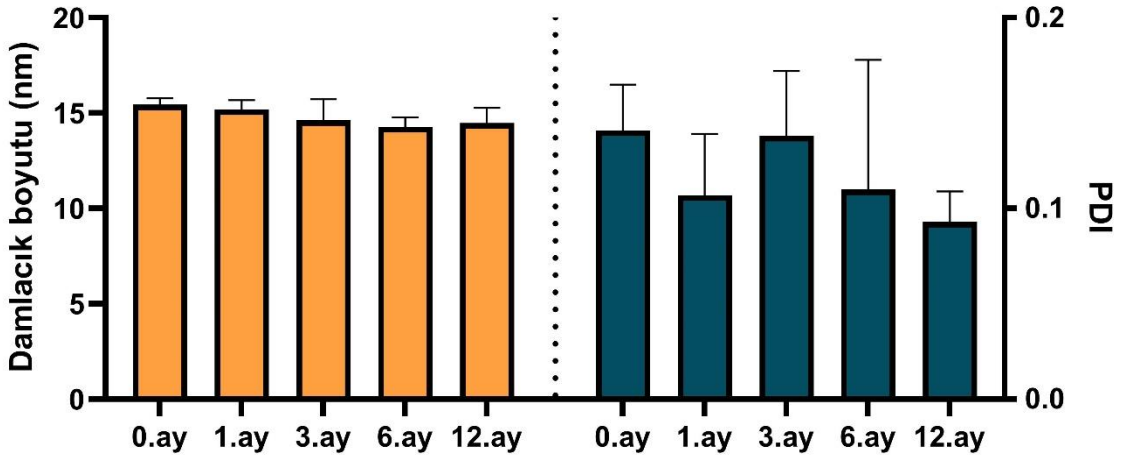
Çizelge 4.64. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları

Saklama koşulu	Zaman (ay)	EKM miktarı (%)	DB (nm)	PDI
5 ± 3°C	0	100,0 ± 0,0	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
	1	99,3 ± 1,4	14,9 ± 0,5	0,137 ± 0,032
	3	98,9 ± 2,7	15,3 ± 0,1	0,199 ± 0,014
	6	101,9 ± 1,3	15,8 ± 0,3	0,205 ± 0,033
	12	95,9 ± 5,2	15,6 ± 0,2	0,137 ± 0,015
25 ± 2°C %60 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
	1	100,7 ± 2,1	15,2 ± 0,5	0,107 ± 0,032
	3	101,1 ± 1,7	14,6 ± 1,1	0,138 ± 0,034
	6	100,4 ± 0,5	14,3 ± 0,5	0,110 ± 0,068
	12	98,1 ± 1,7	14,5 ± 0,8	0,093 ± 0,016
40 ± 2°C %75 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	15,4 ± 0,3	0,141 ± 0,024
	1	101,2 ± 0,8	15,8 ± 0,7	0,186 ± 0,025
	3	99,2 ± 1,3	15,2 ± 0,5	0,100 ± 0,019
	6	100,1 ± 11,6	14,9 ± 0,3	0,118 ± 0,057
	12	100,8 ± 10,2	14,8 ± 0,5	0,067 ± 0,013

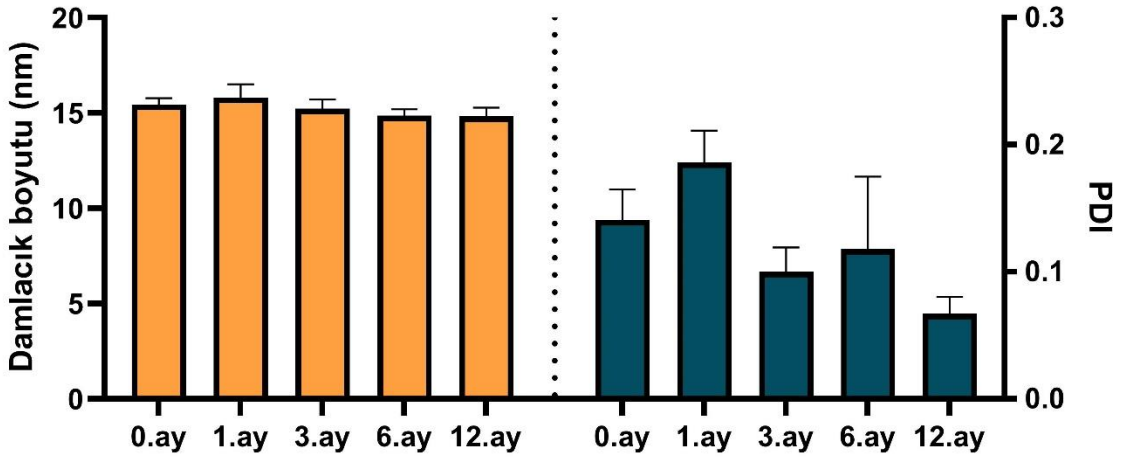
(Ort ± SS, n=3), BN: Bağıl nem, DB: Damlacık boyutu



Şekil 4.67. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05)



Şekil 4.68. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

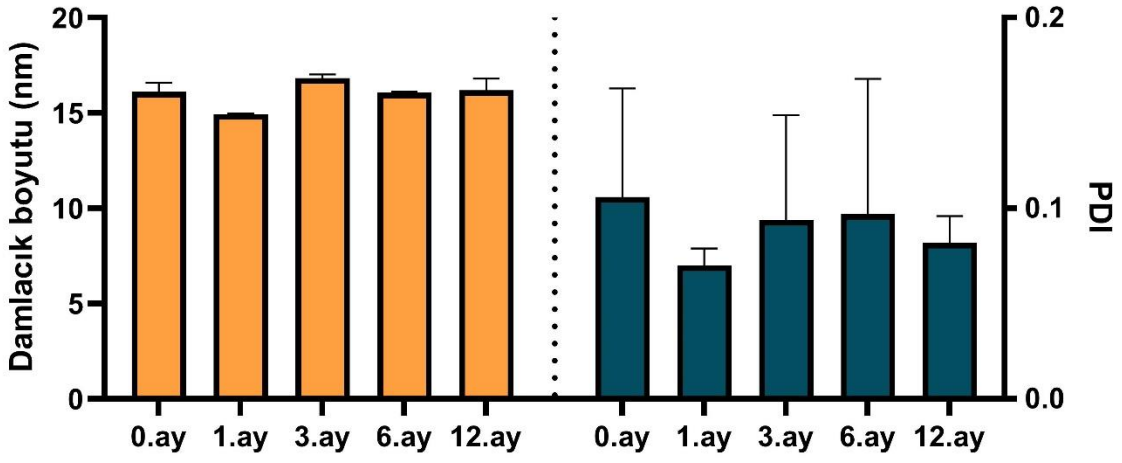


Şekil 4.69. EKM yüklü F2 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

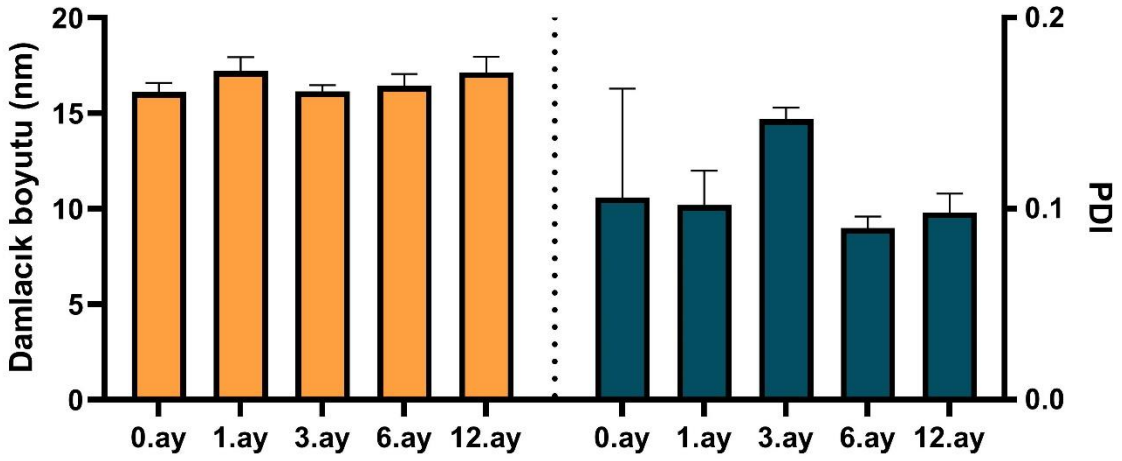
Çizelge 4.65. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları

Saklama koşulu	Zaman (ay)	EKM miktarı (%)	DB (nm)	PDI
5 ± 3°C	0	100,0 ± 0,0	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
	1	98,5 ± 2,1	14,9 ± 0,0	0,070 ± 0,009
	3	102,9 ± 2,4	16,8 ± 0,2	0,094 ± 0,055
	6	100,7 ± 1,2	16,1 ± 0,1	0,097 ± 0,071
	12	99,5 ± 3,8	16,2 ± 0,6	0,082 ± 0,014
25 ± 2°C %60 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
	1	98,7 ± 1,8	17,2 ± 0,7	0,102 ± 0,018
	3	99,3 ± 1,4	16,2 ± 0,3	0,147 ± 0,006
	6	100,0 ± 0,2	16,4 ± 0,6	0,090 ± 0,006
	12	99,3 ± 2,2	17,1 ± 0,8	0,098 ± 0,010
40 ± 2°C %75 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	16,1 ± 0,5	0,106 ± 0,057
	1	99,6 ± 2,8	15,7 ± 1,0	0,147 ± 0,083
	3	97,8 ± 3,4	16,0 ± 0,6	0,124 ± 0,045
	6	97,5 ± 4,1	16,0 ± 0,3	0,102 ± 0,032
	12	97,0 ± 3,4	15,8 ± 0,7	0,099 ± 0,034

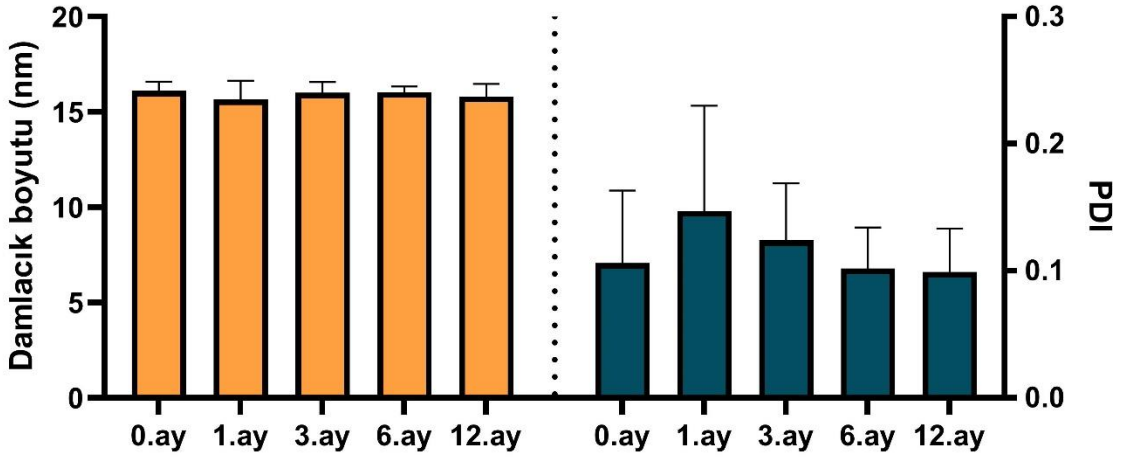
(Ort ± SS, n=3), BN: Bağıl nem, DB: Damlacık boyutu



Şekil 4.70. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.71. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

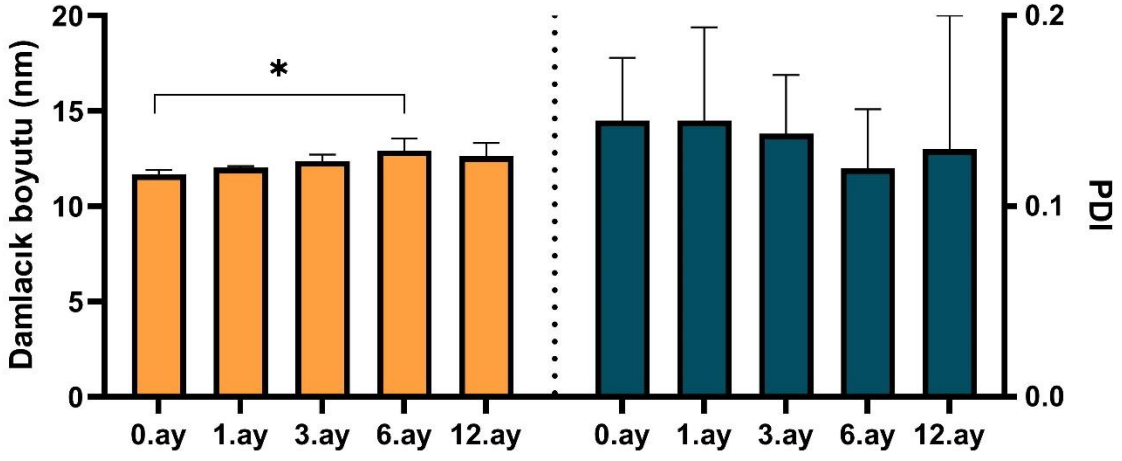


Şekil 4.72. EKM yüklü F3 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3)

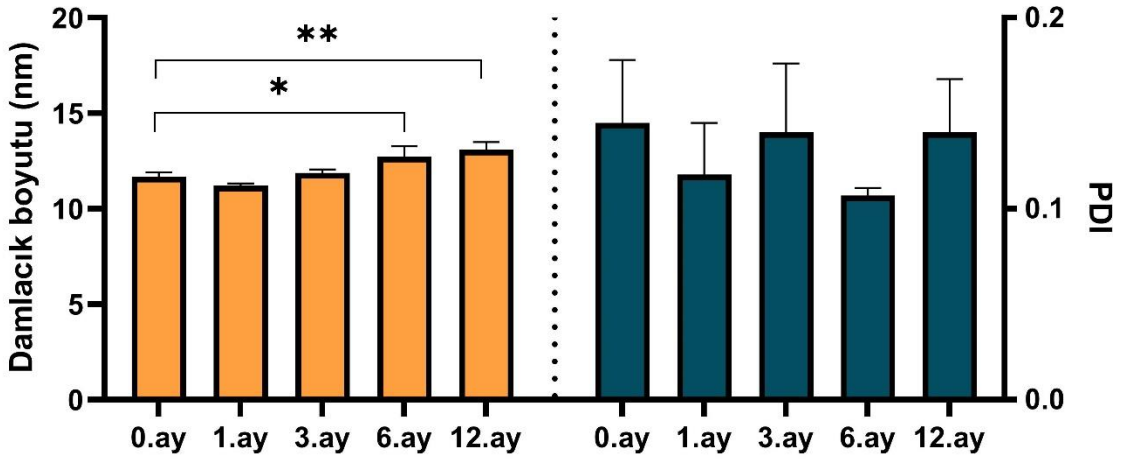
Çizelge 4.66. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları

Saklama koşulu	Zaman (ay)	EKM miktarı (%)	DB (nm)	PDI
5 ± 3°C	0	100,0 ± 0,0	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
	1	99,5 ± 1,8	12,0 ± 0,1	0,145 ± 0,049
	3	95,7 ± 3,4	12,4 ± 0,3	0,138 ± 0,031
	6	59,2 ± 2,6	12,9 ± 0,6	0,120 ± 0,031
	12	39,5 ± 5,9	12,6 ± 0,7	0,130 ± 0,070
25 ± 2°C %60 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
	1	99,5 ± 1,6	11,2 ± 0,1	0,118 ± 0,027
	3	99,1 ± 2,1	11,9 ± 0,2	0,140 ± 0,036
	6	93,6 ± 0,6	12,7 ± 0,6	0,107 ± 0,004
	12	89,9 ± 1,5	13,1 ± 0,4	0,140 ± 0,028
40 ± 2°C %75 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	11,7 ± 0,2	0,145 ± 0,033
	1	98,2 ± 2,6	12,0 ± 0,1	0,122 ± 0,045
	3	99,4 ± 1,3	11,4 ± 0,4	0,106 ± 0,020
	6	97,9 ± 0,9	11,0 ± 0,1	0,102 ± 0,017
	12	100,6 ± 4,8	11,2 ± 0,0	0,133 ± 0,011

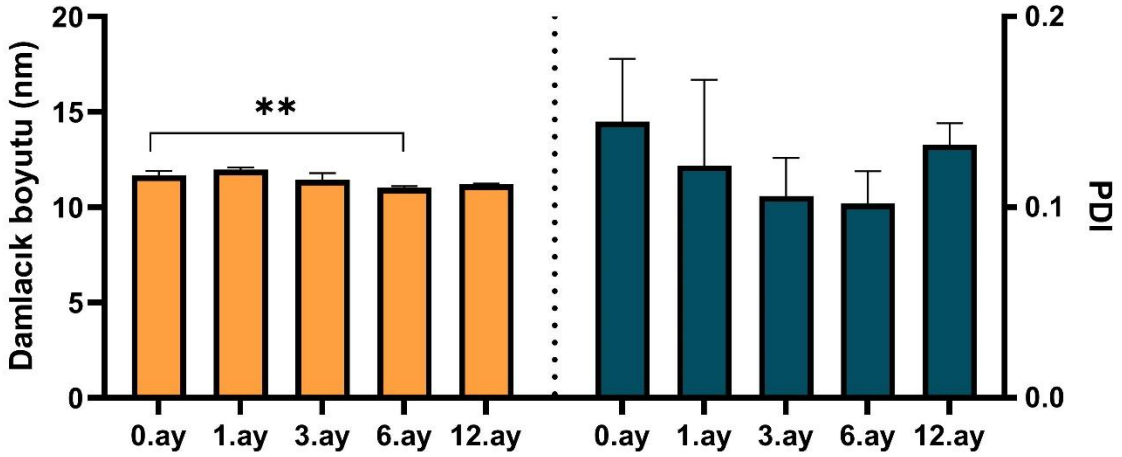
(Ort ± SS, n=3), BN: Bağıl nem, DB: Damlacık boyutu



Şekil 4.73. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05)



Şekil 4.74. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01)

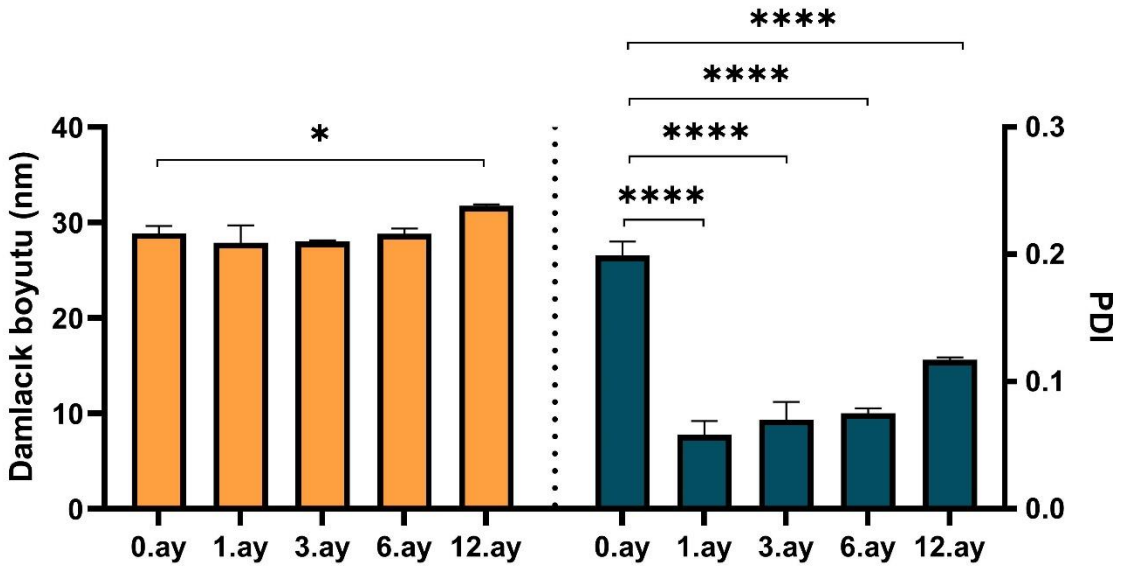


Şekil 4.75. EKM yüklü F4 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (**p<0,01)

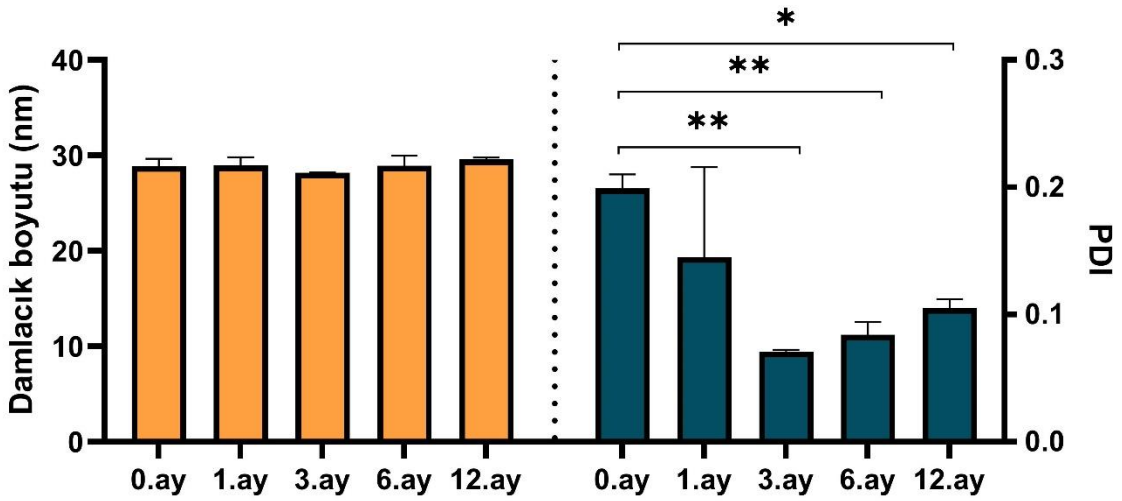
Çizelge 4.67. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonlarının fiziksel ve kimyasal stabilite sonuçları

Saklama koşulu	Zaman (ay)	EKM miktarı (%)	DB (nm)	PDI
5 ± 3°C	0	100,0 ± 0,0	28,9 ± 0,8	0,199 ± 0,011
	1	100,3 ± 0,9	27,9 ± 1,8	0,058 ± 0,011
	3	101,4 ± 3,1	28,0 ± 0,1	0,070 ± 0,014
	6	97,7 ± 3,0	28,8 ± 0,6	0,075 ± 0,004
	12	105,0 ± 1,1	31,8 ± 0,2	0,117 ± 0,002
25 ± 2°C %60 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	28,9 ± 0,8	0,199 ± 0,011
	1	100,8 ± 0,6	28,9 ± 0,9	0,145 ± 0,071
	3	102,4 ± 3,1	28,2 ± 0,1	0,071 ± 0,001
	6	101,1 ± 0,6	28,9 ± 1,1	0,084 ± 0,010
	12	101,5 ± 1,3	29,6 ± 0,2	0,105 ± 0,007
40 ± 2°C %75 ± 5 BN	0	100,0 ± 0,0	28,9 ± 0,8	0,199 ± 0,011
	1	100,3 ± 1,1	28,1 ± 0,9	0,122 ± 0,045
	3	102,1 ± 2,4	32,8 ± 1,4	0,100 ± 0,009
	6	104,0 ± 4,2	32,6 ± 1,1	0,110 ± 0,007
	12	103,5 ± 3,2	32,8 ± 1,4	0,096 ± 0,010

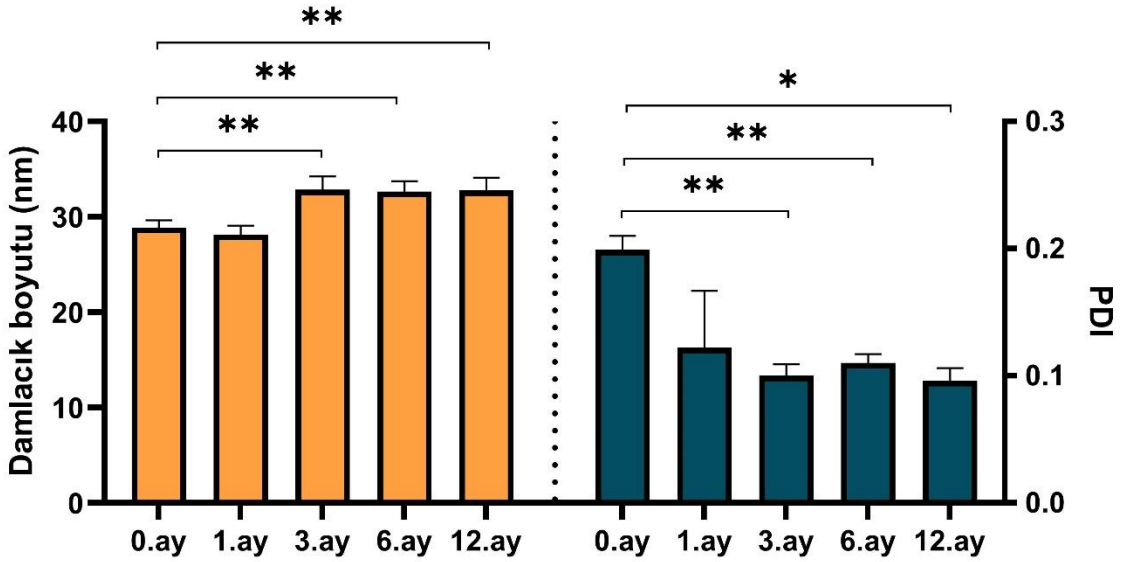
(Ort ± SS, n=3), BN: Bağıl nem, DB: Damlacık boyutu



Şekil 4.76. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, ****p<0,0001)



Şekil 4.77. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01)



Şekil 4.78. EKM yüklü F5 SEDDS formülasyonunun 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda damlacık boyutu ve PDI değerlerine ait fiziksel stabilite sonuçları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01)



Resim 4.5. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 0. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda



Resim 4.6. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 1. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda



Resim 4.7. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 3. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda



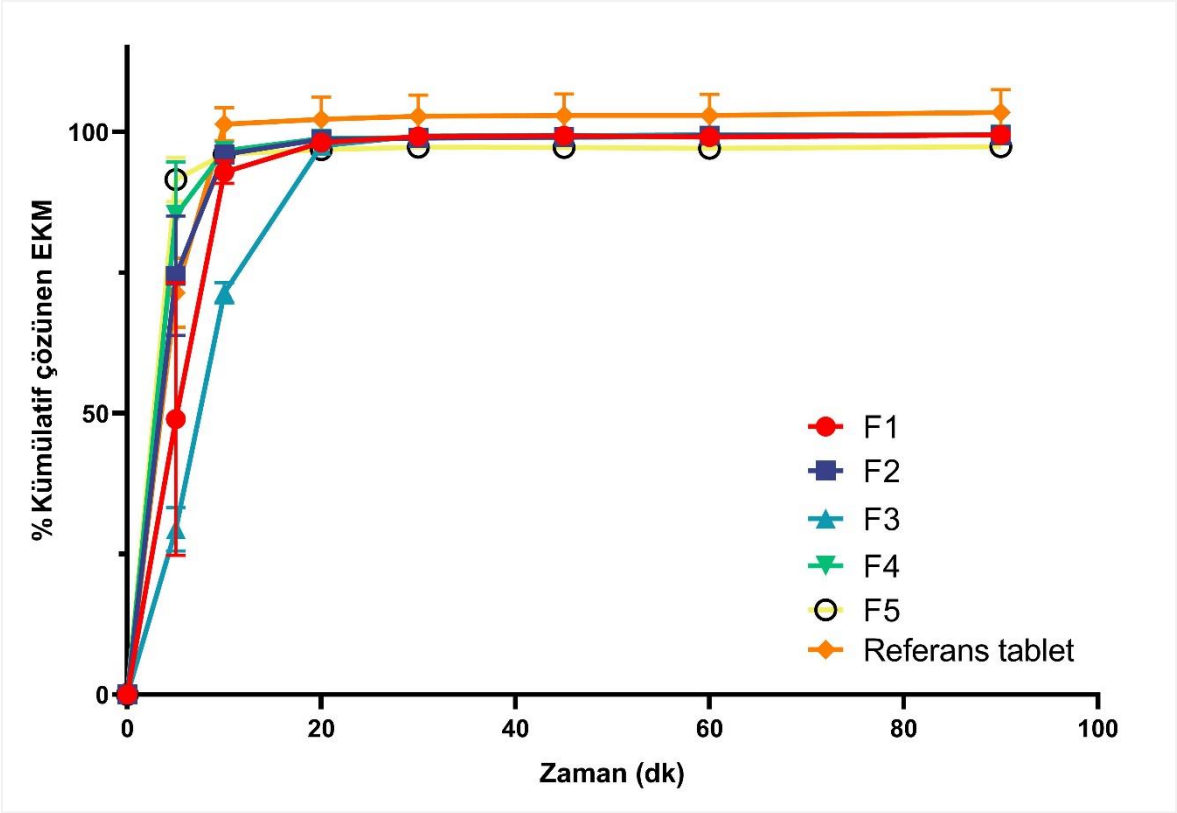
Resim 4.8. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 6. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda



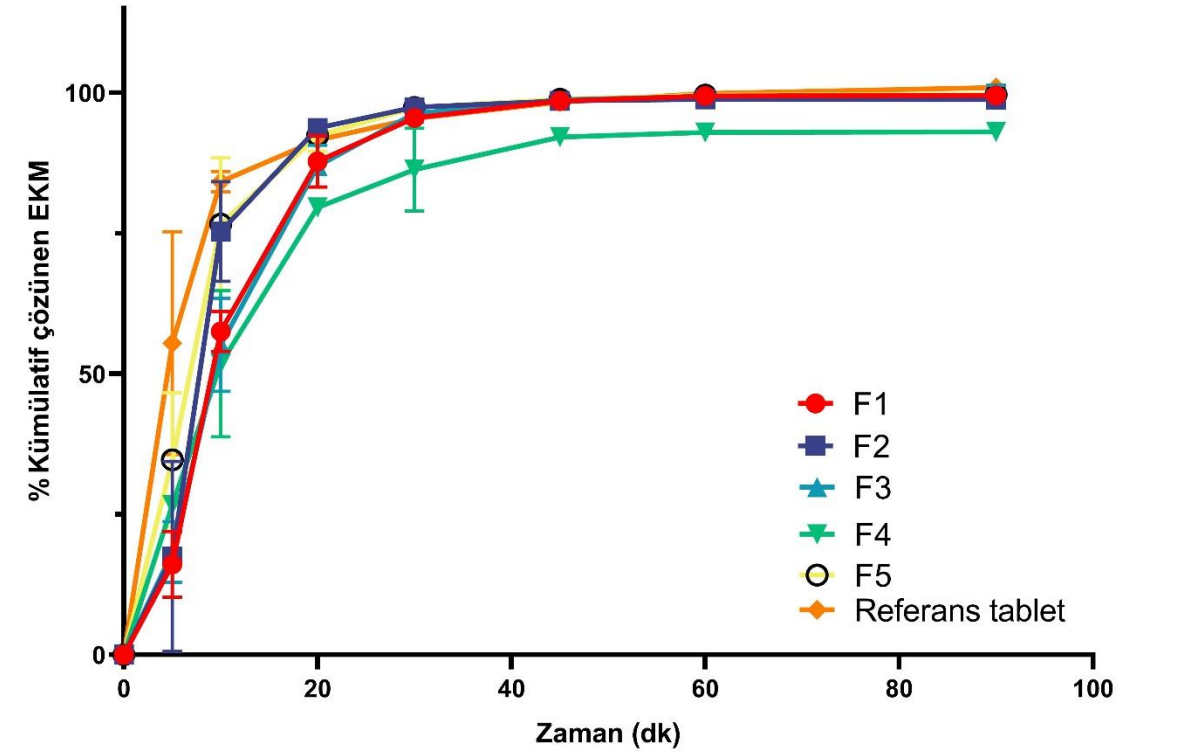
Resim 4.9. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarının 12. ay stabilite görseli a) 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda b) 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda c) 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda

4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

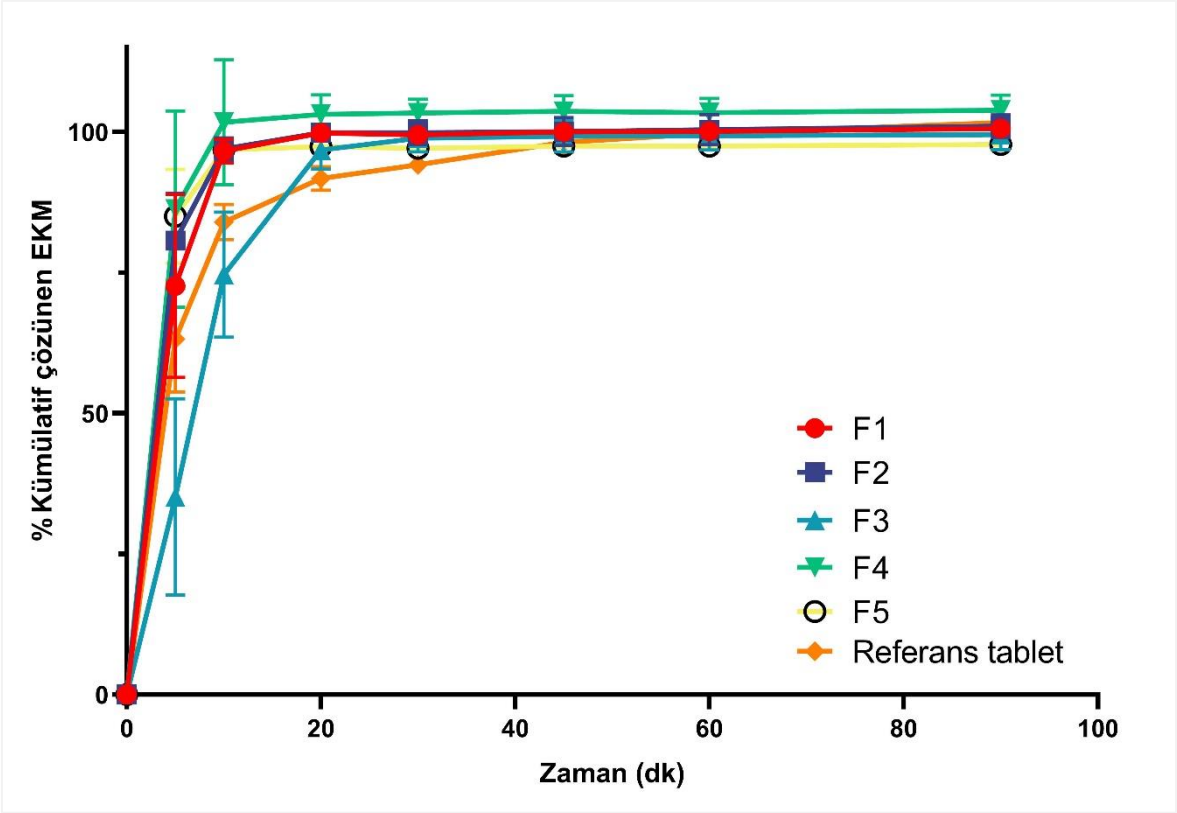
İn vitro çözünme hızı çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF ve FeSSIF biyouyumlu ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Referans tablet ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4, F5 SEDDS formülasyonları için zamana karşı %kümülatif salınan EKM miktarı profilleri Şekil 4.79 - Şekil 4.81'de sunulmuştur.



Şekil 4.79. %0,5 SLS çözeltisi ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.80. FaSSIF ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.81. FeSSIF ortamında referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının çözünme hızı profili (Ort ± SS, n=3)

%0,5 SLS çözeltisi ortamında 10 dakika içinde F1, F2, F4, F5 SEDDS formülasyonları ve referans tablet için %90'dan fazla EKM salımı gözlenirken F3 formülasyonu için %71 EKM salımı gözlenmiştir. Referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının tamamı 30 dakika içinde kararlı duruma ulaşmış ve %95'den fazla EKM salımı sağlamıştır.

FaSSIF ortamında 10 dakika içinde F1 formülasyonundan %58, F2 formülasyonundan %75, F3 formülasyonundan %55, F4 formülasyonundan %52, F5 formülasyonundan %77, referans tabletten %84 EKM salımı gözlenmiştir. Referans tablet ve F1, F2, F3 ve F5 formülasyonları 45 dakika içinde %99'dan fazla EKM salarken, F4 formülasyonu 45 dakika içinde %92 EKM salmıştır. Referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının tamamı 45 dakika içinde kararlı duruma ulaşmıştır.

FeSSIF ortamında 10 dakika içinde F1, F2 ve F5 formülasyonlarından %97, F3 formülasyonundan %75, F4 formülasyonundan %101, referans tabletten %84 EKM salımı gözlenmiştir. F1, F2, F4 ve F5 formülasyonları 20 dakika içinde %99'dan fazla

EKM salımı sağlayarak kararlı duruma ulaşmıştır. 20 dakika içinde F3 formülasyonu %97, referans tablet ise %92 EKM salımı sağlamıştır. F3 formülasyonu 30 dakika içinde EKM'nin %99'unu, referans tablet ise 45 dakika içinden EKM'nin %99'unu salarak kararlı duruma ulaşmıştır.

SEDDS formülasyonlarının referans tablet ile çözünme hızı profillerinin benzerliğinin değerlendirilmesi için yapılan yedi zaman noktasının kullanılarak hesaplandığı f_2 benzerlik faktörü sonuçları Çizelge 4.68'de sunulmuştur.

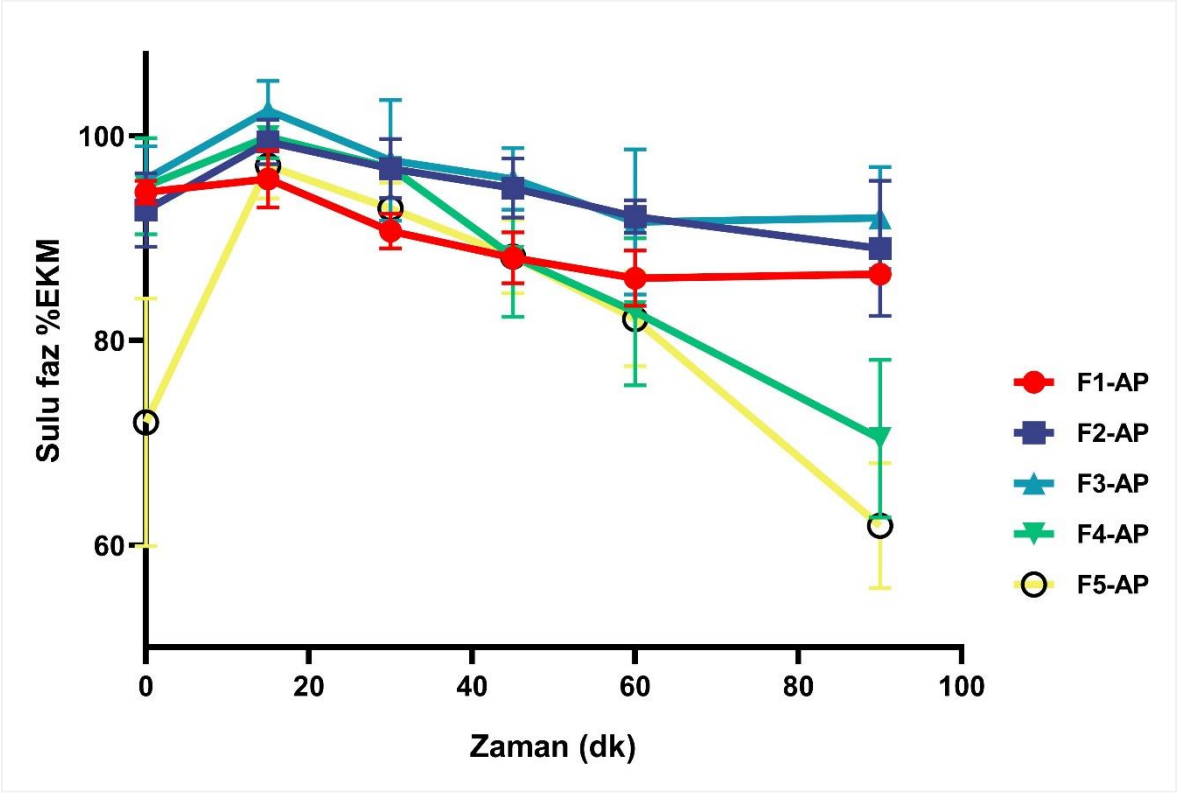
Çizelge 4.68. SEDDS formülasyonları için f_2 benzerlik faktörü sonuçları

Karşılaştırma	%0,5 SLS çözeltisi	FaSSIF	FeSSIF
RT – F1	51	37	57
RT – F2	69	41	52
RT – F3	35	37	47
RT – F4	60	37	45
RT – F5	52	54	50

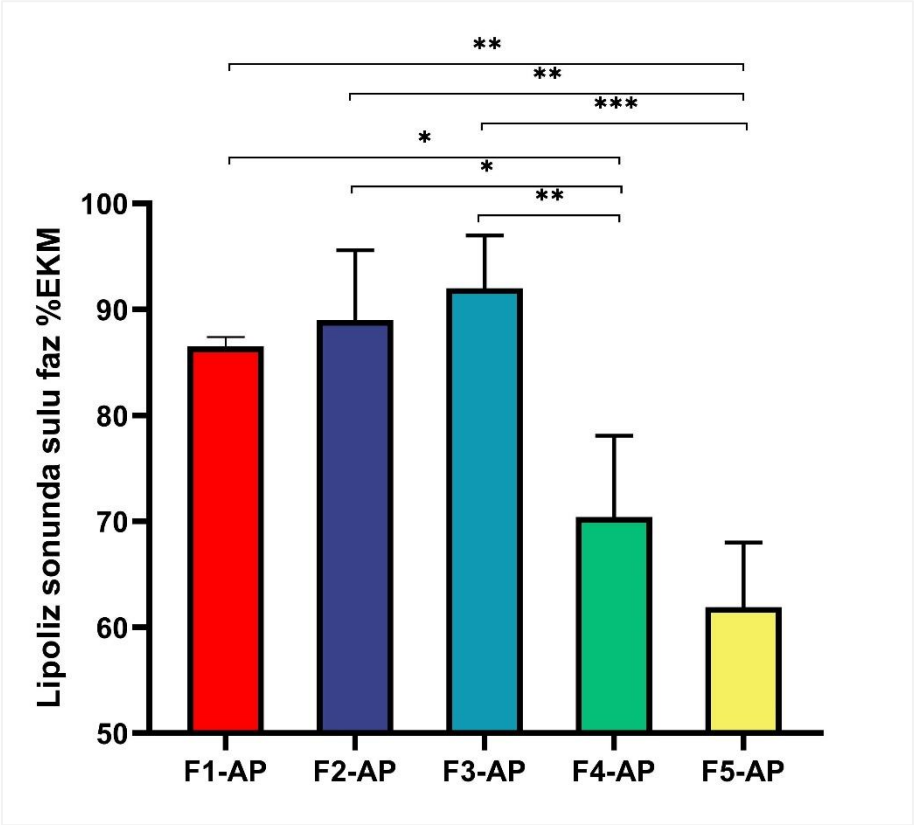
RT: Referans tablet

4.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

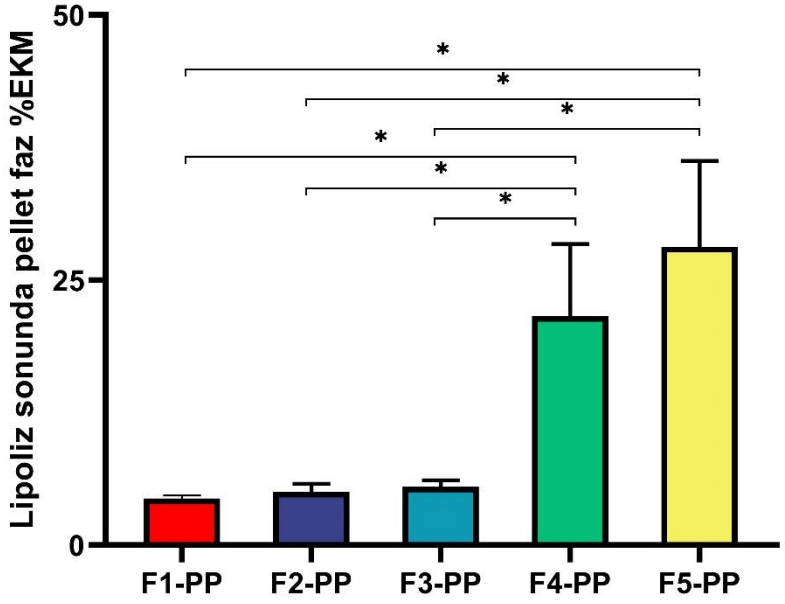
İn vitro lipoliz çalışmaları Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İn vitro lipoliz çalışmasında sulu faz (AP) ve pellet faz (PP) EKM miktarları ayrı olarak grafiklenmiştir. EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için zamana karşı sulu faz %EKM miktarı Şekil 4.82'de, lipoliz sonunda sulu faz %EKM miktarı Şekil 4.83'te ve pellet faz %EKM miktarı Şekil 4.84'te gösterilmiştir. Referans tablet ve SEDDS formülasyonlarının lipolizi boyunca harcanan toplam NaOH miktarı ve lipoliz oranları Şekil 4.85 ve Çizelge 4.69'da sunulmuştur. Referans tablet için zamana karşı sulu ve pellet faz %EKM miktarı Şekil 4.86'da verilmiştir.



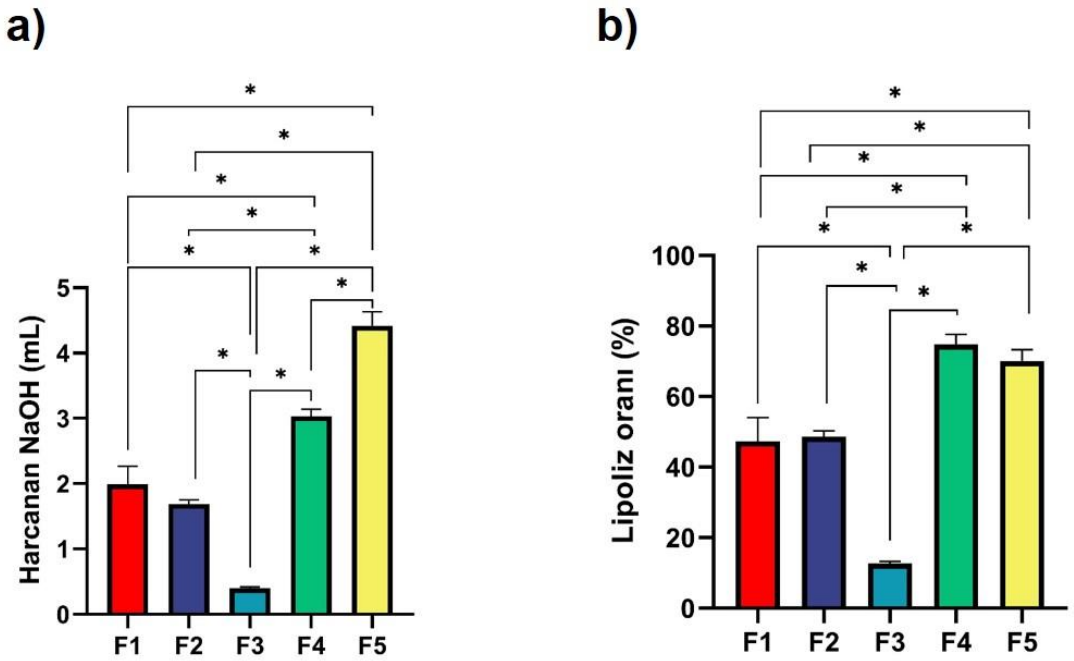
Şekil 4.82. EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının zamana karşı sulu faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.83. Lipoliz sonunda EKM yüklü SEDDS formülasyonları için sulu faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)



Şekil 4.84. Lipoliz sonunda EKM yüklü SEDDS formülasyonları için pellet faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05)

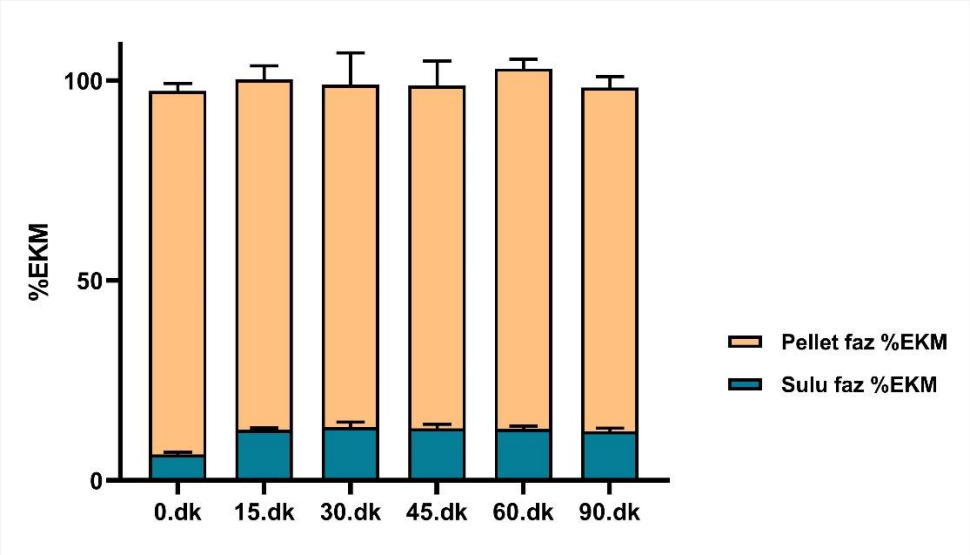


Şekil 4.85. SEDDS formülasyonlarının lipolizi (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) Harcanan toplam NaOH miktarı b) Lipoliz oranı (%)

Çizelge 4.69. SEDDS formülasyonları için harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı

Formülasyon	Harcanan NaOH miktarı (mL)	Lipoliz oranı (%)
F1	1,99 ± 0,28	47,3 ± 6,7
F2	1,69 ± 0,06	48,6 ± 1,7
F3	0,40 ± 0,02	12,7 ± 0,6
F4	3,03 ± 1,33	74,8 ± 2,8
F5	4,42 ± 0,21	70,1 ± 3,2
Referans tablet	-	-

(Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.86. Referans tablet için sulu ve pellet faz %EKM miktarları (Ort ± SS, n=3)

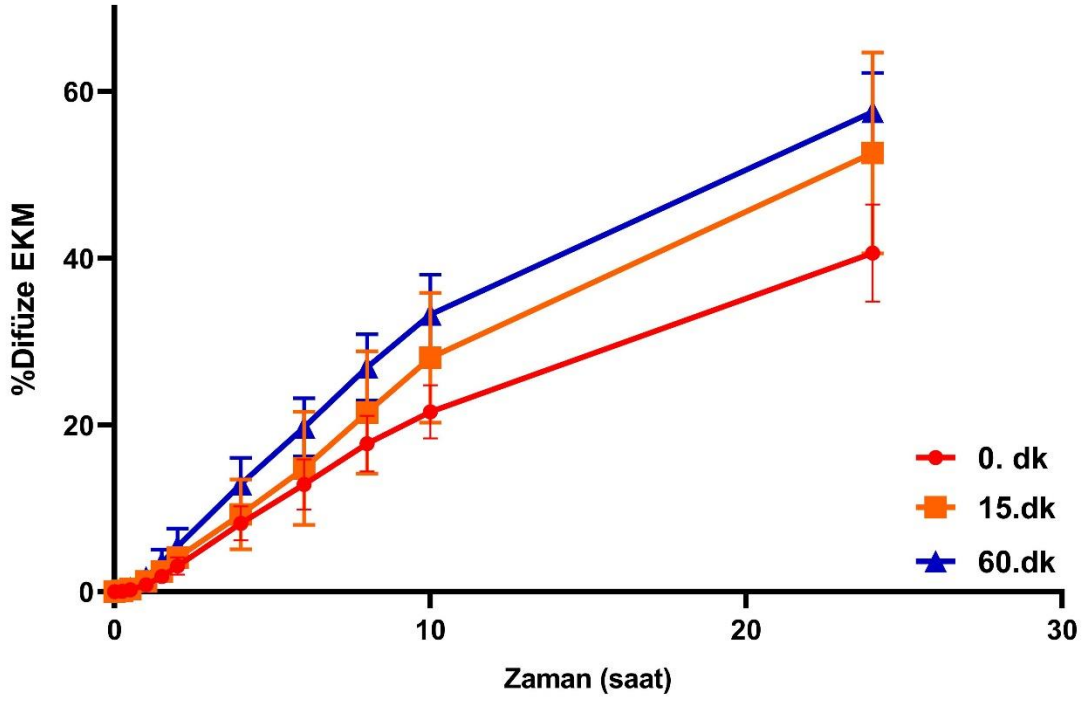
Sindirim sonucunda tüm SEDDS formülasyonlarında sulu faz %EKM miktarı azalmıştır. F1, F2, F3, F4 ve F5 için 90 dakikalık lipolizden sonra sulu faz EKM miktarı sırasıyla %87, %89, %92, %70 ve %62'dir. Referans tablet için ise lipoliz sonunda sulu faz EKM miktarı %12, pellet faz EKM miktarı %86'dır. %EKM miktarı en yüksek F3 formülasyonunda, en düşük F5 formülasyonunda bulunmuştur. En yüksek NaOH miktarı F5 formülasyonunun lipolizi sırasında harcanmıştır.

4.7. Ex-vivo Permeabilite Çalışması

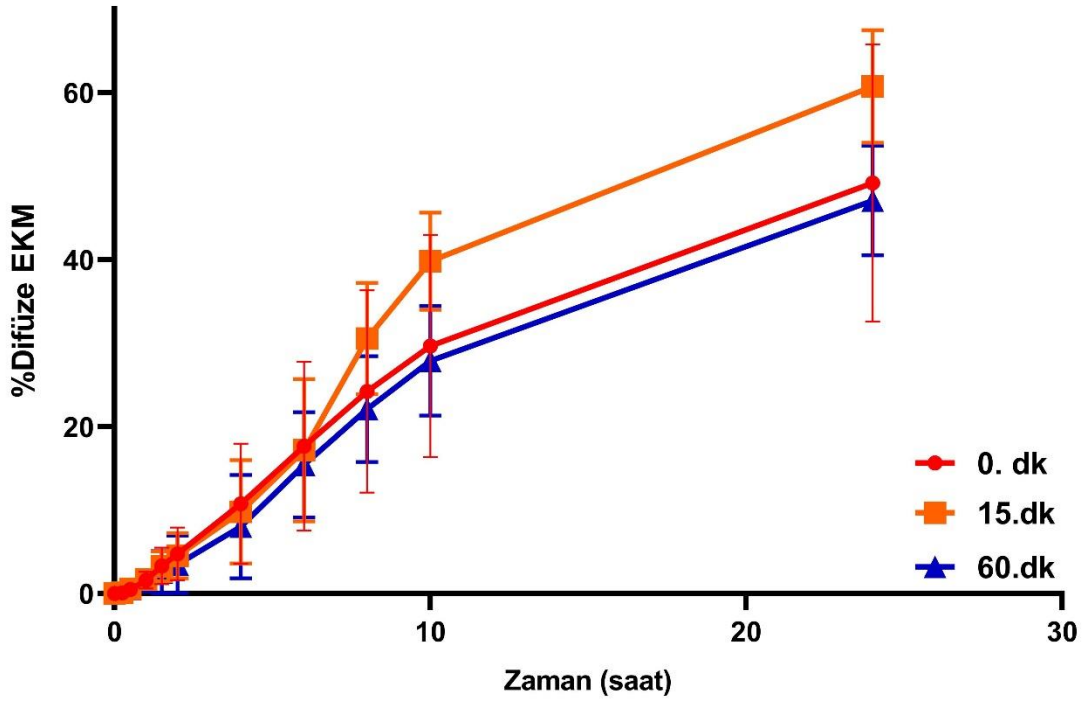
Ex-vivo permeabilite çalışması Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak sink koşulu sağlamak için alıcı hücre ortamı olan %0,5 SLS içeren PBS tamponunda EKM çözünürlüğü belirlenmiştir. %0,5 SLS içeren PBS tamponunda

EKM çözünürlüğü 778,4 ± 11,4 µg/mL olarak bulunmuştur. Verici hücreye eklenecek lipoliz ortamı 750 µL olarak belirlenmiştir.

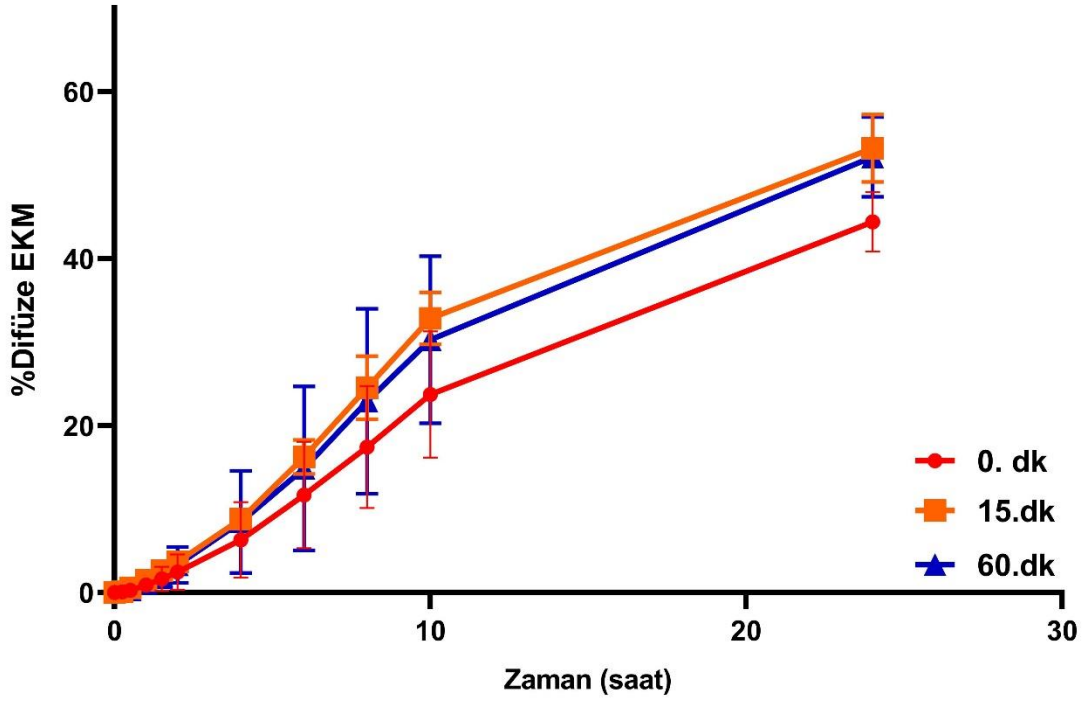
Tez kapsamında in vitro lipoliz çalışması ex-vivo permeabilite çalışması ile birleştirilerek formülasyon lipolizine permeabilite basamağı eklenmiştir. SEDDS formülasyon dispersiyonu (lipoliz başlamadan önce 0. dakika) ve lipolizinin 15. dakika ve 60. dakikasında alınan örnekler franz difüzyon hücresinin verici bölmesine eklenmiştir. Her bir SEDDS formülasyon ve referans ürünün lipolizi sırasında 0. dakika, 15. dakika ve 60. dakika lipoliz örneklerinin zamana karşı %difüze olan EKM miktarı profilleri Şekil 4.87 - Şekil 4.92'de verilmiştir. 24 saat sonunda %difüze olan EKM miktarı Çizelge 4.70 ve Şekil 4.93'te sunulmuştur. Zamana karşı %difüze olan EKM miktarı grafiğinin AUC değerleri Çizelge 4.70'te gösterilmiştir.



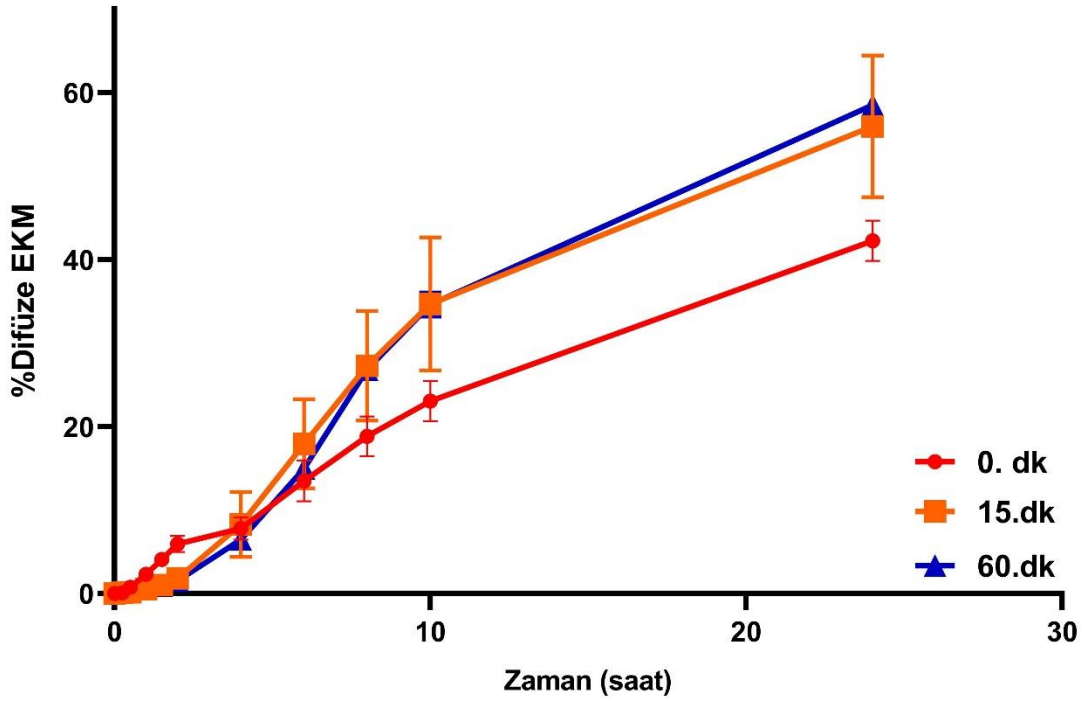
Şekil 4.87. F1 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)



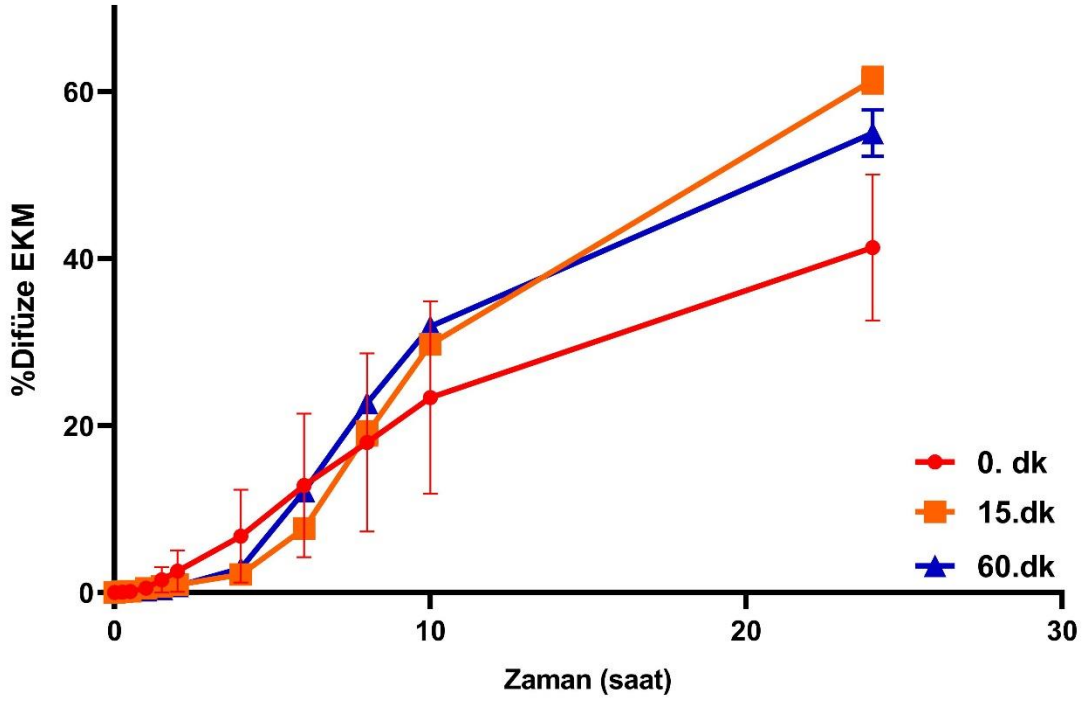
Şekil 4.88. F2 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)



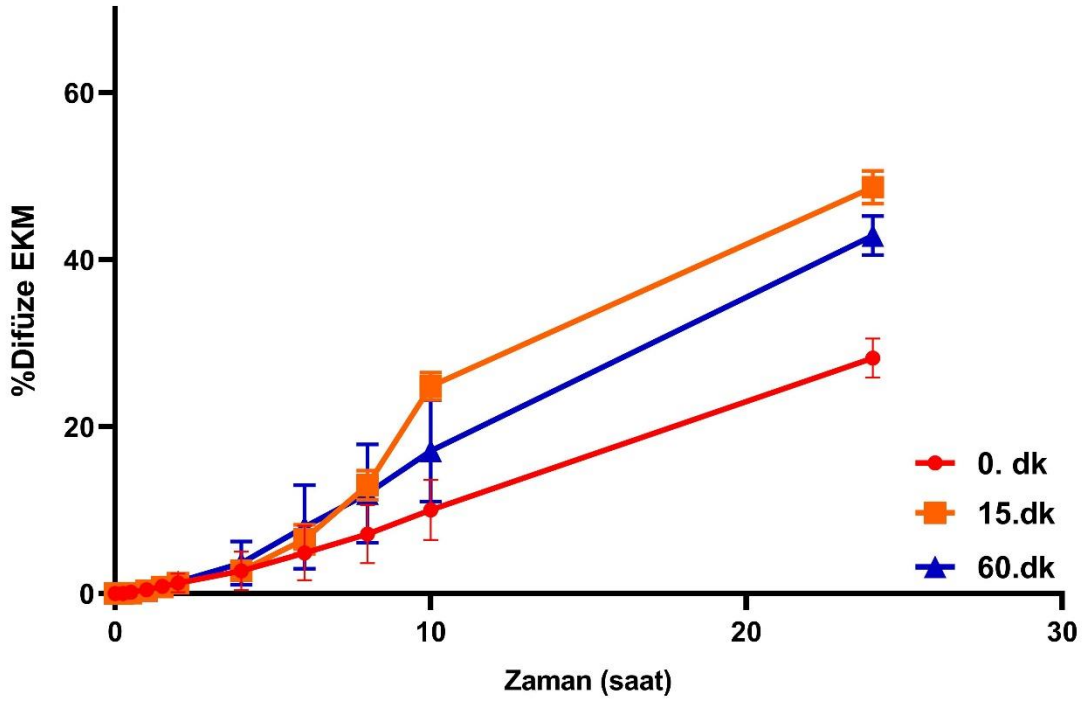
Şekil 4.89. F3 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.90. F4 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.91. F5 SEDDS formülasyonunun başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)



Şekil 4.92. Referans tabletin başlangıç ve farklı lipoliz dakikalarına ait %difüze olan EKM-zaman profili (Ort ± SS, n=3)

Çizelge 4.70. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için 24.saat sonunda %difüze olan EKM miktarı ve AUC değerleri

Formülasyon	0. dk lipoliz örneği		15. dk lipoliz örneği		60. dk lipoliz örneği	
	%difüze olan EKM miktarı	*AUC*	*%difüze olan EKM miktarı*	*AUC*	*%difüze olan EKM miktarı*	*AUC*
F1	40,6 ± 5,8	540,2 ± 47,2[a, d]	52,6 ± 12,1	691,3 ± 101,9[b]	57,6 ± 4,7[g]	797,8 ± 47,9[f]
F2	49,2 ± 16,6	695,4 ± 151,6[d]	60,7 ± 6,8	867,2 ± 67,2[e]	47,1 ± 6,6	650,2 ± 67,4[f]
F3	44,4 ± 3,6	576,2 ± 61,0[d]	53,2 ± 4,1	741,4 ± 36,5	52,2 ± 4,8	706,0 ± 81,6[f]
F4	42,3 ± 2,4	571,6 ± 24,8[a, d]	58,0 ± 5,0	779,5 ± 83,7[b, e]	58,5 ± 0,8[g]	786,0 ± 11,9[f]
F5	41,3 ± 8,8	555,9 ± 104,2[a, d]	61,4 ± 1,5	727,4 ± 12,4[b]	55,0 ± 2,8[g]	717,4 ± 20,9[f]
Referans tablet	28,2 ± 2,3	309,5 ± 31,3[a]	48,7 ± 2,0	586,3 ± 18,5[b]	42,9 ± 2,3	486,5 ± 47,6[c]

(Ort ± SS, n=3)

[a]: p<0,05 SEDDS formülasyonun 0 ve 60. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[a]: p<0,05 Referans tabletin 0 ve 60. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[b]: p<0,05 SEDDS formülasyonun 0 ve 15. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[b]: p<0,05 Referans tabletin 0 ve 15. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

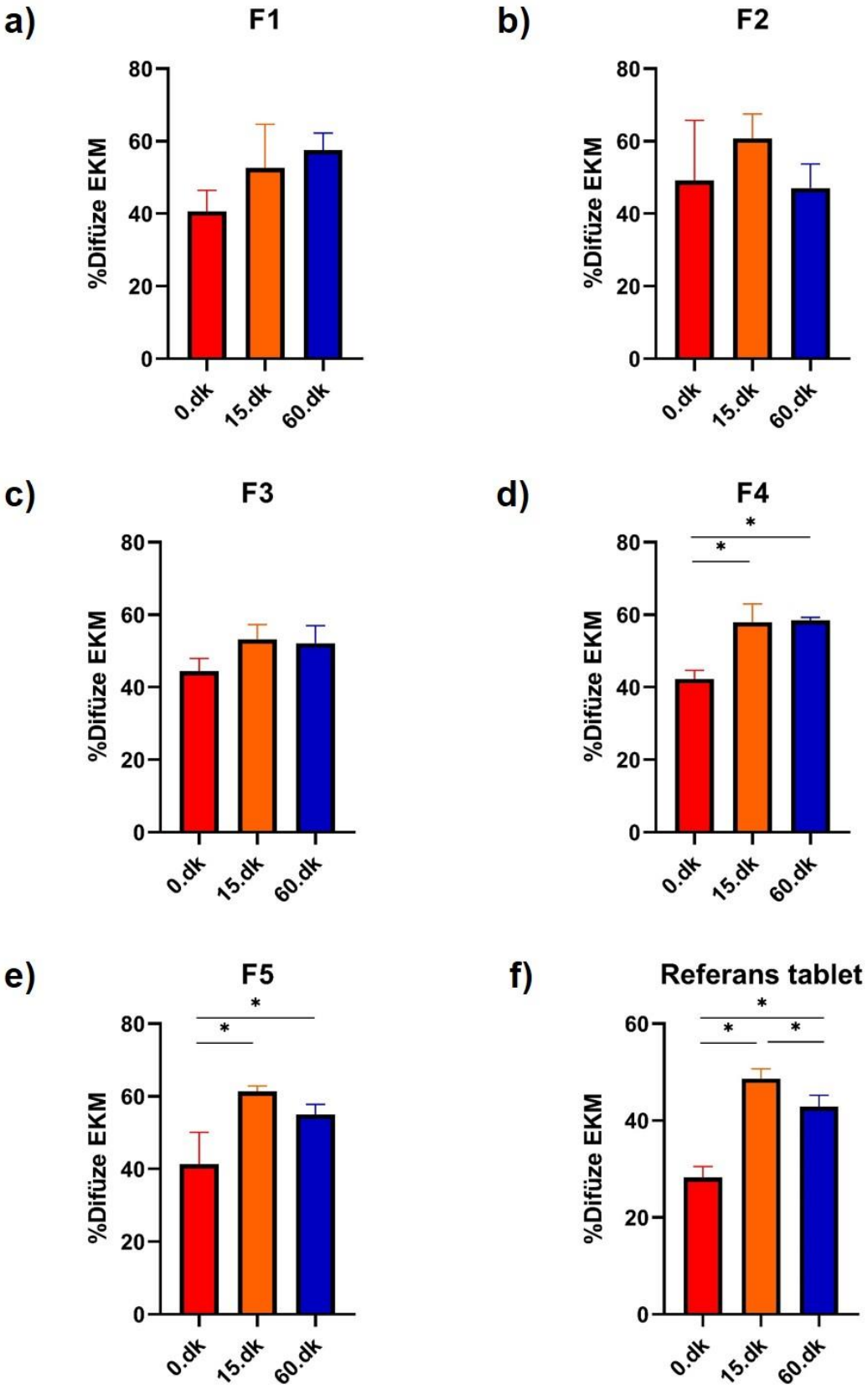
[c]: p<0,05 Referans tabletin 15 ve 60. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[d]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 0. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[e]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 15. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[f]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 60. dakika AUC değerleri karşılaştırıldığında

[g]: p<0,05 SEDDS formülasyon ile referans tabletin 60. dakika %difüze EKM miktarı karşılaştırıldığında



Şekil 4.93. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için 24.saat sonunda %difüze olan EKM miktarı (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Referans tablet

Her bir SEDDS formülasyon ve referans ürünün lipolizi sırasında 0. dakika, 15. dakika ve 60. dakika lipoliz örneklerinin akı değerleri (J) ve permeabilite katsayıları (P_{app}) Çizelge 4.71 ve Şekil 4.94 - Şekil 4.95'te gösterilmiştir. Şekil 4.94 formülasyon içi karşılaştırma, Şekil 4.95 formülasyonlar arası karşılaştırma amacıyla sunulmuştur.

Çizelge 4.71. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için akı ve P_{app} değerleri

Formülasyon	0. dk lipoliz örneği		15. dk lipoliz örneği		60. dk lipoliz örneği	
	J ***(μg.cm^{-2}.s^{-1})***	***P_{app}*** ***(x10^{-3} cm.s^{-1})***	***J*** ***(μg.cm^{-2}.s^{-1})***	***P_{app}*** ***(x10^{-3} cm.s^{-1})***	***J*** ***(μg.cm^{-2}.s^{-1})***	***P_{app}*** ***(x10^{-3} cm.s^{-1})***
F1	5,63 ± 0,83[d]	13,4 ± 2,0	6,08 ± 1,46[e]	17,3 ± 4,2	6,89 ± 0,53[f]	19,1 ± 1,6
F2	5,75 ± 1,96[d]	16,4 ± 5,8	6,24 ± 0,66[e]	20,7 ± 2,4	5,53 ± 0,63[f]	15,8 ± 2,2
F3	5,31 ± 0,67[d]	14,6 ± 1,5	5,84 ± 0,36[e]	17,9 ± 1,5	5,89 ± 0,80[f]	17,5 ± 2,3
F4	4,75 ± 0,47[d]	13,6 ± 1,0	5,91 ± 0,94[e]	19,2 ± 3,2	6,03 ± 0,05[f]	19,9 ± 0,2
F5	5,18 ± 1,19[d]	13,8 ± 3,5	6,29 ± 0,02[e]	20,1 ± 0,3	6,37 ± 0,02[f]	18,7 ± 0,9
Referans tablet	7,42 ± 0,62[a]	11,9 ± 1,0	13,3 ± 0,7[c]	21,2 ± 1,1	11,4 ± 0,8[b]	18,2 ± 1,3

(Ort ± SS, n=3)

[a]: p<0,05 Referans tabletin 0 ve 15. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında

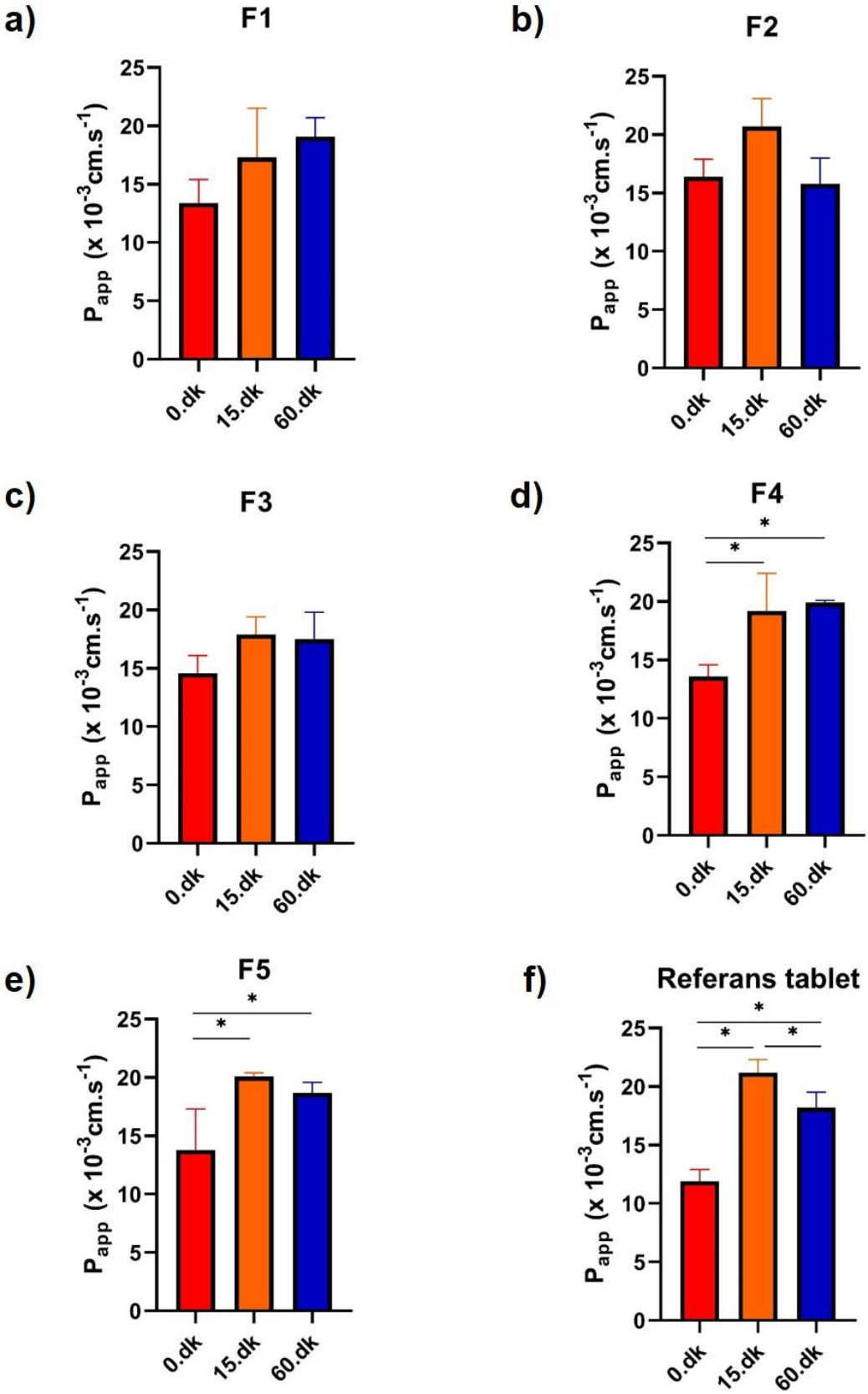
[b]: p<0,05 Referans tabletin 0 ve 60. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında

[c]: p<0,05 Referans tabletin 15 ve 60. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında

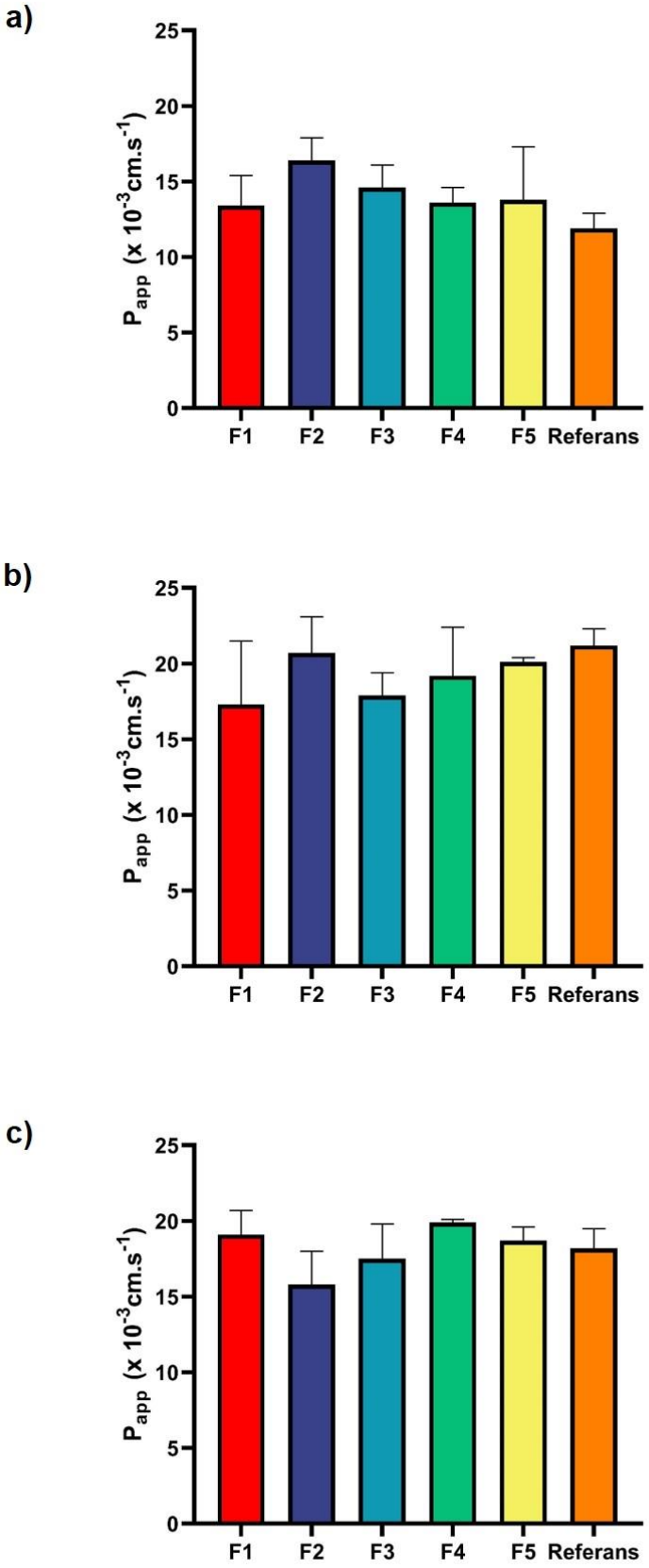
[d]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 0. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında

[e]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 15. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında

[f]: p<0,05 SEDDS formülasyonlarının her biri ile referans tabletin 60. dakika akı değerleri karşılaştırıldığında



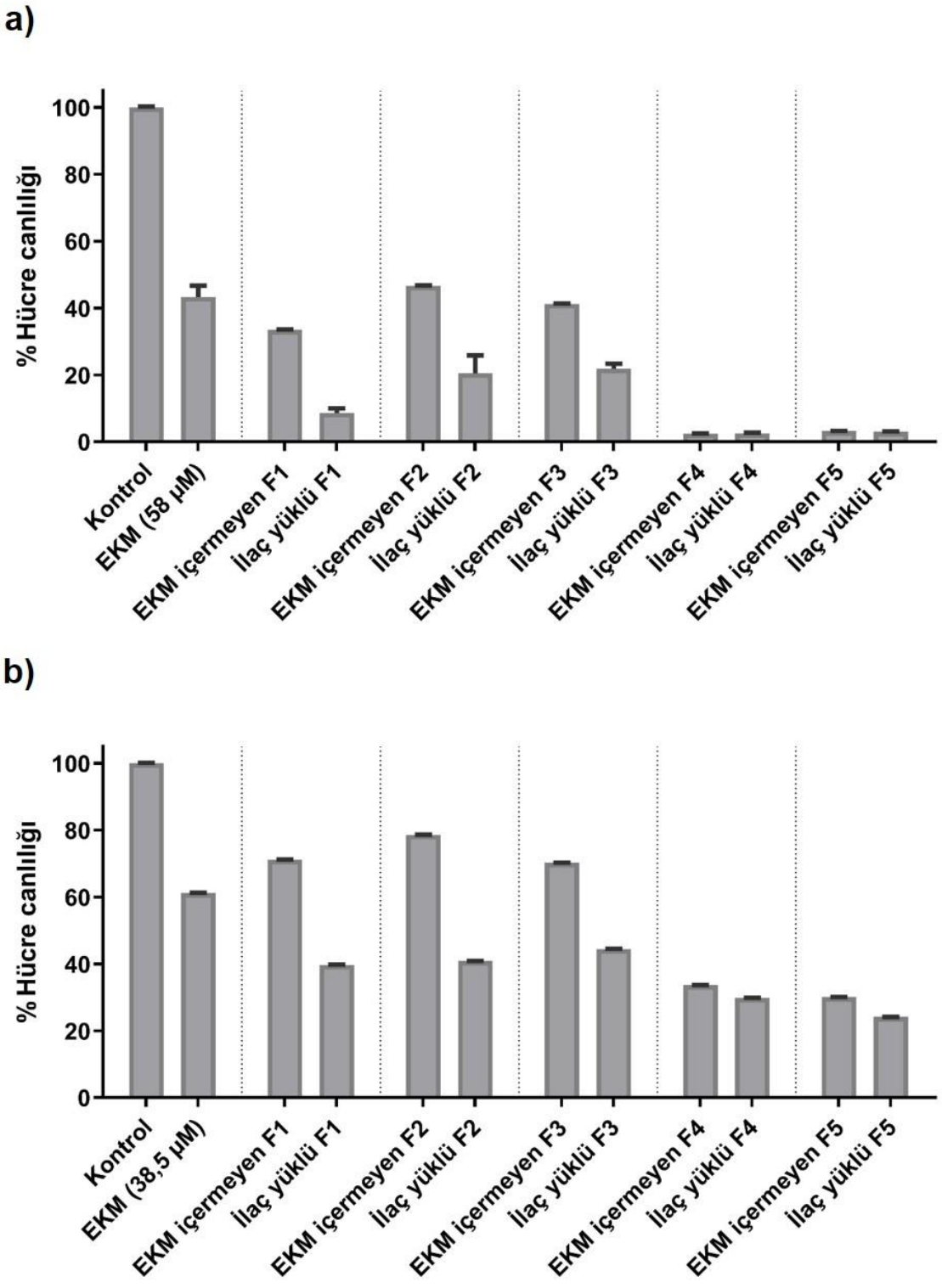
Şekil 4.94. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için P_{app} değerleri (Ort ± SS, n=3) (*p<0,05) a) F1 formülasyonu b) F2 formülasyonu c) F3 formülasyonu d) F4 formülasyonu e) F5 formülasyonu f) Referans tablet



Şekil 4.95. SEDDS formülasyonları ve referans tablet için P_{app} değerleri (Ort ± SS, n=3) a) 0. dakika b) 15. dakika c) 60. dakika

4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

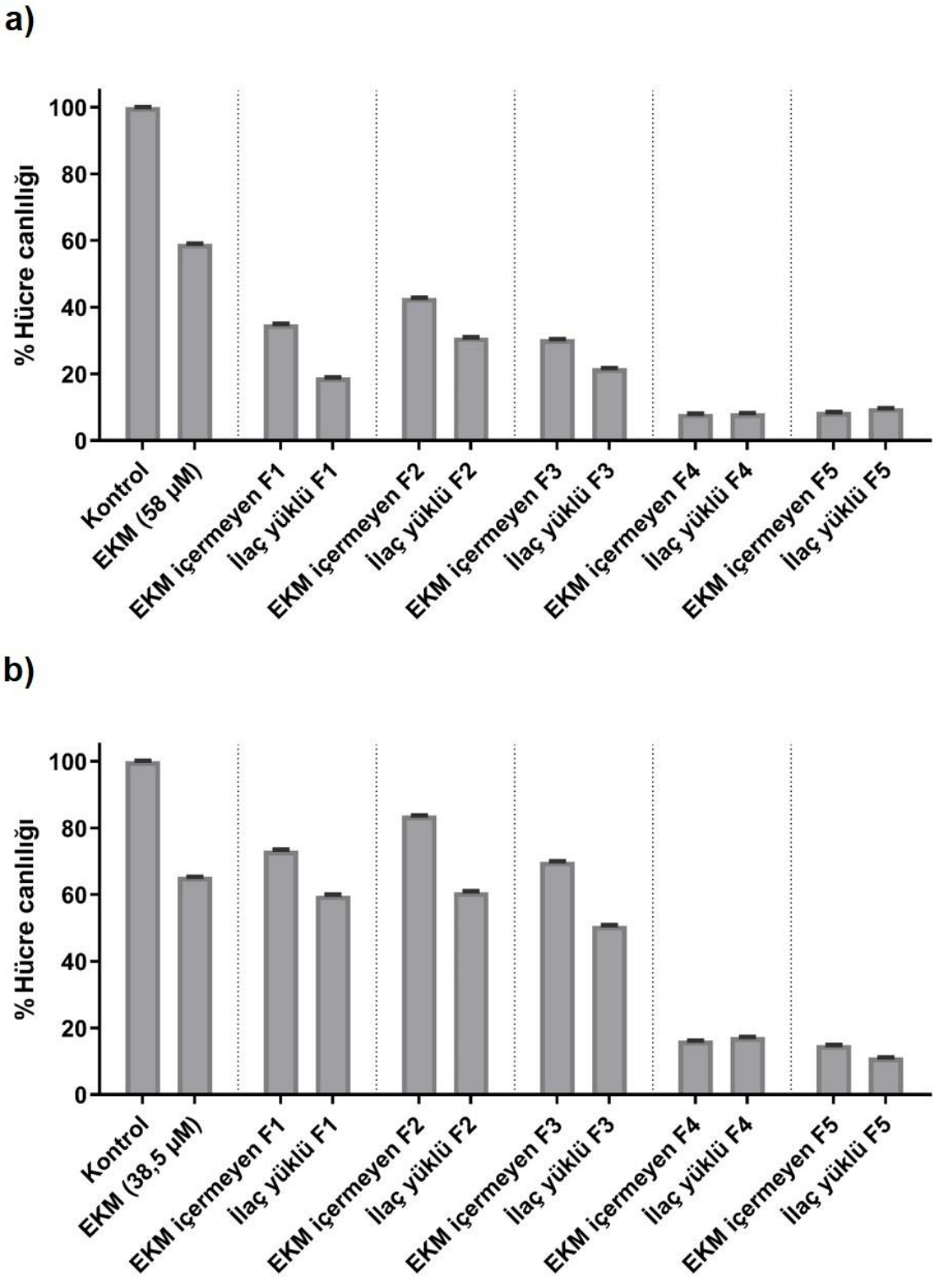
Hücre kültürü çalışmaları Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. 48 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değeri 58 µM, 72 saat için IC_{50} değeri 38,5 µM olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücrelerine 58 µM ve 38,5 µM EKM konsantrasyonunda uygulanan saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonları ve formülasyonlarla aynı miktarda EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarına ait 48 saat sonundaki %hücre canlılığı grafiği Şekil 4.96'da sunulmuştur.



Şekil 4.96. EKM yüklü ve etkin madde içermeyen SEDDS formülasyonlarının saf EKM ile karşılaştırmalı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde 48 saatlik inkübasyon süresi için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 58 µM EKM konsantrasyonu b) 38,5 µM EKM konsantrasyonu

58 µM konsantrasyonda uygulanan saf EKM ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için 48 saat sonunda hücre canlılığı sırasıyla %43, %9, %21, %22, %3 ve %3 bulunmuştur. İlaç içermeyen F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için hücre canlılığı %33, %47, %41, %3 ve %2 olarak bulunmuştur. 38,5 µM konsantrasyonda uygulanan saf EKM ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için 48 saat sonunda hücre canlılığı sırasıyla %61, %40, %41, %44, %30 ve %24 bulunmuştur. İlaç içermeyen F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için hücre canlılığı %71, %79, %70, %34 ve %30 olarak bulunmuştur.

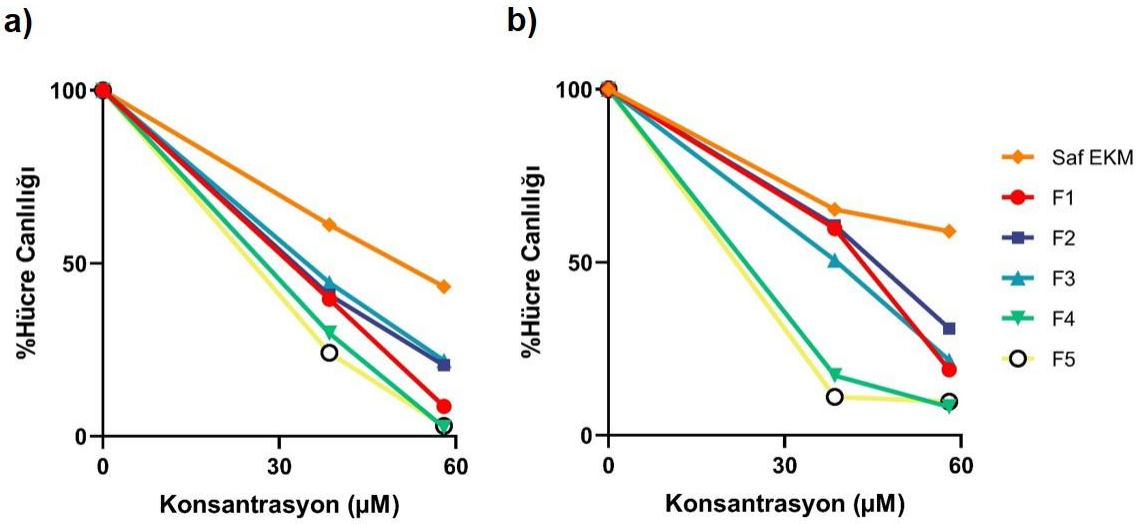
MCF-7 hücrelerine 58 µM ve 38,5 µM EKM konsantrasyonunda uygulanan saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonları ve formülasyonlarla aynı miktarda EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarına ait 72 saat sonundaki %hücre canlılığı grafiği Şekil 4.97’de sunulmuştur.



Şekil 4.97. EKM yüklü ve etkin madde içermeyen SEDDS formülasyonlarının saf EKM ile karşılaştırmalı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde 72 saatlik inkübasyon süresi için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 58 µM EKM konsantrasyonu b) 38,5 µM EKM konsantrasyonu

58 µM konsantrasyonda uygulanan saf EKM ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için 72 saat sonunda hücre canlılığı sırasıyla %59, %19, %31, %22, %8 ve %10 bulunmuştur. İlaç içermeyen F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için hücre canlılığı %35, %43, %30, %8 ve %9 olarak bulunmuştur. 38,5 µM konsantrasyonda uygulanan saf EKM ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için 72 saat sonunda hücre canlılığı sırasıyla %65, 60, %61, %51, %17 ve %11 bulunmuştur. İlaç içermeyen F1, F2, F3, F4 ve F5 SEDDS formülasyonları için hücre canlılığı %73, %84, %70, %16 ve %15 olarak bulunmuştur.

Farklı EKM konsantrasyonlarına sahip formülasyonların (38,5 µM ve 58 µM) aynı inkübasyon süresi sonunda %hücre canlılığını aynı grafik üzerinde gösteren sonuçlar Şekil 4.98'de sunulmuştur.



Şekil 4.98. Saf EKM ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının farklı konsantrasyonlar için %hücre canlılıkları (Ort ± SS, n=5) a) 48 saat inkübasyon süresi b) 72 saat inkübasyon süresi

4.9. İn Situ İntestinal Perfüzyon

İn situ intestinal perfüzyon çalışması Bölüm 3.2.9'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak tubing çapının belirlenmesi, tubing ile etkileşimin incelenmesi ve perfüzyon çalışmasına ait bulgular ayrı başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

4.9.1. Tubing çapının belirlenmesi

Çalışılan 4 mm x 2 mm (iç çap x dış çap) ve 4 mm x 0,5 mm (iç çap x dış çap) boyutlarına sahip iki farklı silikon tubing için akış hızı Eş. 3.9'a göre hesaplanmış ve tubinglere ait bulgular Çizelge 4.72'de sunulmuştur.

Çizelge 4.72. Kullanılan tubinglere ait bulgular

Tubing boyutu	**rpm**	**10 mL çözeltinin toplanması için geçen süre (dk)**	**Akış hızı (mL/dk)**
4 mm x 2 mm	1	18,5 ± 0,2	0,54 ± 0,01
	11	1,43 ± 0,01	7,00 ± 0,05
4 mm x 0,5 mm	1	78,2 ± 1,0	0,13 ± 0,00
	11	5,97 ± 0,03	1,68 ± 0,01

(Ort ± SS, n=3)

4 mm x 2 mm boyuta sahip tubing ile en düşük rpmde 0,54 ± 0,01 ml/dk akış hızı elde edilmiştir. 4 mm x 0,5 mm boyuta sahip tubing ile peristaltik pompanın en düşük çalışma hızı olan 1 rpmde akış hızı 0,126 ± 0,001 mL/dk olarak saptanmıştır. Perfüzyon çalışmasında her bir tubingden geçen çözelti için akış hızının 0,1 mL/dk olması amaçlanmaktadır. Bu değere en yakın akış hızı iç çapı 0,5 mm olan tubing ile peristaltik pompanın en düşük rpm değerinde sağlanmış ve 0,13 mL/dk olarak bulunmuştur. Bu nedenle 4 mm x 0,5 mm boyuta sahip tubing ile çalışılmaya karar verilmiştir. Her iki tubingten dakikada 0,13 mL perfüzyon çözeltisi geçeceği için perfüze segmentteki akış hızı 0,26 mL/dk olarak belirlenmiştir.

4.9.2. Tubing ile etkileşimin incelenmesi

EKM ile silikon tubing etkileşiminin incelendiği çalışmada lipoliz ortamı başlangıç EKM konsantrasyonu (0. dakika) ve lipoliz ortamının peristaltik pompa aracılığıyla tubingden geçirilerek 60. dakikada toplanan örnekteki EKM konsantrasyonu Çizelge 4.73'te sunulmuştur.

Çizelge 4.73. Başlangıç ve örnekteki EKM konsantrasyonu

Örnek	EKM konsantrasyonu (µg/mL)
0. dakika	102,3 ± 0,1
60. dakika	102,5 ± 0,1

(Ort ± SS, n=3)

EKM'nin başlangıç konsantrasyonu ile 60 dakika sonra toplanan konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

4.9.3. Perfüzyon çalışması

Perfüzyon çalışmasında kullanılan sıçanlara ait ağırlık, perfüze jejunum segmentinin uzunluğu, çapı ve akış hızı bilgileri Çizelge 4.74'te sunulmuştur.

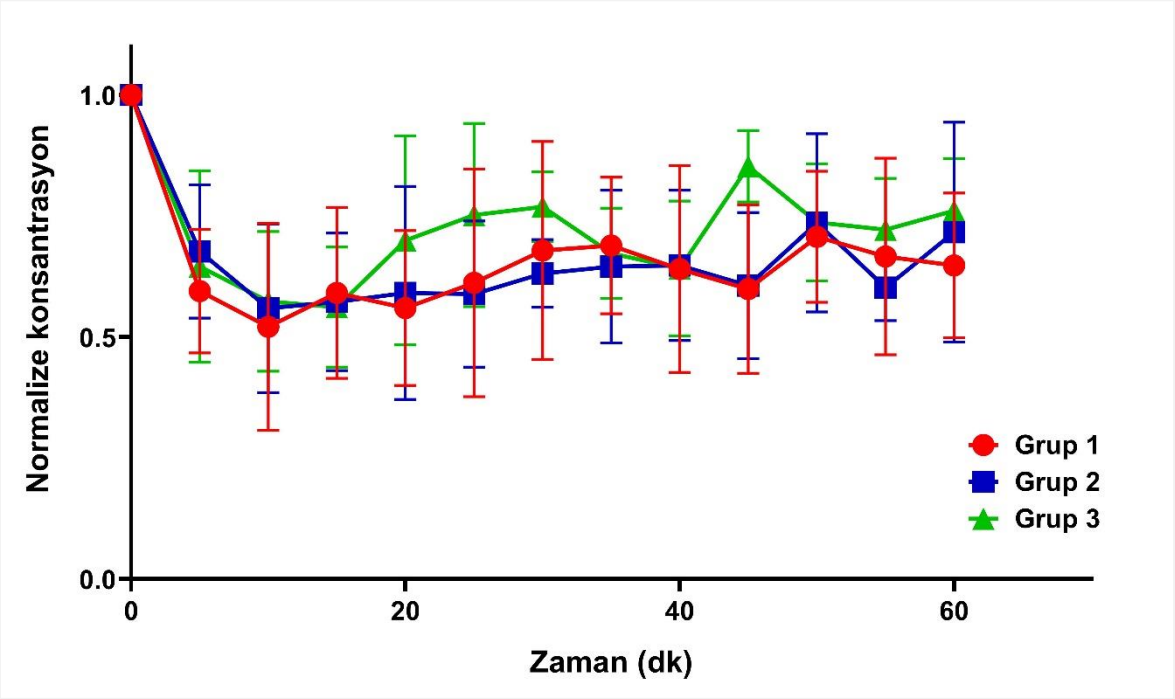
Çizelge 4.74. Perfüzyon çalışmasında kullanılan sıçanlara ait bilgiler

Grup	Sıçan ağırlığı (g)	Jejunum uzunluğu (cm)	Jejunum çapı (cm)	Akış hızı (mL/dk)
Grup 1 (F1)	305,0 ± 20,5	14,2 ± 1,3	0,53 ± 0,12	0,26
Grup 2 (F5)	222,2 ± 8,6	16,2 ± 1,3	0,37 ± 0,05	0,26
Grup 3 (saf EKM)	212,1 ± 9,1	15,8 ± 0,8	0,43 ± 0,09	0,26
Grup 4 (ANT)	296,2 ± 27,0	17,2 ±1,3	0,48 ± 0,04	0,26

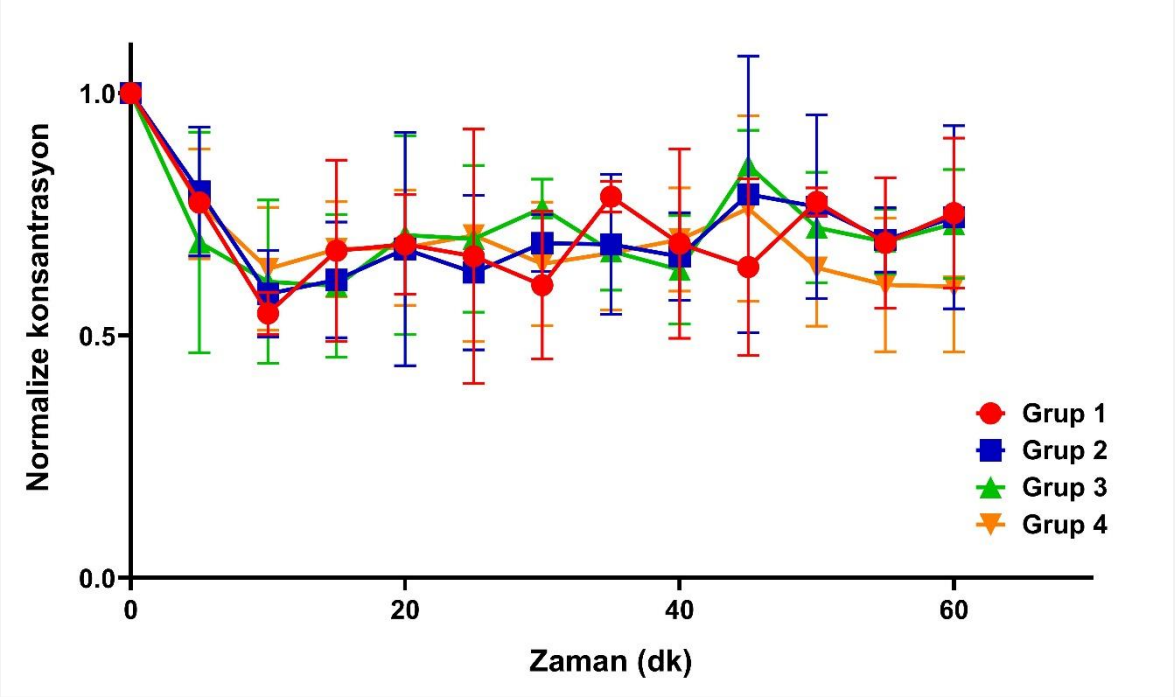
(Ort ± SS, n=6)

Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5) ve grup 3 (saf EKM) için zamana karşı EKM absorpsiyonunu gösteren grafik Şekil 4.99'da, grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 (ANT) için zamana karşı ANT absorpsiyonunu gösteren grafik Şekil 4.100'de

gösterilmiştir. Her bir grup için normalize konsantrasyon grafiğinin AUC değerleri Çizelge 4.75'te sunulmuştur.



Şekil 4.99. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5) ve grup 3 (saf EKM) için EKM absorpsiyon profili (Ort ± SS, n=6)



Şekil 4.100. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için ANT absorpsiyon profili (Ort ± SS, n=6)

Çizelge 4.75. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için normalize konsantrasyon grafiğinin AUC değerleri

Grup	AUC	
	EKM	ANT
Grup 1 (F1)	38,4 ± 2,2[a]	42,1 ± 1,7
Grup 2 (F5)	38,6 ± 1,9[a]	42,4 ± 1,9
Grup 3 (Saf EKM)	42,5 ± 1,7	42,6 ± 1,7
Grup 4 (ANT)	-	41,5 ± 1,7

(Ort ± SS, n=6)

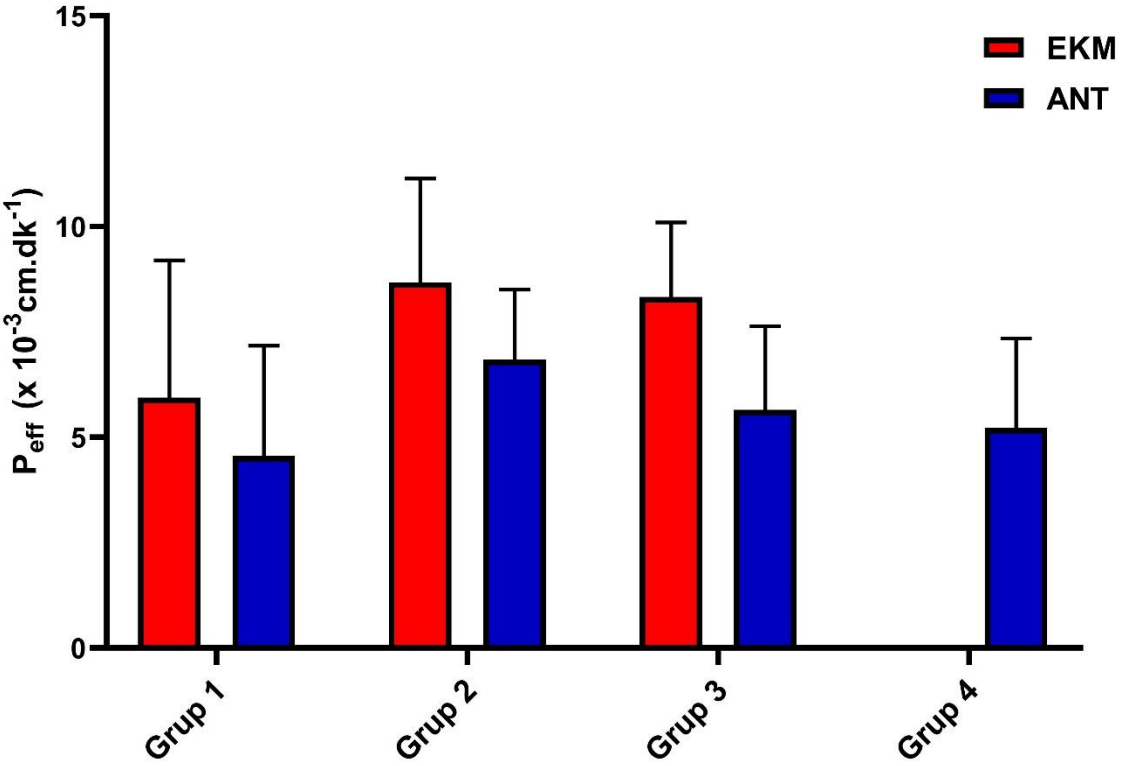
[a]: p<0,05 Grup 3 (saf EKM) ile karşılaştırıldığında

Her bir grup için EKM ve ANT'ye ait effektif permeabilite katsayısı (P_{eff}) değerleri Çizelge 4.76 ve Şekil 4.101 - Şekil 4.102'de sunulmuştur.

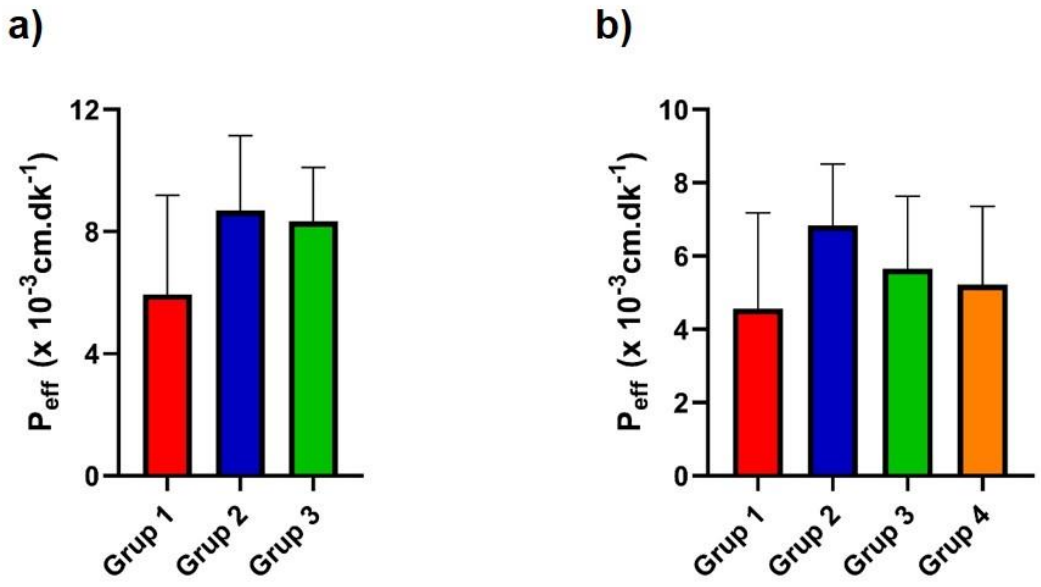
Çizelge 4.76. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'ye P_{eff} değerleri

Grup	$P_{eff,sıçan}$ (x10^{-3} cm.dk^{-1})	
	EKM	ANT
Grup 1 (F1)	5,94 ± 3,26	4,56 ± 2,62
Grup 2 (F5)	8,68 ± 2,46	6,84 ± 1,67
Grup 3 (Saf EKM)	8,33 ± 1,77	5,65 ± 1,99
Grup 4 (ANT)	-	5,22 ± 2,13

(Ort ± SS, n=6)



Şekil 4.101. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için EKM ve ANT'ye ait P_{eff} değerleri (Ort ± SS, n=6)



Şekil 4.102. Gruplar için P_{eff} değerleri (Ort ± SS, n=6) a) EKM'ye ait P_{eff} değerleri b) ANT'ye ait P_{eff} değeleri

EKM ve ANT absorpsiyonunun en yüksek EKM yüklü F5 formülasyonunda en düşük EKM yüklü F1 formülasyonunda olduğu bulunmuştur. Grup 1, 2 ve 3 için EKM'ye ait P_{eff} değerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Grup 1, 2, 3 ve 4 için ANT'ye ait P_{eff} değerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

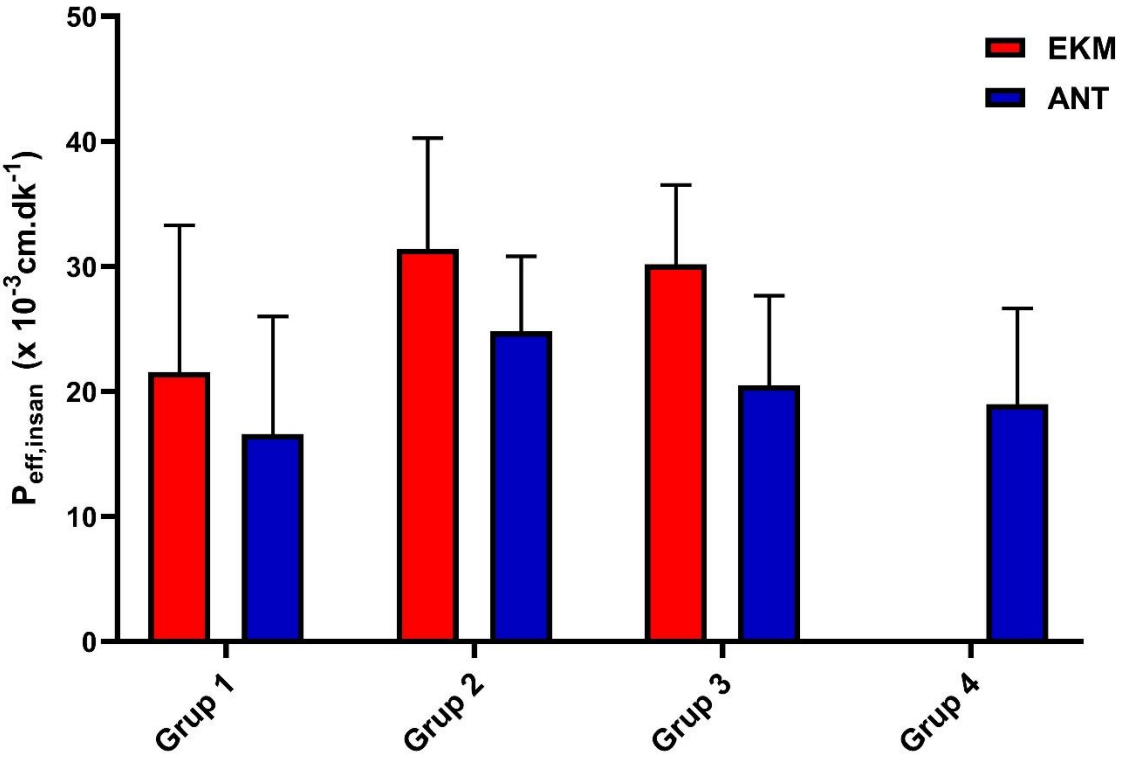
4.9.4. Eksemestan ve antipirinin insandaki P_{eff} değeri ve %absorbe edilen doz fraksiyonunun kestirimi

Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için EKM ve ANT'nin jejunum perfüzyonu sonucu elde edilen sıçandaki P_{eff} değerleri kullanılarak insandaki $P_{eff,insan}$ değerleri ve %absorbe edilen doz fraksiyonu ($\%F_a$) sırasıyla Eş. 3.12 ve Eş. 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır. EKM ve ANT'nin insandaki tahmin edilen $P_{eff,insan}$ değerleri Çizelge 4.77'de ve Şekil 4.103'te, insandaki tahmin edilen $\%F_a$ değerleri Çizelge 4.78'de sunulmuştur.

Çizelge 4.77. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $P_{eff,insan}$ değerleri

Grup	$P_{eff,insan}$ ($x10^{-3}$ cm.dk^{-1})	
	EKM	ANT
Grup 1 (F1)	21,6 ± 11,7	16,6 ± 9,4
Grup 2 (F5)	31,4 ± 8,9	24,8 ± 6,0
Grup 3 (Saf EKM)	30,2 ± 6,4	20,5 ± 7,2
Grup 4 (ANT)	-	19,0 ± 7,7

(Ort ± SS, n=6)



Şekil 4.103. Grup 1 (EKM yüklü F1), grup 2 (EKM yüklü F5), grup 3 (saf EKM) ve grup 4 (ANT) için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $P_{eff,insan}$ değerleri (Ort ± SS, n=6)

Çizelge 4.78. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 için EKM ve ANT'nin tahmin edilen insan $\%F_a$ değerleri

Grup	**$\%F_a$**	
	EKM	**ANT**
Grup 1 (F1)	93,1 ± 8,0	88,9 ± 12,9
Grup 2 (F5)	99,1 ± 1,0	98,1 ± 1,7
Grup 3 (Saf EKM)	99,2 ± 0,9	95,5 ± 4,3
Grup 4 (ANT)	-	93,4 ± 6,1

(Ort ± SS, n=6)

Tez kapsamında geliştirilen F1, F2, F3, F4, F5 SEDDS formülasyonları, referans ürün ve EKM çözeltisine ait in vitro, ex-vivo ve in situ çalışmaların sonuçları Çizelge 4.79'da sunulmuştur.

Çizelge 4.79. SEDDS formülasyonları, referans ürün ve EKM çözeltisine ait in vitro, ex-vivo ve in situ çalışma sonuçları

	F1			F2			F3			F4			F5			Referans (Aromasin®)			Referans (Çözelti)
İn vitro çözünme hızı (FaSSIF ortamında 90 dk sonunda salınan %EKM)	99,5 ± 0,6			98,8 ± 0,9			99,5 ± 1,8			93,0 ± 1,6			99,6 ± 1,5			100,9 ± 0,7			-
İn vitro lipoliz (Lipoliz sonunda sulu faz %EKM)	86,5 ± 0,9			89,1 ± 6,6			92 ± 5,0			70,4 ± 7,7			61,9 ± 6,1			12,3 ± 0,7			-
İn vitro lipoliz (Lipoliz oranı (%))	47,3 ± 6,7			48,6 ± 1,7			12,7 ± 0,6			74,8 ± 2,8			70,1 ± 3,2			-			-
Ex-vivo permeabilite (24 saat sonunda %difüze EKM)	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	***0. dk***	***15. dk***	***60. dk***	**-**
	40,6 ± 5,8	52,6 ± 12,1	57,6 ± 4,7	49,2 ± 16,6	60,7 ± 6,8	47,1 ± 6,6	44,4 ± 3,6	53,2 ± 4,1	52,2 ± 4,8	42,3 ± 2,4	58,0 ± 5,0	58,5 ± 0,8	41,3 ± 8,8	61,4 ± 1,5	55 ± 2,8	28,2 ± 2,3	48,7 ± 2,0	42,9 ± 2,3	-
Ex-vivo permeabilite (AUC)	540,2 ± 47,2	691,3 ± 101,9	797,8 ± 47,9	695,4 ± 151,6	867,2 ± 67,2	650,2 ± 67,4	576,2 ± 61,0	741,4 ± 36,5	706,0 ± 81,6	571,6 ± 24,8	779,5 ± 83,7	786,0 ± 11,9	555,9 ± 104,2	727,4 ± 12,4	717,4 ± 20,9	309,5 ± 31,3	586,3 ± 18,5	486,5 ± 47,6	-

Çizelge 4.79. (devam) SEDDS formülasyonları, referans ürün ve EKM çözeltisine ait in vitro, ex-vivo ve in situ çalışma sonuçları

	F1	F2	F3	F4	F5	Referans (Aromasin®)	Referans (Çözelti)
Hücre kültürü (58 µM EKM konsantrasyonunda 72 saatlik inkübasyon sonucu % hücre canlılığı)	18,9 ± 0,0	30,9 ± 0,1	21,7 ± 0,1	8,2 ± 0,1	9,7 ± 0,0	-	59,0 ± 0,1
İn situ intestinal perfüzyon (AUC)	38,4 ± 2,2	-	-	-	38,6 ± 1,9	-	42,5 ± 1,7
İn situ intestinal perfüzyon (P_{eff} ($x10^{-3}$ cm.dk $^{-1}$))	5,9 ± 3,3	-	-	-	8,7 ± 2,5	-	8,3 ± 1,8
İn situ intestinal perfüzyon (İnsandaki $\%F_a$ kestirimi)	93,1 ± 8,0	-	-	-	99,1 ± 1,0	-	99,2 ± 0,9

5. TARTIŞMA

Östrojen, premenopozal dönemde temel olarak ovaryumda postmenopozal dönemde ise karaciğer, kalp, kas, kemik, beyin gibi organlarda ve periferal dokularda aromataz adı verilen enzim ile androstenedion ve testosteron gibi androjenlerin aromatizasyonu sonucu sentezlenir (Cui, Shen ve Li, 2013; Dieni, Contemori, Biscarini ve Panichi, 2020). Eksemestan (EKM) meme kanseri hücrelerinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli östrojen sentezini aromataz enzimine geri dönüşümsüz bağlanarak inhibe eden aromataz inhibitörüdür (Jones ve Jones, 2000; Robinson, 2009). Hormon reseptör pozitif olan meme kanseri hastalarının tedavisinde önemli bir yere sahiptir. EKM'nin postmenopozal hormon reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde kullanımına yönelik olarak oral tableti (Aromasin® 25 mg kaplı tablet, referans ürün) bulunmaktadır.

EKM suda düşük çözünürlüğe ve biyoyararlanıma sahiptir. Karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramaktadır (Yavuz ve diğerleri, 2010). EKM'nin çözünürlük ve biyoyararlanım problemini çözmek, tedavi dozunu düşürmek ve referans ürüne kıyasla yüksek terapötik etkinlik sağlamak için kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemin (SEDDS) geliştirilmesi, sunulan tezin ilk amacını oluşturmaktadır. Tezin ikinci amacında, in vitro lipoliz çalışması ile franz difüzyon hücresi veya perfüze bağırsak segmenti gibi bir absorpsiyon basamağının birleştirilmesi ve birleşik yöntem kullanılarak farklı özellikteki EKM yüklü SEDDS formülasyonların incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla tez kapsamında EKM'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, spektrofotometrik ve kromatografik miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi, EKM yüklü SEDDS formülasyonların geliştirilmesi, geliştirilen formülasyonların damlacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI), seyreltme ve pH'ya karşı dayanıklılık, kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği ve zamanı, %Transmittans, morfoloji, viskozite açısından karakterize edilmesi, termodinamik ve uzun dönem stabilitesinin incelenmesine yönelik çalışmalar, in vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz, ex-vivo permeabilite, hücre kültürü ve in situ perfüzyon çalışmaları yürütülmüştür. Çalışma sonuçları aşağıda başlıklar halinde tartışılmıştır.

5.1. Eksemestanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

EKM yüklü SEDDS formülasyonları geliştirilmeden önce önformülasyon çalışmaları kapsamında EKM'nin çözünürlüğü, partikül büyüklüğü, erime derecesi belirlenmiş ve FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında EKM'nin çözünürlüğü distile su ve FDA veritabanında EKM için çözünme ortamı olarak belirtilen %0,5 SLS çözeltisinde 25°C ve 37°C sıcaklıklarda belirlenmiştir. EKM'nin 25°C ve 37°C sıcaklıktaki distile su içerisindeki çözünürlüğü sırasıyla 27,8 µg/mL ve 28,7 µg/mL olarak bulunmuştur. EKM'nin 37°C sıcaklıktaki su, klorür tamponu, asetat tamponu ve fosfat tamponundaki çözünürlüğü ise sırasıyla 80 µg/mL, 86 µg/mL, 79 µg/mL ve 73 µg/mL olarak bildirilmiştir (FDA, 1999b). Tez kapsamında yapılan çalışmada EKM çözünürlüğü bildirilen konsantrasyona göre daha düşük bulunmuştur. 80 µg/mL çözünürlük konsantrasyonu için 1 kısım EKM'nin çözüneceği distile su miktarı 12500 kısım iken 28,7 µg/mL çözünürlük konsantrasyonu için 1 kısım EKM'nin çözüneceği distile su miktarı yaklaşık olarak 35000 kısımdır. Her iki çözünürlük konsantrasyonu için 1 kısım EKM'nin çözüneceği distile su miktarı 10000 kısımdan fazladır. Çözünürlük tanımlarına göre 1 kısım katının çözüneceği sıvı miktarının 10000 kısımdan fazla olması pratik olarak çözünmediğini ifade etmektedir (USP, 2003). EKM'nin çalışma sonucu bulunan ve bildirilen çözünürlük konsantrasyonlarının farklı olmasına rağmen her iki çözünürlük konsantrasyonu için pratik olarak suda çözünmediği görülmüştür. EKM'nin distile su ve farklı tamponlardaki çözünürlüğü birbirine yakın olduğu için çözünürlüğünün pH'ya bağlı olmadığı sonucuna varılmıştır (FDA, 1999b).

EKM'nin 25°C ve 37°C sıcaklıktaki distile su çözünürlük konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Distile sudaki EKM çözünürlüğünün sıcaklıktan etkilenmediği görülmüştür.

EKM'nin %0,5 SLS çözeltisindeki çözünürlüğü ise distile su ortamında daha yüksek bulunmuştur. Bu beklenen bir sonuçtur. SLS için kritik misel konsantrasyonu %0,24 (a/h) olarak bildirilmiştir (Sulek, Wasilewski ve Kurzydłowski, 2010). Çözünme ortamına kiritik misel konsantrasyonundan fazla SLS eklenmesi, misel yapılarına ve

EKM'nin ıslanabilirliğinin artmasına bağlı olarak, EKM'nin bu ortamda daha yüksek çözünürlüğü ile sonuçlanmıştır. EKM'nin 25°C ve 37°C sıcaklıktaki %0,5 SLS çözeltisi çözünürlük konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). %0,5 SLS çözeltisindeki EKM çözünürlüğünün sıcaklıktan etkilenmediği görülmüştür.

FDA veri tabanında EKM'nin lipofilik yapısı, suda pratik olarak çözünmemesi ve tamamen oktanolde toplanması nedeniyle partisyon katsayısının belirlenemediği ve sonsuza eğilimli olduğu belirtildiği için partisyon katsayısı çalışması yapılmamıştır (FDA, 1999b).

EKM'nin partikül büyüklüğü lazer ışık saçılımı yöntemi ile 41,73 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1).

FT-IR spektrumunda, fonksiyonel grupların titreşiminden kaynaklı pikler 4000-1300 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, fonksiyonel grupların bağlandığı ana iskelet yapının titreşiminden kaynaklı pikler ise 1300-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gözlenir. Bu bölge parmak izi bölgesi olarak adlandırılır.

-NH2, -SH, -C=O gibi fonksiyonel gruplar yeri çoğunlukla değişmeyen belli dalga sayısındaki IR ışının absorpsiyonuna yol açarlar (Tranter ve Le Pevelen, 2017). Etkin madde, formülasyon veya fiziksel karışımların FT-IR analizi ile etkin maddenin zaman içerisinde veya formülasyonda yapısal bir değişiklikliğe uğrayıp uğramadığı yorumlanabilmektedir. EKM'nin fonksiyonel grupları 3. ve 17. karbona bağlı karbonil (C=O), 6. karbona bağlı metilen (C=C) ve 10. ve 13. karbona bağlı metil (CH_3) gruplarıdır. EKM'nin FT-IR spektrumu incelendiğinde EKM'nin ana iskeletine bağlı metil grubundaki C–H gerilim bantları 3079-2825 cm^{-1}'de, karbonil grubundaki C=O gerilim bantları 1731 cm^{-1} ve 1655 cm^{-1}'de, metilen grubundaki C=C gerilim bantları 1618 cm^{-1}'de gözlenmiştir (Şekil 4.2). EKM'nin fonksiyon gruplarına ait bu piklerin literatür verileri ile benzer olduğu sonucuna varılmıştır (Ramana, Krishna ve Mouli, 2022).

EKM'nin erime derecesi 198,2°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). Literatür araştırması yapıldığında EKM'nin erime derecesinin 194°C ile 200°C arasında

olduğu görülmüştür (Chaturvedi ve Garg, 2022; Yavuz ve diğerleri, 2010). Tez çalışmasında belirlenen erime derecesinin literatür verileri ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2. Eksemestanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonu

EKM'nin miktar tayini yöntemleri ve validasyon çalışmalarına başlanmadan önce dalga boyu taraması yapılmıştır. Dalga boyu taramaları miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi için gerekli bir çalışmadır. Spektrofotometrik veya kromatografik miktar tayini yöntemlerinde genellikle etkin maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda (λ_{maks}) çalışılmaktadır. λ_{maks} olarak bilinen bu dalga boyunda çalışıldığında dalga boyu değerindeki oynamanın absorbans değerine yansıması çok daha az olmaktadır.

EKM'nin λ_{maks} değeri distile su, %0,5 SLS çözeltisi ve asetonitril ortamlarında 250 nm, metanolde ise 245 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4 - Şekil 4.7). Çalışmada dalga boyunun distile su ve metanol gibi çözücü ortamına göre değiştiği gözlenmiştir. λ_{maks} değeri molekülün temel hal ve uyarılmış durumu arasındaki enerji farkına, molekül ile çözücü arasındaki hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimi varlığına ve dolayısıyla çözücünün polaritesine bağlıdır (Rauf, Soliman ve Khattab, 2008). Kullanılan polar çözücü, uyarılmış molekülün enerjisini düşürerek λ_{maks} değerinin 800 nm'ye doğru kaymasına neden olabilmektedir. Çalışmada metanole göre daha polar çözücüler olan distile su ve asetonitril kullanıldığında λ_{maks} değerinin 245 nm'den 250 nm'ye kayması, uyarılmış EKM moleküllerinin enerjisinin düşmesi şeklinde açıklanabilir. Tez çalışmasında belirlenen λ_{maks} değerinin literatür verileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Singh ve diğerleri, 2020; Yavuz, Bilensoy ve Sumnu, 2007).

EKM'nin miktar tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi ve validasyonu distile su ortamında yapılmış ve EKM'nin disitle sudaki çözünürlüğünün belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kromatografik miktar tayini yöntemi olarak HPLC kullanılmıştır. Kromatografik miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF, FeSSIF, %0,5 SLS içeren PBS tamponu ve ACN:Perfüzat (9:1) ortamlarında yapılmıştır. Metanol ortamı için geliştirilen yöntem EKM'nin yağ, sürfaktan ve kosolvanda çözünürlüğünün belirlenmesinde, asetonitril ortamı için geliştirilen yöntem in vitro lipoliz çalışmasında sulu ve pellet faz EKM miktarının asetonitrile ekstre edilerek belirlenmesinde, FDA tarafından önerilen ortam olan %0,5 SLS çözeltisi ortamı için geliştirilen yöntem EKM'nin %0,5 SLS çözeltisinde çözünürlüğünün belirlenmesi ve bu ortamdaki in vitro çözünme hızı profilinin belirlenmesinde, FaSSIF ve FeSSIF ortamları için geliştirilen yöntem bu ortamlardaki in vitro çözünme hızı profillerinin belirlenmesinde, %0,5 SLS içeren PBS tamponu için geliştirilen yöntem ex-vivo permeabilite çalışmasında EKM'nin görünür permeabilitesinin belirlenmesinde, ACN:Perfüzat (9:1) ortamı için geliştirilen yöntem in situ intestinal perfüzyon çalışmasında EKM'nin effektif permeabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF, FeSSIF, %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamları için geliştirilen yöntemde izokratik akış kullanılarak EKM analizi yapılmıştır (Çizelge 3.1). ACN:Perfüzat (9:1) ortamı için geliştirilen yöntemde gradient akış kullanılarak eş zamanlı EKM, ANT ve FK analizi yapılmıştır (Çizelge 3.2 - Çizelge 3.3).

İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında EKM perfüze edilen bağırsak segmentinden toplanan perfüzatta çözünmüş veya çökmüş halde bulunabilir. Perfüzatta bulunan toplam EKM miktarının doğru olarak belirlenebilmesi için çözünmüş ve çökmüş haldeki EKM'nin asetonitrile çekilmesinin analiz için uygun olacağı düşünülmüştür. Perfüzatta var olandan daha düşük miktarda EKM konsantrasyonunun belirlenmesi, EKM'nin emilimi olarak yorumlanacak ve hatalı sonuçlara yol açacaktır. Bu nedenle perfüzat örnekleri 10 kat asetonitril ile seyreltilmiş ve validasyon ortamı olarak ACN:Perfüzat (9:1) kullanılmıştır.

Kullanılan spektrofotometrik veya kromatografik her miktar tayini yöntemi ICH Q2(R1) Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Test ve Metodoloji kılavuzuna göre valide edilerek yöntemin kullanılan amaç doğrultusunda güvenilir olduğu gösterilmiş

ve beklenen sonuçların tekrarlı olarak elde edildiği kanıtlanmıştır (ICH, 1995). Yöntemlerin validasyonu için doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve geri elde, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı parametreleri incelenmiştir (Şekil 4.8 - Şekil 4.41).

Doğrusallık parametresi için en küçük kareler yöntemi kullanılmış ve EKM konsantrasyonu ile sinyal (absorbans/pik alanı) arasındaki doğrusallık, determinasyon katsayısı (R^2) ile incelenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakınlığı doğrusallığı ifade etmektedir. EKM konsantrasyonu ile sinyalin (absorbans/pik alanı) distile su ortamında 4 µg/mL - 20 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 0,0491x + 0,0052$, $R^2 = 1$), metanol ortamında 2 µg/mL - 50 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 46,331x + 3,483$, $R^2 = 0,9999$), asetonitril ortamında 0,5 µg/mL - 18 µg/mL konsantrasyon aralığında (y = 43,283x 1,3266, $R^2 = 0,9999$), %0,5 SLS çözeltisi ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 43,073x 3,375$, $R^2 = 0,9999$), FaSSIF ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 42,25x 2,7246$, $R^2 = 0,9999$), FeSSIF ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 38,89x 1,2118$, $R^2 = 0,9998$), %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamında 1 µg/mL - 40 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 42,981x 2,921$, $R^2 = 1$), ACN:Perfüzat (9:1) ortamında 1 µg/mL - 100 µg/mL konsantrasyon aralığında ($y = 45,352x 15,475$, $R^2 = 0,9996$) doğrusal olduğu görülmüştür.

Kesinlik parametresi ile ölçümler arasındaki yakınlık incelenmiştir. Kesinlik parametresi deney içi kesinlik (tekrar edilebilirlik) ve deneyler arası kesinlik (ara kesinlik) olmak üzere iki düzeyde gerçekleştirilmiştir. Kesinlik parametresinin laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eden tekrar elde edilebilirlik düzeyi incelenmemiştir. Kesinlik parametresi için SS ve VK hesaplanmıştır. Analitik yöntemin kesinliği için VK değerinin %2'den az olması hedeflenmektedir. Distile su, metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamlarında VK %2'den az bulunmuştur.

Doğruluk ve geri elde parametresi ile spektrofotometrik veya kromatogafik yöntem kullanılarak bulunan EKM miktarı ile gerçek EKM miktarı arasındaki yakınlık incelenmiştir. Yöntemin doğruluğu için EKM'nin bilinen konsantrasyonunun %geri eldesi ve VK hesaplanmıştır. İlaç endüstrisinde doğruluk ve geri elde değerlerinin

etkin maddeler için %97 ile %103 arasında olması beklenmektedir. Distile su, metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi, FaSSIF, FeSSIF, %0,5 SLS içeren PBS tamponu ve ACN:Perfüzat (9:1) ortamında EKM için geri elde sonuçları %97 ile %103 aralığında bulunmuştur.

Özgünlük ve seçicilik parametresi için yöntemin EKM'ye ait piki diğer tüm cevaplardan ayırıp ayıramadığı incelenmiştir. Spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerde EKM içermeyen ortam ve formülasyonlara ait spektrum ve kromatogramlar ile EKM'ye ait kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Spektrofotometrik yöntem için distile suyun EKM ile aynı dalga boyunda absorbans vermediği gözlenmiştir. Kromatografik yöntem için çalışılan dalga boyunda EKM'nin alıkonma zamanında ortam veya diğer maddelere ait herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Spektrofotometrik veya kromatografik yöntemin duyarlılık (LOD) parametresi için örnekteki saptanabilecek ancak kesin bir değer olarak ölçülmesi gerekmeyen en düşük EKM miktarı, saptama sınırı (LOQ) için örnekteki uygun hassasiyet ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen en düşük EKM miktarı incelenmiştir. LOD ve LOQ'nun belirlenmesi için görsel değerlendirmeye dayalı, sinyal-gürültü oranına dayalı ve cevap ile eğimin standart sapmasına (kör numunenin standart sapması ya da kalibrasyon doğrusuna göre) dayalı olmak üzere 3 yaklaşım bulunmaktadır (ICH, 1995). LOD ve LOQ parametresi için kalibrasyon doğrusuna göre absorbans/pik alanı ve eğimin standart sapmasına dayalı yaklaşım kullanılmıştır. Eş. 3.1 ve Eş. 3.2 ile hesaplanmıştır. ICH kılavuzunda standart sapma değeri olarak konsantrasyona karşılık gelen absorbans/pik alanı değerlerinin (y kesim noktası) standart sapması kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu amaçla gürültüye en yakın olan konsantrasyon olduğu için kalibrasyon aralığındaki en düşük konsantrasyona ait absorbans/pik alanının standart sapması kullanılmıştır.

5.3. SEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

SEDDS formülasyonlar çeşitli etkin maddelerin oral uygulanmasıyla ilgili çeşitli biyofarmasötik sınırlamaların aşılmasında büyük potansiyel göstermiştir. Bu sınırlamalar arasında EKM gibi suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeler,

karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrama, enzimatik degredasyon, değişken intestinal absorpsiyon yer almaktadır (Buya ve diğerleri, 2020).

SEDDS'ler nanoyapılı lipit taşıyıcı, katı lipit nanopartikül, lipozom veya katı dispersiyonlarla karşılaştırıldığında ise, hazırlanış ve ölçek büyütmenin kolay olması, sistemin katılaştırılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Emülsifikasyon basamağının gastrointestinal kanalda gerçekleşmesi nedeniyle saklama koşullarında agregasyon gibi sorunları yoktur (Mahmood ve Bernkop-Schnürch, 2019). Bu nedenle hem EKM'nin suda zayıf çözünürlüğe sahip olması gibi fizikokimyasal ve düşük biyoyararlanım göstermesi gibi farmakokinetik özellikleri hem de uzun vadede geliştirilecek formülasyonun stabilitesi düşünüldüğünde SEDDS'in uygun bir formülasyon statejisi olduğuna karar verilmiştir.

5.3.1. Çözünürlük çalışması

SEDDS'ler yağ, sürfaktan ve kosolvanın izotropik karışımından oluşmaktadır (Gursoy ve Benita, 2004). SEDD sistemlerin kendiliğinden emülsifikasyon süreci, formülasyonda kullanılan yağ ve sürfaktan gibi spesifik yardımcı maddelerin etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir. Etkili bir kendiliğinden emülsifikasyon sağlamak için formülasyonda kullanılacak yağ, sürfaktan ve kosolvanın kimyasal yapısı ve oranları önem taşımaktadır. Ek olarak, suda çözünürlüğü zayıf olan etkin maddeler için uygun yağ, sürfaktan ve kosolvan seçimi, yüksek ilaç yükleme etkinliği elde etmek ve GİS'te seyreltme sonucu etkin madde çökmesini önlemek için kritik öneme sahiptir (Baral ve diğerleri, 2021). Özellikle etkin maddenin yağdaki çözünürlüğü önemlidir. Çünkü yağ fazı etkin madde için bir rezervuar görevi görür ve GİS'te şilomikron formunu alarak lenfatik emilime uğrar (Buya ve diğerleri, 2020). Bu nedenle ilk olarak EKM için çözünürlük çalışması yapılmış, sonrasında seçilen yardımcı maddeler için optimum oran belirlenmiştir.

EKM, orta zincirli mono ve digliserit yapısına sahip İmwitor® 988 ve uzun zincirli mono ve digliserit yapısına sahip Maisine®'de yüksek çözünürlük göstermiştir (Şekil 4.42). Literatürde yüksek HLB değerinin emülsifikasyon işlemini kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Nasr ve diğerleri, 2016). Maisine® (HLB:1) göre daha yüksek HLB

değerine sahip olması nedeniyle yağ fazı olarak İmwitor® 988 (HLB:3-4) tercih edilmiştir.

Yüksek HLB değerine sahip sürfaktanın emülsifikasyon verimliliğini artırması ve geniş yüzey alanına sahip küçük damlacıkların oluşumunu kolaylaştırması nedeniyle, sürfaktan ve kosürfaktan seçimi de HLB değerlerine göre yapılmıştır. Sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırasıyla daha yüksek EKM çözünürlüğü gösteren Kolliphor® RH40 (HLB:14-16) ve Labrasol® ALF (HLB:12) seçilmiştir (Şekil 4.43).

Ek olarak, EKM Transcutol® HP'de yüksek çözünürlük göstermiştir. Literatürde Transcutol® HP gibi kosolvanların yüksek polaritesi nedeniyle hızlı bir şekilde sulu faza hareket ederek formülasyonun etkin madde için çözünme kapasitesinin düştüğü ve etkin maddenin çökmesine yol açabileceği bildirilmiştir (Buya ve diğerleri, 2020).

5.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

Üçgen faz diyagramları yağ, sürfaktan ve kosürfaktanın faz davranışlarını (miseller faz, lameller faz, Y/S emülsiyonu, S/Y emülsiyonu) anlamak, S_{mix} oranını belirlemek, kendiliğinden emülsifikasyon bölgesini ve sınırlarını tanımlamak, formülasyon bileşenlerinin miktarlarını optimize etmek için yol göstericidir (Akartas ve Karasulu, 2020; Seo, du Plessis ve Viljoen, 2022). Bu amaçla 4 farklı S_{mix} oranı çalışılmış ve her S_{mix} oranı için faz diyagramları çizilmiştir (Şekil 4.44).

Faz diyagramlarının çizilmesinde su ile titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Su fazının damla damla eklenirken karışımın bulanıklaştığı nokta, kendiliğinden emülsifikasyonun meydana geldiği konsantrasyonun yanı sıra uç noktaların da belirlenmesini sağlar. Uç noktaların üçgen faz diyagramı üzerine çizilmesi ile kombinasyona dahil edilen yardımcı maddelerin konsantrasyon aralığı ve kendiliğinden emülsifikasyonun meydana gelme olasılığının en yüksek olduğu yerler belirlenir (Seo ve diğerleri, 2022). Kendiliğinden emülsifikasyon alanı olarak bilinen bu bölgede emülsiyonlar yüksek stabiliteye sahiptir (Gülmezoğlu, Yıldız-Türkyılmaz ve Karasulu, 2022).

Çalışılan S_{mix} oranlarında HLB değeri yüksek sürfaktan miktarındaki artışın, titrasyonda harcanan su miktarında ve kendiliğinden emülsifikasyon alanında artışına yol açtığı görülmüştür. Literatürde HLB değeri yüksek sürfaktan için yüksek S_{mix} oranının küçük damlacık boyutuyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Abou Assi ve diğerleri, 2020). Hem büyük emülsifikasyon alanına sahip olması hem de küçük damlacık boyutu sağlayabileceği için 4:1 sürfaktan:kosürfaktan oranına karar verilmiştir.

Kendiliğinden emülsifikasyon alanı içerisinde optimum SEDDS formülasyonu bileşenlerini bulmak için genellikle bu alanın ağırlık merkezi bir referans görevi görür ve genellikle bir başlangıç noktası olarak kabul edilir (Çelik-Tekeli, 2020). Ağırlık merkezi ve çevresinde denenecek sonsuz nokta mevcuttur. Bu alan içerisinde optimum formülasyon bileşiminin sıklıkla başvurulan bir yol olan deney tasarımı ile belirlenmesinin daha mantıklı olacağı düşünülmüştür (Yılmaz-Usta ve diğerleri, 2022).

5.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyon bileşiminin belirlenmesi

Deney tasarımı, cevabı etkileyen bağımsız değişkenleri izlemek için belirli sayıda deneyin yapılarak daha az maliyetle bilgi edinmeyi sağladığı için SEDDS formülasyon optimizasyonunda tercih edilmiştir (Haque, 2022). Deney tasarımında yanıt yüzey yöntemlerinden bir tanesi olan Box-Behnken deney tasarımı (BBD) kullanılmıştır. BBD tercih edilme sebebi merkezi kompozit tasarıma göre daha az deney sayısı içermesidir (Mahmoud ve McConville, 2023).

BBD'de bağımsız değişken olarak yağ, sürfaktan ve kosürfaktan miktarı, bağımlı değişken yani cevap olarak damlacık boyutu ve PDI seçilmiştir. Bağımsız değişkenler için kendiliğinden emülsifikasyon alanı içerisinde olacak şekilde alt ve üst değerler tanımlanmıştır (Çizelge 3.7). BBD tasarımda alt ve üst değerlerden hareketle kübün orta noktaları ve merkez noktasını temsil eden 15 formülasyona ait sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.44) (Demir, Aksu ve Özsoy, 2017). Her bir cevap için (damlacık boyutu ve PDI) matematiksel modeller ve denklemler oluşturulmuştur (Çizelge 4.45).

Tasarımda lineer model, 2FI (two-factor interaction, ikili etkileşim) ve kuadratik model mevcuttur. Lineer modelde bağımsız değişkenler tek başlarına cevabı etkilemektedir, 2FI modelde bağımsız değişkenlerin cevabı tek başına etkilemesinin yanında iki bağımsız değişken beraber olarak da cevabı etkileyebilmektedir. Kuadratik modelde 2FI modeline ek olarak bağımsız değişkenlerin ikinci dereceden etkileri de mevcuttur. Cevapların hangi modele uyum sağlandığının belirlenmesi için R^2 değerine, varyans analizi (ANOVA) ve uyum eksikliği testine (lack of fit) bakılmıştır. R^2 değerinin yüksek olması (1'e yakın) ve modele uyum eksikliğinin olmaması uyum için aranan koşullardır. R^2 değerinin 0,8'den yüksek oluşu modelin iyi öngörülebilirliğe sahip olduğunu göstermektedir (Montgomery, 2017).

Uyum eksikliği testinde H_0 hipotezi uyum eksikliği yoktur, H_1 hipotezi ise uyum eksikliği vardır şeklindedir. 0,05 anlamlılık düzeyinde p değerinin 0,05'den küçük çıkması durumunda H_0 hipotezi reddedilip H_1 hipotezi kabul edilirken, p değerinin 0,05'den büyük çıkması durumunda H_0 hipotezi kabul edilip H_1 hipotezi reddedilir.

Damlacık boyutu ve PDI için Çizelge 4.45'e bakıldığında kuadratik model için en yüksek R^2 değeri ve istatistiksel olarak anlamsız uyum eksikliği görülmüş ($p>0,05$) ve bu modele uyum sağladığına karar verilmiştir. Kuadratik modele göre bağımsız değişkenler tek başına, iki değişken beraber ve değişkenler ikinci dereceden, damlacık boyutu ve PDI'yı etkilemektedir. Bu etkileşimlerden hangilerinin damlacık boyutu ve PDI üzerindeki etkisinin anlamlı olduğunu belirlemek için ANOVA sonuçları incelenmiştir (Çizelge 4.46).

Matematiksel denkleme göre İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF artışı damlacık boyutunda artmaya sebep olurken Kolliphor® RH40 artışı azalma sağlamaktadır. ANOVA sonuçlarına göre ise damlacık boyutu üzerine İmwitor® 988'in Labrasol® ALF ile ikili etkileşimi, İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF'nin ikinci dereceden etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF'nin ikili etkileşimi damlacık boyutu üzerinde diğer faktörlere göre daha önemli etkiye sahiptir. Bu sonuçlar yanıt yüzey grafiklerinde de görülmüştür (Şekil 4.46 - Şekil 4.47). Kolliphor® RH40 orta seviyede sabit tutulduğunda Labrasol® ALF miktarının azalması, İmwitor® 988 miktarının artışı ile damlacık boyutunun arttığı görülmüştür. Labrasol® ALF orta seviyede, Kolliphor® RH40 alt seviyede sabit

tutulduğunda İmwitor® 988 miktarının artışı damlacık boyutunu önce azaltmış sonra artırmıştır.

Matematiksel denkleme göre İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF artışı PDI'da artışa sebep olurken Kolliphor® RH40 artışı PDI'da azalma sağlamaktadır. ANOVA sonuçlarına göre ise PDI üzerine İmwitor® 988'in Labrasol® ALF ile ikili etkileşimi ve Labrasol® ALF'nin ikinci dereceden etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). İmwitor® 988 ve Labrasol® ALF'nin ikili etkileşimi PDI üzerinde diğer faktörlere göre daha önemli etkiye sahiptir. Yanıt yüzey grafiklerine bakıldığında ise Labrasol® ALF orta seviyede sabit tutulduğunda İmwitor® 988 ve Kolliphor® RH40'ın eş zamanlı alt ve üst seviyelerinde PDI'ın arttığı görülmüştür (Şekil 4.48). Kolliphor® RH40 orta seviyede sabit tutulduğunda Labrasol® ALF üst seviyeye, İmwitor® 988 alt seviyeye yaklaştıkça PDI'ın arttığı görülmüştür (Şekil 4.48 - Şekil 4.49).

BBD ile yardımcı maddelerin damlacık boyutu ve PDI üzerine etkisi incelenmiş ancak Kolliphor® RH40 için seçilen alt ve üst seviye aralığının dar olması nedeniyle etkisinin tam olarak gözlemlenemediği düşünülmüştür. Literatürde, sürfaktan bileşeninin artışı ile yağ-su arayüzeyinin stabilizasyonunu sağlayarak damlacık boyutunda azalmaya sağlayacağı belirtilmiştir (Kommuru, Gurley, Khan ve Reddy, 2001).

Elde edilen sonuçlardan hareketle optiumum formülasyon bileşimi için sayısal optimizasyon ve arzuedilebilirlik (istenilen hedefe ulaşma) yaklaşımı kullanılmıştır. Design Expert® programının arzuedilebilirlik fonksiyonu tüm bağımsız değişkenleri tek bir fonksiyon olarak ifade edebilen ve cevabın öneminin 1 ile 5 arasında derecelendirilebildiği, hedefe göre cevapları minimize veya maksimize edebilen bir fonksiyonudur. Fonksiyonun 1'e yakın veya eşit olması istenilen hedefe ulaşıldığını göstermektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010). Çizelge 4.47'de sunulan İmwitor® 988, Kolliphor® RH40, Labrasol® ALF miktarı, damlacık boyutu ve PDI hedef değerlerine göre formülasyon bileşimine karar verilmiştir. Ölçülen damlacık boyutu ve PDI değerlerinin program tarafından %95 güven ile tahmin edilen aralıkta olup olmadığı kontrol edilmiş ve aralıkta olduğu görülmüştür (Çizelge 4.48 - Çizelge 4.49).

F1 kodlu optimum SEDDS formülasyonu %14 İmwitor® 988, %68,8 Kolliphor® RH40 ve %17,2 Labrasol® ALF içermektedir. F1'den hareketle farklı faktörlerin incelenmesi için başka SEDDS formülasyonları geliştirilmiştir. Bu faktörler uzun zincirli yağ kullanımı, yüksek ve düşük oranda yağ içeriği, kosolvan kullanımı ve sindirilebilir sürfaktan varlığıdır. Bu amaçla F1 formülasyonunda kosürfaktan olarak kullanılan Labrasol® ALF yerine aynı miktarda kosolvan Transcutol® HP tercih edilerek F2, sürfaktan olarak kullanılan Kolliphor® RH40 yerine aynı miktarda ancak daha yüksek sindirilebilirliğe sahip Tween® 80 tercih edilerek F4 formülasyonu hazırlanmıştır. Kolliphor® RH40 ve Tween® 80, HLB değeri ve effluks taşıyıcı olan P-gp'yi inhibe etmeleri bakımından benzemektedir (Al-Mohizea, Zawaneh, Alam, Al-Jenoobi ve El-Maghraby, 2014). Ancak Kolliphor® RH40'ın sindirim oranı çok düşükken, Tween® 80 yüksek oranda sindirime uğrayabilmektedir (Rosso ve diğerleri, 2021). Yüksek miktarda yağ içeriği için ise F1 formülasyonundan hareketle %40 oranında İmwitor® 988 içeren F5 formülasyonu hazırlanmıştır. Uzun zincirli yağ fazı içeren SEDDS formülasyonu için araştırma grubumuzda yürütülen doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen SEDDS formülasyonu F3 koduyla kullanılmıştır (Yılmaz-Usta, 2022). Formülasyon içerikleri Çizelge 3.9'da sunulmuştur.

F3 ve F5 formülasyonları için 4:1 S_{mix} oranı çalışılmış ancak sırasıyla 9:1 ve 1:1 S_{mix} oranı tercih edilmiştir. F3 formülasyonu için F1'den hareketle İmwitor® 988 yerine uzun zincirli Maisine® (%14 Maisine®, %68,8 Kolliphor® RH40, %17,2 Labrasol® ALF) kullanıldığında emülsiyon damlacıkları 0,546 PDI ile polidispers bir dağılım göstermiştir. F5 formülasyonu için F1'den hareketle 4:1 S_{mix} oranında %40 İmwitor® 988 kullanıldığında (%40 İmwitor® 988, %48 Kolliphor® RH40, %12 Transcutol® HP) emülsiyon damlacıkları 0,402 PDI ile polidispers bi dağılım göstermiştir. Literatürde yüksek miktarda yağ içeren SEDDS formülasyonları için 1:1 S_{mix} oranı ve kosürfaktan yerine kosolvan kullanıldığı görülmüştür (Nipun ve Islam, 2014).

5.3.4. SEDD sistemlere eksemestan yüklenmesi

Formülasyonlara yüklenecek EKM miktarını belirlemek için çözünürlük çalışması yapılmıştır (Çizelge 4.50). Çalışmada en yüksek EKM yükleme kapasitesi F5 nolu formülasyonda bulunmuştur. F5 formülasyonunu sırasıyla F2, F4, F1 ve F3 takip etmiştir (Şekil 4.51). F5 formülasyonu en yüksek yağ içeriğine sahiptir.

Formülasyonda yağ yüzdesi arttıkça ilaç yükleme kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. Formülasyon geliştirilmesinde etkin maddenin maksimum çözünürlük gösterdiği yağ ve bu yağın yüksek miktarda kullanılması, formülasyonun ilaç yükleme kapasitesini artırması nedeniyle tercih edilmektedir (Gürsoy ve Benita, 2004). EKM Transcutol® HP'de de yüksek çözünürlük gösterdiği için bu durum F2 formülasyonunun ilaç yükleme kapasitesini olumlu yönde etkilemiştir. En düşük yağ oranına sahip F3 formülasyonu için en düşük EKM çözünürlüğü elde edilmiştir.

Formülasyon karşılaştırması yapılabilmesi ve formülasyonlara eşit ve en yüksek miktarda etkin madde yüklenmesini sağlamak amacıyla 1 gram formülasyon başına 15 mg EKM yüklenmesine karar verilmiştir.

5.4. Geliştirilen SEDD Sistemlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

5.4.1. Damlacık boyutu ve PDI

Kendiliğinden emülsifiye sistemler yapılarındaki bir veya daha fazla hidrofilik sürfaktan veya kosolvan ile sulu bir ortamda hafif çalkalama sonucu 200 nm'den küçük damlacıklara sahip emülsiyonlar oluştururlar (Mou ve diğerleri, 2008). LFCS'ye göre Tip IIIB olarak sınıflandırılan %20'den az yağ içeren sistemler için ise damlacık boyutunun 100 nm'den küçük olduğu belirtilmiştir (Niederquell ve Kuentz, 2013). Tez kapsamında geliştirilmek istenen formülasyonlar Tip IIIB'dir.

Damlacık boyutu, dispersiyon hızı, emülsifikasyon etkinliği, SEDDS formülasyondan etkin madde salımı ve absorpsiyon gibi çok sayıda faktörü etkilemektedir (Nielsen, Petersen ve Müllertz, 2008). Nano boyutlu damlacıklar geniş bir yüzey alanı ile hızlı etkin madde salımı ve absorpsiyon sağlar (Wang ve diğerleri, 2009). Ayrıca SEDDS formülasyonu boyutları sayesinde mikrovilluslar arası boşluklara erişim sağlayarak emilimi artırır (Elgart ve diğerleri, 2013).

PDI emülsiyon damlacıklarının boyut dağılımını ifade etmektedir. Dağılımın monodispers ve homojen olması için PDI değerinin 0,2'den küçük olması istenmektedir (Timur ve diğerleri, 2022). PDI değerinin küçük olması damlacıkların dar bir dağılıma sahip olduğunu gösterir.

EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının tamamının damlacık boyutu 100 nm'den, PDI değerleri 0,2'den küçük çıkmıştır (Çizelge 4.51 ve Şekil 4.52). EKM içermeyen ve EKM yüklü SEDDS formülasyonlarını damlacık boyutları arasındaki farklılık F5 formülasyonu hariç anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). EKM içermeyen F5 formülasyonunun damlacık boyutu 31,7 ± 1,0 nm iken, EKM yüklü F5 formülasyonu için 28,9 ± 0,8 nm olarak ölçülmüştür. Bu farklılık küçük olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

EKM yüklü formülasyonlar arası damlacık boyutları arasındaki farklılık incelendiğinde F1 (14,5 ± 0,2 nm), F2 (15,4 ± 0,3 nm) ve F3 (16,1 ± 0,5 nm) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamsızken ($p>0,05$) bu formülasyonların F4 (11,7 ± 0,2 nm) ve F5 formülasyonları (28,9 ± 0,8 nm) arasındaki ve F4 ile F5'in kendi arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). F1, F2 ve F3 formülasyonlarının damlacık boyutu birbirine yakınken F4 daha küçük, F5 ise daha büyük çıkmıştır.

F5 formülasyonu %40 oranında İmwitor® 988 içermektedir. Formülasyondaki hidrofilik bileşenlere göre yağ oranının artışı daha büyük emülsiyon damlacıklarının oluşumunu sağlamıştır (Zewail, El-Gizawy, Osman ve Haggag, 2021). Benzer sonuçlar Parmar ve ark. tarafından yapılan çalışmada da görülmüştür (Parmar ve diğerleri, 2011).

F4 formülasyonunda F1 formülasyonundaki Kolliphor® RH40 yerine Tween® 80 kullanılmıştır. Tween® 80 ile hazırlanan formülasyonda gözlemlenen daha küçük damlacık boyutunun, Kolliphor® RH40 ile hazırlanan formülasyonun damlacık boyutu ile karşılaştırıldığında iki sürfaktanın moleküler geometrisindeki farklılıklardan kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Saberi, Fang ve McClements, 2013). Bir sürfaktanın moleküler geometrisi kuyruk grubunun kesit alanını baş grubununun kesit alanıyla ilişkilendiren kritik paketleme parametresi ile açıklanmaktadır. Sürfaktanın kritik paketleme parametresi yağ-su arayüzeyini ve emülsiyon damlacıklarının oluşumunu etkilemektedir (Guttoff, Saberi ve McClements, 2015). Kolliphor® RH40 molekülünün kuyruk ve baş grubu karbon sayısının Tween® 80'e göre fazla olması F1'e kıyasla F4 için küçük damlacık boyutu ile sonuçlanmış olabileceği düşünülmektedir (Xi ve diğerleri, 2009).

EKM içermeyen ve EKM yüklü tüm SEDDS formülasyonları 0,2'den küçük PDI değeri ile monodipsers bir dağılım göstermiştir (Şekil 4.53 - Şekil 4.54).

5.4.2. Seyreltme ve pH'a karşı dayanıklılık

SEDDS formülasyonları farklı oranlar ve pH'da seyreltildiğinde etkin maddenin çökmemesi önemlidir. Çünkü oral uygulamadan sonra SEDDS, GIS'in farklı bölümlerindeki farklı pH'larda çeşitli oranlarda seyreltmelerle karşılaşmak zorundadır (Nasr ve diğerleri, 2016). Bu nedenle geliştirilen SEDD sistemler, farklı seyreltme oranları ve pH'da çökme veya faz ayrımı açısından değerlendirilmiştir. 50, 100, 250 ve 500 kat seyreltme oranları ve distile su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları kullanılmıştır.

EKM içermeyen tüm SEDDS formülasyonları, EKM yüklü F1, F3, F4 ve F5 formülasyonları için, farklı seyreltme oranları ve pH'da etkin madde çökmesi ya da faz ayrımı gözlenmemiştir (Çizelge 4.52 - Çizelge 4.56). Ancak EKM yüklü F2 formülasyonu için pH 6,8 ortamı ile seyreltme oranlarının hepsinde bulanma görülmüştür. Bu durum Transcutol® HP kaynaklı formülasyonun EKM için çözme kapasitesini kaybetmesine bağlı olarak EKM'nin çökmesi şeklinde yorumlanmıştır. Literatürde bir formülasyon farklı seyreltme oranı ve pH maruziyetine karşı dayanıklılık göstermiyorsa, etkin madde emiliminde önemli bir değişiklik (çoğunlukla azalma) gözlemlenebilir şeklinde belirtilmiş olmasına rağmen SEDDS formülasyonları oral olarak alındığında ilk mide ortamında emülsifiye olarak duodenuma geçeceğinden F2 formülasyonu da değerlendirilmiştir (Avachat ve Patel, 2015).

F5 formülasyonu F2'den fazla miktarda Transcutol® HP içermesine rağmen herhangi bir bulanma ve EKM çökmesi gözlenmemiştir. Bu durum F5 formülasyonundaki yağ ile ilişkilendirilmiş ve %40 oranında kullanılan İmwitor® 988'in EKM için bir rezervuar görevi görerek çökmesini önlediği şeklinde yorumlanmıştır.

F5 formülasyonu için seyreltme oranı azaldıkça damlacık boyutunun arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.56). Literatürde benzer durum lipofenol yüklü SNEDDS

formülasyonu geliştirme çalışmalarında da görülmüştür (Vincent ve diğerleri, 2022). Sırasıyla %25, %60 ve %15 oranında yağ, sürfaktan ve kosolvan içeren SNEDDS formülasyonunun damlacık boyutu 1:1000 oranında seyreltildiğinde 62,4 ± 3,4 nm; 1:100 oranında seyreltildiğinde 102,2 ± 7,2 nm olarak ölçülmüştür. Damlacık boyutunun ortam hacmiyle değişmesi ile emilimin etkilenebileceği bildirilmiştir.

F5'in 50 kat seyreltme oranında damlacıklar 30 nm ve 400 nm civarında iki modlu olarak dağılmıştır. Bu durum ortam hacminin azlığı nedeniyle damlacıkların yeterince yakınlaşması ve damlacıklardan saçılan ışığın Malvern Zeta Sizer cihazı tarafından tek bir damlacık olarak algılanması şeklinde açıklanabileceği düşünülmüştür.

5.4.3. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği

EKM içermeyen ve EKM yüklü F1, F2, F3, F4 formülasyonlarının kendiliğinden emülsifikasyon etkinliği Sınıf A olarak belirlenirken, EKM içermeyen ve EKM yüklü F5 formülasyonu için ise damlacık boyutunun büyüklüğü nedeniyle Sınıf B olarak belirlenmiştir. Literatürde bu test için Sınıf A'nın en iyi olduğu belirtilmiştir (Rathore ve diğerleri, 2023).

5.4.4. Kendiliğinden emülsifikasyon zamanı

SEDDS formülasyonlarında hızlı emülsifikasyon, hızlı etkin madde salımı ve etkinin hızlı başlamasını sağladığı için önemlidir (Czajkowska-Kośnik ve diğerleri, 2015). Sınıflandırma sistemine uygun şekilde F1, F2 ve F3 formülasyonları yaklaşık olarak 1 dakika içinde, F4 ve F5 2 dakika içinde emülsifiye olmuştur (Khoo ve diğerleri, 1998).

F1'e kıyasla F4 nolu formülasyonda kullanılan Tween® 80'in emülsifikasyon süresini artırdığı gözlenmiştir. Çünkü Kolliphor® RH40, Tween® 80'e göre daha yüksek emülsifikasyon kapasitesine sahiptir (Zeng, Xin ve Zhang, 2017).

F2 formülasyonunda Transcutol® HP varlığı arayüzey gerilimini azaltarak ve akışkanlığını artırarak emülsifikasyonu iyileştirmiş, F1'e göre daha kısa süre de emülsifikasyon sağlamıştır (Kommuru ve diğerleri, 2001).

5.4.5. %Transmittans

LTFC'ye göre Tip III formülasyonlar suda çözünebilen sürfaktan içeren, şeffaf ve berrak bir görünüme sahiptir (Pouton, 2006). Berrak dispersiyonların ortaya çıkması etkin madde çökmesinin olmadığının bir göstergesidir. Yüksek %Transmittans ise bu berraklığı kanıtlar ve aynı zamanda küçük damlacık boyutunu yansıtır (Buya ve diğerleri, 2020; Prajapat ve diğerleri, 2017). %Transmittans ölçümlerinde tüm formülasyonlar için %99'un üzerinde değerler elde edilmiştir.

5.4.6. Morfoloji

EKM yüklü SEDDS formülasyonların morfolojik yapısı TEM ile incelenmiştir (Resim 4.2). TEM görselleri ile formülasyonların su ile hafif karıştırma sonucu emülsifiye olduğu, emülsiyon damlacıklarının küresel ve boyutlarının 100 nm'den küçük olduğu kanıtlanmıştır. Image J® ile skala ayarı yaparak resimler üzerinde boyut ölçümü gerçekleştirilmiş ve sonuçların Malvern Zeta Sizer sonuçlarıyla benzer olduğu görülmüştür (Çizelge 4.51).

5.4.7. Viskozite

Seyreltme işlemine tabi tutulan SEDDS'in viskozitesi, kendiliğinden emülsifikasyon sürecini doğrudan etkilemektedir. Viskozite düştükçe, kendiliğinden emülsifikasyonun kolaylaşması beklenmektedir. Formülasyona yüksek miktarlarda sürfaktan eklenmesiyle sistemin artan viskozitesi, emülsiyon damlacıklarının oluşması için daha fazla zaman gerektirebilmektedir (Pouton, 1997; Wang ve diğerleri, 2009). Formülasyona kosolvan ilavesi ise viskozitede azalma sağlamaktadır. Ayrıca, sürfaktan konsantrasyonunun artırılması, S_{mix} oranında artış ile birlikte kosolvan içeriğini azaltarak arayüzey filminin esnekliğinde bir azalmaya ve arayüzeyin bükülme geriliminin ve sertliğinin artmasına neden olmaktadır (Kawakami ve diğerleri, 2002).

SNEDDS formülasyonunun viskozitesi, sert veya yumuşak jelatin kapsüllere doldurulabilme özelliğinin belirlenmesinde de çok önemlidir. Sistemin viskozitesi çok düşükse kapsülden sızıntı ihtimali artabilir ve çok yüksek viskoziteli sistem doldurma

aşamasında sorun oluşturabilir (Gupta ve diğerleri, 2011; Patil, Patil ve Paradkar, 2007).

F1 formülasyonu F2 ve F5 ile karşılaştırıldığında, formülasyonda kosolvan kullanılması ve miktarının artırılması viskozitede azalma sağlamış, emülsifikasyon zamanını hızlandırmıştır (Çizelge 4.58, Çizelge 4.60 ve Şekil 4.55). F1 formülasyonu F3 ile karşılaştırıldığında, formülasyonda sürfaktan miktarının artırılması viskozitede artışa yol açmıştır. Ancak emülsifikasyon zamanınında artış beklenirken değiştirmemiştir.

SEDDS formülasyonların kapsüle doldurma işlemi için kabul edilebilir sınırların 0,1 - 25 Pa.s olduğu belirtilmiştir (Khan ve diğerleri, 2022). F5 formülasyonu hariç diğer formülasyonların bu aralık içinde olduğu görülmüştür.

Akış reogramlarına göre tüm formülasyonlar newtonian akışa sahiptir (Şekil 4.56). Literatürde EKM yüklü formülasyonlarla benzer şekilde, farklı oranlarda Captex® 300, Capmul® MCM, Labrasol® ve Lipoid® S LPC 80 içeren beş farklı SNEDDS formülasyonu sıcaklık artışından (20°C ve 70°C) bağımsız olarak newtonian akış göstermiştir (Tran, Xi, Rades ve Müllertz, 2016).

5.4.8. FT-IR analizi

EKM ile yardımcı maddelerin geçimliliği FT-IR analizi ile incelenmiştir. Saf EKM'ye ait FT-IR spektrumu Bölüm 5.1'de tartışılmış, EKM'nin kimyasal yapısına göre spektrumda tüm piklerin olduğu gözlenmiştir. EKM, EKM içermeyen SEDDS, EKM yüklü SEDDS formülasyonları ve yardımcı maddelere ait %Transmittans değerleri aynı spektrumda gösterilmiştir (Şekil 4.57 - Şekil 4.61). İmwitor® 988, Maisine®, Kolliphor® RH40, Tween® 80, Labrasol® ALF ve Transcutol® HP'ye ait spektrumlar literatür verileriyle benzerdir (Nazlı, Mesut ve Özsoy, 2021; Reddy ve Gubbiyappa, 2022; Yılmaz-Usta, Olgac, Timur ve Teksin, 2023).

Formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin fonskiyonel grupları benzer olduğu için gruplara ait gerilim bantları yakın bölgelerde gözlenmiştir. İmwitor® 988'in O–H fonksiyonel grubuna ait gerilim bandı 3406 cm^{-1}'de, C–H grubuna ait gerilim bantları

2926 cm^{-1} ve 2855 cm^{-1}'de, C=O fonksiyonel grubuna ait gerilim bandı 1736 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Kolliphor® RH40'ın O–H fonksiyonel grubuna ait gerilim bandı 3490 cm^{-1}'de zayıf bir pik olarak, C–H grubuna ait gerilim bantları 2942 cm^{-1} ve 2857 cm^{-1}'de, C=O fonksiyonel grubuna ait gerilim bandı 1732 cm^{-1}'de, yapı iskeletinde yer alan ait C–O bağına ait gerilim bandı 1097 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Transcutol® HP'de karbonil yapısı bulunmadığı için 1730 cm^{-1} civarında pik görülmemiştir.

EKM yüklü SEDDS formülasyonlarına ait spektrumlar incelendiğinde 3440 cm^{-1} civarında tüm yardımcı maddelerde var olan O–H fonksiyonel grubuna ait zayıf gerilim piki, 2920 cm^{-1} ve 2860 cm^{-1} civarında tüm yardımcı maddelerde var olan C–H grubuna ait gerilim piki, 1730 cm^{-1} civarında ise Transcutol® HP hariç tüm yardımcı maddelerde var olan C=O fonkiyonel grubuna ait gerilim bandı gözlenmiştir.

EKM yüklü formülasyonların spektrumlarında EKM ve yardımcı maddelerde ortak olarak bulunan C–H, C=O fonksiyonel gruplarının gerilim bantları gözlenirken, EKM için 1618 cm^{-1}'de görülen C=C fonksiyonel grubuna ait gerilim bandının C=O grubunun gerilim bandı nedeniyle gölgelendiği görülmüştür. Bu durum 1 gram formülasyonun düşük miktarda (15 mg) EKM içermesi ve bu miktarında formülasyon matrisi içinde tamamen kapsüllenmesi şeklinde yorumlanmıştır. Bravo-Alfaro ve ark. tarafından yürütülen betülinik asit yüklü SEDDS formülasyon geliştirme çalışmasında da benzer olarak betülinik asite ait C=C gerilim bandının etkin madde yüklü formülasyon spektrumda kaybolduğu gözlenmiştir (Bravo-Alfaro ve diğerleri, 2022).

5.4.9. Termodinamik stabilite çalışmaları

SEDDS'in termodinamik olarak stabil faz ayrımı veya kremalaşma belirtisi göstermemesi gereklidir. GIS'de hafif çalkalama ile emülsifiye olan bu sistemler bazen saklama koşullarında stabil olmayabilir. Bu nedenle stres koşullarında termodinamik stabilite çalışmaları yürütülür (Kanwal ve diğerleri, 2023).

EKM içermeyen ve EKM yüklü beş SEDDS formülasyonları için ısıtma-soğutma, santrifüj ve donma-çözme döngüleri sonrasında faz ayrımı, kremalaşma veya etkin madde çökmesi gözlenmemiştir (Resim 4.3 - Resim 4.4). Damlacık boyutu ve PDI

değişimleri incelendiğinde başlangıç ve döngü sonrası damlacık boyutu ve PDI değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (p>0,05) (Çizelge 4.61 - Çizelge 4.62 ve Şekil 4.62 - Şekil 4.63). Hazırlanan SEDDS formülasyonları termodinamik olarak stabil bulunmuştur.

5.4.10. Uzun dönem stabilite çalışmaları

Geliştirilen EKM yüklü formülasyonlar için hedeflenen saklama koşulu 25°C oda sıcaklığıdır. Bu durumda uzun süreli stabilite çalışmalarının 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN'de, hızlandırılmış stabilite çalışmalarının ise 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN'de yürütülmüş olması gereklidir. Tez kapsamında gerekli olmamasına rağmen 5 ± 3°C/ortam nemi koşulunda da stabilite çalışmaları yürütülmüştür. EKM yüklü SEDDS formülasyonları 12 ay boyunca görsel olarak, EKM miktarı, damlacık boyutu ve PDI açısından incelenmiştir.

Görsel olarak değerlendirmede 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulunda tutulan formülasyonlar, sıcaklık gereği katı hale geçerek berraklığını kaybetmiştir. F5 formülasyonu iki faz şeklinde gözlenmiş ancak tüm formülasyonlar oda sıcaklığında bir süre tutulduğunda başlangıç berrak görünüme kavuşmuştur. 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda F3 hariç tüm formülasyonlar berrak halini korumuş, faz ayrışması veya etkin madde çökmesi gözlenmemiştir. F3 formülasyonu ise beyaz bir form almıştır. 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda tutulan 5 formülasyonda 1. aydan itibaren renk değişimi gözlenmiştir. Berrak ve şeffaf olan F1, F2, F3 ve F5 formülasyonları berrak ve şeffaflığını sürdürmüş ancak sarı renk almıştır (Resim 4.5 - Resim 4.9). F4 formülasyonu Tween® 80 içeriği nedeniyle başlangıçta sarı ve berrak bir görünüme sahip olduğu için bu formülasyonda bir değişim gözlenmemiştir. 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda tutulan F3 formülasyonun 6. ayında EKM kristalleri görülmüştür.

ICH Q1E stabilite verilerinin değerlendirilmesiyle ilgili kılavuza göre saklama koşulu oda sıcaklığı olan bir etkin madde ve ürün için ruhsat başvurusu için 12 ay uzun süreli, 6 ay ara koşul ve 6 ay hızlandırılmış stabilite çalışması gereklidir. Hızlandırılmış stabilite koşullarında önemli değişiklik görülmemesi, hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite çalışmalarında değişikliğin çok az veya hiç olmaması

durumunda raf ömründe uzun süreli stabilite çalışmalarının yürütüldüğü sürenin iki katı kadar uzatma yapılabileceği bildirilmiştir. Önemli değişikliklerden biri etkin maddenin başlangıç değerinde %5'ten fazla değişiklik görülmesidir (ICH, 2003).

SEDDS formülasyonları EKM miktarı açısından incelendiğinde F1, F2, F3 ve F5 formülasyonlarının 3 saklama koşulu için etkin madde miktarında %5'i geçen bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 4.63 - Çizelge 4.67). F4 formülasyonundaki EKM miktarı ise 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulundaki 12. ayın sonunda %40'a, 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulundaki 12. ayın sonunda %90'a düşmüştür. F4 formülasyonunun kimyasal stabilitesinin diğer formülasyonlara göre düşük olduğu görülmüştür.

SEDDS formülasyonları damlacık boyutu açısından incelendiğinde F1, F2 ve F3 formülasyonları için 3 saklama koşulunda, F5 formülasyonu için 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulunda başlangıç, 1, 3, 6 ve 12. ay damlacık boyutu ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.64 - Şekil 4.78). F4 formülasyonu için 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulu, 6. ay, 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN saklama koşulu 6 ve 12. ay, 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulu 6. ay damlacık boyutu ölçümleri, başlangıç damlacık boyutuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahiptir ($p<0,05$). F5 formülasyonu için 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulu 12. ay ve 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulu 3, 6 ve 12. ay damlacık boyutu ölçümleri başlangıç değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahiptir ($p<0,05$). Bu farklılıklar gözardı edilebilecek kadar küçük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlıdır.

SEDDS formülasyonları PDI açısından incelendiğinde F1, F3 ve F4 formülasyonları için 3 saklama koşulunda, F2 formülasyonu için 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN ve 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunda başlangıç, 1, 3, 6 ve 12. ay PDI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.64 - Şekil 4.78). F2 formülasyonu için 5 ± 3°C/ortam nemi saklama koşulu 6. ay, F5 formülasyonu için 3 saklama koşulu 3, 6 ve 12. ay PDI değerleri başlangıç PDI değerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahiptir ($p<0,05$). Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olsa da, tüm ölçümler 0,2'ye çok yakın veya 0,2'den küçük bulunduğu için emülsiyonların monodispers dağılıma sahip olduğu söylenebilir.

Özellikle F5 formülasyonu için başlangıç değerine göre çok daha küçük PDI elde edilmiştir.

Uzun dönem stabilite çalışmalarındaki fiziksel ve kimyasal koşullar beraber değerlendirildiğinde damlacık boyutu ve PDI açısından tüm formülasyonların 3 saklama koşulunda da stabil olduğu, renk değişimi gözlendiği için 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN saklama koşulunun uygun olmadığı, EKM miktarının en fazla F4 formülasyonunda azalma gösterdiği, F1, F2, F3 ve F5'in kimyasal olarak stabil olduğu gözlenmiştir.

5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları, GIS'de etkin madde çözünmesinin incelenmesi, suda zayıf çözünürlüğe sahip ilaçlar için absorpsiyon oranı ve miktarının tahmin edilmesi, yardımcı maddelerin incelenmesi ve aday formülasyon seçiminin yapılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Yılmaz-Usta ve Teksin, 2017). GIS'i fizyolojik açıdan daha yakın simüle etmek için çoğunlukla biyouyumlu ortamlar tercih edilmiştir. Bu durum çözünme hızı çalışmasının kapsamını, formülasyonların in vivo performansının tahmin edilmesini içerecek şekilde önemli ölçüde genişletmiştir (Klein, 2010; Nicolaides, Symillides, Dressman ve Reppas, 2001).

EKM yüklü SEDDS'ler için in vitro çözünme hızı çalışmaları FDA tarafından önerilen %0,5 SLS içeren distile su ve biyouyumlu ortamlar olan FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada SEDDS formülasyonları literatürde mevcut çalışmalara benzer olarak 00el numaralı kapsüle doldurulmuştur (Shahba2012). Çözünme hızı profil benzerlikleri Eş. 3.4'e göre hesaplanan f_2 benzerlik faktörü ile değerlendirilmiştir. f_2 değerinin 0 ile 50 arasında olması iki çözünme profilinin farklı olduğunu göstermektedir.

%0,5 SLS çözeltisinde yürütülen çözünme hızı çalışması sonunda referans tablet dahil olmak üzere 5 SEDDS formülasyonu için %100'e yakın EKM salımı gözlenmiştir (Şekil 4.79). SEDDS formülasyonlarının referans tablet ile profil karşılaştırması f_2 benzerlik faktörüne göre değerlendirildiğinde F3 formülasyonu hariç in vitro benzerlik elde edilmiştir (Çizelge 4.68). Çözünme hızı ortamına eklenen

SLS gibi sürfaktanlar suda çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerin çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırır, bu da SEDDS formülasyonunun etkinliğinin incelenmesini ve farklı formülasyonların salım profillerinin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır (Timur ve diğerleri, 2022). Bu nedenle biyouyumlu ortamlarda çözünme hızı çalışmaları yürütülmüştür.

FaSSIF ortamında yürütülen çözünme hızı çalışması sonunda referans tablet, F1, F2, F3 ve F5 formülasyonları %100'e yakın, F4 formülasyonu %93'e yakın EKM salımı göstermiştir (Şekil 4.80). FaSSIF ortamında SEDDS formülasyonlarının referans tablet ile profil karşılaştırması f_2 benzerlik faktörüne göre değerlendirildiğinde F1, F2, F3 ve F4 için çözünme hızı profillerinin benzer olmadığı görülmüş, sadece F5 formülasyonu için profil benzerliği elde edilmiştir (Çizelge 4.68).

FeSSIF ortamında yürütülen çözünme hızı çalışması sonunda referans tablet dahil olmak üzere tüm SEDDS formülasyonları %100'e yakın EKM salımı göstermiştir (Şekil 4.81). FeSSIF ortamında SEDDS formülasyonlarının referans tablet ile profil karşılaştırması f_2 benzerlik faktörüne göre değerlendirildiğinde F1, F2 ve F5 profil benzerliği göstermiş, F3 ve F4 formülasyonları profil benzerliği göstermemiştir (Çizelge 4.68).

Suda zayıf çözünürlüğe sahip referans ürün için %100'e yakın EKM salımı beklenen bir durum değildir. Literatürde EKM referans tableti için yürütülen çözünme hızı çalışmaları mevcuttur. Yavuz ve ark. tarafından yapılan çalışmada referans tablet %0,5 SLS çözeltisi ortamında 30 dakika sonunda %80 EKM salımı gözlenmiştir (Yavuz ve diğerleri, 2010).

Referans ürünün içeriğine bakıldığında polisorbat 80, ticari adıyla Tween® 80, içerdiği görülmüştür (Pfizer, 2018). Referans tabletin beklenmedik EKM salım nedeni Tween® 80'den kaynaklanmaktadır. Piyasada bulunan EKM referans tableti sürfaktan ile zenginleştirilmiş, miselizasyon ile EKM'nin çözünmesini sağlamak amacıyla Tween® 80 içeren bir üründür. Miseller çözündürme yaklaşımı suda çözünürlüğü düşük olan ilaçları formüle etmek için uzun süredir kullanılan bir

yaklaşımdır (Ruddy ve diğerleri, 1999). Direkt basım yöntemiyle hazırlanabilen bu tabletlerde etkin maddeyi çözmek için gerekli sürfaktan miktarı önemlidir.

Benzer sonuçlar Badr-Eldin ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada da gözlenmiştir. Çalışmada zayıf suda çözünürlük ve değişken absorpsiyon profili gösteren tadalafil etkin maddesi için sürfaktan içeren tablet geliştirmiştir. Tablette sürfaktan olarak Tween® 80 kullanılmıştır. Çalışma sonucunda referans ürüne kıyasla C_{maks} için 1,8 kat, $AUC_{0-\infty}$ için 1,6 kat artış gözlenmiştir (Badr-Eldin, Elkheshen ve Ghorab, 2017). Bu yaklaşımın uygulanması için etkin madde miktarının düşük olması gerekliliğine de dikkat edilmesi gerekmektedir.

Referans tabletin EKM yüklü SEDDS formülasyonları gibi %100'e yakın EKM salımı göstermesi ve geliştirilen formülasyonların bazı ortamlarda benzer çözünme hızı profiline sahip olmasına rağmen, EKM yüklü SEDDS formülasyonları 1 gramında 15 mg EKM içerirken referans tablet 25 mg EKM içermektedir. SEDDS formülasyonlarının üretimi için daha az enerji, ekipman ve zaman gerekliliği, düşük maliyet ve kolay üretim basamaklarına sahip olması, ölçek büyütme işleminin basitliği ile düşük dozda EKM yüklü formülasyon geliştirilmesi açısında endüstriyel ölçekli üretim için referans tablete kıyasla daha avatajlı olabileceği düşünülmektedir.

5.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları formülasyon performans ve kalitesinin belirlenmesinde önemli bir araç olsa da, oral uygulamaya yönelik geliştirilmiş SEDD sistemlerin değerlendirilmesinde in vitro lipoliz çalışmalarına da ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü SEDDS de dahil olmak üzere LTF'de kullanılan di-, trigliserit, fosfolipit, polietilen glikol mono- ve diester, polisorbat gibi ester yapısı içeren yağ, sürfaktan ve kosürfaktanlar gastrointestinal kanaldaki pankreatik lipaz, kolipaz, fosfolipaz A_2, kolesterol esteraz gibi sindirim enzimleri tarafından lipolize uğrayabilirler (Carrière, 2016). SEDDS'in GIS'de disperse olması ve lipolize uğraması sonucu kolloidal yapılarda yeni bir düzenleme meydana gelir. Formülasyon lipolizi sonucu açığa çıkan lipit sindirim ürünlerinin pankreas ve safra kesesinden salgılanan safra tuzları, fosfolipit ve kolesterolden oluşan miseller yapılara eklenmesiyle; tek veya çok katmanlı veziküller, sıvı kristal fazlar, karışık

misel türleri gibi bir dizi kolloidal yapı oluşur. Suda düşük çözünürlüğe sahip etkin madde bu kolloidal fazlara aktarılır. Bu süreçteki kritik durum, formülasyonun gastrointestinal sistemde disperse olma aşamasında hemen veya lipoliz ilerledikçe, kolloidal yapıların değişmesi sonucu etkin maddeyi çözme/çözebilme kapasitesinin değişmesi ve etkin maddenin çökmesidir (Feeney ve diğerleri, 2016). Etkin maddenin çökmesinin ise süspansiyona benzer olarak çözünme hızıyla sınırlı absorpsiyon ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Williams ve diğerleri, 2012a).

SEDD sistemlerin en büyük avantajı etkin maddeyi çözünmüş halde barındırmaları nedeniyle GIS'e çözünmüş halde sunmalarıdır. GIS boyunca etkin maddeyi çözünmüş halde tutması beklenen formülasyonun; lipolize uğramasının etkin madde çözünürlüğünü, absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını etkilediği görülmektedir (Bibi ve diğerleri, 2017). İn vitro lipoliz çalışmasının ise lipit yapılı formülasyonların etkin madde için çözünürlük kapasitesini koruma durumunu, formülasyon sindirim oranı ve hızını değerlendirmeyi, bu sayede in vivo ortam için öngörülebilir bilgiler elde etmeyi mümkün kılmaktadır (Williams ve diğerleri, 2012a).

İn vitro lipoliz çalışması 3 mM sodyum taurokolat ve 0,75 mM fosfolipit içeren lipoliz ortamında tüm SEDDS formülasyonları ve referans ürün için yürütülmüştür. Referans ürün SEDDS formülasyonu olmamasına rağmen Tween® 80 içermektedir. Sindirilebilir sürfaktan içeriği nedeniyle referans tablet için de lipoliz çalışması yapılmıştır. Literatürde ticari ürünün kullanıldığı lipoliz çalışmaları mevcuttur (Christophersen ve diğerleri, 2014; Thomas ve diğerleri, 2014).

Formülasyon lipolizi sırasında ortamdan alınan örneklerin santrifüjü ile sulu ve pellet faz olmak üzere iki faz elde edilmiştir. Gözlenen bu fazlardaki EKM miktarının geliştirilen SEDDS formülasyonlarının performansı hakkında yol göstericidir (Berthelsen ve diğerleri, 2019). Yağ fazı (OP) sindirilmemiş ve emülsifiye olmamış yağ damlacıklarından, sulu faz (AP) veziküller ve miseller gibi kolloidal yapılardan, pellet faz ise çökmüş etkin madde ve nötralize olmuş yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarından oluşmaktadır (Carrière, 2016). Yağ fazı ve sulu fazın etkin maddeyi çözünmüş halde bulundurmaları nedeniyle in vivo ortamda absorbe olacağı, formülasyon performansı tahmininin temelini oluşturmaktadır (Klitgaard ve diğerleri 2021). Formülasyon sindirimleri sırasında yağ fazı gözlenmemiştir. Bu durum

formülasyonların içerdiği yağ oranının düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Larsen ve diğerleri, 2011). F5 formülasyonunun %40 yağ oranı olmasına rağmen dispersiyon aşamasında yağ fazı görülmemiştir. Yağ fazının görülmemesi yağın tamamen emülsifiye olduğunu göstermiştir.

Sulu faz %EKM miktarı incelendiğinde SEDDS formülasyonları için lipoliz başlangıcından 15 dakika sonra sulu faz EKM miktarı artmış sonrasında çalışma sonuna kadar F2, F4 ve F5 için azalarak devam ederken, F1 ve F3 için azalıp sabit kalmıştır (Şekil 4.82). Çalışmanın sonunda sulu faz %EKM miktarı F3 için en yüksek bulunurken sıralama F2, F1 ve F4 olarak devam etmiş ve en düşük F5 için bulunmuştur (Şekil 4.83). Lipoliz sonunda sulu faz %EKM miktarları açısından F1, F2, F3 formülasyonları arasındaki fark anlamsızken ($p>0,05$), F1, F2 ve F3'ün F4 ve F5 ile arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışma sonunda pellet faz %EKM incelendiğinde EKM en yüksek F5 formülasyonunda çökmeye uğramış, bu sıralamayı F4 takip etmiştir. F1, F2 ve F3 için çöken %EKM miktarı birbiriyle yakın olarak bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.84). F1, F2 ve F3'ün çöken %EKM miktarı ile F4 ve F5'in çöken %EKM miktarı arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Formülasyonların lipoliz oranı ve lipoliz boyunca harcanan NaOH miktarı incelendiğinde ise çöken %EKM miktarı sıralamasına benzer şekilde en yüksek lipolize uğrayan formülasyonların F4 ve F5 olduğu görülmüştür. Bu sıralamayı F1, F2 ve F3 takip etmiştir. En düşük lipoliz oranına sahip formülasyon ise F3 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.85, Çizelge 4.69).

Tez çalışması kapsamında F1 formülasyonu ile karşılaştırılarak yağ miktarı (İmwitor® 988, F5), kosolvan kullanımı (Transcutol® HP, F2 ve F5), sindirilebilir sürfaktan varlığı (Tween® 80, F4), uzun zincirli yağ etkisini (Maisine®, F3) incelemek için geliştirilen formülasyonların lipoliz çalışmaları tek tek tartışılmıştır.

F1 SEDDS formülasyonu lipoliz sonunda EKM'nin %87'sini sulu fazda tutmayı başarmış ve %47,3 oranında lipolize uğramıştır.

F2 formülasyonu F1'den farklı olarak Labrasol® ALF yerine Transcutol® HP içermektedir. Transcutol® HP yapısında ester bağı içermeyen bir kosolvandır. Bu nedenle saponifikasyon değeri bulunmamaktadır. Ester hidrolizi gerçekleşmediği için lipoliz oranı hesaplamalarına dahil edilmemiştir. F2 formülasyonu lipoliz çalışması sonunda EKM'nin %89'unu sulu fazda tutmayı başarmıştır. F2 formülasyonundan hareketle SEDDS formülasyonunda düşük oranda kosolvan kullanımının sulu faz EKM miktarını etkilemediği sonucuna varılmıştır. F1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında sulu faz %EKM, pellet faz %EKM miktarları, harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı açısından anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

F3 formülasyonu F1'den farklı olarak yapısında %10,1 oranında uzun zincirli yağ (Maisine®) içerir ve yüksek S_{mix} oranına sahiptir. Formülasyonda uzun zincirli yağ kullanılması ve S_{mix} oranı artışı formülasyon lipolizini azaltmış ve F3 formülasyonu lipoliz boyunca EKM'nin %92'sini sulu fazda tutmayı başarmıştır. F3 nolu formülasyonda sürfaktan olarak kullanılan Kolliphor® RH40'ın %7,5 oranında lipolize uğradığı bilinmektedir (Cuine ve diğerleri, 2008). Ayrıca uzun zincirli yağların lipolize karşı daha dirençli olduğu ve etkin maddeyi daha uzun süre sulu fazda tutabildiği gösterilmiştir (Thomas, Müllertz, Graf ve Rades, 2012). F3 formülasyonundan hareketle, SEDDS formülasyonunda uzun zincirli yağ kullanılmasının ve S_{mix} oranında lipoliz oranı düşük olan sürfaktan yüzdesindeki artışın, sulu faz EKM miktarını olumlu etkilediği sonucuna varılmıştır. Ancak F1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında, harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı açısından anlamlı fark görülürken ($p<0,05$), sulu faz %EKM ve pellet faz %EKM miktarları açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

F4 formülasyonu için ise tam tersi bir durum söz konusudur. F4 formülasyonu F1'den farklı olarak Kolliphor® RH40 yerine Tween® 80 içermektedir. Tween® 80 %54 ve Labrasol® ALF %53 lipoliz oranına sahiptir. Lipoliz çalışması sonunda EKM'nin %70'ini sulu fazda tutmayı başarmıştır. F4 formülasyonundan hareketle, SEDDS formülasyonunda lipoliz oranı yüksek sürfaktan kullanılmasının sulu faz EKM miktarında azalmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır. F1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında sulu faz %EKM, pellet faz %EKM miktarları, harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı açısından anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$).

F5 formülasyonunda yüksek İmwitor® 988 miktarı ile lipoliz oranının arttığı görülmüştür. Bu beklenen ve literatür ile örtüşen bir sonuçtur (Diril, Yıldız-Türkyılmaz ve Karasulu, 2019). Lipoliz sonucunda ise çözünür durumda olan %EKM miktarının azaldığı görülmüştür. Lipoliz çalışması sonunda EKM'nin %62'sini sulu fazda tutmayı başarmıştır. F5 formülasyonu için düşük sulu faz %EKM miktarının diğer bir nedeninin yüksek Transcutol® HP miktarı olduğu düşünülmüştür. F5 formülasyonundan hareketle SEDDS formülasyonunda yüksek yağ ve kosolvan miktarının sulu faz EKM miktarında azalmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır. F1 formülasyonu ile karşılaştırıldığında sulu faz %EKM, pellet faz %EKM miktarları, harcanan NaOH miktarı ve lipoliz oranı açısından anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$).

Referans tablet için yürütülen lipoliz çalışmasında ise çalışma sonunda EKM'nin çok büyük bir miktarda çöktüğü (%86) görülmüştür (Şekil 4.86). Ortamda bulunan safra tuzu, fosfolipit ve tablet içeriğinde bulunan Tween® 80 etkisi ile in vitro çözünme hızında görülen referans tabletten yüksek oranda salınan EKM profili lipoliz çalışmasında görülmemiştir.

Sulu faz etkin madde miktarının absorbe olacağı hipotezine dayanarak SEDDS formülasyon performansının tahmin edildiği lipoliz çalışmasında yukarıdaki bilgilerden hareketle, en yüksek EKM absorpsiyonunun F1, F2 ve F3 SEDDS formülasyonlarında, en düşük absorpsiyonun ise F4 ve F5 SEDDS formülasyonlarında görüleceği düşünülmektedir.

5.7. Ex-vivo Permeabilite Çalışması

Lipoliz çalışması SEDD sistemlerin değerlendirilmesinde gerekli bir çalışmadır. Ancak, SEDD sistemin gastrointestinal sistemde karşılaştığı dispersiyon, lipoliz, safra tuzu ve fosfolipitlerle etkileşimi, etkin maddenin çözünür durumu, aşırı doygunluk hali ve absorpsiyonu gibi kompleks olaylar değerlendirildiğinde, lipoliz çalışmasının da tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bunun nedeni sistemin absorpsiyon basamağı içermemesidir. Formülasyon performansının incelenmesi ve optimum formülasyonun tasarlanması için dispersiyon, lipoliz, aşırı doygunluk ve absorpsiyon gibi olayların incelenmesinde kullanılacak yöntemlerin in vivo ortamı iyi taklit etmesi gerekmektedir. Tez kapsamında EKM yüklü

formülasyonları permeabilite adımı içeren lipoliz düzeneğinde incelemek için in vitro lipoliz çalışması ex-vivo permeabilite yöntemiyle birleştirilmiştir (Şekil 3.1).

Ön çalışmalarda permeabilite adımı keçi bağırsağı dokusu, domuz bağırsağı dokusu ve diyaliz membran kullanılarak test edilmiştir. Keçi bağırsağı dokusunun pankreatin ile geçimli olmadığı görülmüştür. Diyaliz membrana kıyasla küçük farklılıkların domuz bağırsağı dokusunda daha belirgin olarak gözlenebileceği sonucuna varılmıştır (Timur ve diğerleri, 2022). Bu nedenle permeabilite adımında domuz bağırsağı dokusu tercih edilmiştir. SEDDS formülasyonların ve referans tabletin lipoliz çalışmasında lipolizin 0., 15. ve 60. dakikalarında alınan lipoliz örneklerinin permeabilitesi incelenmiştir. Permeabilitenin sink koşul ve ozmotik basınçtan etkilenmemesi için alıcı hücre ozmotik basıncı kana eşit olacak şekilde ayarlanmış ve SLS ilavesi ile sink koşul sağlanmıştır.

F1 formülasyonuna ait veriler incelendiğinde 15. ve 60. dakika lipoliz örneklerindeki EKM, 0. dakika örneğindeki EKM'ye kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, lipoliz sonrası (15. ve 60. dakika) akı ve permeabilite katsayısı değerleri lipoliz öncesi (0. dakika) akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Ancak 0., 15. ve 60. dakikaların kümülatif %difüze EKM miktarı, akı ve permeabilite katsayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94). Permeasyonun tümünü temsil eden %difüze EKM grafiğinin AUC değeri incelendiğinde ise 0. dakikaya göre 15. ve 60. dakika örneklerinde EKM permeabilitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 0. dakika AUC değerinin 15. ve 60. dakika AUC değeriyle arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.70).

F2 formülasyonuna ait veriler incelendiğinde 15. dakika lipoliz örneğindeki EKM, 0. ve 60. dakika lipoliz örneklerindeki EKM'ye kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, 15. dakika lipoliz örneğine ait AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri, 0. ve 60. dakika lipoliz örneklerine ait AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Ancak 0., 15. ve 60. dakikalara ait kümülatif %difüze EKM miktarı, AUC, akı ve permeabilite katsayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94).

F3 formülasyonuna ait veriler incelendiğinde 15. ve 60. dakika lipoliz örneğindeki EKM, 0. dakikaya kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, lipoliz sonrası (15. ve 60. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri, lipoliz öncesi (0. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Ancak 0., 15. ve 60. dakikalara ait kümülatif %difüze EKM miktarı, AUC, akı ve permeabilite katsayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94).

F4 formülasyonuna ait veriler incelendiğinde 15. ve 60. dakika lipoliz örneklerindeki EKM, 0. dakika lipoliz örneğindeki EKM'ye kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, lipoliz sonrası (15. ve 60. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri lipoliz öncesi (0. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. 0., 15. ve 60. dakikalara ait akı değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94). 0. dakika örneğine ait kümülatif %difüze EKM, permeabilite katsayısı ve AUC değerleri ile 15. ve 60. dakika örneklerine ait değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.70).

F5 formülasyonuna ait veriler incelendiğinde 15. ve 60. dakika lipoliz örneklerindeki EKM, 0. dakika lipoliz örneğindeki EKM'ye kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, lipoliz sonrası (15. ve 60. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri lipoliz öncesi (0. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. 0., 15. ve 60. dakikalara ait akı değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94). 0. dakika örneğine ait kümülatif %difüze EKM, permeabilite katsayısı ve AUC değerleri ile 15. ve 60. dakika örneklerine ait değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.70).

Referans tablete ait veriler incelendiğinde 15. ve 60. dakika lipoliz örneklerindeki EKM, 0. dakika lipoliz örneğindeki EKM'ye kıyasla yüksek oranda difüze olmuştur (Çizelge 4.70). Ek olarak, lipoliz sonrası (15. ve 60. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri lipoliz öncesi (0. dakika) AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerlerine göre yüksek bulunmuştur. 0., 15. ve 60. dakikaların kümülatif %difüze

EKM, AUC, akı ve permeabilite katsayısı değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.71 ve Şekil 4.93 - Şekil 4.94).

Elde edilen sonuçlara göre F4 ve F5 için anlamlı olup, F1, F2 ve F3 için anlamsız bulunmasına rağmen tüm SEDDS formülasyonlarında lipoliz öncesi EKM difüzyonunun, lipoliz sonrasına kıyasla düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.87 - Şekil 4.93, Çizelge 4.70). Literatürde geliştirilen lipoliz/permeabilite modelinde, hidrolize uğramış SNEDDS formülasyonundaki sinnirazinin, hidroliz edilmemiş SNEDDS dispersiyonuna göre daha fazla difüze olduğunu bildirmiştir (Bibi ve diğerleri, 2017). Formülasyonda kullanılan yağ oranı arttıkça lipoliz ile beraber etkin maddenin difüzyonu ve akı değerinde artış olabileceği gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan yöntemde de benzer bir sonuç elde edilmiştir. LTF ile çalışırken lipoliz ve permeabilite unsunlarının kombinasyon halinde değerlendirilmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Referans tablet ile karşılaştırıldığında geliştirilen tüm SEDDS formülasyonları daha yüksek %difüze EKM ve AUC göstermiştir. SEDDS formülasyonları ile referans tabletin %difüze EKM miktarları arasındaki bu fark 0. ve 15. dakika için anlamsızken ($p>0,05$), F1, F4 ve F5 formülasyonlarının 60. dakikası için anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). SEDDS formülasyonlarının permeabilitenin tümünü temsil eden AUC değerleri tek tek referans tablet ile karşılaştırıldığında aradaki fark F1, F3 ve F5 formülasyonlarının 15. dakikası hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.70). Geliştirilen SEDDS formülasyonlarının EKM permeabilitesini arttırdığı kanıtlanmıştır. Ancak geliştirilen SEDDS formülasyonları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

SEDDS formülasyonlarının 0. dakika akı değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında, 15. dakika akı değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında ve 60. dakika akı değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), referans tablet ile karşılaştırıldığında farkın anlamlı ve referans tablet için 0, 15 ve 60. dakika akı değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.71). Verici hücreye koymak üzere lipoliz ortamından alınan referans örneğinde lipoliz çalışmasından elde edilen bilgiye göre EKM'nin %12'si sulu faz içinde çözünmüş halde iken %86'sı çökmüş haldedir. Verici hücre ortamında çökmüş halde bulunan EKM, iki hücre arasındaki

konsantrasyon farkının hep sabit kalması ve ortalama difüzyon hızının azalmamasını yani difüzyon hızının hep maksimumda tutulmasını sağlamıştır (Fick, 1855). Bu nedenle refereans tablet için akı değeri yüksek bulunmuştur. Ancak akı değerleri düşük olsa da toplamda difüze olan EKM miktarı SEDDS formülasyonlar için daha yüksektir.

Literatürde lipoliz sırasında oluşan kolloidal yapıların etkin madde moleküllerinin permeabilitesini etkileyebileceği bildirilmiştir. Kolloidal yapılar içinde çözünmüş etkin madde ile çözünmüş ilaç arasında belirgin bir fark olduğu ve yalnızca serbest etkin madde moleküllerinin difüze edilebileceği kabul edilmektedir (Buckley, Frank, Fricker ve Brandl, 2013). Lipofilik bir etkin maddenin misel ve veziküler yapılara dahil olması, moleküler olarak çözünmüş etkin madde konsantrasyonun azalmasından dolayı difüzyon hızında azalmaya neden olabilir (Bibi ve diğerleri, 2017). Referans tablet için bulunan yüksek akı değeri yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda beklenen bir sonuç olarak görülmektedir.

Permeabilite katsayısı Eş 3.6'ya göre hesaplanmıştır. Hesaplamada kolloidal yapılar içinde çözünmüş halde bulunan, çökmüş olarak serbest ve moleküler düzeyde çözünmüş halde bulunan EKM, akı ve permeabiliteye katkı sağladığı için hesaplamaya dahil edilmiştir (Tanaka ve diğerleri, 2021). Permeabilite katsayısı, akı değerinin verici hücre etkin madde konsantrasyonuna bölmesiyle belirlenmektedir. P_{app} için verici hücreye eklenen başlangıç EKM miktarının etkisi elimine edilmiştir. Bu nedenle, referans tablet ile SEDDS formülasyonlarının P_{app} değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.95).

Lipoliz çalışmasındaki sulu fazda EKM miktarının absorpsiyon için uygun olması hipotezinden hareketle, sulu faz EKM miktarları düşük olan F4 ve F5 formülasyonları için diğer formülasyonlara kıyasla EKM difüzyonunun düşük olması beklenirken lipoliz ile birleştirilmiş permeabilite çalışmasında tam tersi bir durum olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.93). Bu durum literatürde aşırı doygunluk ile açıklanmıştır. Dispersiyon ve lipoliz ile indüklenen etkin maddenin aşırı doygunluk hali serbest etkin madde miktarı ve termodinamik aktivitede artış sağlayarak absorpsiyon için itici bir güç oluşturmakta ve daha yüksek permeabilite ile sonuçlanmaktadır (Crum, Trevaskis, Pouton ve Porter, 2017). F4 ve F5 formülasyonlarında 15 ve 60.

dakikalarda aşırı doygunluk durumu sonucu çöken etkin madde, referans tablette yüksek akı elde edilmesine benzer olarak, difüzyon hızını ve akıyı artırmıştır.

Literatürde permeabilite basamağı içermeyen ve sink koşulu sağlamayan lipoliz sisteminde yapılan çalışmalarda SEDD sistemlerin sahip oldukları nano boyut nedeniyle sindirilmeyeceği, aşırı doygunluğun etkin madde çökmesine yol açacağı ve çöken etkin maddenin süspansiyondan farksız olarak davranacağı bilgisi belirtilmiştir (Williams ve diğerleri, 2012a). EKM yüklü SEDDS sistemlerde yapılan lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışmasında, bu sistemlerin de lipolize uğradığı, çöken etkin maddenin absorpsiyona katkısı olduğu ve lipoliz öncesi/sonrasının permeabiliteyi etkilediği görülmüştür. Çalışmada bulunan sonuçlar permeabilite basamağı içeren lipoliz çalışması sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (Crum ve diğerleri, 2016). Lipit temelli formülasyonların lipolize uğraması ve sulu faz etkin madde miktarındaki azalmanın her zaman düşük permeabilite ile sonuçlanmayacağı görülmüştür.

5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında yüksek seviyede aromataz ekspresyonu nedeniyle aromataz inhibitörlerine karşı büyüme tepkilerini incelemek için önemli bir araç olarak kabul edilen MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır (Itoh ve diğerleri, 2005). MDA-MB-231 hücre hattı östrojen reseptörü taşımayıp üçlü negatif moleküler alt tipe sahip olduğu için çalışmada tercih edilmemiştir (Flodrova ve diğerleri, 2016).

EKM'nin antiproliferatif etkisi kısa süreli maruziyetinde hücre döngüsünün G1/S faz geçişini engellemesiyle uzun süreli maruziyette ise apoptoz ve sitotoksisite ile ilişkili olduğu belirtilen hücre döngüsünü G2/M fazında tutması nedeniyle olduğu bildirilmiştir (DiPaola, 2002). Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarında 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi tercih edilmiştir.

48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 58 µM saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonlara ve aynı konsantrasyonda EKM içermeyen formülasyonlara maruz kalan MCF-7 hücreleri incelendiğinde ilaç yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları

saf EKM'ye kıyasla hücre canlılığında 5, 2, 2, 14 ve 14 kat azalma ($p<0,05$) sağlamıştır. Ancak EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının da MCF-7 hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4. 96). F1, F2 ve F3 formülasyonları için EKM yüklü formülasyonların etkisi ilaç içermeyen formülasyonlara göre daha yüksek bulunurken, F4 ve F5 formülasyonları için eşit bulunmuştur.

Aynı inkübasyon süresinde 38,5 µM saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonlar ve aynı konsantrasyonda EKM içermeyen formülasyonlara maruz kalan MCF-7 hücreleri incelendiğinde, saf EKM'ye kıyasla EKM yüklü formülasyonlar hücre canlılığında daha fazla azalma sağlamıştır. Ancak EKM içermeyen formülasyonlar da hücre canlılığında azalmaya yol açmıştır. F4 ve F5, saf EKM'ye göre daha düşük hücre canlılığı göstermiştir (Şekil 4.96).

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 58 µM saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonlar ve aynı konsantrasyonda EKM içermeyen formülasyonlara maruz kalan MCF-7 hücreleri incelendiğinde ilaç yüklü F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonları saf EKM'ye kıyasla hücre canlılığında 3, 2, 3, 7 ve 6 kat azalma sağlamıştır. EKM içermeyen SEDDS formülasyonlarının da MCF-7 hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4. 97).

Aynı inkübasyon süresinde 38,5 µM saf EKM, EKM yüklü SEDDS formülasyonlar ve aynı konsantrasyonda EKM içermeyen formülasyonlara maruz kalan MCF-7 hücreleri incelendiğinde, saf EKM'ye kıyasla EKM yüklü formülasyonlar hücre canlılığında daha fazla azalma sağlamıştır. Ancak EKM içermeyen formülasyonlar da hücre canlılığında azalmaya yol açmıştır. İlaç içermeyen F4 ve F5, saf EKM'den daha düşük hücre canlılığı göstermiştir (Şekil 4.97).

EKM yüklü SEDDS formülasyonları saf EKM'ye kıyasla iki konsantrasyon ve iki inkübasyon süresinde de daha etkili bulunmuştur ($p<0,05$). EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.98). İlaç içermeyen SEDDS formülasyonları MCF-7 hücreleri üzerinde %80'den düşük hücre canlılığı göstermiştir. Saf EKM'ye göre artan antiproliferatif etkinin ilaç içermeyen formülasyonlara da bağlı olduğu görülmüştür.

Literatürde kurkumin için çörek otu yağı, İmwitor® 988 ve Kolliphor® EL içeren ve sadece Kolliphor®'dan oluşan SEDDS formülasyonları hazırlanmış ve kurkuminin yanı sıra çörek otu yağının MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiştir. IC_{50} değerinde saf kurkuminin ve iki formülasyon uygulandığında ilaç içermeyen Kolliphor® formülasyonunun %25 oranında hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür (Kazi ve diğerleri, 2020).

Literatürde yüksek miktarda Kolliphor® RH40'ın hücre zarını bozduğu, oksidatif stresi artırdığı ve kardiyak mitokondriyal solunumu inhibe ederek farklı hücre tiplerine zarar verdiği bildirilmiştir (Rosso ve diğerleri, 2021). Literatürde Tween® 80 için IC_{50} değeri 1,06 mg/mL olarak belirtilmiştir (Hamzeloo ve diğerleri, 2014). Formülasyonlar içinde Kolliphor® RH40 ve Tween® 80, 0,79 mg/mL ve 0,52 mg/mL konsantrasyonda MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Kolliphor RH40'ın yüksek miktarlarının MCF-7 hücreleri üzerinde de Caco-2'ya benzer etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Yardımcı maddelerin IC_{50} değerinden ve MCF-7 hücre hattına uygulandıkları konsantrasyondan hareketle ilaç içermeyen formülasyonların da antiproliferatif etkinliği olduğu sonucuna varılmıştır.

5.9. İn Situ İntestinal Perfüzyon

EKM yüklü formülasyonları permeabilite adımı içeren lipoliz düzeneğinde incelemek için kullanılan birleştirilmiş lipoliz – ex-vivo permeabilite yönteminde, lipoliz ortamından lipoliz öncesi ve sonrası alınan örneklerin permeabilitesi eş zamanlı olarak değil sıralı olarak incelenmiştir. Bu yöntemde lipoliz in vivo da olduğu gibi absorpsiyon bölgesinde değil, öncesinde gerçekleşmektedir. Doğal olarak bir gecikme söz konusudur. Bu süreçte dispersiyon veya lipoliz ile oluşan etkin maddenin aşırı doygunluk durumu permeabilite basamağına ulaşmadan önce bozulabilir ve çöken EKM miktarının fazla tahmin edilmesine yol açabilir. Yapılan araştırmalara göre kısa süreli aşırı doygunluk durumunun bile ilaç absorpsiyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (Crum ve diğerleri, 2016).

Bu amaçla lipoliz ve permeabilitenin eş zamanlı olarak gerçekleşebileceği in vitro lipoliz çalışması ile in situ intestinal perfüzyon yöntemi birleştirmiştir. Yöntemde SEDDS formülasyonu içeren lipoliz ortamı ve pankreatik enzimleri içeren lipoliz

ortamı, ayrı peristaltik pompa hatlarından gelerek bağırsak segmentine girmeden önce karışıp perfüze segmente ulaşmıştır.

Birleşik yöntemle EKM çözeltisi, F1 ve F5 formülasyonları değerlendirilmiştir. F1 ve F5 formülasyonlarının seçimi in vitro lipoliz ve ex-vivo permeabilite çalışması sonuçlarına göre yapılmıştır. F1 formülasyonu düşük lipoliz oranı ve sulu fazda yüksek EKM miktarı sağlarken, F5 formülasyonu yüksek lipoliz oranı ve sulu fazda düşük EKM miktarına sahiptir.

F1, F5 ve saf EKM için örnek alınan zaman noktalarında başlangıç EKM konsantrasyonu, perfüzat EKM konsantrasyonuna oranlanarak normalize konsantrasyon hesaplanmıştır. Normalize konsantrasyonun 1 olması EKM'nin perfüze segmentten emilmediğini ifade etmektedir. Normalize konsantrasyon grafiğinin AUC değeri emilmeyen EKM hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.99).

AUC değerleri incelendiğinde F1 ve F5 formülasyonları için AUC değerleri birbirine yakınken ($p>0,05$), saf EKM ile karşılaştırıldığında F1 ve F5 formülasyonlarının daha düşük AUC değeri sergilediği ($p<0,05$) görülmüştür (Çizelge 4.75). Geliştirilen F1 ve F5 formülasyonları saf EKM'ye göre daha yüksek absorpsiyon göstermiştir.

Perfüzyon çalışmasında referans tablet veya süspande EKM'nin kullanılması durumunda, lipoliz ortamı veya jejunumda çöken EKM'nin emildiği düşünülerek yanlış yorumlamaya yol açacağı için EKM'nin çözeltisi tercih edilmiştir. Ayrıca EKM'nin çözünmeden emilmeyeceğine dikkat edilerek çözelti halinde uygulanmasıyla formülasyonların karşılaştırılabilir olması sağlanmıştır.

Literatürde SEDDS formülasyonlarının yanı sıra, etkin madde süspansiyonu da birleşik lipoliz - in situ perfüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Örnekleme mezenterik venden yapıldığı için SEDDS formülasyonlarla karşılaştırma mümkün kılınmıştır. Süspansiyon LTF ile karşılaştırıldığında, akı ve akı grafiklerinin AUC değeri daha düşük bulunmuştur (Crum ve diğerleri, 2016).

F1 ve F5 formülasyonları lipoliz çalışmasına göre farklı lipoliz oranı ve sulu faz EKM miktarlarına sahiptir. Bu farklılık in situ intestinal perfüzyon çalışmasına göre

absorbe olan EKM miktarını etkilememiş, F1 ve F5 için yakın AUC değerleri elde edilmiştir. Birleştirilmiş lipoliz – ex-vivo permeabilite çalışması sonuçları perfüzyon çalışmasının bulgularını desteklemiştir.

Jejunum bütünlüğünü tayin etmek için kullanılan ANT için AUC değerleri incelendiğinde 4 grup için benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.75). Bu durumda minimum aktivitede kullanılan pankreatik lipazın doku bütünlüğünü etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Effektif permeabilite katsayıları (P_{eff}) incelendiğinde F5 ve saf EKM için benzer ve yüksek değerler elde edilirken F1 için düşük bir değer elde edilmiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). ANT'ye ait P_{eff} değerleri incelendiğinde ise değerler birbirine yakın bulunmuş olup gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.76, Şekil 4.101 - Şekil 4.102).

Saf EKM'ye ait P_{eff} değerinin yüksek çıkmasında, suda 80 µg/mL çözünürlüğe sahip EKM'yi çözmek için kullanılan metanolün etkili olduğu düşünülmektedir. Metanolün bağırsak epitel bariyerinin geçirgenliğini sıkı bağlantı noktalarıyla ilişkili proteinlerle etkileşerek artırdığı bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014).

İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında sıçanlardan elde edilen P_{eff} değeri kullanılarak insandaki P_{eff} değeri ve %absorbe edilen doz fraksiyonu kestirimi yapılabilmektedir. Literatürde $P_{eff,insan}$ değeri ve insanda emilen doz fraksiyonunu hesaplamak için kullanılan bir çok denklem mevcuttur. Denklemlerin kullanılabilmesi için maddenin pasif olarak emilmesi gerektiği belirtilmiştir. $P_{eff,insan}$ değerinin Fagerholm ve ark. göre sıçandan elde edilen katsayısının 3,6 katı, Zakeri ve ark. göre permeabilite problemi olan etkin maddeler için 11 katı olduğu korelasyon çalışmaları ile gösterilmiştir (Zakeri-Milani ve diğerleri, 2007). EKM ve ANT'nin permeabilite problemi olmadığı için Fagerholm ve ark. tarafından elde edilen denklem kullanılmıştır (Fagerholm ve diğerleri, 1996).

Literatürde ANT için yapılan perfüzyon çalışmasında P_{eff} değeri $3,5x10^{-3}$ - $7,8x10^{-3}$ cm/dk aralığında, $P_{eff,insan}$ değeri $12,6x10^{-3}$ - $50,4x10^{-3}$ cm/dk aralığında bulunmuştur

(Dahlgren, Roos, Sjögren ve Lennernäs, 2015). Çalışmalarımızda ANT için bulunan P_{eff} ve $P_{eff,insan}$ değerlerinin literatür verileriyle tutarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.76 - Çizelge 4.77).

İnsanda %absorbe edilen doz fraksiyonu kestirim değerleri incelendiğinde, geliştirilen SEDDS formülasyonları ile uygulanan EKM'nin %100'e yakın absorbe edildiği görülmüştür (Çizelge 4.78). Gastrointestinal sistemden %42 oranında emildiği bildirilen EKM'nin absorpsiyonunun geliştirilen F1 ve F5 SEDDS formülasyonlarıyla %100'e yaklaştığı kestirilmiştir. Kestirim değeri karaciğer ilk geçiş etkisini öngörmemektedir. EKM'nin karaciğerde ilk geçiş etkisine uğradığı bilinmektedir. EKM'nin çözelti olarak uygulandığı taktirde elde edilen %100'e yakın absorpsiyon kestirimi farmakokinetik çalışmada daha düşük çıkabilir. SEDDS formülasyonlarının ise lenfatik emilimi artırarak ilk geçiş etkisini elimini etme avantajları sayesinde EKM'nin absorpsiyonunda artış sağlayacağı açıktır. Tez kapsamında yapılan çalışmalar geliştirilen F1 ve F5 formülasyonlarının lipoliz oranı farketmeksizin EKM'nin çözünürlük ve emilen doz fraksiyonunu artırabileceği ve referans tablete göre daha düşük doz sağlayan dozaj şekli alternatifi olabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması sonucunda meme kanserinin hormonal tedavisinde kullanılmak üzere eksemestan (EKM) içeren kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SEDDS) formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonlar yağ miktarı, kosolvan içeriği, kosolvan miktarı ve lipoliz oranı açısından in vitro, ex-vivo ve in situ yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Yardımcı maddelerde yapılan çözünürlük çalışması sonucu EKM'nin yüksek çözünürlük gösterdiği yağ, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırasıyla İmwitor® 988, Kolliphor® RH40 ve Labrasol® ALF seçilmiştir. Su titrasyon yöntemi ile faz diyagramları çizilmiştir. S_{mix} oranı 4:1 olarak seçilmiştir.
- Box-Behnken deney tasarımı (BBD) kullanılarak SEDDS formülasyonu için optimum bileşim belirlenmiştir. Optimum formülasyon bileşiminde yağ miktarı, uzun zincirli yağ, sindirilebilir sürfaktan ve kosolvan kullanımı, kosolvan miktarı gibi değişiklikler yapılarak 5 farklı SEDDS formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir.
- SEDDS formülasyonlarda yapılan çözünürlük çalışması sonucu, formülasyonların 1 gramında 15 mg EKM yüklenmiştir.
- SEDDS formülasyonları damlacık boyutu, PDI, %Transmittans, viskozite, kendiliğinden emülsifikasyon zamanı, seyreltme ve pH'ya dayanıklılık, morfoloji, viskozite ve stabilite çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Tüm formülasyonlar için damlacık boyutu ve PDI, sırasıyla 100 nm ve 0,2'nin altında bulunmuştur. FT-IR analizine göre EKM ile yardımcı maddelerin geçimli olduğu sonucuna varılmıştır. Morfolojik incelemelerle damlacıkların küreselliği kanıtlanmıştır. Formülasyonlar termodinamik olarak stabil bulunmuştur.
- Uzun dönem stabilite çalışmalarına göre F1, F2, F3 ve F5 kodlu SEDDS formülasyonlarının 5 ± 3°C/ortam nemi ve 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN koşullarında 12 ay fiziksel ve kimyasal olarak stabil olduğu bulunmuştur. 40 ± 2°C/%75 ± 5 BN koşulunda tüm formülasyonlar, kimyasal stabilitesini korumasına rağmen fiziksel olarak stabil bulunmamıştır. Formülasyonlarda renk değişimi meydana gelmiştir. F4 formülasyonunun 5 ± 3°C/ortam nemi ve 25 ± 2°C/%60 ± 5 BN koşullarında kimyasal stabilitesini korumadığı gözlenmiştir.

- İn vitro çözünme hızı çalışmasında SEDDS formülasyonları ve referans tablet %95'in üzerinde EKM salımı göstermiştir. Damlacık boyutu, yağ miktarı, uzun zincirli yağ, sindirilebilir sürfaktan ve kosolvan kullanımı, kosolvan miktarının %kümülatif salınan etkin madde miktarını etkilemediği görülmüştür.
- İn vitro lipoliz çalışmasında, lipolizin formülasyondaki EKM'nin çözünür durumunu etkilediği görülmüştür. Lipoliz oranı düşük formülasyonlar, EKM'yi daha yüksek oranda çözünür tutmayı başarmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yağ ve kosolvan miktarındaki artışın çözünür haldeki EKM miktarını etkilediği gözlenmiştir. Yağ miktarı arttıkça sulu faz EKM miktarında azalma gözlenmiştir. Kosolvanın düşük miktarda kullanılması sulu faz EKM miktarını etkilememiştir. Uzun zincirli yağ kullanımı ve sindirim oranı düşük sürfaktan miktarındaki artış sonucu sulu faz EKM miktarı daha yüksek bulunmuştur. Formülasyonda sindirilebilir sürfaktan varlığı, çözünür EKM miktarında azalmaya yol açmıştır. Referans tablet ise EKM'yi çözünür halde tutamamış, etkin maddenin büyük bir kısmı çökmüştür.
- Ex-vivo permeabilite çalışmasında, difüzyonun tamamının değerlendirildiği %difüze EKM grafiğinin AUC değerleri hesaplanmıştır. Referans tablete göre, SEDDS formülasyonları EKM permeabilitesini artırmıştır. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. SEDDS formülasyonlar arasında ise anlamlı farklılık bulunmamıştır. Damlacık boyutu, lipoliz oranı, yağ ve kosolvan miktarı, uzun zincirli yağ ve sindirilebilir sürfaktan kullanımı %difüze EKM miktarını etkilememiştir. SEDDS formülasyonları için tek başına in vitro lipoliz çalışmasının uygulanmasının yerine, hem lipoliz hem de permeabilitenin birlikte değerlendirilmesi gereklidir.
- EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında antiproliferatif etkinliğinin zamana ve konsantrasyon bağlı olduğu görülmüştür. Saf EKM'nin IC_{50} değerinde uygulanan EKM yüklü SEDDS formülasyonlarının, daha yüksek etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir.
- İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında incelemek üzere, stabil olmaları, lipoliz oranı ve çözünmüş halde tutabildikleri EKM miktarındaki farklılığa rağmen difüze EKM miktarının yakın olması nedeniyle F1 ve F5 formülasyonları seçilmiştir.
- İn situ intestinal perfüzyon çalışmasında, emilimin tamamını değerlendirmek için zaman-normalize EKM konsantrasyonu grafiğinin AUC değeri hesaplanmıştır.

AUC değerlerine göre saf EKM'ye göre, SEDDS formülasyonları EKM absorpsiyonunu artırmıştır. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. F1 ve F5 formülasyonları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Formülasyonların yüksek veya düşük oranda lipolize uğraması, yüksek yağ ve kosolvan miktarı, EKM absorpsiyonunu etkilememiştir.

- İnsanda absorbe edilen doz fraksiyonu kestirimine göre, oral olarak uygulandığında %42 oranında absorbe edildiği bildirilen EKM'nin, geliştirilen SEDDS formülasyonlar ile %100'e yakın emileceği tahmin edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen F1 ve F5 kodlu SEDDS formülasyonların EKM'nin çözünürlük problemini ortadan kaldırdığı, daha yüksek absorpsiyon sağlandığı ve EKM çözeltisine kıyasla daha yüksek antiproliferatif etkinliğe sahip olduğu in vitro, ex-vivo ve in situ çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda EKM yüklü F1 formülasyonu TR 2021 019639 B patent numarası ile tescillenmiştir (Timur, Yılmaz-Usta ve Teksin, 2021). Çalışma sonuçlarımızın bir kısmı 'Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the in vitro lipolysis-permeation model' isimli yayın ile literatüre katkı sağlamıştır (Timur, Yılmaz-Usta, Teksin, 2022).

KAYNAKLAR

Abou Assi, R., M. Abdulbaqi, I., Seok Ming, T., Siok Yee, C., A. Wahab, H., Asif, S. M., and Darwis, Y. (2020). Liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems (Sedds) as carriers for the oral delivery of azithromycin: Optimization, in vitro characterization and stability assessment. *Pharmaceutics, 12*(11), 1052.

Agarwal, V. R., Bulun, S. E., Leitch, M., Rohrich, R., and Simpson, E. R. (1996). Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, 81*(11), 3843-3849.

Akartas, I. and Karasulu, H. Y. (2020). Preparation and characterization of self-microemusifying drug delivery system (SMEDDS) of cisplatin for oral use in ovarian cancer treatment. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 77*(1), 183-193.

Akhtar, N., Mohammed, S. A., Khan, R. A., Yusuf, M., Singh, V., Mohammed, H. A., Al-Omar, M. S., Abdellatif, A. A., Naz, M., and Khadri, H. (2020). Self-Generating nano-emulsification techniques for alternatively-routed, bioavailability enhanced delivery, especially for anti-cancers, anti-diabetics, and miscellaneous drugs of natural, and synthetic origins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 58*, 101808.

Akkuş-Arslan, Ş. (2013). *Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Al-Mohizea, A., Zawaneh, F., Alam, M., Al-Jenoobi, F., and El-Maghraby, G. (2014). Effect of pharmaceutical excipients on the permeability of P-glycoprotein substrate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 24*(5), 491-495.

Alskär, L. C. and Bergström, C. A. (2015). Models for predicting drug absorption from oral lipid-based formulations. *Current Molecular Biology Reports, 1*, 141-147.

Alskär, L. C., Parrow, A., Keemink, J., Johansson, P., Abrahamsson, B., and Bergström, C. A. (2019). Effect of lipids on absorption of carvedilol in dogs: Is coadministration of lipids as efficient as a lipid-based formulation? *Journal of Controlled Release, 304*, 90-100.

Alvarez, F. J. and Stella, V. J. (1989). The role of calcium ions and bile salts on the pancreatic lipase-catalyzed hydrolysis of triglyceride emulsions stabilized with lecithin. *Pharmaceutical Research, 6*, 449-457.

Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., and Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research, 12*, 413-420.

Andreas, C., Rosenberger, J., Butler, J., Augustijns, P., McAllister, M., Abrahamsson, B., and Dressman, J. (2018). Introduction to the OrBiTo decision tree to select the most appropriate in vitro methodology for release testing of solid oral dosage forms during development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 130*, 207-213.

Anton, N., Benoit, J.-P., and Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release, 128*(3), 185-199.

Anton, N. and Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research, 28*, 978-985.

Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., and Lairon, D. (1992). Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 3*(7), 333-341.

Arnold, Y. E., Imanidis, G., and Kuentz, M. (2012). In vitro digestion kinetics of excipients for lipid-based drug delivery and introduction of a relative lipolysis half life. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 38*(10), 1262-1269.

Ashkar, A., Sosnik, A., and Davidovich-Pinhas, M. (2022). Structured edible lipid-based particle systems for oral drug-delivery. *Biotechnology Advances, 54*, 107789.

Ates, M., Kaynak, M. S., and Sahin, S. (2016). Effect of permeability enhancers on paracellular permeability of acyclovir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 781-790.

Ateş, M. (2013). *Barsaklardan Paraselüler İlaç Absorpsiyonu Üzerine Permeabilite Artırıcı Ajanların Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Avachat, A. M. and Patel, V. G. (2015). Self nanoemulsifying drug delivery system of stabilized ellagic acid–phospholipid complex with improved dissolution and permeability. *Saudi Pharmaceutical Journal, 23*(3), 276-289.

Badr-Eldin, S. M., Elkheshen, S. A., and Ghorab, M. M. (2017). Improving tadalafil dissolution via surfactant-enriched tablets approach: Statistical optimization, characterization, and pharmacokinetic assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 41*, 197-205.

Bakala-N'Goma, J.-C., Williams, H. D., Sassene, P. J., Kleberg, K., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., and Jule, E. (2015). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 5. Lipolysis of representative formulations by gastric lipase. *Pharmaceutical Research, 32*, 1279-1287.

Banik, S., Halder, S., Sato, H., and Onoue, S. (2021). Self-emulsifying drug delivery system of (R)-α-lipoic acid to improve its stability and oral absorption. *Biopharmaceutics Drug Disposition, 42*(5), 226-233.

Baral, K. C., Song, J.-G., Lee, S. H., Bajracharya, R., Sreenivasulu, G., Kim, M., Lee, K., and Han, H.-K. (2021). Enhanced bioavailability of AC1497, a novel anticancer drug candidate, via a self-nanoemulsifying drug delivery system. *Pharmaceutics, 13*(8), 1142.

Basalious, E. B., Shawky, N., and Badr-Eldin, S. M. (2010). SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: development and optimization. *International Journal of Pharmaceutics, 391*(1-2), 203-211.

Bektaş, D. (2019). *Tenofovir İçeren Lipit Kaynaklı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Nano Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Beltrame, D., di Salle, E., Giavini, E., Gunnarsson, K., and Brughera, M. (2001). Reproductive toxicity of exemestane, an antitumoral aromatase inactivator, in rats and rabbits. *Reproductive Toxicology, 15*(2), 195-213.

Berthelsen, R., Klitgaard, M., Rades, T., and Müllertz, A. (2019). In vitro digestion models to evaluate lipid based drug delivery systems; present status and current trends. *Advanced Drug Delivery Reviews, 142*, 35-49.

Berthelsen, R., Sassene, P., Rades, T., and Müllertz, A. (2016). Evaluating oral drug delivery systems: Digestion models. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*, 773-790.

Bibi, H. A., Holm, R., and Bauer-Brandl, A. (2017). Simultaneous lipolysis/permeation in vitro model, for the estimation of bioavailability of lipid based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 117*, 300-307.

Bolko, K., Zvonar, A., and Gašperlin, M. (2014). Simulating the digestion of lipid-based drug delivery systems (LBDDS): overview of in vitro lipolysis models. *Acta Chimica Slovenica, 61*(1).

Borel, P., Armand, M., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., and Lairon, D. (1994). Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 5*(3), 124-133.

Borkar, N., Xia, D., Holm, R., Gan, Y., Müllertz, A., Yang, M., and Mu, H. (2014). Investigating the correlation between in vivo absorption and in vitro release of fenofibrate from lipid matrix particles in biorelevant medium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 51*, 204-210.

Bravo-Alfaro, D. A., Ochoa-Rodríguez, L. R., Villaseñor-Ortega, F., Luna-Barcenas, G., and García, H. S. (2022). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) improves the oral bioavailability of betulinic acid. *Journal of Molecular Liquids, 364*, 119946.

Brockman, H. (2002). Colipase-induced reorganization of interfaces as a regulator of lipolysis. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 26*(1-2), 102-111.

Buckley, S. T., Fischer, S. M., Fricker, G., and Brandl, M. (2012). In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 45*(3), 235-250.

Buckley, S. T., Frank, K. J., Fricker, G., and Brandl, M. (2013). Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 50*(1), 8-16.

Burstein, H. J., Lacchetti, C., Anderson, H., Buchholz, T. A., Davidson, N. E., Gelmon, K. A., Giordano, S. H., Hudis, C. A., Solky, A. J., and Stearns, V. (2019). Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: ASCO clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology, 37*(5), 423-438.

Buya, A. B., Beloqui, A., Memvanga, P. B., and Préat, V. (2020). Self-nano-emulsifying drug-delivery systems: From the development to the current applications and challenges in oral drug delivery. *Pharmaceutics, 12*(12), 1194.

Buzdar, A. U., Robertson, J. F., Eiermann, W., and Nabholtz, J. M. (2002). An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 95*(9), 2006-2016.

Carleton, N., Nasrazadani, A., Gade, K., Beriwal, S., Barry, P. N., Brufsky, A. M., Bhargava, R., Berg, W. A., Zuley, M. L., and van Londen, G. (2022). Personalising therapy for early-stage oestrogen receptor-positive breast cancer in older women. *The Lancet Healthy Longevity, 3*(1), e54-e66.

Carrière, F. (2016). Impact of gastrointestinal lipolysis on oral lipid-based formulations and bioavailability of lipophilic drugs. *Biochimie, 125*, 297-305.

Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R., and René, L. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology, 105*(3), 876-888.

Celik-Tekeli, M., Celebi, N., Tekeli, M. Y., and Aktas, Y. (2021). Evaluation of the hypoglycemic effect of exendin-4’s new oral self-nanoemulsifying system in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 158*, 105644.

Charman, W. N., Rogge, M. C., Boddy, A. W., and Berger, B. M. (1993). Effect of food and a monoglyceride emulsion formulation on danazol bioavailability. *The Journal of Clinical Pharmacology, 33*(4), 381-386.

Chatterjee, B., Hamed, A. S., Ahmed, M. D. A., Mandal, U. K., and Sengupta, P. (2016). Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. *Drug delivery, 23*(9), 3639-3652.

Chaturvedi, S. and Garg, A. (2022). A comprehensive review on novel delivery approaches for exemestane. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, 103655.

Chaturvedi, S. and Garg, A. (2023). Development and optimization of nanoemulsion containing exemestane using box-behnken design. *Journal of Drug Delivery Science Technology, 80*, 104151.

Chen, M.-L. (2008). Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 768-777.

Christophersen, P. C., Christiansen, M. L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., and Müllertz, A. (2014). Fed and fasted state gastro-intestinal in vitro lipolysis: In vitro in vivo relations of a conventional tablet, a SNEDDS and a solidified SNEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 57*, 232-239.

Clemett, D. and Lamb, H. M. (2000). Exemestane: a review of its use in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Drugs, 59*, 1279-1296.

Coleman, R. E., Banks, L. M., Girgis, S. I., Vrdoljak, E., Fox, J., Cawthorn, S. J., Patel, A., Bliss, J. M., Coombes, R. C., and Kilburn, L. (2010). Reversal of skeletal effects of endocrine treatments in the Intergroup Exemestane Study. *Breast Cancer Research Treatment, 124*, 153-161.

Coombes, R., Kilburn, L., Snowdon, C., Paridaens, R., Coleman, R., Jones, S., Jassem, J., Van de Velde, C., Delozier, T., and Alvarez, I. (2007). Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2–3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *The Lancet Healthy Longevity, 369*(9561), 559-570.

Crum, M. F., Trevaskis, N. L., Pouton, C. W., and Porter, C. J. (2017). Transient supersaturation supports drug absorption from lipid-based formulations for short periods of time, but ongoing solubilization is required for longer absorption periods. *Molecular Pharmaceutics, 14*(2), 394-405.

Crum, M. F., Trevaskis, N. L., Williams, H. D., Pouton, C. W., and Porter, C. J. (2016). A new in vitro lipid digestion–in vivo absorption model to evaluate the mechanisms of drug absorption from lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research, 33*, 970-982.

Cui, J., Shen, Y., and Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine, 19*(3), 197-209.

Cuine, J. F., McEvoy, C. L., Charman, W. N., Pouton, C. W., Edwards, G. A., Benameur, H., and Porter, C. J. (2008). Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *Journal of pharmaceutical sciences, 97*(2), 995-1012.

Czajkowska-Kośnik, A., Szekalska, M., Amelian, A., Szymańska, E., and Winnicka, K. (2015). Development and evaluation of liquid and solid self-emulsifying drug delivery systems for atorvastatin. *Molecules, 20*(12), 21010-21022.

Çelik-Tekeli M. (2020). *Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılmak Üzere Oral Yolla Uygulanacak Protein/Peptit İçeren Kendiliğinden Emülsifiye Olan Nanoformülasyonunun Geliştirilmesi, İn Vitro/İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Dahan, A. and Hoffman, A. (2006). Use of a dynamic in vitro lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: correlation with in vivo data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. *Pharmaceutical Research, 23*, 2165-2174.

Dahan, A. and Hoffman, A. (2007). The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of in vitro lipolysis and consecutive ex-vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 67*(1), 96-105.

Dahan, A. and Hoffman, A. (2008). Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release, 129*(1), 1-10.

Dahan, M., Cortet, M., Lafon, C., and Padilla, F. (2023). Combination of focused ultrasound, immunotherapy, and chemotherapy: new perspectives in breast cancer therapy. *Journal of Ultrasound in Medicine, 42*(3), 559-573.

Dahlgren, D., Roos, C., Sjögren, E., and Lennernäs, H. (2015). Direct in vivo human intestinal permeability (Peff) determined with different clinical perfusion and intubation methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 104*(9), 2702-2726.

Danhof, M., Van Zuilen, A., Boeijinga, J., and Breimer, D. (1982). Studies of the different metabolic pathways of antipyrine in man: Oral versus iv administration and the influence of urinary collection time. *European Journal of Clinical Pharmacology, 21*, 433-441.

Date, A. A., Desai, N., Dixit, R., and Nagarsenker, M. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine, 5*(10), 1595-1616.

Deeks, E. D. and Scott, L. J. (2009). Exemestane: a review of its use in postmenopausal women with breast cancer. *Drugs, 69*, 889-918.

Demir, Ö., Aksu, B., Özsoy, Y (2017). İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2): 216–227.

Dickinson, P. A., Abu Rmaileh, R., Ashworth, L., Barker, R. A., Burke, W. M., Patterson, C. M., Stainforth, N., and Yasin, M. (2012). An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs. *AAPS PharmaSciTech, 14*(2), 196-205.

Dieni, C. V., Contemori, S., Biscarini, A., and Panichi, R. (2020). De novo synthesized estradiol: A role in modulating the cerebellar function. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(9), 3316.

DiPaola, R. S. (2002). Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research, 8*(11), 3311-3314.

Diril, M., Yıldız-Türkyılmaz, G., and Karasulu, H. Y. (2019). Formulation and In Vitro Evaluation of Self Microemulsifying Drug Delivery System Containing Atorvastatin Calcium. *Current Drug Delivery*, 16(8), 768-779.

Dixon, J. M. (2004). Exemestane and aromatase inhibitors in the management of advanced breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy, 5*(2), 307-316.

Dokania, S. and Joshi, A. K. (2015). Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)–challenges and road ahead. *Drug Delivery, 22*(6), 675-690.

Doluisio, J. T., Billups, N. F., Dittert, L. W., Sugita, E. T., and Swintosky, J. V. (1969). Drug absorption I: An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of pharmaceutical sciences, 58*(10), 1196-1200.

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., and Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research, 7*, 756-761.

Eedara, B. B. and Bandari, S. (2017). Lipid-based dispersions of exemestane for improved dissolution rate and intestinal permeability: in vitro and ex-vivo characterization. *Artificial Cells, Nanomedicine, Biotechnology, 45*(5), 917-927.

Ege, M.A., Karasulu, H.Y., Guneri, T. (2004, September). *Triangle phase diagram analysis software*. Paper presented at The 4th International Postgraduate Research Symposiumon Pharmaceutics, Istanbul.

El-Lakany, S. A., Elgindy, N. A., Helmy, M. W., Abu-Serie, M. M., and Elzoghby, A. O. (2018). Lactoferrin-decorated vs PEGylated zein nanospheres for combined aromatase inhibitor and herbal therapy of breast cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery, 15*(9), 835-850.

Elgart, A., Cherniakov, I., Aldouby, Y., Domb, A. J., and Hoffman, A. (2013). Improved oral bioavailability of BCS class 2 compounds by self nano-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS): the underlying mechanisms for amiodarone and talinolol. *Pharmaceutical Research, 30*, 3029-3044.

Elzoghby, A. O., El-Lakany, S. A., Helmy, M. W., Abu-Serie, M. M., and Elgindy, N. A. (2017). Shell-crosslinked zein nanocapsules for oral codelivery of exemestane and resveratrol in breast cancer therapy. *Nanomedicine, 12*(24), 2785-2805.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment Reviews, 38*(6), 698-707.

Fagerholm, U., Johansson, M., and Lennernäs, H. (1996). Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research, 13*, 1336-1342.

Falavigna, M., Brurok, S., Klitgaard, M., and Flaten, G. E. (2021). Simultaneous assessment of in vitro lipolysis and permeation in the mucus-PVPA model to predict oral absorption of a poorly water soluble drug in SNEDDSs. *International Journal of Pharmaceutics, 596*, 120258.

Fatouros, D. G., Deen, G. R., Arleth, L., Bergenstahl, B., Nielsen, F. S., Pedersen, J. S., and Mullertz, A. (2007). Structural development of self nano emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by small-angle X-ray scattering. *Pharmaceutical Research, 24*, 1844-1853.

FDA. (1999(a)). *Drug approval package, Aromasin® (exemestane) tablets*. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20-753_Aromasin_prntlbl.pdf, Son Erişim Tarihi: 01.02.2024.

FDA. (1999(b)). *Drug approval package, Aromasin® (exemestane) tablets*. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20-753_Aromasin_biopharmr_P1.pdf, Son Erişim Tarihi: 01.02.2024.

FDA. (2018). *Aromasin® (exemestane) tablets*.

Feeney, O. M., Crum, M. F., McEvoy, C. L., Trevaskis, N. L., Williams, H. D., Pouton, C. W., Charman, W. N., Bergström, C. A., and Porter, C. J. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews, 101*, 167-194.

Fernandez, S., Jannin, V., Rodier, J.-D., Ritter, N., Mahler, B., and Carrière, F. (2007). Comparative study on digestive lipase activities on the self emulsifying excipient Labrasol®, medium chain glycerides and PEG esters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Biology of Lipids, 1771*(5), 633-640.

Fernandez, S., Rodier, J.-D., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carrière, F., and Jannin, V. (2008). Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids, 1781*(8), 367-375.

Fick, A. (1855). Ueber diffusion. *Annalen der Physik, 170*(1), 59-86.

Flodrova, D., Toporova, L., Macejova, D., Lastovickova, M., Brtko, J., and Bobalova, J. (2016). A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. *General Physiology and Biophysics, 35*(3), 387-392.

Fusi, C., Materazzi, S., Benemei, S., Coppi, E., Trevisan, G., Marone, I. M., Minocci, D., De Logu, F., Tuccinardi, T., and Di Tommaso, M. R. (2014). Steroidal and

non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. *Nature Communications, 5*(1), 5736.

Gaillard, S. and Stearns, V. (2011). Aromatase inhibitor-associated bone and musculoskeletal effects: new evidence defining etiology and strategies for management. *Breast Cancer Research Treatment, 13*(2), 205.

Gao, H., Wang, M., Sun, D., Sun, S., Sun, C., Liu, J., and Guan, Q. (2017). Evaluation of the cytotoxicity and intestinal absorption of a self-emulsifying drug delivery system containing sodium taurocholate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 106*, 212-219.

Gershanik, T. and Benita, S. (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics, 50*(1), 179-188.

Goss, P. E. and Gwyn, K. (1994). Current perspectives on aromatase inhibitors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology, 12*(11), 2460-2470.

Gradzielski, M. (1998). Effect of the cosurfactant structure on the bending elasticity in nonionic oil-in-water microemulsions. *Langmuir, 14*(21), 6037-6044.

Gulsun, T. and Sahin, S. (2016). Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride, phenol red and metoprolol tartrate for intestinal perfusion studies. *Latin American Journal of Pharmacy, 35*(1), 50-57.

Güler, N. (2012). Adjuvan Endokrin Tedavi., V. Özmen, Z. Cantürk, V. Çelik, N. Güler, M. Kapkaç, A. Koyuncu, M. Müslümanoğlu, Z. Utkan (Editörler). *Meme Hastalıkları Kitabı*. İkinci Baskı. Ankara. Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu ve Güneş Tıp Kitabevleri, s. 493-505.

Gülmezoğlu, E., Yıldız-Türkyılmaz, G., and Karasulu, H. Y. (2022). Preparation and evaluation of a lipid-based drug delivery system to ımprove valsartan oral bioavailability: pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 48(12), 727-736.

Gülsün-İnal, T. (2016). *İlaçların Absorpsiyonu ve Permeabilitesi Üzerine Diyabetin Etkisinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Gürsoy, R. N. and Benita, S. J. (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine Pharmacotherapy, 58*(3), 173-182.

Guttoff, M., Saberi, A. H., and McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry, 171*, 117-122.

Hagen, K. B., Aas, T., Kvaløy, J. T., Søiland, H., and Lind, R. (2019). Adherence to adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: A 5-year prospective study. *The Breast, 44*, 52-58.

Hamzeloo, M. M., Taiebi, N., Mosaddegh, M., Eslami, T. B., and Esmaeili, S. (2014). The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy*.

Haque, S. M. (2022). Box–Behnken experimental design for optimizing the HPLC method to determine hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations and biological fluid. *Journal of Molecular Liquids, 352*, 118708.

Hedge, O. J. and Bergström, C. A. (2020). Suitability of artificial membranes in lipolysis-permeation assays of oral lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research, 37*, 1-14.

Henry, N., Shah, P., Haider, I., Freer, P., Jagsi, R., and Sabel, M. (2020). Cancer of the Breast. In J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan, and Tepper J. E. (Eds.), *Abeloff's clinical oncology.* Philadelphia, PA: Elsevier, pp. 1560-1602.

Hens, B., Gonzalez-Alvarez, I., and Bermejo, M. (2022). Exploring the Predictive Power of the In Situ Perfusion Technique towards Drug Absorption: Theory, Practice, and Applications. *Molecular Pharmaceutics, 19*(3), 749-762.

Hernandez-Juarez, J., Gonzalez-Cruz, A. O., Miranda-Espino, R., Ronquillo-Sanchez, M. D., Ramirez-Estrada, K., Balderas-Renteria, I., and Arredondo-Espinoza, E. (2023). Effects of siRNA-mediated Silencing of ERBB2, IGF-1R, and ITGB1 in HER2-positive Breast Cancer Cells. *Cancer Diagnosis Prognosis, 3*(2), 183.

Higashino, H., Develin, C., Higashino, C., Lim, T., Martin, A., Zhou, F., Strab, R., Patel, R., Bhoopathy, S., and Hidalgo, I. (2023). In vitro digestion-diffusion model for predicting in vivo performance of lipid-based formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 83*, 104439.

Hiremath, P. S., Soppimath, K. S., and Betageri, G. V. (2009). Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: formulation and in vitro evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine. *International Journal Of Pharmaceutics, 380*(1-2), 96-104.

Hope, A., Wade, S. J., Aghmesheh, M., and Vine, K. L. (2022). Localized delivery of immunotherapy via implantable scaffolds for breast cancer treatment. *Journal of Controlled Release, 341*, 399-413.

Huang, Y., Yu, Q., Chen, Z., Wu, W., Zhu, Q., and Lu, Y. (2021). In vitro and in vivo correlation for lipid-based formulations: Current status and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 11*(8), 2469-2487.

ICH Q1 E *Evaluation of Stability Data* (2003)

ICH Q2 (R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Step 5, Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology*, CPMP/ICH/381/95 C.F.R. (1995).

Incecayir, T., Ilbasmis-Tamer, S., Tirnaksiz, F., and Degim, T. (2016). Assessment of the potential drug-drug interaction between carvedilol and clopidogrel mediated through intestinal P-glycoprotein. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 71*(8), 472-477.

Iqbal, M. M. A., Bakar, W. A. W. A., Toemen, S., Razak, F. I. A., and Azelee, N. I. W. (2020). Optimization study by Box-Behnken design (BBD) and mechanistic insight of CO2 methanation over Ru-Fe-Ce/γ-Al2O3 catalyst by in-situ FTIR technique. *Arabian Journal of Chemistry, 13*(2), 4170-4179.

Itoh, T., Karlsberg, K., Kijima, I., Yuan, Y.-C., Smith, D., Ye, J., and Chen, S. (2005). Letrozole-, anastrozole-, and tamoxifen-responsive genes in MCF-7aro cells: a microarray approach. *Molecular Cancer Research, 3*(4), 203-218.

İnternet: Biorelevant. (2023). Media preparation tool. Web: https://biorelevant.com/#media_prep_tool_tab adresinden 1 Ağustos 2023'te alınmıştır.

İnternet: FDA. (2006). Dissolution methods Web:https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm adresinden 1 Ağustos 2023'te alınmıştır.

İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı. (2024). Türkiye Kanser İstatistikleri. Web: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017_OZETLI.pdf adresinden 1 Şubat 2024'te alınmıştır.

Jayapal, J. J. and Dhanaraj, S. J. (2017). Exemestane loaded alginate nanoparticles for cancer treatment: formulation and in vitro evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules, 105*, 416-421.

Jiang, Y., Jiang, Z., Wang, M., and Ma, L. (2022). Current understandings and clinical translation of nanomedicines for breast cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews, 180*, 114034.

Jones, S. A. and Jones, S. E. (2000). Exemestane: a novel aromatase inactivator for breast cancer. *Clinical Breast Cancer, 1*(3), 211-216.

Jørgensen, S. D. S., Al Sawaf, M., Graeser, K., Mu, H., Müllertz, A., and Rades, T. (2018). The ability of two in vitro lipolysis models reflecting the human and rat gastro-intestinal conditions to predict the in vivo performance of SNEDDS dosing regimens. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 124*, 116-124.

Jukanti, R., Sheela, S., Bandari, S., and Veerareddy, P. R. (2011). Enhanced bioavailability of exemestane via proliposomes based transdermal delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 100*(8), 3208-3222.

Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., and Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research, 23*, 165-176.

Kalepu, S., Manthina, M., and Padavala, V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems–an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 3*(6), 361-372.

Kanicky, J. R. and Shah, D. O. J. (2002). Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids. *Journal of Colloid and Interface Science, 256*(1), 201-207.

Kanwal, T., Rehman, K., Hamid, H. M., Shuja, A. A., Saifullah, S., Ahmed, T., Hasnain, M., Simjee, S. U., and Shah, M. R. (2023). A novel cationic arginine-modified Self-Nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for improved anticancer and antioxidant activities of Naringin. *Journal of Molecular Liquids, 391*, 123235.

Kaur, S., Jena, S. K., Samal, S. K., Saini, V., and Sangamwar, A. T. (2017). Freeze dried solid dispersion of exemestane: A way to negate an aqueous solubility and oral bioavailability problems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 107*, 54-61.

Kawakami, K., Yoshikawa, T., Hayashi, T., Nishihara, Y., and Masuda, K. (2002). Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: II. In vivo study. *Journal of Controlled Release, 81*(1-2), 75-82.

Kazi, M., A. Nasr, F., Noman, O., Alharbi, A., Alqahtani, M. S., and Alanazi, F. K. (2020). Development, characterization optimization, and assessment of curcumin-loaded bioactive self-nanoemulsifying formulations and their inhibitory effects on human breast cancer MCF-7 cells. *Pharmaceutics, 12*(11), 1107.

Kazi, M., Al-Swairi, M., Ahmad, A., Raish, M., Alanazi, F. K., Badran, M. M., Khan, A. A., Alanazi, A. M., and Hussain, M. D. (2019). Evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for poorly water-soluble talinolol: Preparation, in vitro and in vivo assessment. *Frontiers in Pharmacology, 10*, 459.

Keemink, J. and Bergström, C. A. (2018). Caco-2 cell conditions enabling studies of drug absorption from digestible lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research, 35*, 1-11.

Keemink, J., Hedge, O. J., Bianco, V., Hubert, M., and Bergström, C. A. (2022). Comparison of Cellular Monolayers and an Artificial Membrane as Absorptive Membranes in the in vitro Lipolysis-permeation Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 111*(1), 175-184.

Keemink, J., Mårtensson, E., and Bergström, C. A. (2019). Lipolysis-permeation setup for simultaneous study of digestion and absorption in vitro. *Molecular Pharmaceutics, 16*(3), 921-930.

Khan, M. A., Ullah, K., ur Rahman, N., Mahmood, A., Müllertz, A., Mannan, A., Murtaza, G., and Khan, S. A. (2022). Formulation, characterization and in-vitro evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system containing rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 75*, 103673.

Khedekar, K. and Mittal, S. (2013). Self emulsifying drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research, 4*(12), 4494.

Khoo, S.-M., Humberstone, A. J., Porter, C. J., Edwards, G. A., and Charman, W. N. (1998). Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *International Journal of Pharmaceutics, 167*(1-2), 155-164.

Kleberg, K., Jacobsen, J., and Müllertz, A. (2010). Characterising the behaviour of poorly water soluble drugs in the intestine: application of biorelevant media for solubility, dissolution and transport studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62*(11), 1656-1668.

Klein, S. (2010). The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS PharmaSciTech, 12*(3), 397-406.

Klitgaard, M., Müllertz, A., and Berthelsen, R. (2021). Estimating the oral absorption from self-nanoemulsifying drug delivery systems using an in vitro lipolysis-permeation method. *Pharmaceutics, 13*(4), 489.

Klitgaard, M., Sassene, P. J., Selen, A., Müllertz, A., and Berthelsen, R. (2017). Studying furosemide solubilization using an in vitro model simulating gastrointestinal digestion and drug solubilization in neonates and young infants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 109*, 191-199.

Koç, B., ve Kaymak-Ertekin, F. (2010). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 1-8.

Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., and Khar, R. K. (2010). Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discovery Today: Technologies, 15*(21-22), 958-965.

Kollipara, S. and Gandhi, R. K. (2014). Pharmacokinetic aspects and in vitro–in vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 4*(5), 333-349.

Kommuru, T., Gurley, B., Khan, M., and Reddy, I. (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics, 212*(2), 233-246.

Kossena, G. A., Boyd, B. J., Porter, C. J., and Charman, W. N. (2003). Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 92*(3), 634-648.

Kossena, G. A., Charman, W. N., Wilson, C. G., O'Mahony, B., Lindsay, B., Hempenstall, J. M., Davison, C. L., Crowley, P. J., and Porter, C. J. (2007). Low dose lipid formulations: effects on gastric emptying and biliary secretion. *Pharmaceutical Research, 24*, 2084-2096.

Kostewicz, E. S., Abrahamsson, B., Brewster, M., Brouwers, J., Butler, J., Carlert, S., Dickinson, P. A., Dressman, J., Holm, R., and Klein, S. (2014). In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 57*, 342-366.

Kothari, A. and Rajagopalan, P. (2020). The assembly of integrated rat intestinal-hepatocyte cultures. *Bioengineering and Translational Medicine, 5*(1), e10146.

Kuentz, M. (2012). Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discovery Today: Technologies, 9*(2), e97-e104.

Laranjeira, M. S., Ribeiro, T. P., Magalhães, A. I., Silva, P. C., Santos, J. A., and Monteiro, F. J. (2022). Magnetic mesoporous silica nanoparticles as a theranostic approach for breast cancer: Loading and release of the poorly soluble drug exemestane. *International Journal of Pharmaceutics, 619*, 121711.

Larsen, A., Holm, R., Pedersen, M. L., and Müllertz, A. (2008). Lipid-based formulations for danazol containing a digestible surfactant, Labrafil M2125CS: in vivo bioavailability and dynamic in vitro lipolysis. *Pharmaceutical Research, 25*, 2769-2777.

Larsen, A. T., Sassene, P., and Müllertz, A. (2011). In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics, 417*(1-2), 245-255.

Li, L., Zhou, C. H., and Xu, Z. P. (2019). Self-nanoemulsifying drug-delivery system and solidified self-nanoemulsifying drug-delivery system. In S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, and Thomas S. (Eds.), *Nanocarriers for drug delivery*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 421-449.

Liu, X.-H., Li, X.-R., Gao, X.-M., Wang, M., Chang, Z.-Y., and Gao, X.-L. (2022). Comparison of the permeability between conjugated estrogens and atenolol in rat in situ single-pass intestinal perfusions model and in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 68*, 102786.

Lombardi, P. (2002). Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease, 1587*(2-3), 326-337.

Lønning, P. (2001). Exemestane: a review of its clinical efficacy and safety. *The breast, 10*(3), 198-208.

López-Yerena, A., Vallverdú-Queralt, A., Mols, R., Augustijns, P., Lamuela-Raventós, R. M., and Escribano-Ferrer, E. (2020). Absorption and intestinal metabolic profile of oleocanthal in rats. *Pharmaceutics, 12*(2), 134.

Mahmood, A. and Bernkop-Schnürch, A. (2019). SEDDS: A game changing approach for the oral administration of hydrophilic macromolecular drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews, 142*, 91-101.

Mahmoud, B. S. and McConville, C. (2023). Box–Behnken Design of Experiments of Polycaprolactone Nanoparticles Loaded with Irinotecan Hydrochloride. *Pharmaceutics, 15*(4), 1271.

Marcos-Escribano, A., Bermejo, F. A., Bonde-Larsen, A. L., Retuerto, J. I., and Sierra, I. H. (2009). 1, 2-Dehydrogenation of steroidal 6-methylen derivatives. Synthesis of exemestane. *Tetrahedron, 65*(36), 7587-7590.

Mármol, Á. L., Fischer, P. L., Wahl, A., Schwöbel, D., Lenz, V., Sauer, K., and Koziolek, M. (2022). Application of tiny-TIM as a mechanistic tool to investigate the in vitro performance of different itraconazole formulations under physiologically relevant conditions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 173*, 106165.

McClements, D. J. and Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Function, 1*(1), 32-59.

Memvanga, P. B., Coco, R., and Préat, V. (2013). An oral malaria therapy: curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with β-arteether. *Journal of Controlled Release, 172*(3), 904-913.

Mercuri, A., Passalacqua, A., Wickham, M. S., Faulks, R. M., Craig, D. Q., and Barker, S. A. (2011). The effect of composition and gastric conditions on the self-emulsification process of ibuprofen-loaded self-emulsifying drug delivery systems: a microscopic and dynamic gastric model study. *Pharmaceutical Research, 28*, 1540-1551.

Mishra, B., Padaliya, R., and Patel, R. R. (2017). Exemestane encapsulated vitamin E-TPGS–polymeric nanoparticles: preparation, optimization, characterization, and in vitro cytotoxicity assessment. *Artificial Cells, Nanomedicine, Biotechnology, 45*(3), 522-534.

Moen, M. D. and Wagstaff, A. J. (2006). Exemestane: a review of its use as adjuvant treatment for early breast cancer in postmenopausal women. *American Journal of Cancer, 5*, 259-272.

Mohsin, K., Long, M. A., and Pouton, C. W. (2009). Design of lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs: precipitation of drug after dispersion of formulations in aqueous solution. *Journal Of Pharmaceutical Sciences, 98*(10), 3582-3595.

Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John wiley & sons.

Mosgaard, M. D., Sassene, P., Mu, H., Rades, T., and Müllertz, A. (2015). Development of a high-throughput in vitro intestinal lipolysis model for rapid screening of lipid-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 94*, 493-500.

Mosgaard, M. D., Sassene, P. J., Mu, H., Rades, T., and Müllertz, A. (2017). High-throughput lipolysis in 96-well plates for rapid screening of lipid-based drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 106*(4), 1183-1186.

Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., and Yang, X. (2008). Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics, 353*(1-2), 270-276.

Mountfield, R. J., Senepin, S., Schleimer, M., Walter, I., and Bittner, B. (2000). Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450. *International Journal of Pharmaceutics, 211*(1-2), 89-92.

Mu, H., Holm, R., and Müllertz, A. (2013). Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics, 453*(1), 215-224.

Müllertz, A., Ogbonna, A., Ren, S., and Rades, T. (2010). New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62*(11), 1622-1636.

Nasr, A., Gardouh, A., and Ghorab, M. (2016). Novel solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) for oral delivery of olmesartan medoxomil: design, formulation, pharmacokinetic and bioavailability evaluation. *Pharmaceutics, 8*(3), 20.

Nazlı, H., Mesut, B., and Özsoy, Y. (2021). In vitro evaluation of a solid supersaturated self nanoemulsifying drug delivery system (Super-SNEDDS) of aprepitant for enhanced solubility. *Pharmaceuticals, 14*(11), 1089.

Nicolaides, E., Symillides, M., Dressman, J. B., and Reppas, C. (2001). Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharmaceutical Research, 18*, 380-388.

Niederquell, A. and Kuentz, M. (2013). Proposal of stability categories for nano-dispersions obtained from pharmaceutical self-emulsifying formulations. *International Journal of Pharmaceutics, 446*(1-2), 70-80.

Nielsen, F. S., Petersen, K. B., and Müllertz, A. (2008). Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: influence of droplet size and dietary state. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 69*(2), 553-562.

Nipun, T. S. and Islam, S. A. (2014). SEDDS of gliclazide: preparation and characterization by in-vitro, ex-vivo and in-vivo techniques. *Saudi Pharmaceutical Journal, 22*(4), 343-348.

O'Driscoll, C. M. (2002). Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 15*(5), 405-415.

Ogunbona, F., Smith, I., and Olawoye, O. (1985). Fat contents of meals and bioavailability of griseofulvin in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 37*(4), 283-284.

Özbaş, S., Boylu, Ş., and Soyder, A. (2012). Meme kanserinde risk faktörleri. V. Özmen, Z. Cantürk, V. Çelik, N. Güler, M. Kapkaç, A. Koyuncu, M. Müslümanoğlu, and Utkan Z. (Editörler). *Meme Hastalıkları Kitabı.* Ankara.

Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu ve Güneş Tıp Kitabevleri, s. 151-158.

Pandey, V. and Kohli, S. (2018). Lipids and surfactants: The inside story of lipid-based drug delivery systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 35*(2).

Parmar, J., Singh, D., Lohade, A., Hegde, D. D., Soni, P., Samad, A., and Menon, M. D. (2011). Inhalational system for etoposide liposomes: Formulation development and in vitro deposition. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 73*(6), 656.

Parmar, K. and Shah, J. (2021). Optimization of Performance Variables of Exemestane Nanosuspension Using Box-Behnken Design to Improve Dissolution and Oral Bioavailability. *Current Drug Delivery, 18*(8), 1160-1173.

Patel, J. and Barve, K. H. (2012). Intestinal permeability of lamivudine using single pass intestinal perfusion. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 74*(5), 478.

Patil, P. and Paradkar, A. (2006). Porous polystyrene beads as carriers for self-emulsifying system containing loratadine. *AAPS PharmaSciTech, 7*, E199-E205.

Patil, P., Patil, V., and Paradkar, A. (2007). Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: in vitro and in vivo evaluation. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 57*(1), 111-122.

Persson, E. M., Gustafsson, A.-S., Carlsson, A. S., Nilsson, R. G., Knutson, L., Forsell, P., Hanisch, G., Lennernäs, H., and Abrahamsson, B. (2005). The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharmaceutical Research, 22*, 2141-2151.

Pfizer. (2018). *Product monograph, Aromasin® (exemestane) tablets*.

Pistelli, M., Della Mora, A., Ballatore, Z., and Berardi, R. (2018). Aromatase inhibitors in premenopausal women with breast cancer: the state of the art and future prospects. *Current Oncology, 25*(2), 168-175.

Porter, C. J. and Charman, W. N. (2001(a)). In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced drug delivery reviews*, 50, S127-S147.

Porter, C. J. and Charman, W. N. (2001(b)). Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Advanced Drug Delivery Reviews, 50*(1-2), 61-80.

Porter, C. J., Pouton, C. W., Cuine, J. F., and Charman, W. N. (2008). Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 673-691.

Porter, C. J., Trevaskis, N. L., and Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery, 6*(3), 231-248.

Pouton, C. W. (1997). Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews, 25*(1), 47-58.

Pouton, C. W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying'drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 11*, S93-S98.

Pouton, C. W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29*(3-4), 278-287.

Pouton, C. W. and Porter, C. J. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 625-637.

Prajapat, M. D., Patel, N. J., Bariya, A., Patel, S. S., and Butani, S. B. (2017). Formulation and evaluation of self-emulsifying drug delivery system for nimodipine, a BCS class II drug. *Journal of Drug Delivery Science Technology, 39*, 59-68.

Qian, J., Meng, H., Xin, L., Xia, M., Shen, H., Li, G., and Xie, Y. (2017). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of myricetin: Formulation development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 160*, 101-109.

Rajesh, S. Y., Singh, S. K., Pandey, N. K., Sharma, P., Bawa, P., Kumar, B., Gulati, M., Jain, S. K., Gowthamarajan, K., and Singh, S. (2018). Impact of various solid carriers and spray drying on pre/post compression properties of solid SNEDDS loaded with glimepiride: in vitro-ex-vivo evaluation and cytotoxicity assessment. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 44*(7), 1056-1069.

Ramana, P. V., Krishna, Y. R., and Mouli, K. C. (2022). Experimental FT-IR and UV–Vis spectroscopic studies and molecular docking analysis of anti-cancer drugs Exemestane and Pazopanib. *Journal of Molecular Structure, 1263*, 133051.

Rathore, C., Hemrajani, C., Sharma, A. K., Gupta, P. K., Jha, N. K., Aljabali, A. A., Gupta, G., Singh, S. K., Yang, J.-C., and Dwivedi, R. P. (2023). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) mediated improved oral bioavailability of thymoquinone: Optimization, characterization, pharmacokinetic, and hepatotoxicity studies. *Drug Delivery and Translational Research, 13*(1), 292-307.

Rauf, M. A., Soliman, A. A., and Khattab, M. (2008). Solvent effect on the spectral properties of Neutral Red. *Chemistry Central Journal, 2*, 1-8.

Reddy, M. R. and Gubbiyappa, K. S. (2022). Formulation development, optimization and characterization of Pemigatinib-loaded supersaturable self-nanoemulsifying drug delivery systems. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 8*(1), 45.

Rizwanullah, M., Perwez, A., Mir, S. R., Rizvi, M. M. A., and Amin, S. (2021). Exemestane encapsulated polymer-lipid hybrid nanoparticles for improved efficacy against breast cancer: Optimization, in vitro characterization and cell culture studies. *Nanotechnology, 32*(41), 415101.

Robinson, A. (2009). A review of the use of exemestane in early breast cancer. *Therapeutics Clinical Risk Management*, 91-98.

Rodríguez, S. A., Qiu, F., Mulcey, M., Weigandt, K., and Tamblyn, T. (2015). Monitoring the chemical and physical stability for tromethamine excipient in a lipid based formulation by HPLC coupled with ELSD. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 115*, 245-253.

Rosso, A., Almouazen, E., Pontes, J., Andretto, V., Leroux, M., Romasko, E., Azzouz-Maache, S., Bordes, C., Coste, I., and Renno, T. (2021). Supersaturable self-microemulsifying delivery systems: An approach to enhance oral bioavailability of benzimidazole anticancer drugs. *Drug Delivery and Translational Research, 11*, 675-691.

Ruddy, S. B., Matuszewska, B. K., Grim, Y. A., Ostovic, D., and Storey, D. E. (1999). Design and characterization of a surfactant-enriched tablet formulation for oral delivery of a poorly water-soluble immunosuppressive agent. *International Journal of Pharmaceutics, 182*(2), 173-186.

Russo, J. and Russo, I. H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology, 102*(1-5), 89-96.

Saberi, A. H., Fang, Y., and McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science, 391*, 95-102.

Saifullah, S., Kanwal, T., Ullah, S., Kawish, M., Habib, S. M., Ali, I., Munir, A., Imran, M., and Shah, M. R. (2021). Design and development of lipid modified chitosan containing muco-adhesive self-emulsifying drug delivery systems for cefixime oral delivery. *Chemistry Physics of Lipids, 235*, 105052.

Sandhu, P. S., Beg, S., Mehta, F., Singh, B., and Trivedi, P. (2015). Novel dietary lipid-based self-nanoemulsifying drug delivery systems of paclitaxel with p-gp inhibitor: implications on cytotoxicity and biopharmaceutical performance. *Expert Opinion on Drug Delivery, 12*(11), 1809-1822.

Sarpal, K., Pawar, Y. B., and Bansal, A. K. (2010). Self-emulsifying drug delivery systems: a strategy to improve oral bioavailability. *Current Research Information on Pharmaceuticals Sciences, 11*(3), 42-49.

Sassene, P., Fanø, M., Mu, H., Rades, T., Aquistapace, S., Schmitt, B., Cruz-Hernandez, C., Wooster, T., and Müllertz, A. (2016). Comparison of lipases for in vitro models of gastric digestion: lipolysis using two infant formulas as model substrates. *Food Function, 7*(9), 3989-3998.

Sassene, P., Kleberg, K., Williams, H. D., Bakala-N'Goma, J.-C., Carrière, F., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., and Marchaud, D. (2014). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 6: effects of varying pancreatin and calcium levels. *AAPS PharmaSciTech, 16*, 1344-1357.

Sassene, P. J., Knopp, M. M., Hesselkilde, J. Z., Koradia, V., Larsen, A., Rades, T., and Müllertz, A. (2010). Precipitation of a poorly soluble model drug during in vitro lipolysis: characterization and dissolution of the precipitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 99*(12), 4982-4991.

Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K. M., and Wasan, E. K. (2017). Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 43*(11), 1743-1758.

Sawant, K., Pandey, A., and Patel, S. (2016). Aripiprazole loaded poly (caprolactone) nanoparticles: Optimization and in vivo pharmacokinetics. *Materials Science Engineering: C, 66*, 230-243.

Scott, L. J. and Wiseman, L. R. (1999). Exemestane. *Drugs, 58*, 675-680.

See, S. H. C. and Siziopikou, K. P. (2022). Pathologic evaluation of specimens after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: Current recommendations and challenges. *Pathology-Research Practice, 230*, 153753.

Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., and Cardoso, F. (2015). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology, 26*, v8-v30.

Seo, E. B., du Plessis, L. H., and Viljoen, J. M. (2022). Solidification of Self-Emulsifying Drug Delivery Systems as a Novel Approach to the Management of Uncomplicated Malaria. *Pharmaceuticals, 15*(2), 120.

Serajuddin, A. T., Mufson, D., Bernstein, D. F., Sheen, P.-C., and Augustine, M. A. (1988). Effect of vehicle amphiphilicity on the dissolution and bioavailability of a poorly water-soluble drug from solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 77*(5), 414-417.

Shah, R. and O'Regan, R. M. (2018). Adjuvant endocrine therapy. *Optimizing Breast Cancer Management*, 15-29.

Shah, V., Bharatiya, B., Gawali, S., Hassan, P. A., Shukla, A. D., Khandelwal, A., Bhatt, H., Vasu, V., and Shah, D. O. (2021). Thermoresponsive liquid crystalline formulation of Exemestane: Design and structural characterization. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 202*, 111683.

Shahba, A. A.-W., Mohsin, K., and Alanazi, F. K. (2012). Novel self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of cinnarizine: design, optimization, and in-vitro assessment. *AAPS PharmaSciTech, 13*, 967-977.

Shrestha, H., Bala, R., and Arora, S. (2014). Lipid-based drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutics, 2014*.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., and Jemal, A. (2021). Cancer statistics, 2021. *A Cancer Journal for Clinicians, 71*(1), 7-33.

Singh, A., Chaurasiya, A., Awasthi, A., Mishra, G., Asati, D., Khar, R. K., and Mukherjee, R. (2009). Oral bioavailability enhancement of exemestane from self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *AAPS PharmaSciTech, 10*, 906-916.

Singh, A., Neupane, Y. R., Mangla, B., and Kohli, K. (2019). Nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement of exemestane: formulation design, in vitro, ex-vivo, and in vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 108*(10), 3382-3395.

Singh, A., Neupane, Y. R., Shafi, S., Mangla, B., and Kohli, K. (2020). PEGylated liposomes as an emerging therapeutic platform for oral nanomedicine in cancer therapy: In vitro and in vivo assessment. *Journal of Molecular Liquids, 303*, 112649.

Singh, B., Bandopadhyay, S., Kapil, R., Singh, R., and Katare, O. P. (2009). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 26*(5).

Singh, B., Garg, B., Kaur, R., Jain, A., Kumar, R., and Katare, O. (2016). Self-nanoemulsifying systems for oral bioavailability enhancement: Recent paradigms. In Grumezescu A. M. (Ed.), *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials.* Elsevier, pp. 91-115.

Singh, G., Singh, D., Choudhari, M., Kaur, S. D., Dubey, S. K., Arora, S., and Bedi, N. (2021). Exemestane encapsulated copolymers L121/F127/GL44 based mixed micelles: Solubility enhancement and in vitro cytotoxicity evaluation using MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Pharmaceutical Investigation, 51*, 701-714.

Singh, P., Alka, Maurya, P., Nisha, R., Singh, N., Parashar, P., Mishra, N., Pal, R. R., and Saraf, S. A. (2023). QbD-assisted development of lipidic nanocapsules for antiestrogenic activity of exemestane in breast cancer. *Journal of Liposome Research, 33*(2), 154-169.

Sobral, A. F., Amaral, C., Correia-da-Silva, G., and Teixeira, N. (2016). Unravelling exemestane: From biology to clinical prospects. *The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology, 163*, 1-11.

Souliman, S., Blanquet, S., Beyssac, E., and Cardot, J.-M. (2006). A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: applied to solid immediate release oral dosage form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 27*(1), 72-79.

Spinelli, R., Jannuzzo, M., Poggesi, I., Frevola, L., Broutin, F., Cicioni, P., Marrari, P., and Le Coz, F. (1999). Pharmacokinetics (PK) of Aromasin (R)(exemestane, EXE) after single and repeated doses in healthy postmenopausal volunteers (HPV). *European Journal of Cancer, 35*, S295-S295.

Stappaerts, J., Brouwers, J., Annaert, P., and Augustijns, P. (2015). In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *International Journal of Pharmaceutics, 478*(2), 665-681.

Sulek, M. W., Wasilewski, T., and Kurzydłowski, K. J. (2010). The effect of concentration on lubricating properties of aqueous solutions of sodium lauryl sulfate and ethoxylated sodium lauryl sulfate. *Tribology Letters, 40*, 337-345.

Suram, D., Narala, A., and Veerabrahma, K. (2020). Development, characterization, comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of iloperidone solid SMEDDS and liquisolid compact. *Drug Development Industrial Pharmacy, 46*(4), 587-596.

Suys, E. J., Brundel, D. H., Chalmers, D. K., Pouton, C. W., and Porter, C. J. (2021). Interaction with biliary and pancreatic fluids drives supersaturation and drug absorption from lipid-based formulations of low (saquinavir) and high (fenofibrate) permeability poorly soluble drugs. *Journal of Controlled Release, 331*, 45-61.

Suys, E. J., Chalmers, D. K., Pouton, C. W., and Porter, C. J. (2018). Polymeric precipitation inhibitors promote fenofibrate supersaturation and enhance drug absorption from a type IV lipid-based formulation. *Molecular Pharmaceutics, 15*(6), 2355-2371.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid Interface Science, 108*, 303-318.

Tanaka, Y., Nguyen, T.-H., Suys, E. J., and Porter, C. J. (2021). Digestion of lipid-based formulations not only mediates changes to absorption of poorly soluble drugs due to differences in solubilization but also reflects changes to thermodynamic activity and permeability. *Molecular Pharmaceutics, 18*(4), 1768-1778.

Thakare, P., Mogal, V., Borase, P., Dusane, J., and Kshirsagar, S. (2016). A review on self-emulsified drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Biological Evaluations, 3*(2), 140-153.

Thomas, N., Holm, R., Garmer, M., Karlsson, J. J., Müllertz, A., and Rades, T. (2013). Supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (Super-SNEDDS) enhance the bioavailability of the poorly water-soluble drug simvastatin in dogs. *AAPS PharmaSciTech, 15*, 219-227.

Thomas, N., Holm, R., Müllertz, A., and Rades, T. (2012). In vitro and in vivo performance of novel supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (super-SNEDDS). *Journal of Controlled Release, 160*(1), 25-32.

Thomas, N., Müllertz, A., Graf, A., and Rades, T. (2012). Influence of lipid composition and drug load on the in vitro performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 101*(5), 1721-1731.

Thomas, N., Richter, K., Pedersen, T. B., Holm, R., Müllertz, A., and Rades, T. (2014). In vitro lipolysis data does not adequately predict the in vivo performance of lipid-based drug delivery systems containing fenofibrate. *AAPS PharmaSciTech, 16*, 539-549.

Timur B., Yılmaz-Usta, D., ve Teksin, Z.S. (2021). Türkiye Patent No: 2021 019639 B. Türk Patent ve Marka Kurumu.

Timur, B., Yılmaz-Usta, D., and Teksin, Z. S. (2022). Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the in vitro lipolysis-permeation model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 77*, 103797.

Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 6*(1), 112-118.

Tran, T., Xi, X., Rades, T., and Müllertz, A. (2016). Formulation and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine. *International Journal of Pharmaceutics, 502*(1-2), 151-160.

Tranter, G. E. and Le Pevelen, D. D. (2017). Chiroptical spectroscopy and the validation of crystal structure stereochemical assignments. *Tetrahedron: Asymmetry, 28*(10), 1192-1198.

Tuğcu-Demiröz, F., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., and Bermejo, M. (2014). Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 62*, 105-110.

USP. 2003.The United States Pharmacopeia USP 26: the National Formulary NF 21.

Van Asten, K., Neven, P., Lintermans, A., Wildiers, H., and Paridaens, R. (2014). Aromatase inhibitors in the breast cancer clinic: focus on exemestane. *Endocrine-Related Cancer, 21*(1), R31-R49.

Van de Velde, C. J., Rea, D., Seynaeve, C., Putter, H., Hasenburg, A., Vannetzel, J.-M., Paridaens, R., Markopoulos, C., Hozumi, Y., and Hille, E. T. (2011). Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Healthy Longevity, 377*(9762), 321-331.

Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S. A., Craig, D. Q., Faulks, R. M., and Wickham, M. S. (2011). Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmaSciTech, 12*, 620-626.

Varela, C. L., Amaral, C., da Silva, E. T., Lopes, A., Correia-da-Silva, G., Carvalho, R. A., Costa, S. C., Roleira, F. M., and Teixeira, N. (2014). Exemestane metabolites: Synthesis, stereochemical elucidation, biochemical activity and anti-proliferative effects in a hormone-dependent breast cancer cell line. *European Journal of Medicinal Chemistry, 87*, 336-345.

Vincent, M., Simon, L., Brabet, P., Legrand, P., Dorandeu, C., Him, J. L. K., Durand, T., Crauste, C., and Begu, S. (2022). Formulation and evaluation of SNEDDS loaded with original lipophenol for the oral route to prevent dry AMD and Stragardt's disease. *Pharmaceutics, 14*(5), 1029.

Vogel, V. G. (2018). Epidemiology of breast cancer. In K. I. Bland, V. S. Klimberg, and Gradishar W. J. (Eds.), *The Breast.* Elsevier, pp. 207-218.

Wahba, H. A. and El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biology Medicine, 12*(2), 106.

Wang, L.-Z., Goh, S.-H., Wong, A. L.-A., Thuya, W.-L., Lau, J.-Y. A., Wan, S.-C., Lee, S.-C., Ho, P. C., and Goh, B.-C. (2015). Validation of a rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of exemestane and its metabolites, 17β-hydroxyexemestane and 17β-hydroxyexemestane-17-O-β-D-glucuronide: Application to human pharmacokinetics study. *PLoS One, 10*(3), e0118553.

Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., and Li, X. (2009). Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid Interface Science, 330*(2), 443-448.

Wang, L., Zhu, B., Lu, W., Zhang, Q., Fang, W., Gao, S., Cao, Y., Chen, S., and Hu, R. (2023). Intestinal absorption studies of ORI-SMEDDS with different zeta potentials through lipolysis absorption model in vitro, single pass intestine perfusion and pharmacokinetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 87*, 104782.

Wang, Y., Tong, J., Chang, B., Wang, B., Zhang, D., and Wang, B. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Molecular Medicine Reports, 9*(6), 2352-2356.

Wickham, M., Faulks, R., Mann, J., and Mandalari, G. (2012). The design, operation, and application of a dynamic gastric model. *Dissolution Technologies, 19*(3), 15-22.

Williams, H. D., Anby, M. U., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N'Goma, J.-C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., and Marchaud, D. (2012(b)). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during in vitro digestion. *Molecular Pharmaceutics, 9*(11), 3286-3300.

Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N'Goma, J.-C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., and Jule, E. (2012(a)). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of in vitro

digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 101*(9), 3360-3380.

Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Calderone, M., Igonin, A., Jule, E., Vertommen, J., Blundell, R., Benameur, H., and Müllertz, A. (2013). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 3: understanding supersaturation versus precipitation potential during the in vitro digestion of type I, II, IIIA, IIIB and IV lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research, 30*, 3059-3076.

Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Calderone, M., Igonin, A., Jule, E., Vertommen, J., Blundell, R., Benameur, H., and Müllertz, A. (2014). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 4: proposing a new lipid formulation performance classification system. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 103*(8), 2441-2455.

Xi, J., Chang, Q., Chan, C. K., Meng, Z. Y., Wang, G. N., Sun, J. B., Wang, Y. T., Tong, H. H., and Zheng, Y. (2009). Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS PharmaSciTech, 10*, 172-182.

Yavuz, B. (2009). *Siklodekstrin kompleksi oluşturarak, ekzemestanın çözünmesinin ve in vitro geçirgenliğinin arttırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Yavuz, B., Bilensoy, E., and Sumnu, M. (2007). Analytical method validation for HPLC assay of oral anticancer drug exemestane. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 32*(1), 15.

Yavuz, B., Bilensoy, E., and Sumnu, M. (2007). Bioavailability file: exemestane. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 32*(2), 79.

Yavuz, B., Bilensoy, E., Vural, İ., and Şumnu, M. (2010). Alternative oral exemestane formulation: improved dissolution and permeation. *International Journal of Pharmaceutics, 398*(1-2), 137-145.

Yeom, D. W., Song, Y. S., Kim, S. R., Lee, S. G., Kang, M. H., Lee, S., and Choi, Y. W. (2015). Development and optimization of a self-microemulsifying drug delivery system for ator vastatin calcium by using D-optimal mixture design. *International Journal of Nanomedicine*, 3865-3878.

Yılmaz-Usta, D. (2022). *Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro – İn Vivo Değerlendirmeler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Yılmaz-Usta, D., Olgac, S., Timur, B., and Teksin, Z. S. (2023). Development and pharmacokinetic evaluation of Neusilin® US2-based S-SNEDDS tablets for bosentan: Fasted and fed states bioavailability, IVIS® real-time biodistribution, and ex-vivo imaging. *International Journal of Pharmaceutics, 643*, 123219.

Yılmaz-Usta, D., Timur, B., and Teksin, Z. S. (2022). Formulation development, optimization by Box-Behnken design, characterization, in vitro, ex-vivo, and in

vivo evaluation of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system: A novel alternative dosage form for pulmonary arterial hypertension treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 174*, 106159.

Yılmaz-Usta, D., ve Teksin, Z.S. (2017). *İn vitro çözünme hızı çalışmalarında yeni yaklasımlar/New approaches to in vitro dissolution rate studies*. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 40(1), 33.

Yin, Y.-M., Cui, F.-D., Mu, C.-F., Choi, M.-K., Kim, J. S., Chung, S.-J., Shim, C.-K., and Kim, D.-D. (2009). Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: preparation and in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release, 140*(2), 86-94.

Yoo, J., Baskaran, R., and Yoo, B.-K. (2013). Self-nanoemulsifying drug delivery system of lutein: physicochemical properties and effect on bioavailability of warfarin. *Biomolecules Therapeutics, 21*(2), 173.

Yu, J., Mu, Q., Fung, M., Xu, X., Zhu, L., and Ho, R. J. (2022). Challenges and opportunities in metastatic breast cancer treatments: Nano-drug combinations delivered preferentially to metastatic cells may enhance therapeutic response. *Pharmacology Therapeutics, 236*, 108108.

Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S., and Barzegar-Jalali, M. (2007). Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. *Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences, 10*(3), 368-379.

Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G., and Hovgaard, L. (2001). A dynamic in vitro lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 14*(2), 115-122.

Zeng, L., Xin, X., and Zhang, Y. (2017). Development and characterization of promising Cremophor EL-stabilized o/w nanoemulsions containing short-chain alcohols as a cosurfactant. *RSC advances, 7*(32), 19815-19827.

Zewail, M. B., El-Gizawy, S. A., Osman, M. A., and Haggag, Y. A. (2021). Preparation and In vitro characterization of a novel self-nano emulsifying drug delivery system for a fixed-dose combination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61*, 102320.

Zhu, S., Hong, M., Liu, C., and Pei, Y. (2009). Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation. *Pharmaceutical Development and Technology, 14*(6), 642-649.

Zupančič, O., Partenhauser, A., Lam, H. T., Rohrer, J., and Bernkop-Schnürch, A. (2016). Development and in vitro characterisation of an oral self-emulsifying delivery system for daptomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 81*, 129-136.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.03.2023-E.612251

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-612251 15.03.2023
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zeynep Şafak TEKSİN, Mürşide Ayşe DEMİREL, Gamze VARAN, Duygu YILMAZ USTA, Burcu TİMUR ve Seval OLĞAÇ'tan oluşan, G.Ü.ET-23.027 kod numaralı ve ***"Eksemestan Yüklü Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi İn Vitro- İn Situ Değerlendirmeler"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.027 and entitled ***"Development of Exemestane Loaded Self-Emulsifying Drug Delivery Systems an In Vitro-In Situ Evaluations"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Spraque Dawley
Hayvan Sayısı : 39

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BS47RYLJL2 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.03.2023-E.612251

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17/02/2023	TOPLANTI SAYISI : 02
ADI-SOYADI	**İMZA**
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)	
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.İlker ŞEN	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.İpek SÜNTAR	
Prof.Dr.Serkan YAVUZ	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN	
Doç.Dr.Elvan ANADOL	
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ	
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN	
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ	
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ	
Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN	
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Tez Konusu Değişiklik Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.03.2023-E.614666

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : E-14574941-302.14.01-614666 16.03.2023
Konu : Konu Belirleme, Değiştirme ve Onama

Dağıtım Yerlerine

Enstitümüz Yönetim Kurulunun 16.03.2023 tarih ve 14 nolu toplantısında alınan 06 sayılı karar metni yazı ekinde gönderilmektedir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Aysel BERKKAN
Enstitü Müdür Yardımcısı

DAĞITIM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığına
Sayın Prof. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSC71RB1A3
Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys

Tunus Cad. No:35 Kat: 3 ve 4 P.K. 06540 Çankaya/ANKARA
Tel:0 (312) 202 33 87 Faks:0 (312) 202 82 20
e-Posta :saglikb@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://saglikb.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr
Bilgi için :Aykut ORHAN
Hizmetli
Telefon No:2023266

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. (devam) Tez Konusu Değişiklik Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.03.2023-E.614666

61

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ: 16.03.2023 **TOPLANTI SAYISI: 14**

Enstitü Yönetim Kurulu, 16.03.2023 Perşembe günü saat 10.30'da, Enstitü Müdürü Prof.Dr. A.Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'in başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Karar 14/06- Enstitümüzün anabilim/bilim dalı başkanlıklarından gelen yazılar doğrultusunda, Gazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin 30. Maddesi gereğince, aşağıdaki tabloda bilgileri bulunan **Doktora öğrencisi** adına düzenlenen Tez konusu öneri Formunda yer alan tez konusu değişiklik önerisinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

DOKTORA			
168511403	**Burcu TİMUR**	**Farmasötik Teknoloji**	**Prof. Dr.Zeynep ŞAFAK TEKSİN**
Tez Konusu Eski	BCS Sınıf 2 İlaçların Biyoyararlanım Değerlendirilmelerinde Lipoliz ve Çözünme Testlerine Yönelik Çalışmalar		
Tez Konusu Yeni (Danışman tarafından)	Eksemestan Yüklü Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro- İn Situ Değerlendirmeler. **Etik Komisyon İzni Gereklidir ve Alınacaktır.**		

Prof. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP	Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Aysel BERKKAN	Enstitü Müdür Yardımcısı
Prof. Dr. Çiğdem ELMAS	Üye
Prof. Dr. Burcu ÖZDEMİR	Üye
Prof. Dr. İpek SÜNTAR	Üye

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-3. Yayın Bilgisi

Journal of Drug Delivery Science and Technology 77 (2022) 103797

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the *in vitro* lipolysis-permeation model

Burcu Timur [a,b], Duygu Yilmaz Usta [a], Zeynep Safak Teksin [a,*]

[a] Gazi University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06330, Ankara, Turkey
[b] Zonguldak Bulent Ecevit University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 67600, Zonguldak, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:
Lipid-based formulation
Self-nanoemulsifying drug delivery systems
Exemestane
In vitro digestion
Supersaturation
Permeation

ABSTRACT

This study aimed to examine the effect of colloidal structures forming and changing with dispersion and digestion of lipid-based formulation (LBF) on the permeability of exemestane (EXE), a poorly water-soluble drug. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS), one of the LBF, was developed using Imwitor® 988, Kolliphor® RH 40, and Labrasol® according to the solubility study and optimized using Box-Behnken Design. The EXE-loaded SNEDDS formulation has a 14.46 ± 0.23 nm droplet size with a 0.119 ± 0.053 polydispersity index. EXE was loaded into SNEDDS at 15 mg/g. *In vitro* digestion was conducted to investigate the EXE permeability at the digestion medium and the flux of EXE through a dialysis membrane and porcine intestinal tissue was assessed with the permeability step. *In vitro* digestion study revealed that the SNEDDS formulation retained the solubilization of EXE and showed moderate supersaturation. The permeation of EXE through the dialysis membrane was observed that the EXE amount on the acceptor side was similar during different digestion phases, but the permeation of EXE through porcine intestinal tissue was slightly different during different digestion phases and EXE permeability was higher at 60 min of digestion although statistically not significant. However, EXE precipitation was observed since the solvation capacity of colloidal structures was slightly decreased at 60 min of digestion. It can be explained by the fact that EXE re-dissolved and increased the free fraction, increasing permeability. This study showed that the drug precipitation in the digestion study does not always result in low permeation and minor differences could be observed more evident in the porcine intestine tissue.

1. Introduction

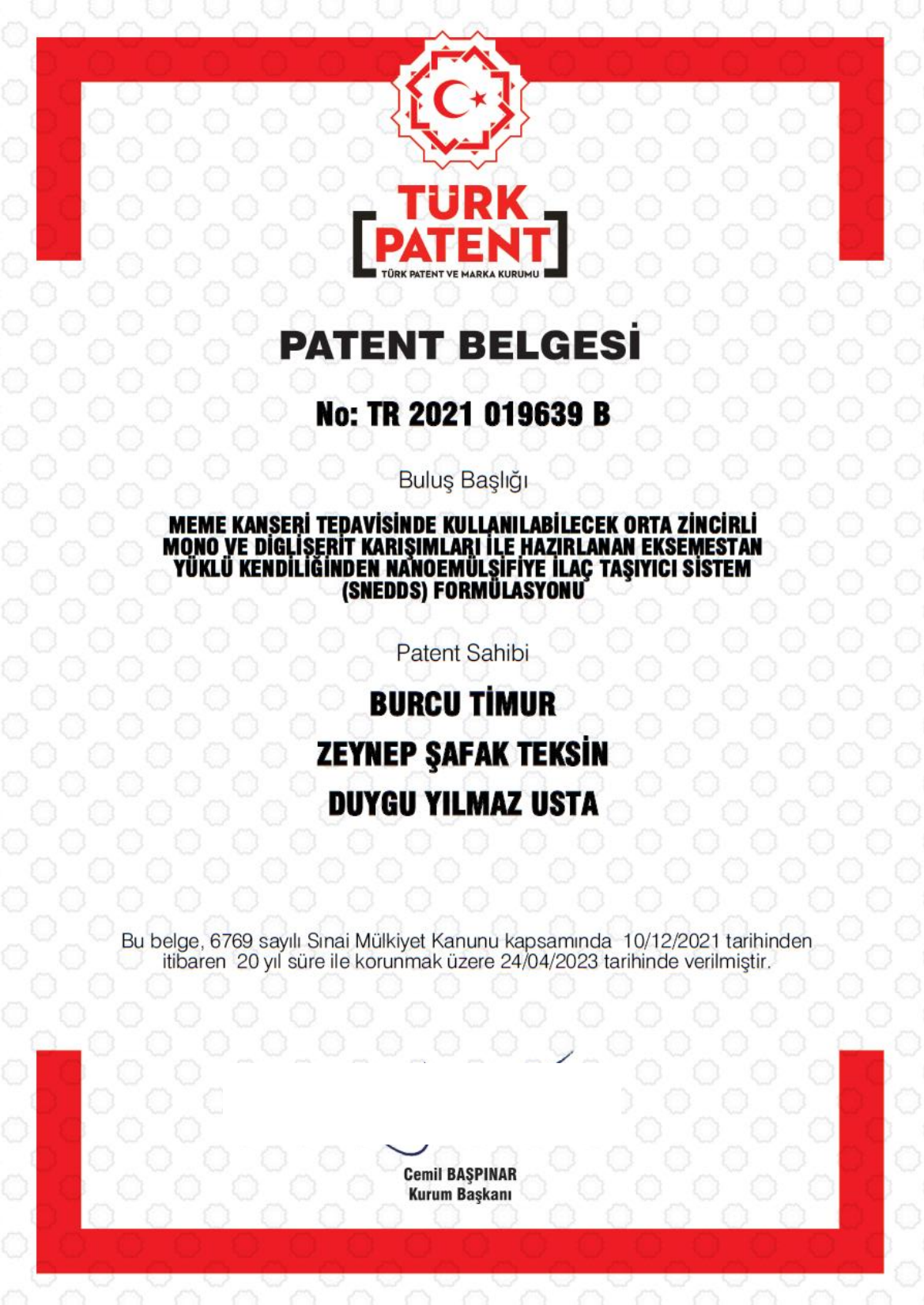
Drug dissolution and solubility determination in gastrointestinal fluids are crucial since dissolution is a precondition for drug absorption [1,2]. Therefore, the limiting step to absorption of poorly water-soluble drugs is low solubility and/or slow dissolution rate resulting in inadequate and variable oral bioavailability [3,4]. For drugs that have low water solubility, different formulation strategies and several drug delivery systems have been developed to solve poor oral bioavailability by increasing solubility and/or dissolution rate [5]. Lipid-based formulations (LBFs) are one of these systems developed based on the fact that the bioavailability of poorly water-soluble drugs could promote when coadministration with food containing highly fat [5,6]. LBFs are wide-ranging drug delivery systems consisting of a homogeneous mixture of oils, surfactants, and/or cosolvents, categorized according to physical properties such as content, particle size, dispersion, and digestion behavior [7]. Among lots of LBFs, self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDSs) are one of the most effective strategies to improve solubility and oral bioavailability [8].

The main purpose of LBFs, which bypasses the drug dissolution step by presolubilization of the drug in the formulation, is to keep the drug in solution throughout the gastrointestinal tract (GIT) [9–11]. However, after oral administration, dynamic and complex intraluminal processes such as formulation dispersion and digestion take over and the solvation capacity of LBFs for the drug alters and often decreases as a result of digestion of formulation components [12]. These situations conclude with drug supersaturation. Supersaturation can improve drug absorption since drug concentration greater than drug solubility in GIT is expected to increase the absorption flux. On the contrary, supersaturation is thermodynamically unstable therefore, drug precipitation can also

* Corresponding author.
E-mail addresses: burcu.timur2@gazi.edu.tr (B. Timur), yilmazduyguusta@gazi.edu.tr (D. Yilmaz Usta), zsteksin@gazi.edu.tr (Z.S. Teksin).

https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103797
Received 26 June 2022; Received in revised form 5 September 2022; Accepted 6 September 2022
Available online 11 September 2022
1773-2247/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

EK-3. (devam) Yayın Bilgisi



TÜRK PATENT

TÜRK PATENT VE MARKA KURUMU

PATENT BELGESİ

No: TR 2021 019639 B

Buluş Başlığı

MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK ORTA ZİNCİRLİ MONO VE DİGLİSERİT KARIŞIMLARI İLE HAZIRLANAN EKSEMESTAN YÜKLÜ KENDİLİĞİNDEN NANOEMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM (SNEDDS) FORMÜLASYONU

Patent Sahibi

BURCU TİMUR

ZEYNEP ŞAFAK TEKSİN

DUYGU YILMAZ USTA

Bu belge, 6769 sayılı Sınai Mülkiyet Kanunu kapsamında 10/12/2021 tarihinden itibaren 20 yıl süre ile korunmak üzere 24/04/2023 tarihinde verilmiştir.

Cemil BAŞPINAR
Kurum Başkanı

EK-3. (devam) Yayın Bilgisi



TÜRK PATENT
TÜRK PATENT VE MARKA KURUMU

Sayın ZEYNEP ŞAFAK TEKSİN
Sayın BURCU TİMUR
Sayın DUYGU YILMAZ USTA

Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Himayelerinde Gerçekleştirilen
PATENTLE TÜRKİYE
3. ÜNİVERSİTELER PATENT YARIŞMASI'nda
"Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılabilecek Orta Zincirli Mono Ve Digliserit Karışımları İle Hazırlanan Eksemestan Yüklü Kendiliğinden Nanoemülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistem (Snedds) Formülasyonu"
Buluşunuzla 3'ÜNCÜLÜK Ödülüne Layık Görülerek
Göstermiş Olduğunuz Başarıdan Dolayı Tebrik Ederiz.

28 Nisan 2023

Cemil BAŞPINAR
TÜRKPATENT Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TİMUR, Burcu
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2016
Lise	Bartın Anadolu Öğretmen Lisesi	2011

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2017- Devam ediyor	Zonguldak Bülent Ecevit Üni. Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce - 83,75 (YÖKDİL)

Yayın

1. Yılmaz-Usta D, Olgac S, **Timur B**, Teksin ZS. (2023). Development and pharmacokinetic evaluation of Neusilin® US2-based S-SNEDDS tablets for bosentan: Fasted and fed states bioavailability, IVIS® real-time biodistribution, and ex-vivo imaging. International Journal of Pharmaceutics, 643, 123219.
2. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS. (2022). Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the in vitro lipolysis-permeation model. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 77, 103797.
3. **Timur B**, Teksin ZS. (2022). Pharmacokinetics-Bioavailability Assessments and Registration Stages of Herbal Medicines: Traditional Review. Journal of Literature Pharmacy Sciences, 11(1).
4. Yılmaz-Usta D, **Timur B**, Teksin ZS. (2022). Formulation development, optimization by Box-Behnken design, characterization, in vitro, ex-vivo, and in vivo evaluation of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system: A novel alternative dosage form for pulmonary arterial hypertension treatment. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 174, 106159.

Patent

1. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZŞ. “Meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek orta zincirli mono ve digliserit karışımları ile hazırlanan eksemestan yüklü kendiliginden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SNEDDS) formülasyonu”. Türk Patent ve Marka Kurumu. İncelemeli Ulusal Patent. Patent Başvuru No: 2021/019639. Tescil Tarihi: 10.12.2021.

Ödül

1. Türk Patent ve Marka Kurumu, Patentle Türkiye 3. Üniversiteler Patent Yarışması, Üçüncülük Ödülü, 28.04.2023.

Proje

1. Teksin ZS, **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Demirel MA, Varan G. “Eksemestan yüklü kendiliginden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin in vitro - in situ degerlendirilmesi”, 1002 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Kodu: 123S357, Araştırmacı, 01.08.2023-01.08.2024.
2. Teksin ZŞ, Bilensoy E, Olğaç A, Canpınar H, Varan G, Olğaç S, **Timur B**. “Böbrek kanseri tedavisi için moleküler dinamik simülasyonlar kullanılarak rekombinant insan interlökin-2 içeren oral nano ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro - in vivo değerlendirilmesi”. 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Kodu: 222S478, Bursiyer, 02.01.2023-Devam ediyor.

Bildiri

1. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “Assessment of lipid-based formulations containing excipients with different digestion profiles using in vitro digestion model”, The combined FIGON DMD / The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2022, Leiden, Netherlands, 1-3 June, 2022.
2. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “In vitro characterization of exemestane loaded self-nanoemulsifying drug delivery system containing medium chain mono and diglycerides”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
3. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “Development of in vitro lipolysispermeation method to estimate oral absorption of exemestane-loaded lipidbased formulation”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
4. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “Assessment the correlation between in vitro dissolution and in vitro intestinal lipolysis data for bosentan loaded lipidbased formulations”, 48th Annual Meeting of the Controlled Release Society (CRS), Virtual Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 25-29 July, 2021.

5. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “Evaluation of in vitro-in vivo relationship: Bosentan-loaded lipid based formulation versus commercial product”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey, 22-25 June 2021.
6. Yılmaz-Usta D, **Timur B**, Teksin ZS: “In vitro, ex-vivo, and in vivo evaluation of Bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2021, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.
7. Yılmaz-Usta D, Olgaç S, **Timur B**, Teksin ZS: “Enhancement of in vitro dissolution, in vitro lipolysis, ex-vivo permeability, and fasted and fed state bioavailability of Bosentan-solid SNEDDS: New oral drug delivery system for pulmonary arterial hypertension”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2021, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.
8. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “The development of exemestane-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2021, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.
9. **Timur B**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: “Comparison of in vitro lipolysis of bosentan-loaded lipid based formulationsin fasted state biorelevant media”, 12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Virtual Meeting, Vienna, Austria, 11-14 May, 2021.
10. **Timur B**, Olgaç S, Yılmaz-Usta D,Teksin ZŞ. “Evaluation of Fasted and Fed State Intestinal In Vitro Lipolysis Test for Bosentan Loaded Lipid-Based Drug Delivery Systems”, 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Çeşme İzmir, Turkey, October 14-16, 2019.

Burs

1. Eğitim Burs Programları. 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı, 2018 - 03.04.2018 - 30.03.2021.
2. Etkinliklere Katılma Destekleri. 2224-A Yurt Dışı Bilimsel Etkinliklere Katılımı Destekleme Programı, 2022 - 01.06.2022 - 03.06.2022.

Sertifika

1. Eğiticilerin Eğitimi Sertifikası. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Ereğli Eğitim Fakültesi. 5 Kasım 2022.
2. İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği Koordinatörlüğü. 25-26 Mayıs 2022.
3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu. 12-23 Şubat 2018.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…



Gavili olmak ayrıcalıktır