T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KATI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRMELER

DUYGU YILMAZ USTA

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2022


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

KATI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRMELER

Duygu YILMAZ USTA

DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2022

ETİK BEYAN

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

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

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

Duygu YILMAZ USTA
08/02/2022

KATI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRMELER
(Doktora Tezi)

Duygu YILMAZ USTA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2022

ÖZET

Bu tez çalışmasında, pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılan BCS Sınıf 2 ilaç olan bosentanın çözünürlük ve buna bağlı biyoyararlanım sorununun uygun formülasyon yaklaşımları ile iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, bosentanın katı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (S-SNEDDS) tableti geliştirilmiş ve in vitro-in vivo değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir. S-SNEDDS tablet elde etmek için öncelikle optimum kendiliğinden nanoemülsifiye sistem (SNEDDS) formülasyonu geliştirilmiştir. Bunun için uygun yağ, sürfaktan ve kosürfaktanlar deneysel tasarım (DoE) ile Design Expert® 10 programı kullanılarak belirlenmiştir. Hazırlanan optimum SNEDDS formülasyonun in vitro karakterizasyonları (damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, türbidite, % transmittans, viskozite ve stabilite) ve morfolojik incelemeleri yapılmıştır. Sıvı SNEDDS formülasyonu geniş spesifik yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, yüksek yağ adsorbsiyon kapasiteli adsorban taşıyıcı olan Neusilin® US2 kullanılarak katı forma dönüştürülmüştür. Elde edilen farklı oranlardaki toz kütleleri üzerinde toz karakterizasyon çalışmaları (küme ve sıkıştırılmış dansite, yığın açısı, Carr indeksi, Hausner oranı), katı hal karakterizasyon çalışmaları (SEM, DSC, FT-IR, X-RPD ve BET) ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. En uygun akış özelliği gösteren toz kütlesi belirlenerek doğrudan basım tekniği ile tablet haline getirilmiştir. Elde edilen tabletlerin karakterizasyonu (sertlik, çap-kalınlık, ağırlık sapması, ufalanma-aşınma, dağılma süresi, içerik tekdüzeliği) ve stabilitesi incelenmiştir. SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz, ex vivo permeabilite, in vivo farmakokinetik, açlık ve tokluk biyoyararlanım çalışmaları yapılmıştır. PAH oluşturulan sıçanlarda farmakodinamik çalışmalar yürütülerek ekokardiyografi ve histoloji değerlendirmeleri yapılmıştır. Farmakodinamik görüntüleme çalışmalarında In Vivo Imaging System (IVIS®) kullanılarak biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlar için in vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite çalışmalarından elde edilen sonuçlar referans ürüne (Tracleer®) göre daha yüksek bulunmuştur. SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları tokluk durumunda AUC ve C_{max}'ı sırasıyla 1,84 ve 5,15; 2,37 ve 4,73 kat artırmıştır ($p<0,05$). Referans ürün, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet için in vitro çözünme hızı ve in vivo plazma konsantrasyonu arasında MathLab® 9.10 programı kullanılarak IVIVR kurulmuştur. Sonuçta, geliştirilen formülasyonlar için yüksek korelasyon elde edilmiştir. Ekokardiyografi çalışmalarında klinik etkinlik açısından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Histoloji çalışmaları ile SNEDDS ve S-SNEDDS tabletin akciğer, karaciğer ve böbrekte histopatolojik parametreler üzerindeki tedavi edici etkisinin benzer olduğu ve bu formülasyonların daha düşük dozlarının referans üründen daha etkili olduğu belirlenmiştir. Biyodağılım çalışmalarında biyodağılım ve ex vivo organ tutulumunun geliştirilen formülasyonlarda arttığı görülmüş ve bu sonuç bosentanın biyoyararlanım artışını desteklemiştir.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Bosentan, katı kendiliğinden nano emülsifiye sistem, çözünme hızı, lipoliz, biyoyararlanım, IVIVR, ekokardiyografi, histoloji, biyodağılım
Sayfa Adedi : 483
Danışman : Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

DEVELOPMENT OF SOLID SELF EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS AND IN VITRO - IN VIVO EVALUATIONS
(Ph. D. Thesis)

Duygu YILMAZ USTA

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2022

ABSTRACT

This thesis was aimed to improve the solubility and bioavailability problem of bosentan, one of the BCS Class 2 drugs used in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH), using the appropriate formulation approaches. For this purpose, a bosentan solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) tablet was developed and in vitro-in vivo evaluations were carried out. To obtain S-SNEDDS tablets, firstly, an optimum self-nanoemulsifying system (SNEDDS) formulation was developed. For this, suitable oils, surfactants, and cosurfactants were determined using the Design Expert® 10 program with experimental design (DoE). The in vitro characterizations (droplet size, polydispersity index, turbidity, % transmittance, viscosity, and stability) and morphological analyzes of the prepared optimum SNEDDS formulation were performed. Liquid SNEDDS formulation was converted into a solid form using Neusilin® US2, an adsorbent carrier with large specific surface area, high porosity, high oil adsorption capacity. Powder characterization studies (density, angle of repose, Carr index, Hausner ratio), solid-state characterization studies (SEM, DSC, FT-IR, X-RPD, and BET), and stability studies were carried out on the powder masses of different ratios obtained. The powder mass with the most suitable flow characteristics was used to prepare the tablets by direct compression technique. The characterization of the tablets (hardness, diameter-thickness, weight deviation, friability, disintegration time, content uniformity) and stability was examined. In vitro dissolution, in vitro lipolysis, ex vivo permeability, in vivo pharmacokinetic, fasted and fed bioavailability studies were performed for SNEDDS, and S-SNEDDS tablet formulation. Pharmacodynamic studies were performed in PAH-induced rats. Echocardiography and histology evaluations were performed by conducting pharmacodynamic studies in PAH-induced rats. Biodistribution studies were carried out using in vivo imaging system (IVIS®) in pharmacodynamic imaging studies. Results from in vitro dissolution rate, in vitro lipolysis, and ex vivo permeability studies, were found to be higher for SNEDDS and S-SNEDDS tablet formulations compared to the reference product (Tracleer®). SNEDDS and S-SNEDDS tablet formulations have increased AUC and C_{max} in the fed state, respectively, 1,84, 5,15, 2,37, and 4,73 times ($p<0,05$). IVIVR was established using the MathLab® 9.10 program between in vitro dissolution rate and in vivo plasma concentration for the reference product, SNEDDS, and S-SNEDDS tablet. As a result, a high correlation was obtained for the developed formulations. No significant results were found in terms of clinical efficacy in the echocardiography studies. In histology studies, it was determined that the therapeutic effect of SNEDDS and S-SNEDDS tablets on histopathological parameters in the lung, liver, and kidney was similar and lower doses of these formulations were more effective than the reference product. In biodistribution studies, it was observed that biodistribution and ex vivo organ fluorescent emissions increased in the developed formulations, and this result supported the enhancement of bioavailability of bosentan.

Science Code : 1020
Key Words : Bosentan, solid self nanoemulsifying system, dissolution, lipolysis, bioavailability, IVIVR, echocardiography, histology, biodistribution
Page Number : 483
Supervisor : Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zor anımda arkamda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, akademik hayatta birlik olmanın kıymetini öğreten değerli hocam Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye, tez izleme jürimde yer alarak değerli fikirleri ve bilgileri ile çalışmalarıma yön veren Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK ve Prof. Dr. Hakan EROĞLU'na, ekokardiyografik çalışmalardaki yardımlarından dolayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Serdar KULA'ya ve Uzm. Dr. Akif KAVGACI'ya, histoloji çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Çiğdem ELMAS ve Dr. Öğr. Üyesi Perihan SEZGİNER'e, biyodağılım çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'dan Prof. Dr. Ercüment KARASULU, Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM ve Yük. Bio. Ebru ŞANCI'ya, in vivo deneylerde yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ayşe DEMİREL'e, çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan Ecz. Seval OLĞAÇ ve Arş. Gör. Burcu TİMUR'a, her koşulda sorularımı sabırla dinleyerek benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ, Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER, Dr. Öğr. Üyesi Serdar TORT'a, manevi desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, bana tez çalışmam dışında yeni şeyler öğreten Doç. Dr. Fatma Nur TUĞCU-DEMİRÖZ'e, anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bölüm sekreterimiz Fatma ÇELİK'e, in vivo deneylerde yardımlarından dolayı GÜEDAM personeli Hacer ŞİRİN'e, tablet çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Serdar ÜNLÜ ve Dr. Ecz. Mehtap SAYDAM'a, değerli desteklerinden dolayı Prof. Dr. Yeşim TEZEL KARASULU'ya, akademik hayata beraber başladığımız çalışma arkadaşından öte bana kardeş ve her zor anımda destek olan Dr. Öğr. Üyesi Sıla GÜLBAĞ PINAR ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÇOBAN'a, bu sürece yakından şahit olup sıkıntılı anlarımda destek olan arkadaşlarım Dr. Vet. Hek. Ufuk KAYA ve Vet. Hek. Zerrin ÖZEL KAYA'ya, etkin madde teminindeki desteklerinden dolayı Abdi İbrahim İlaç'a, tüm hayatım boyunca bana güvenen ve beni her koşulda destekleyen sevgili annem Nurdan YILMAZ ve babam Şükrü YILMAZ'a, en iyi dostum ve sırdaşım olan biricik kardeşim Op. Dr. Ebru ŞEMET'e, 15 senedir beni hiç yalnız bırakmayan her türlü derdimi dinleyen ve bir kez olsun desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım Utku USTA'ya, bu süreçte varlığıyla hayatımıza en mucizevi dokunuşu yaparak hayatımızı anlamlandıran canım oğlum Okyanus Kemal USTA'ya ve 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı çerçevesinde doktora eğitimimi ve SBAG 217S602 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xiii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xxii

RESİMLERİN LİSTESİ xxxi

SİMGELER VE KISALTMALAR xxxix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon ve Güncel Tedavi Yaklaşımları 3

2.2. Bosentanın Pulmoner Arteriyel Hipertansiyondaki Kullanımı 7

2.3. Bosentana Ait Genel Bilgiler 9

2.3.1. Bosentanın fizikokimyasal özellikleri 9

2.3.2. Bosentanın farmakolojik özellikleri 10

2.3.3. Bosentanın farmakokinetik özellikleri 14

2.4. Suda Çözünürlüğü Düşük Olan İlaçların Çözünürlük ve Biyoyararlanımlarını Arttırma Stratejileri 18

2.5. Bosentanın Çözünürlük ve Çözünmesinin Arttırılması ile İlgili Çalışmalar 20

2.6. Lipit Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler 21

2.6.1. Lipit formülasyon sınıflandırma sistemi 23

2.7. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler 26

Sayfa

2.7.1. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları ve dezavantajları 27

2.7.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunu etkileyen faktörler 32

2.7.3. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşum mekanizmaları 32

2.7.4. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan bileşenler 33

2.7.5. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması .. 35

2.7.6. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde yapılan kalite denetimleri 39

2.8. Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler 43

2.8.1. SEDDS'i S-SEDDS'e dönüştürmek için kullanılan katılaştırma teknikleri 45

2.8.2. SEDDS'i S-SEDDS'e dönüştürmek için kullanılan taşıyıcı materyaller 47

2.8.3. Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde yapılan kalite denetimleri 49

2.9. İn Vitro - İn Vivo İlişki (IVIVR) Kurulması 51

3. GEREÇ VE YÖNTEM 53

3.1. Gereç 53

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 53

3.1.2. Kullanılan antikor ve kitler 55

3.1.3. Kullanılan floresans boyalar 55

3.1.4. Kullanılan araç ve gereçler 55

3.1.5. Kullanılan yazılımlar 57

3.2. Yöntem 58

3.2.1. Bosentanın fizikokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar 60

3.2.2. Bosentanın in vitro miktar tayini 62

3.2.3. Bosentanın in vivo miktar tayini 70

Sayfa

3.2.4. SNEDDS formülasyonu geliştirme çalışmaları 72
3.2.5. S-SNEDDS tablet formülasyonu geliştirme çalışmaları..... 82
3.2.6. İn vitro çözünme hızı çalışmaları 89
3.2.7. İn vitro lipoliz çalışmaları..... 93
3.2.8. Ex vivo permeabilite çalışması..... 94
3.2.9. İn vivo çalışmalar 95
3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler..... 114
4.BULGULAR 117
4.1. Bosentanın Fizikimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar 117
4.1.1. %1 SLS içeren distile su ortamındaki çözünürlük çalışması 117
4.1.2. Partisyon katsayısının belirlenmesi..... 117
4.1.3. Partikül büyüklüğü analizi 118
4.1.4. FT-IR analizi 118
4.1.5. Erime derecesi tayini..... 120
4.1.6. X-RPD analizi 120
4.2. Bosentanın İn Vitro Miktar Tayini..... 121
4.2.1. Bosentanın UV spektrofotometrede dalga boyunun belirlenmesi 121
4.2.2. Bosentana ilişkin kalibrasyon doğruları..... 123
4.2.3. Bosentanın UV spektrofotometre ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu..... 128
4.2.4. Bosentanın HPLC ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu . 132
4.3. Bosentanın İn Vivo Miktar Tayini..... 155
4.3.1. Bosentanın LC-MS/MS miktar tayini yöntem validasyonu 157
4.4. SNEDDS Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları..... 173
4.4.1. Farklı yağlardaki çözünürlük çalışmaları..... 173

Sayfa

4.4.2. Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları ve üçgen faz diyagramlarının oluşturulması 176

4.4.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyonların bulunması 179

4.4.4. Etkin madde yükleme çalışmaları 198

4.4.5. Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmaları 198

4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları - I 213

4.6. S-SNEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları 219

4.6.1. S-SNEDDS için toz özelliklerinin incelenmesi 219

4.6.2. S-SNEDDS tozun tablet formülasyonu için katı hal karakterizasyonu 222

4.6.3. S-SNEDDS tablet basımı 241

4.6.4. S-SNEDDS ile geliştirilen tablet formülasyonunda yapılan kontroller 242

4.7. Referans Tablette Yapılan Kontroller 248

4.7.1. Sertlik 248

4.7.2. Çap-kalınlık 248

4.7.3. Ağırlık sapması 249

4.7.4. Ufalanma-aşınma 250

4.7.5. Dağılma süresi 250

4.7.6. İçerik tek düzeliği 251

4.8. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları - II 251

4.9. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları 259

4.10. Ex Vivo Permeabilite Çalışmaları 263

4.11. İn Vivo Çalışmalar 266

4.11.1. Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları 266

4.11.2. Farmakodinamik ve histolojik çalışmalar 281

Sayfa

4.11.3. Biyodağılım çalışmaları 371

5. TARTIŞMA 391

5.1. Bosentanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar 392

5.2. Bosentanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonları 393

5.2.1. Bosentanın in vitro miktar tayini yöntemleri ve validasyonları 393

5.2.2. Bosentanın in vivo miktar tayini yöntemi ve validasyonu 396

5.3. SNEDDS Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları 396

5.3.1. Yağlardaki çözünürlük çalışmaları 397

5.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması 398

5.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyonların bulunması 399

5.3.4. Etkin madde yükleme çalışmaları 402

5.4. SNEDDS Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon ve Stabilite Çalışmaları 403

5.4.1. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi 403

5.4.2. % Transmittans 404

5.4.3. Damlacık büyüklüğü ve PDİ 404

5.4.4. Damlacık büyüklüğü ve PDİ'ye pH ve sıvı hacminin etkisi 405

5.4.5. Türbidite ve viskozite 406

5.4.6. Termodinamik stabilite çalışmaları 406

5.4.7. Morfolojik analiz 407

5.4.8. Uzun dönem stabilite çalışmaları 407

5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları – I 407

5.6. S-SNEDDS Tablet Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları 409

5.6.1. S-SNEDDS tozun toz özelliklerinin incelenmesi 410

5.6.2. S-SNEDDS tozun katı hal karakterizasyonu 411

5.6.3. S-SNEDDS tablet basımı 413

Sayfa

5.6.4. S-SNEDDS toz ile geliştirilen tablet formülasyonunda yapılan kontroller 413

5.7. Referans Tablette Yapılan Kontroller 414

5.8. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları–II 414

5.9. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları 416

5.10. Ex Vivo Permeabilite Çalışmaları 419

5.11. İn Vivo Çalışmalar 420

5.11.1. Farmakokinetik ve biyorarlanım çalışmaları 420

5.11.2. Farmakodinamik ve histolojik çalışmalar 424

5.11.3. Biyodağılım çalışmaları 433

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 435

KAYNAKLAR 439

EKLER 473

EK-1. Etik Kurul Onayı 474

EK-2. Etik Kurul Onayı 475

ÖZGEÇMİŞ 476

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. DSÖ pulmoner hipertansiyon sınıflandırması 4

Çizelge 2.2. NYHA ve DSÖ'ye göre PAH fonksiyonel sınıflandırması..... 5

Çizelge 2.3. Endotelin reseptör antagonistleri ve piyasada bulunan dozaj formları..... 8

Çizelge 2.4. Referans ürün ile tedavide çok sık ve sık görülen yan etkiler 13

Çizelge 2.5. Oral uygulamadan sonra sağlıklı gönüllü ve PAH'lı hastalarda farklı dozlara ait farmakokinetik parametreler 15

Çizelge 2.6. BOS için sağlıklı yetişkin gönüllülerde ve pediyatrik hastalarda yapılan farmakokinetik klinik çalışma örnekleri 15

Çizelge 2.7. BOS-ilaç etkileşimleri 17

Çizelge 2.8. BOS ile yapılan oral formülasyon geliştirme çalışmalarına ait literatür örnekleri 21

Çizelge 2.9. LFCS için Tip I, II, IIIA, IIIB ve IV lipit formülasyonlarının tipik özellikleri 24

Çizelge 2.10. Oral lipit temelli kendiliğinden emülsifiye formülasyonların ticari ürünleri, patentleri ve patent durumları 29

Çizelge 2.11. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri 31

Çizelge 2.12. Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri 44

Çizelge 2.13. Farklı katılaştırma teknikleri ile elde edilen çeşitli S-SEDDS formülasyonlarına ait örnekler 46

Çizelge 2.14. Spesifik yüzey alanlarına ve kimyasal yapılarına göre taşıyıcı materyallerin sınıflandırılması 48

Çizelge 3.1. Farklı ortamlar için kullanılan HPLC yöntem koşulları 67

Çizelge 3.2. LC-MS/MS sistem özellikleri..... 70

Çizelge 3.3. LC-MS/MS sisteminin HPLC kısmında kullanılan akış gradienti... 71

Çizelge 3.4. LC-MS/MS sistemi cihaz şartları..... 71

Çizelge 3.5. Formülasyonda kullanılan bileşenler ve HLB değerleri..... 75

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.6. 3 merkezli BBD parametreleri 76

Çizelge 3.7. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri 77

Çizelge 3.8. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri 77

Çizelge 3.9. Yığın açısına göre akış özellikleri 84

Çizelge 3.10. Basılabilirlik (Carr) indeksine göre akış özellikleri 85

Çizelge 3.11. Hausner oranına göre akış özellikleri 85

Çizelge 3.12. FDA çözünme hızı veri tabanında BOS için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi 90

Çizelge 3.13. %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 çözünme hızı ortamlarının içerikleri 91

Çizelge 3.14. İn vitro çözünme hızı test koşulları 92

Çizelge 3.15. Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışma tasarımı 97

Çizelge 3.16. Farmakodinamik ekokardiyografi çalışma tasarımı 101

Çizelge 3.17. Histolojik çalışma tasarımı 104

Çizelge 3.18. Karaciğer ve böbrek dokularının H&E boyamasında kullanılan histopatolojik değerlendirme ölçeği 106

Çizelge 3.19. Karaciğer ve böbrek dokularının IHC boyama için değerlendirilmesinde kullanılan H-Score yöntemi 107

Çizelge 3.20. İn vivo ve ex vivo görüntüleme (biyodağılım) çalışma tasarımı ... 111

Çizelge 4.1. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında çözünürlük sonuçları 117

Çizelge 4.2. Partisyon katsayısı sonuçları 117

Çizelge 4.3. BOS'un metanol ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları 129

Çizelge 4.4. BOS'un metanol ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 129

Çizelge 4.5. BOS'un metanol ortamında ara kesinlik sonuçları 130

Çizelge 4.6. BOS'un metanol ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları 130

Çizelge 4.7. BOS'un metanol ortamında stabilite sonuçları 132

Çizelge 4.8. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları 133

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.9. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 134

Çizelge 4.10. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları 135

Çizelge 4.11. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamı için stabilite sonuçları.. 137

Çizelge 4.12. BOS'un FaSSIF ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları 138

Çizelge 4.13. BOS'un FaSSIF ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 139

Çizelge 4.14. BOS'un FaSSIF ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları 139

Çizelge 4.15. BOS'un FaSSIF ortamı için stabilite sonuçları 142

Çizelge 4.16. BOS'un FeSSIF ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları 143

Çizelge 4.17. BOS'un FeSSIF ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 143

Çizelge 4.18. BOS'un FeSSIF ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları 144

Çizelge 4.19. BOS'un FeSSIF ortamı için stabilite sonuçları 146

Çizelge 4.20. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları.. 147

Çizelge 4.21. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 148

Çizelge 4.22. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları. 148

Çizelge 4.23. BOS'un FaSSIF-V2 ortamı için stabilite sonuçları 151

Çizelge 4.24. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları.. 152

Çizelge 4.25. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları 152

Çizelge 4.26. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları. 153

Çizelge 4.27. BOS'un FeSSIF-V2 ortamı için stabilite sonuçları 155

Çizelge 4.28. BOS'a ait LC-MS/MS analiz verileri 156

Çizelge 4.29. LC-MS/MS analizi için BOS kalibrasyonu konsantrasyon aralığı 157

Çizelge 4.30. BOS'un stok çözelti kararlılığı sonuçları 158

Çizelge 4.31. BOS'un gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları 160

Çizelge 4.32. BOS'un günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları 162

Çizelge 4.33. BOS'un yöntem seçimliğine ait sonuçlar..... 164

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.34. BOS'un carry-over (taşınma) etkisi sonuçları 166

Çizelge 4.35. BOS'un matriks etkisi sonuçları 166

Çizelge 4.36. BOS'un dilüsyon doğruluğu sonuçları 167

Çizelge 4.37. BOS ve iç standart etadolak için LLOQ sonuçları 168

Çizelge 4.38. BOS'un kısa süreli oda sıcaklığı (KSOS) kararlılığı sonuçları 170

Çizelge 4.39. BOS'un donma erime kararlılığı (DEK) sonuçları 172

Çizelge 4.40. BOS'un yüksek çözünürlük gösterdiği yağlardaki çözünürlük değerleri 176

Çizelge 4.41. Maisine® SNEDDS formülasyonu için yağ-sürfaktan-kosürfaktan ve su oranlarını gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (K_m: 9:1) 177

Çizelge 4.42. Peceol® SNEDDS formülasyonu için yağ-sürfaktan-kosürfaktan ve su oranlarını gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (K_m: 9:1) 178

Çizelge 4.43. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri ve cevapları 180

Çizelge 4.44. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD model ve yanıtları ... 180

Çizelge 4.45. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü ve PDİ için modellere ait parametreler 180

Çizelge 4.46. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları 181

Çizelge 4.47. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD PDİ cevabı için ANOVA sonuçları 183

Çizelge 4.48. Maisine® SNEDDS hedef formülasyonunun 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri 187

Çizelge 4.49. Deneysel çalışmalar sonucunda Maisine® SNEDDS formülasyonu için elde edilen karakterizasyon özellikleri 188

Çizelge 4.50. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri ve cevapları 188

Çizelge 4.51. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD model ve yanıtları 189

Çizelge 4.52. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü ve PDİ için modellere ait parametreler 189

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.53. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları 189

Çizelge 4.54. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD PDİ cevabı için ANOVA sonuçları 193

Çizelge 4.55. Peceol® SNEDDS hedef formülasyonun 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri 197

Çizelge 4.56. Deneysel çalışmalar sonucunda Peceol® SNEDDS formülasyonu için elde edilen karakterizasyon özellikleri 198

Çizelge 4.57. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait disperse olabilme sonuçları 199

Çizelge 4.58. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifiye olma zamanı sonuçları 199

Çizelge 4.59. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar ve bileşenlerine ait % transmittans sonuçları 200

Çizelge 4.60. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları 200

Çizelge 4.61. Maisine® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü ve PDİ'sine pH ve sıvı hacmi etkisinin sonuçları 203

Çizelge 4.62. Peceol® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü ve PDİ'sine pH ve sıvı hacminin etkisinin sonuçları 204

Çizelge 4.63. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait türbidite sonuçları 205

Çizelge 4.64. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait viskozite sonuçları 205

Çizelge 4.65. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait ısıtma-soğutma döngüsü sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçlar 208

Çizelge 4.66. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait santrifüj sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları 208

Çizelge 4.67. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait dondurma-çözme sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları 209

Çizelge 4.68. BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait uzun dönem stabilite sonuçları 212

Çizelge 4.69. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 213

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.70. FaSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 213

Çizelge 4.71. FeSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 214

Çizelge 4.72. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 214

Çizelge 4.73. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 214

Çizelge 4.74. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS formülasyonların % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi 218

Çizelge 4.75. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için küme dansitesi sonuçları 219

Çizelge 4.76. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için sıkıştırılmış dansite sonuçları 220

Çizelge 4.77. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için yığın açısı sonuçları 220

Çizelge 4.78. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için Carr indeksi sonuçları 220

Çizelge 4.79. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için Hausner oranı sonuçları 221

Çizelge 4.80. Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarına ait BET sonuçları 241

Çizelge 4.81. S-SNEDDS tablete ait sertlik sonuçları 242

Çizelge 4.82. S-SNEDDS tablete ait çap-kalınlık sonuçları 243

Çizelge 4.83. S-SNEDDS tablete ait ağırlık sapması sonuçları 244

Çizelge 4.84. S-SNEDDS tabletlerin uzun dönem stabilitesine ait % BOS içeriği analiz sonuçları 247

Çizelge 4.85. Referans tablete ait sertlik sonuçları 248

Çizelge 4.86. Referans tablete ait çap-kalınlık sonuçları 249

Çizelge 4.87. Referans tablete ait ağırlık sapması sonuçları 250

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.88. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 251

Çizelge 4.89. FaSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 251

Çizelge 4.90. FeSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 252

Çizelge 4.91. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 252

Çizelge 4.92. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları 252

Çizelge 4.93. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi..... 256

Çizelge 4.94. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların kullanılan ortamlara göre çözünme hızı profillerinin f_2 benzerlik faktörü sonuçları 256

Çizelge 4.95. Referans tablet ve S-SNEDDS tablet formülasyonunun kullanılan ortamlara göre çözünme hızı profillerinin model bağımlı yöntem sonuçları 258

Çizelge 4.96. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların biyouyumlu ortamlarda % sulu faz BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi..... 263

Çizelge 4.97. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının akı ve permeabilite katsayısı sonuçları 265

Çizelge 4.98. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların permeabilite katsayısı için istatistiksel değerlendirmesi 265

Çizelge 4.99. Referans tablete kıyasla SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite artışları 266

Çizelge 4.100. Referans tablete kıyasla S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite artışları 266

Çizelge 4.101. Açlık grubuna ait farmakokinetik parametreler..... 274

Çizelge 4.102. Tokluk grubuna ait farmakokinetik parametreler 275

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.103. Başlangıca (sağlıklı hayvanlara) ait ekokardiyografik parametre sonuçları 283

Çizelge 4.104. Tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün ekokardiyografik parametre sonuçları 284

Çizelge 4.105. 14. gün tedavi ekokardiyografik parametre sonuçları 285

Çizelge 4.106. Başlangıç (sağlıklı hayvanların) ve tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün için ekokardiyografik parametre sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi 286

Çizelge 4.107. Referans tablet grubunda tedavinin 14. gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi..... 287

Çizelge 4.108. SNEDDS grubunda tedavinin 14. gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi..... 288

Çizelge 4.109. S-SNEDDS tablet grubunda tedavinin 14.gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi..... 289

Çizelge 4.110. Referans tablet - SNEDDS - S-SNEDDS tablet tedavi gruplarının 14. gün tedavi için ekokardiyografik parametresonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi..... 290

Çizelge 4.111. Kontrol gruplarının akciğer, karaciğer ve böbrek kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları 359

Çizelge 4.112. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının akciğer kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları..... 360

Çizelge 4.113. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının karaciğer kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları..... 361

Çizelge 4.114. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının böbrek kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları..... 362

Çizelge 4.115. Kontrol gruplarının akciğer kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 363

Çizelge 4.116. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının akciğer kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 364

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.117. Kontrol gruplarının karaciğer kesitlerine ait TROP2 ve TNF-α ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 365

Çizelge 4.118. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının karaciğer kesitlerine ait TROP2 ve TNF-α ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 366

Çizelge 4.119. Kontrol gruplarının böbrek kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 367

Çizelge 4.120. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının böbrek kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları 368

Çizelge 4.121. Akciğer, karaciğer ve böbreğe ait kesitlerde dejenerasyon H-Score değerlendirmesi için istatistiksel analiz sonuçları 369

Çizelge 4.122. Akciğer ve böbreğe ait kesitlerde Kaspaz-3 ve IL-6, karaciğere ait kesitlerde TROP2 ve TNF-α H-Score değerlendirmesi için istatistiksel analiz sonuçları..... 370

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. PAH ile ilişkili olduğu düşünülen fizyolojik yolaklar 6

Şekil 2.2. BOS'un kimyasal yapısı 9

Şekil 2.3. BOS'un etki mekanizması 11

Şekil 2.4. BOS metabolizması 16

Şekil 2.5. Oral lipit formülasyonların GİS'te transportu 23

Şekil 2.6. Üçgen faz diyagramının iki boyutlu gösterimi 36

Şekil 2.7. Lipitlerin GİK'teki sindirim süreci 42

Şekil 3.1. İn vitro çalışmalara ait yöntem akış şeması 59

Şekil 3.2. İn vivo çalışmalara ait yöntem akış şeması 60

Şekil 3.3. İn vivo ve ex vivo görüntüleme (biyodağılım) çalışmalarına ait akış şeması 110

Şekil 4.1. BOS'un partikül büyüklüğü analiz grafiği 118

Şekil 4.2. BOS'un FT-IR spektrumu 119

Şekil 4.3. BOS'un DSC termogramı 120

Şekil 4.4. BOS'un X-RPD diyagramı 121

Şekil 4.5. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu 122

Şekil 4.6. BOS'un distile su ortamında 20 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu 122

Şekil 4.7. BOS'un metanol ortamında 20 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu 123

Şekil 4.8. %1 SLS içeren distile su ortamında çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=220 nm, n=6, X_{ort} ± SS) 124

Şekil 4.9. %1 SLS içeren distile su ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH) 124

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10. Distile su ortamında partisyon katsayısı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=271 nm, n=3, X_{ort} ± SS)..... 125

Şekil 4.11. Metanol ortamında yağ çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=267 nm, n=6, X_{ort} ± SS)..... 125

Şekil 4.12. FaSSIF ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH) 126

Şekil 4.13. FeSSIF ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH) 126

Şekil 4.14. FaSSIF-V2 ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH) 127

Şekil 4.15. FeSSIF-V2 ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH) 127

Şekil 4.16. BOS'un metanol ortamında yağ çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6, X_{ort} ± SS) 128

Şekil 4.17. BOS içermeyen metanol ortamına ait özgünlük ve seçicilik UV spektrumu..... 131

Şekil 4.18. 20 µg/mL konsantrasyondaki BOS'un metanol ortamındaki özgünlük ve seçicilik UV spektrumu..... 131

Şekil 4.19. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH) 133

Şekil 4.20. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun %1 SLS içeren distile su ortamındaki kromatogramı 135

Şekil 4.21. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun %1 SLS içeren distile su ortamındaki kromatogramı 136

Şekil 4.22. BOS içermeyen %1 SLS içeren distile su ortamının kromatogramı 136

Şekil 4.23. 10 µg/mL BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki ortamındaki kromatogramı..... 136

Şekil 4.24. BOS'un FaSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH) 138

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.25. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FaSSIF ortamındaki kromatogramı 140

Şekil 4.26. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FaSSIF ortamındaki kromatogramı 140

Şekil 4.27. BOS içermeyen FaSSIF kromatogramı 141

Şekil 4.28. 20 µg/mL BOS'un FaSSIF ortamındaki kromatogramı 141

Şekil 4.29. BOS'un FeSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH) 142

Şekil 4.30. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FeSSIF ortamındaki kromatogramı 144

Şekil 4.31. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FeSSIF ortamındaki kromatogramı 145

Şekil 4.32. BOS içermeyen FeSSIF kromatogramı 145

Şekil 4.33. 20 µg/mL BOS'un FeSSIF ortamındaki kromatogramı 145

Şekil 4.34. BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH) 147

Şekil 4.35. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 149

Şekil 4.36. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 149

Şekil 4.37. BOS içermeyen FaSSIF-V2 kromatogramı 150

Şekil 4.38. 20 µg/mL BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 150

Şekil 4.39. BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH) 151

Şekil 4.40. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 153

Şekil 4.41. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 154

Şekil 4.42. BOS içermeyen FeSSIF-V2 kromatogramı 154

Şekil 4.43. 20 µg/mL BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı 154

Şekil 4.44. BOS (100 ng/mL) ait LC-MS/MS kromatogramı 156

Şekil 4.45. İç standart etadolaka (20 ng/mL) ait LC-MS/MS kromatogramı 156

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.46. LC-MS/MS analizi için BOS kalibrasyon eğrisi..... 157

Şekil 4.47. BOS ve iç standart (etadolak) içermeyen ortam kromatogramı 164

Şekil 4.48. BOS içermeyen, etadolak (20 ng/mL) içeren ortam kromatogramı . 165

Şekil 4.49. BOS (5 ng/mL) ve etadolak (20 ng/mL) içeren ortam kromatogramı 165

Şekil 4.50. BOS'un orta zincirli trigliseritlerdeki çözünürlüğü 173

Şekil 4.51. BOS'un orta zincirli mono ve digliseritlerdeki çözünürlüğü 174

Şekil 4.52. BOS'un uzun zincirli yağ asitlerindeki çözünürlüğü..... 174

Şekil 4.53. BOS'un uzun zincirli mono ve digliserit karışımları ve propilen glikol esterindeki çözünürlüğü..... 175

Şekil 4.54. BOS'un denenen tüm yağ gruplarındaki çözünürlüğü..... 175

Şekil 4.55. BOS'un en yüksek çözünürlük gösterdiği yağlar (n=3) 176

Şekil 4.56. Maisine® SNEDDS formülasyonu için üçgen faz diyagramı 178

Şekil 4.57. Peceol® SNEDDS formülasyonu için üçgen faz diyagramı 179

Şekil 4.58. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği..... 182

Şekil 4.59. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği 182

Şekil 4.60. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının PDİ üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği..... 184

Şekil 4.61. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının PDİ üzerine etkisini gösteren kontur grafiği 184

Şekil 4.62. Maisine® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğüne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği..... 185

Şekil 4.63. Maisine® SNEDDS formülasyonun PDİ'ye ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği..... 186

Şekil 4.64. Maisine® SNEDDS hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri..... 187

Şekil 4.65. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği..... 191

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.66. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği 191

Şekil 4.67. Peceol®, Labrasol® miktarının ve Peceol® - Labrasol® miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği 192

Şekil 4.68. Peceol®, Labrasol® miktarının ve Peceol® - Labrasol® miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği 192

Şekil 4.69. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin PDİ üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği 194

Şekil 4.70. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin PDİ üzerine etkisini gösteren kontur grafiği 194

Şekil 4.71. Peceol® SNEDDS formülasyonunda damlacık büyüklüğüne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği 195

Şekil 4.72. Peceol® SNEDDS formülasyonunda PDİ'ne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği 196

Şekil 4.73. Peceol® SNEDDS hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri 197

Şekil 4.74. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları 201

Şekil 4.75. BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları 201

Şekil 4.76. Etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları 202

Şekil 4.77. BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları 202

Şekil 4.78. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 215

Şekil 4.79. FaSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 215

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.80. FeSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 216

Şekil 4.81. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 216

Şekil 4.82. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 217

Şekil 4.83. BOS ve S-SNEDDS hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelere ait DSC termogramı 231

Şekil 4.84. BOS ve S-SNEDDS hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerin karışımları ve fiziksel karışıma ait DSC termogramı..... 231

Şekil 4.85. BOS, fiziksel karışım ve etkin madde içermeyen S-SNEDDS formülasyonlarına ait DSC termogramı 232

Şekil 4.86. BOS, fiziksel karışım ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarına ait DSC termogramı 232

Şekil 4.87. BOS, Neusilin® US2, BOS-Neusilin® US2 FT-IR spektrumu..... 233

Şekil 4.88. BOS, Maisine®, BOS-Maisine® FT-IR spektrumu 233

Şekil 4.89. BOS, Labrasol®, BOS-Labrasol® FT-IR spektrumu..... 234

Şekil 4.90. BOS, Cremophor® RH 40, BOS-Cremophor® RH 40 FT-IR spektrumu..... 234

Şekil 4.91. BOS, Magnezyum stearat, BOS-Magnezyum stearat FT-IR spektrumu..... 235

Şekil 4.92. BOS, Ac-Di-Sol®, BOS-Ac-Di-Sol® FT-IR spektrumu..... 235

Şekil 4.93. BOS, etkin madde içermeyen S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyon FT-IR spektrumu 236

Şekil 4.94. BOS, BOS yüklü S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyon FT-IR spektrumu..... 236

Şekil 4.95. Neusilin® US2'ye ait X-RPD diyagramı 237

Şekil 4.96. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 formülasyonuna ait X-RPD diyagramı..... 237

Şekil 4.97. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 formülasyonuna ait X-RPD diyagramı..... 238

Şekil 4.98. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait X-RPD diyagramı 238

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.99. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait X-RPD diyagramı 239

Şekil 4.100. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait X-RPD diyagramı 239

Şekil 4.101. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait X-RPD diyagramı 240

Şekil 4.102. BOS, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyonlarına ait X-RPD diyagramı 240

Şekil 4.103. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri 253

Şekil 4.104. FaSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri..... 253

Şekil 4.105. FeSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri..... 254

Şekil 4.106. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri..... 254

Şekil 4.107. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri..... 255

Şekil 4.108. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FaSSIF lipoliz ortamına ait profilleri..... 259

Şekil 4.109. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FaSSIF-V2 lipoliz ortamına ait profilleri 260

Şekil 4.110. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FeSSIF lipoliz ortamına ait profilleri..... 260

Şekil 4.111. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FeSSIF-V2 lipoliz ortamına ait profilleri 261

Şekil 4.112. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların 90 dakika lipolizi sonunda % sulu faz BOS miktarları..... 261

Şekil 4.113. Referans tablet ve SNEDDS formülasyonuna ait % difüze olan BOS-zaman profili 264

Şekil 4.114. Referans tablet ve S-SNEDDS tablet formülasyonuna ait % difüze olan BOS-zaman profili..... 264

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.115. Referans tablet açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 267

Şekil 4.116. Referans tablet açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 267

Şekil 4.117. SNEDDS formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 268

Şekil 4.118. SNEDDS formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 268

Şekil 4.119. S-SNEDDS tablet formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 269

Şekil 4.120. S-SNEDDS tablet formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) .. 269

Şekil 4.121. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarına ait açlık sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 270

Şekil 4.122. Referans tablet tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 270

Şekil 4.123. Referans tablet tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu - zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 271

Şekil 4.124. SNEDDS formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 271

Şekil 4.125. SNEDDS formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 272

Şekil 4.126. S-SNEDDS tablet formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6) 272

Şekil 4.127. S-SNEDDS tablet formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) .. 273

Şekil 4.128. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarına ait tokluk sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH) 273

Şekil 4.129. Referans tablet için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki 277

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.130. Referans tablet için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki..... 277

Şekil 4.131. SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki..... 278

Şekil 4.132. SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki..... 279

Şekil 4.133. S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki 280

Şekil 4.134. S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki 280

Şekil 4.135. ELISA yöntemi ile serum albümin düzeylerine ait sonuçlar..... 358

Şekil 4.136. IVIS® XenoLight™ DIR kontrol-SNEDDS formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması 376

Şekil 4.137. IVIS® XenoLight® DIR kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması 380

Şekil 4.138. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-SNEDDS formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması 385

Şekil 4.139. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması 390

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Dipserse olabilme çalışmalarında kullanılan sınıflandırma sistemi görseli 79

Resim 3.2. Farmakokinetik çalışmalarda kullanılan sıçan grupları 96

Resim 3.3. Sıçanlara oral gavaj uygulaması 98

Resim 3.4. Sıçanlarda kuyruk veninden kan alınması işlemi 99

Resim 3.5. Ekokardiyografik ölçüm işlemi 102

Resim 3.6. Balb/c farelere gavaj uygulaması 108

Resim 3.7. IVIS® cihazına ait görseller 109

Resim 3.8. IVIS® cihazına entegre anestezi sistemi ve işlem anından bir görüntü 111

Resim 4.1. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonuna ait görsel 206

Resim 4.2. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonuna ait görsel 206

Resim 4.3. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonuna ait görsel 207

Resim 4.4. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonuna ait görsel 207

Resim 4.5. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü 210

Resim 4.6. Etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü 210

Resim 4.7. BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü . 211

Resim 4.8. BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü... 211

Resim 4.9. 1:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri 221

Resim 4.10. 1,25:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri..... 222

Resim 4.11. 1,5:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri..... 222

Resim **Sayfa**

Resim 4.12. BOS'a ait 1000 X ve 5000 X ölçekli SEM görüntüleri 223

Resim 4.13. Neusilin® US2'ye ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri..... 224

Resim 4.14. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait 1000 X ölçekli SEM görüntüleri 225

Resim 4.15. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait 100 X ve 1000 X ölçekli SEM görüntüleri 226

Resim 4.16. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait 100 X ve 1000 X ölçekli SEM görüntüleri 227

Resim 4.17. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri 228

Resim 4.18. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait 100 X ve 2000 X ölçekli SEM görüntüleri 229

Resim 4.19. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri 230

Resim 4.20. Stabilite 1. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartlarıiçin S-SNEDDS tabletlerin görseli 245

Resim 4.21. Stabilite 3.ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli 246

Resim 4.22. Stabilite 6. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli 246

Resim 4.23. Stabilite 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli 247

Resim 4.24. PAH oluşumu sonrası akciğerde çilek görünümüne ait görsel..... 281

Resim 4.25. Kontrol grubu (G1) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler 291

Resim 4.26. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grup (G2) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler..... 292

Resim 4.27. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 293

Resim 4.28. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 293

Resim 4.29. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 294

Resim **Sayfa**

Resim 4.30. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 295

Resim 4.31. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 296

Resim 4.32. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 297

Resim 4.33. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 298

Resim 4.34. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 299

Resim 4.35. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 300

Resim 4.36. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler..... 301

Resim 4.37. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 302

Resim 4.38. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 303

Resim 4.39. 14 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 304

Resim 4.40. 15 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 304

Resim 4.41. Kontrol grubu (G1) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 305

Resim 4.42. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-1 306

Resim 4.43. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-2 307

Resim 4.44. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 308

Resim 4.45. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 309

Resim 4.46. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 310

Resim **Sayfa**

Resim 4.47. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 311

Resim 4.48. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 312

Resim 4.49. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 313

Resim 4.50. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 314

Resim 4.51. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 315

Resim 4.52. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 316

Resim 4.53. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü 317

Resim 4.54. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 318

Resim 4.55. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 319

Resim 4.56. 14 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 320

Resim 4.57. 15 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü..... 321

Resim 4.58. Kontrol grubu (G1) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-1. 322

Resim 4.59. Kontrol grubu (G1) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-2. 322

Resim 4.60. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grup (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-1 323

Resim 4.61. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-2 324

Resim 4.62. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 325

Resim 4.63. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 326

Resim **Sayfa**

Resim 4.64. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 327

Resim 4.65. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 328

Resim 4.66. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 329

Resim 4.67. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 330

Resim 4.68. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 331

Resim 4.69. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 332

Resim 4.70. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 333

Resim 4.71. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 334

Resim 4.72. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 335

Resim 4.73. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 336

Resim 4.74. 14 doz referans tablet tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü 337

Resim 4.75. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 339

Resim 4.76. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 341

Resim 4.77. IL-6 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 342

Resim 4.78. IL-6 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 344

Resim 4.79. TNF-α primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 345

Resim 4.80. TNF-α primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 347

Resim **Sayfa**

Resim 4.81. TROP2 primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 348

Resim 4.82. TROP2 primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 350

Resim 4.83. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 351

Resim 4.84. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 353

Resim 4.85. IL-6 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-1 354

Resim 4.86. IL-6 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-2 356

Resim 4.87. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 15. dakika görüntüleri 372

Resim 4.88. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 30. dakika görüntüleri 372

Resim 4.89. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 1. saat görüntüleri 373

Resim 4.90. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 2. saat görüntüleri 373

Resim 4.91. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 3. saat görüntüleri 374

Resim 4.92. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 4. saat görüntüleri 374

Resim 4.93. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 5. saat görüntüleri 375

Resim 4.94. IVIS® XenoLight™ DIR kontrol-SNEDDS formülasyon ex vivo görüntüleri 375

Resim 4.95. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 15. dakika görüntüleri 376

Resim 4.96. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 30. dakika görüntüleri 377

Resim 4.97. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 1. saat görüntüleri 377

Resim 4.98. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 2. saat görüntüleri 378

Resim 4.99. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 3. saat görüntüleri 378

Resim **Sayfa**

Resim 4.100. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 4. saat görüntüleri 379

Resim 4.101. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 5. saat bulguları..... 379

Resim 4.102. IVIS® XenoLight® DIR kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon ex vivo görüntüleri 380

Resim 4.103. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 15. dakika bulguları..... 381

Resim 4.104. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 30. dakika bulguları..... 382

Resim 4.105. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 1. saat bulguları 382

Resim 4.106. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 2. saat bulguları 383

Resim 4.107. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 3. saat bulguları 383

Resim 4.108. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 4. saat bulguları 384

Resim 4.109. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 5. saat görüntüleri 384

Resim 4.110. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-SNEDDS formülasyon ex vivo görüntüleri 385

Resim 4.111. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 15. dakika bulguları 386

Resim 4.112. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 30. dakika bulguları 386

Resim 4.113. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 1. saat bulguları..... 387

Resim 4.114. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 2. saat bulguları..... 387

Resim 4.115. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 3. saat bulguları..... 388

Resim 4.116. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 4. saat bulguları..... 388

Resim 4.117. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 5. saat görüntüleri 389

Resim **Sayfa**

Resim 4.118. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyonu ex vivo görüntüleri 389

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
$AUC_{0-\infty}$	Sıfırdan sonsuza kadar plazma-zaman eğrisi altında kalan alan
%	Yüzde
% VK	Yüzde varyasyon katsayısı
C_{max}	Plazmadaki maksimum konsantrasyon
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
k_d	Uzaklaşma hız sabiti
mAU	Mili-absorbans birimi
mL	Mililitre
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
λ_{maks}	Maksimum dalga boyu
X_{ort}	Örneklerin ortalaması
R^2	Regresyon katsayısı, korelasyon katsayısı
t_{max}	C_{max}'a ulaşmak için geçen süre
$t_{1/2}$	Biyolojik yarı ömür
V_d	Dağılma hacmi

Kısaltmalar	Açıklamalar
4-BBBA	4-bromobenzeneboronik asit
Abs	Absorbans
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BBD	Box-Behnken Design (Box-Behnken tasarım)
BCS	Biopharmaceutics Classification System (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi)
BET	Brunauer, Emmett ve Teller (Gözenekli yapılar için kullanılan bir ölçüm tekniği)
BOS	Bosentan monohidrat
BSS	Bağıl standart sapma
Cl	Klirens
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel taramalı kalorimetri)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzime bağlı immune sorbent deneyi)
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid (Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı)
FaSSIF-V2	Fasted State Simulated Intestinal Fluid-Version 2 (Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısının ikinci versiyonu)
FDA	Food and Drug Administration Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FeSSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid (Tokluk durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı)
FeSSIF-V2	Fed State Simulated Intestinal Fluid-Version 2 (Tokluk durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısının ikinci versiyonu)
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre)
GİK	Gastrointestinal kanal

Kısaltmalar	Açıklamalar
GİS	Gastrointestinal sistem
HLB	Hydrophilic–Lipophilic Balance (Hidrofilik-lipofilik denge)
ICH	The International Council for Harmonisation (Uluslararası uyum konseyi)
IHC	Immunohistochemical (İmmünohistokimyasal)
IL-6	Interleukin 6 (İnterlökin 6)
IVIVC	In Vitro-In Vivo Correlation (İn vitro-İn vivo korelasyon)
IVIVR	In Vitro-In Vivo Relationship (İn vitro-İn vivo ilişki)
Kaspaz-3	Sistein-aspartik asit proteaz 3
LFCS	The Lipid Formulation Classification System (Lipit formülasyon sınıflandırma sistemi)
LOD	Limit of Detection (En küçük saptayabilme sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (En küçük konsantrasyon değeri)
NTU	Nephelometric Turbidity Unit (Nefelometrik türbidite değeri)
PAH	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PAAcT	Pulmonary Artery Acceleration Time (Pulmoner arter akselerasyon zamanı)
PDİ	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
P-gp	P-glycoprotein (P-glikoprotein)
ROI	Region of Interest (İlişkili alan)

Kısaltmalar	Açıklamalar
PCHIP	Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomials (Parçalı kübik hermite interpolasyon polinomları)
SEDDS	Self-emulsifying Drug Delivery Systems (Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
SMEDDS	Self-microemulsifying Drug Delivery Systems (Kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler)
SNEDDS	Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems (Kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler)
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
TAPSE	Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (Triküspit kapak anuler plane sistolik ekskursiyonu)
TEM	Transmission Electron Microscope (Transmisyon elektron mikroskobu)
TNF-α	Tumour Necrosis Factor-alfa (Tümör nekroz faktörü-alfa)
TROP2	Human Trophoblast Cell Surface Antigen 2 (İnsan trofoblast hücre yüzeyi antijeni 2)
UV	Ultraviyole
X-RDP	X-Ray Powder Diffraction (X-ışını toz kırınımı)

1. GİRİŞ

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) dinlenme veya egzersiz esnasında pulmoner arteriyel basıncın artışı ile karakterize olup vasküler rezistansta artışa, sağ kalp yetersizliğine yol açmaktadır. Hastalığın kesin prevalansı tanısının zor olması nedeniyle tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalar sonucu dünya çapında yaklaşık olarak 25 milyon insanın PAH'dan etkilendiği düşünülmektedir. Hastalığın tedavisindeki yeni gelişmelere rağmen ciddi ve hayatı tehdit edici bir durum olmaya devam etmektedir.

Bosentan monohidrat (BOS) esansiyel hipertansiyonlu hastalarda kan basıncını sempatik sistem veya renin-anjiyotensin sistemi üzerinde etkisi olmaksızın düşüren spesifik tedavi grubunda yer almaktadır. BOS çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (Biopharmaceutics Classification System-BCS) Sınıf 2 (düşük çözünürlük/yüksek permeabilite) olarak değerlendirilmektedir. Sahip olduğu bu düşük çözünürlük nedeniyle emilimi ve biyoyararlanımı düşüktür.

PAH tedavisi zor bir tedavi süreci olup spesifik tedavide kullanılan BOS'un suda çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının düşük, dozunun yüksek olması ve pahalı bir ilaç olması yeni formülasyon yaklaşımlarını gerekli kılmıştır. Lipit temelli formülasyonların kullanılması, suda az çözünen bileşiklerin sınırlı ve öngörülemeyen oral biyoyararlanımının üstesinden gelmek için ticari olarak da uygulanabilir en önemli yaklaşımlardan biridir. Günümüzde etkin maddeleri çeşitli dozaj formlarında lipit taşıyıcılar ile kullanan farklı yaklaşımlar arasından, kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin (Self-nanoemulsifying Drug Delivery System-SNEDDS) biyoyararlanımı artırmada en başarılı yaklaşımlardan biri olduğu kanıtlanmıştır. Bu formülasyon sistemlerinin temel başarısı suda çözünmeyen ilaçların emülsiyonlar ve/veya miseller sistemler (kolloidal çözeltiler) oluşturulmasıyla çözünürlüğünün ve absorpsiyonunun artırılmasına dayanmaktadır. Bu sistemler su içermeyen emülsiyonlar olup, sulu faz ile temas ettiğinde kendiliğinden yağ/su emülsiyonu meydana getiren, doğal/sentetik yağların, katı/sıvı sürfaktanların veya alternatif olarak bir veya daha fazla hidrofilik

çözücü ve ilacın susuz izotropik karışımlarıdır. Bileşimlerinde yer alan sürfaktan ve kosürfaktanların P-glikoprotein (P-gp) inhibisyonu etkisiyle, uzun zincirli yağ asitlerinin de lenfatik sisteme geçiş etkisiyle etkin maddenin absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını artırabileceği belirtilmektedir. SNEDDS'in bu avantajlarına rağmen formülasyonları ve ambalajlanmaları sırasında pek çok zorlukla karşılaşılmaktadır. Ayrıca SNEDDS formülasyonlarında bulunan yüksek miktarda sürfaktan (%30-60) nedeniyle gastrointestinal sistemde (GİS) iritasyon görülmesi, sıvı SNEDDS formülasyonların yumuşak jelatin kapsüller içine endüstriyel dolumu için pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulması, kapsüllenebilen sistemlerin kapsüllerden sızması, formülasyon bileşenlerinin kapsül kabuğuna göç etme riski ve zayıf taşınabilirlik sorunları gibi stabilite sorunları da bulunmaktadır. Var olan dezavantajların üstesinden gelebilmek için sıvı SNEDDS formülasyonlarının katı bir dozaj formuna dönüştürülmesi hedeflenen bir yaklaşımdır. Sıvı SNEDDS'in katılaştırılması ile hem SNEDDS'in hem de konvansiyonel katı dozaj formun avantajlarını birleştirerek dezavantajların üstesinden gelinmesi amaçlanmaktadır. S-SNEDDS daha düşük üretim maliyetleri, birey içi ve bireyler arası değişkenlikte azalma, tekrarlanabilirlik, daha iyi taşınabilirlik, yüksek stabilite ve gelişmiş hasta uyuncu gibi önemli avantajlara sahip sistemlerdir.

“Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirmeler” isimli tez çalışması için model madde olarak seçilen BCS Sınıf 2 ilaç olan bosentan çözünürlük ve biyoyararlanım sorunu göstermektedir. Uygun formülasyon stratejileriyle biyoyararlanımının artırılması tedavi etkinliği, doz miktarının/sayısının ve yan etkilerinin azaltılması açısından gerekmektedir. Bu nedenle bosentanın çözünürlük, in vitro çözünme hızı, biyoyararlanımını, klinik etkinliğini artırmak, yan etki profilini azaltmak için lipit kaynaklı katı dozaj şeklinin tasarlanmasının piyasadaki dozaj şekline göre daha avantajlı olacağı düşünülmüş, biyodağılım çalışması ile geliştirilen formülasyonun in vivo gerçek zamanlı görüntülenmesi hedeflenmiştir. Literatürde bosentanın S-SNEDDS tablet formülasyonuna yönelik farmakokinetik ve farmakodinamik değerlendirmeler bulunmadığından yapılan çalışmalar özgün ve yenilikçidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon ve Güncel Tedavi Yaklaşımları

PAH nefes darlığı, yorgunluk, göğüs ağrısı ve senkop ile karakterize bir hastalık olup, küçük arterlerin ve arteriyollerin daralması sonucu pulmoner vasküler direncin artmasına neden olan ilerleyici, tedavi edilmezse sağ ventrikül yetmezliği ve ölümle sonuçlanan yaşamı tehdit edici bir hastalıktır (Gabbay, Fraser ve McNeil, 2007; Humbert, Sitbon ve Simonneau, 2004). PAH idiyopatik (primer) veya HIV enfeksiyonu, konjenital kalp hastalığı veya bağ dokusu hastalığı ile sekonder olarak görülebilmektedir (Alan ve Nalbantgil, 2010; Farber ve Loscalzo, 2004). PAH'da tanı sağ kalp kateterizasyonu ile elde edilen basınç ölçümlerine dayanmaktadır (You ve diğerleri, 2018). İstirahatte normal ortalama pulmoner arter basıncı 5-12 mmHg arasındayken PAH'ta ortalama pulmoner arteriyel basıncı istirahat halinde 25 mmHg, egzersiz sırasında 30 mmHg üzerinde olması şeklinde tanımlanabilmektedir (Cohen, Chahine, Hui ve Mukherji, 2004).

1998 yılında DSÖ tarafından pulmoner hipertansiyondaki patolojik farklılıkları ve tedavi sürecini daha iyi yönetebilmek için bir sınıflandırma (Evian Sınıflaması) oluşturulmuştur (Öztürk ve Şahin, 2009; Simonneau ve diğerleri, 2004) (Çizelge 2.1). Bu sınıflandırma yıllar içinde elde edilen yeni bilgiler doğrultusunda güncellenmiştir (Fukuda ve diğerleri, 2019; Yaghi, Novikov ve Trandafirescu, 2020).

Çizelge 2.1. DSÖ pulmoner hipertansiyon sınıflandırması (Öztürk ve Şahin, 2009; Simonneau ve diğerleri, 2004)

1. Pulmoner arteriyel hipertansiyon

Birincil pulmoner hipertansiyon

- *Sporadik*
- *Ailevi*

Kolajen vasküler hastalığa bağlı pulmoner hipertansiyon, konjenital sistemik pulmoner şantlar, portal hipertansiyon, insan immün yetmezlik viral enfeksiyonu, ilaçlar/toksinler (örneğin anoreksjenler), yenidoğanın persistan pulmoner hipertansiyonu ve diğerleri

2. Pulmoner venöz hipertansiyon

Sol taraflı atriyal veya ventriküler kalp hastalığı

Sol taraflı kalp kapak hastalığı

Pulmoner venlerin ekstrinsik kompresyonu

- *Fibrozan mediastinit*
- *Adenopati / tümör*

Pulmoner ven-tıkayıcı hastalık

Diğer

3. Solunum sistemi bozuklukları ve/veya hipoksemi ile ilişkili pulmoner hipertansiyon

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

İnterstisyel akciğer hastalığı

Uykuda solunum bozukluğu

Alveolar hipoventilasyon bozuklukları

Yüksek rakıma uzun süreli maruz kalma

Yenidoğan akciğer hastalığı

Alveolar kapiller displazi

Diğer

4. Kronik trombotik ve/veya embolik hastalığa bağlı pulmoner hipertansiyon

Proksimal pulmoner arterlerin tromboembolik tıkanması

Distal pulmoner arterlerin tıkanması

- *Pulmoner emboli*
- *Yerinde tromboz*
- *Orak hücre hastalığı*

5. Pulmoner damar sistemini doğrudan etkileyen bozukluklara bağlı pulmoner hipertansiyon

İnflamatuar

- *Şistozomiyaz*
- *Sarkoidoz*
- *Pulmoner kapiler hemanjiyomatoz*
- *Diğer*

PAH için hastalığın progresyonunu takipte ve tedavi yanıtını değerlendirmede fonksiyonel sınıflandırması yapılmalıdır. Bunun için ise New York Kalp Birliği (New York Heart Association-NYHA) ve DSÖ fonksiyonel alt sınıflandırılması kullanılmaktadır (Çizelge 2.2) (Galie ve diğerleri, 2004; Hoeper, 2005).

Çizelge 2.2. NYHA ve DSÖ'ye göre PAH fonksiyonel sınıflandırması (Galie ve diğerleri, 2004; Hoeper, 2005)

New York Kalp Birliği Fonksiyonel Sınıflaması

Sınıf I: Olağan fiziksel aktivitede semptom olmaması

Sınıf II: Olağan aktiviteyle semptomların bulunuşu ve aktivitenin hafif kısıtlanması

Sınıf III: Olağandan daha az aktiviteyle semptomların bulunuşu ve belirgin aktivite sınırlaması

Sınıf IV: Aktivite olmadan, istirahatte de semptomların bulunuşu

DSÖ Fonksiyonel Sınıflaması

Sınıf I: Fiziksel aktivitesinde herhangi bir kısıtlama olmayan pulmoner hipertansiyonlu hastalardır. Normal günlük aktivitede nefes darlığı, göğüs ağrısı, yorgunluk, senkop olmaz.

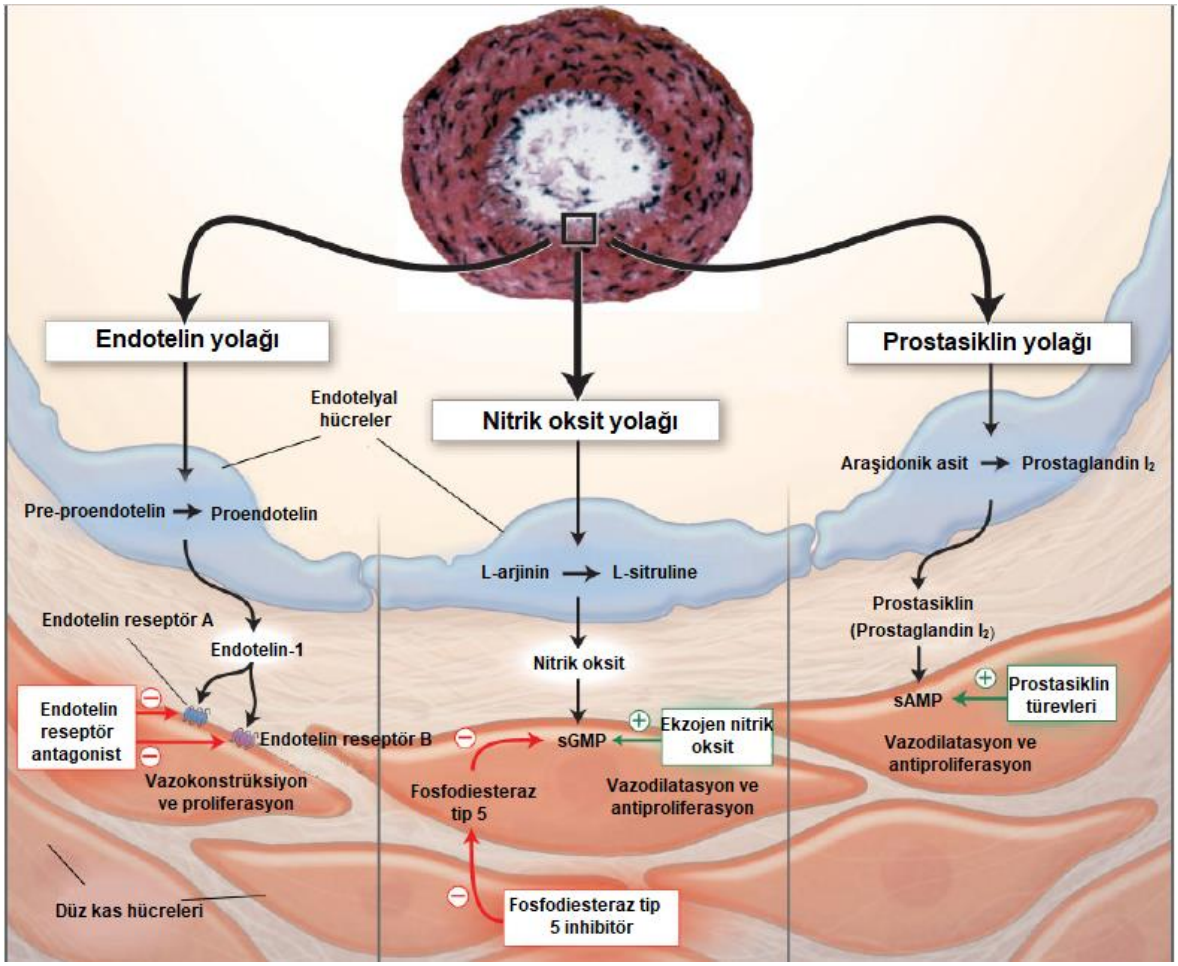
Sınıf II: Fiziksel aktivitelerinde minimal sınırlama oluşan PH'lu hastalarda normal günlük aktivitede nefes darlığı, göğüs ağrısı, senkop olur.

Sınıf III: Fiziksel aktivitesinde belirgin sınırlama olan pulmoner hipertansiyonlu hastalar. İstirahatte rahattırlar, normal sıradan aktivitelerinden daha azında bile nefes darlığı, göğüs ağrısı, yorgunluk, senkop benzeri etkiler oluşur.

Sınıf IV: Semptomsuz hiçbir fiziksel aktiviteyi yapamazlar. Sağ kalp yetmezliği semptomları, bulguları vardır. İstirahatte nefes darlığı, yorgunluk olabilir. Küçük bir aktiviteyle bile rahatsızlıkları artar.

PAH nadir bir hastalık olup insidansı milyonda bir olarak bilinmektedir (Gaine ve Rubin, 1998). Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre daha fazladır (Prakash ve Perry, 2002). PAH'ın patagonezi tam olarak bilinememekle birlikte PAH ve PAH'ın tedavisi konusundaki spesifik bilgiler açısından en anlamlı mekanizmaların endotelin, nitrik oksit ve prostasiklin yolağı ile ilişkili olanlar olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.1) (Humbert ve diğerleri, 2004). Bununla birlikte PAH'da pulmoner vasküler yanıtlara neden olabilecek ve her biri PAH'ın gelişiminde bir rol oynuyor olabilecek tromboksan A_2 (TxA_2), serotonin (5-HT), vazoaktif intestinal peptid (VIP), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), bir dizi başka vazoaktif

maddenin sentezlendiği ve salıverildiği de gözlemlenmiştir. Tüm bu etkenler PAH için etkili bir tedavinin geliştirilebilmesi için potansiyel önem taşımaktadır.



Şekil 2.1. PAH ile ilişkili olduğu düşünülen fizyolojik yolaklar (Humbert ve diğerleri, 2004)

PAH'ın primer (idiopatik) veya sekonder olup olmamasına bakılmaksızın ortak tedavi hedefleri ortaya konulmuştur. Bunlar:

- Vazodilatasyonun sağlanması
- Hücresel proliferasyonun baskılanması
- Pulmoner arter duvarındaki apopitozisin uyarılması
- Pulmoner vasküler direncin azaltılarak kardiyak debinin arttırılması
- Patogenez üzerine olan bu etkilere bağlı olarakta klinik semptomların azaltılması

- Yaşam kalitesinin arttırılması ve hastalığın progresyonunun olabildiğince yavaşlatılmasıdır (Archer ve Michelakis, 2009).

PAH tedavisi temel olarak:

- Önleyici tedaviler (pulmoner arter basıncını arttırıcı ve kardiyak debiyi azaltıcı zorlu egzersiz, yüksek rakımda uzun süre bulunma, uçak seyahati, kalp hastalıkları, hipoksi maruziyeti ve sigara içme gibi etkenlerin ortadan kaldırılması)
- Nonspesifik tedaviler (diüretikler, tuz kısıtlaması, dijitalizasyon ve oksijen desteği)
- Spesifik tedaviler (Kalsiyum kanal antagonistleri, prostanoidler, endotelin reseptör antagonistleri, fosfodiesteraz inhibitörleri, tirozin kinaz inhibitörleri (PDGF, VEGF üzerinden), rho-kinaz inhibisyonu, statinler vb. gibi)
- Alternatif tedaviler (gen tedavileri ve hücresel tedaviler) olmak üzere dört grupta sınıflandırılabilir (Boutet ve diğerleri, 2008; Olsson ve Hoeper, 2009; Rhodes, Davidson, Gibbs, Wharton ve Wilkins, 2009).

2.2. Bosentanın Pulmoner Arteriyel Hipertansiyondaki Kullanımı

Pulmoner hipertansiyonun kendisinin neden olduğu morbidite ve mortalite kadar önemli olan bir diğer unsur da bu hastalığa ikincil gelişen sağ ventrikül hipertrofisiyle birlikte giden sağ kalp yetmezliğidir (Palmer, 2009). Yapılan klinik araştırma sonuçlarına göre PAH'lı hastaların prognozunu belirleyen en önemli faktör sağ ventrikül yetmezliğidir (Bogaard ve diğerleri, 2009). Pulmoner arteriyel hipertansiyon ayrıca pek çok hastalığa bağlı (skleroderma, sistemik lupus eritematozis, Sjögren's sendromu, polimyozit, Hashimoto troiditi, HIV ve Human Herpes Virus-8 gibi) sekonder olarak gelişebilmektedir (Adanalı, 2011).

PAH'ın dünyada kesin prevalansı bilinmemektedir. İdiyopatik PAH Avrupa'da bir milyon kişi başına yaklaşık 6 kişiyi etkileyen nadir bir durumdur, ancak genel pulmoner hipertansiyon prevalansı %0,3-%6 arasında değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 200 000 hastaneye yatışta birincil veya ikincil

tanı olarak pulmoner hipertansiyon bulunur. Avustralya'da pulmoner hipertansiyon prevalansı yaklaşık %0,33'tür. Japonya ve Fransa ise sırasıyla nüfusun 100 000'de yaklaşık 10 ve 100 000'de 15'lik bir pulmoner hipertansiyon prevalansı bildirmiştir (Mocumbi, Thienemann ve Sliwa, 2015).

BOS (Ro 47-0203; Tracleer®, Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, İsviçre) spesifik tedavide PAH kullanımı için ilk geliştirilen ve ilk onaylanan peptit olmayan endotelin reseptör (ET_A ve ET_B) antagonistidir (McLaughlin ve diğerleri, 2005). Endotelin reseptörlerini bloke ederek sol ventrikül performansını iyileştiren, kardiyak vaskülarizasyonu azaltan ve sağkalımı iyileştiren bir vazodilatör ve nörohormonal bloker görevi görür (Ioselevich, Nogid ve Rozenfeld, 2001).

Oral BOS pulmoner hipertansiyonun tedavisi için Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından 20 Kasım 2001'de ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency-EMA) tarafından merkezi prosedürle 15 Mayıs 2002'de onaylanmıştır. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanan ticari preparatı 01 Nisan 2011 tarihinde pulmoner hipertansiyon endikasyonuna ek olarak dijital ülseri olan sistemik skleroz hastalarında yeni dijital ülser sayısının azaltılması endikasyonu için de onaylanmıştır. Çizelge 2.3'te Türk ilaç pazarında bulunan dozaj formları gösterilmiştir (RxMediaPharma, 2021).

Çizelge 2.3. Endotelin reseptör antagonistleri ve piyasada bulunan dozaj formları

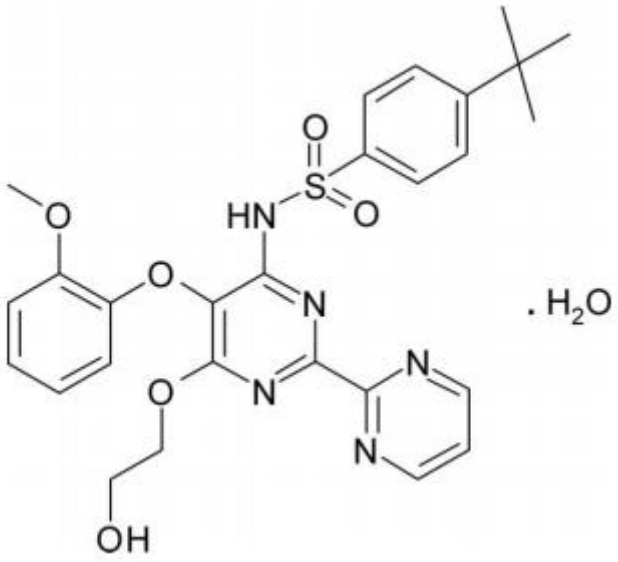
Etkin madde	Ticari isim	Dozaj formu	Doz	Firma
Bosentan monohidrat	Tracleer®	Film tablet	62,5-125 mg 56 Film tablet	Johnson & Johnson
	Diamond®	Film tablet	62,5-125 mg 56 Film tablet	Abdi İbrahim
	Tractan®	Film tablet	62,5-125 mg 56 Film tablet	Pharmactive
	Zepahex®	Film tablet	62,5-125 mg 56 Film tablet	Sanofi

2.3. Bosentana Ait Genel Bilgiler

2.3.1. Bosentanın fizikokimyasal özellikleri

BOS (Ro 47-0203) 1994 yılında Hoffman-La-Roche (Basel, İsviçre) tarafından geliştirilmiştir (Ono ve Matsumori, 2002). BOS katı formda, sarımsı-beyaz renkte bir tozdur. Katı halde çok stabildir, higroskopik değildir, polimorfizm göstermez ve ışıktan etkilenmez. Erime noktası 115°C'dir (Jadhav ve Pore, 2017).

BOS kiral merkez içermeyen sübstütiye bir primidin türevidir (FDA, 2003). Molekül ağırlığı 569,64 ve molekül formülü $C_{27}H_{29}N_5O_6S \cdot H_2O$'dur (Cohen ve diğerleri, 2004). Kimyasal adı 4-tert-butil-N-[6-(2-hidroksietoksi)-5-(2-metoksi-fenoksi)-[2,2´]-bipirimidin-4-yl]-benzensülfonamid monohidrattır ve kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir (Kaur ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.2. BOS'un kimyasal yapısı

BOS çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre, Amidon ve arkadaşları tarafından 1995 yılında oluşturulan BCS'e göre BCS Sınıf 2 olarak değerlendirilmektedir (Amidon, Lennernas, Shah ve Crison, 1995; Tiwari, Shikare ve Sontakke, 2014). pKa'sı 5,5'tir ve zayıf asidik özellik gösterir Roux, Breu, Ertel ve Clozel, 1999). Zayıf asidik özelliğinden dolayı Tsume ve arkadaşları tarafından yapılan BCS alt sınıflandırmasına göre BCS Sınıf 2a'dır (Tsume ve diğerleri,

2014). Sahip olduğu bu düşük çözünürlük nedeniyle emilimi ve biyoyararlanımı düşüktür.

Suda (1,0 mg/100 mL) ve düşük pH'lı sulu çözeltilerde az çözünür (pH 1,1 ve 4,0'da 0,1 mg/100 mLve pH 5,0'te 0,2 mg/100 mL). Yüksek pH'larda çözünürlüğü artar (pH 7,5'ta 43 mg/100 mL) (FDA, 2003). BOS aseton ve diklorometan içinde serbestçe çözünür, etanol ve etil asetat içinde çözünür, metanol ve izopropanol içinde biraz çözünür ve hekzan içinde çok az çözünmektedir (EMA, 2005).

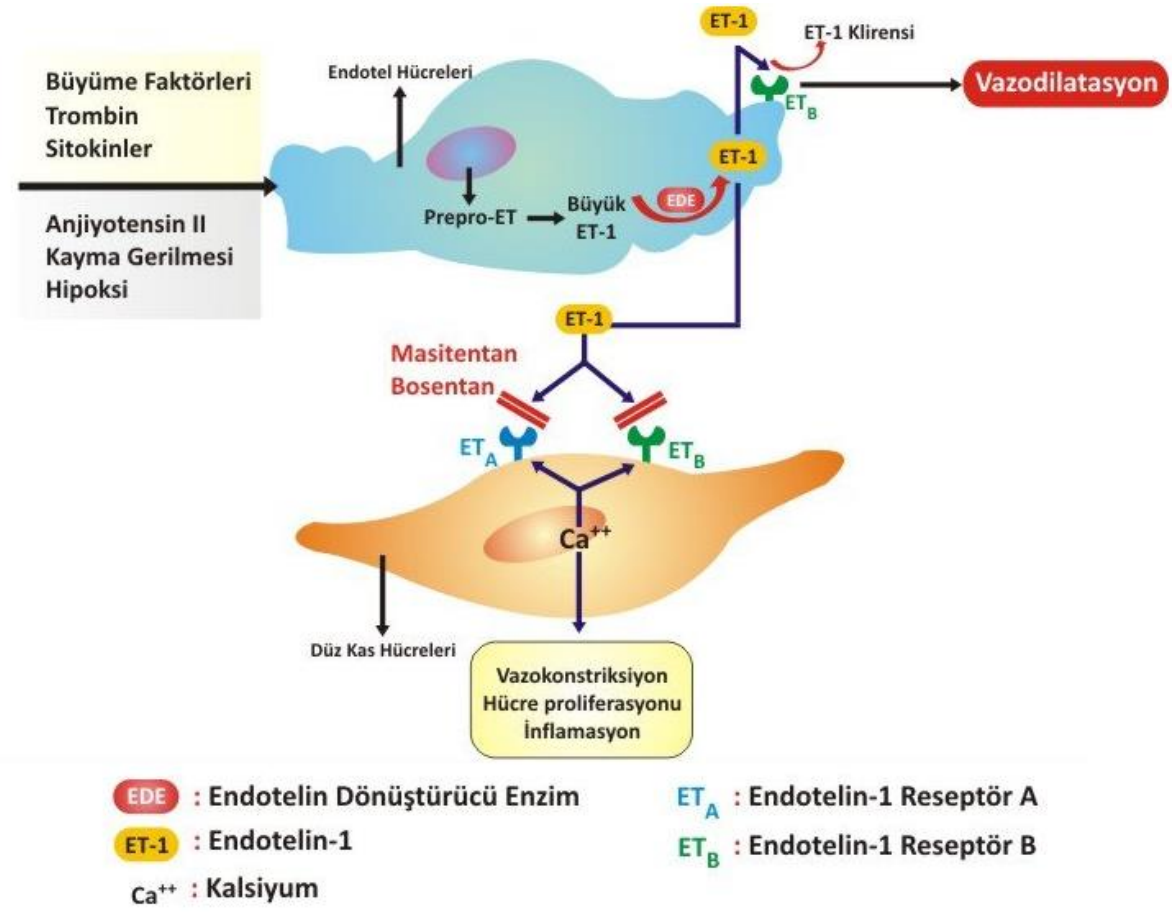
Bosentanın oktanol/tampon içinde partisyon katsayısı (log P) ise pH 4'te log P= 3,1, pH 7,4'te log D= 1,3 ile lipofilik bir etkin maddedir (EMA, 2005).

2.3.2. Bosentanın farmakolojik özellikleri

Endotel hücreleri tarafından salınan 21 aminoasitlik peptit olan endotelin 1 (ET-1) bilinen en güçlü vazokonstriktör ajan olup, pulmoner damarların düz kas hücrelerinde vazokonstriktör ve mitojen etkiler yaratır (Yanagisawa ve diğerleri, 1988). Endotelin reseptörleri G protein reseptör ailesinden olup endotelin A (ET_A) ve endotelin B (ET_B) olmak üzere iki izoformu mevcuttur. ET_A reseptörleri düz kas hücreleri ve kalp hücrelerinde, ET_B ise daha çok damar endotelinde, az bir kısmı ise düz kas hücrelerinde bulunur. Düz kas hücrelerinde ET_A ve ET_B reseptörlerinin etkinleşmesi vazokonstriksiyon, hücre proliferasyonu ve hipertrofiye neden olurken, endotel hücrelerindeki ET_B reseptörlerinin uyarılması nitrik oksit, prostasiklin gibi vazodilatörlerin salımını sağlayarak vazodilatasyona ve hiperproliferasyonun baskılanmasına yol açarak, ET-1'in zararlı etkilerini dengeleyebilir (D'Orleans-Juste ve diğerleri, 2002; Tokgoz, Can ve Kaymaz, 2010).

BOS'un etki mekanizması Şekil 2.3'te görüldüğü gibi hem tip A hem de tip B endotelin reseptörleri üzerinde spesifik ve kompetitif antagonizma ile gerçekleşir (RxMediaPharma, 2021). BOS esansiyel hipertansiyonlu hastalarda kan basıncını sempatik sistem veya renin-anjiyotensin sisteminde refleks bir uyarı olmaksızın düşürür. Pulmoner hipertansiyonda, sistemik vasküler rezistansı, pulmoner vasküler rezistansı ve ortalama pulmoner arteriyel basıncı kalp debisinde hafif bir

artma ile düşürür. Kalp debisinde yaptığı artma olasılıkla vasküler rezistanstaki düşmeye bağlıdır.



Şekil 2.3. BOS'un etki mekanizması (RxMediaPharma, 2021)

Klinik araştırmalar birçok PAH çalışmasında plasebo ile karşılaştırıldığında BOS kullanımının etkilerinin egzersiz kapasitesi, DSÖ fonksiyonel sınıfı, kardiyopulmoner hemodinami, yaşam kalitesi ve klinik kötüleşmeye kadar geçen sürenin uzaması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca uzun vadeli çalışmalar geçmiş kontrollerle karşılaştırıldığında BOS kullanımı ile sağkalımın arttığını göstermiştir (Gabbay ve diğerleri, 2007; Tokgoz ve diğerleri, 2010). Pilot, BREATHE-1, BREATHE-2, BREATHE-5 ve EARLY isimli beş randomize klinik çalışmada farklı nedenlere bağlı (idiyopatik, bağ dokusu hastalığı ve Eisenmenger sendromu) PAH hastalarında BOS'un etkinliği değerlendirilmiş ve egzersiz kapasitesi, işlevsel sınıf, hemodinamik durum, ekokardiyografi değişkenleri ve klinik bozulmaya dek geçen süre gibi farklı açılardan düzelmeler sağladığı

görülmüştür (Channick ve diğerleri, 2001; Humbert ve diğerleri, 2004; McLaughlin ve diğerleri, 2005; Rubin ve diğerleri, 2002; Sitbon ve diğerleri, 2005).

BOS ile ilgili ilk çift-kör, plasebo-kontrollü ve çok merkezli pilot çalışmada (Study 351) BOS'un egzersiz kapasitesi, kardiyopulmoner hemodinami üzerindeki etkisi, güvenilirliği ve toleritesi araştırılmıştır. Fonksiyonel Sınıf III veya IV olan idiyopatik PAH (İPAH) ve skloroderma ilişkili PAH'lı hastalarda 12. haftada altı dakika yürüme mesafesinde plasebo grubuna kıyasla BOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Channick ve diğerleri, 2001).

Bir başka klinik çalışma olan BREATHE-3 çalışmasında, 4-17 yaş arası 18 PAH hastasında BOS tek başına veya epoprostenol ile kullanıldığında 12 haftadan sonra anlamlı hemodinamik düzelmeler sağlamıştır (Barst ve diğerleri, 2003). Aynı araştırıcılar tarafından yayımlanan başka bir çalışmada BOS tedavi dozunun çocuklarda erişkinlere göre daha düşük tutulmasının etkin ve güvenilir olduğu gösterilmiştir. Rosenzweig ve arkadaşlarının çocuklarda yaptıkları retrospektif çalışmada ise uzun süreli BOS tedavisinin tek başına veya epoprostenol ya da treprostinil ile uygulanmasının etkin ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir (Beghetti ve diğerleri, 2009).

Diğer bir BOS ile ilgili olan BREATHE-4 çalışmasında ise HIV pozitif fonksiyonel sınıfı Sınıf III ve IV olan 16 PAH hastasında BOS ile 16. haftada altı dakika yürüme mesafesi, yaşam kalitesi skoru, işlevsel sınıfta ve ekokardiyografik belirteçlerde düzelmeler gözlenmiştir (Sitbon ve diğerleri, 2004).

Tüm bu bilgiler doğrultunda BOS NYHA'nın fonksiyonel sınıflandırmasına göre Sınıf II, III veya IV olan pulmoner hipertansiyonlu hastaların egzersiz kapasitesinin artırılması ve klinik semptomlarının düzeltilmesi için endike bulunmuştur (Heresi ve Minai, 2008; Oldfield ve Lyseng-Williamson, 2006; RxMediaPharma, 2021).

Pulmoner arteriyel hipertansiyonda oral olarak günde iki kez 62,5 mg'lık başlangıç dozu verildikten sonra doz 4 hafta sonra günde iki kez 125 mg'lık bir idame dozuna arttırılır. Düşük vücut ağırlığı olan hastalarda (40 kg'ın altında) başlangıç ve idame dozu günde 62,5 mg'dir. 1 yaş ve üzerindeki PAH'lı çocuklarda önerilen başlangıç

ve idame dozu, günde iki kez vücut ağırlığı kilogramı başına 2 mg'dır (EMA, 2015). Hamilelikte teratojenik etkisinden dolayı X kategorisinde yer almaktadır (FDA, 2003).

BOS için advers reaksiyonlara ait veriler ortalama tedavi süresi 45 hafta olan çeşitli terapötik endikasyonlarda yürütülen 20 plasebo kontrollü çalışmada, 100 mg ila 2000 mg arasında değişen günlük dozlarda tedavi gören toplam 2486 hasta, plasebo ile tedavi edilmiş 1838 hasta ve pazarlama sonrası verilerden elde edilmiştir (EMA, 2012). Yan etkiler ilacı kullanan hastaların en az %1'inde ve plasebodan en az %0,5 daha fazla sıklıkta meydana gelen olaylar olarak tanımlanmıştır. En sık görülen yan etkiler başağrısı (%11,5), ödem/sıvı tutulması (%13,2), anormal karaciğer fonksiyon testi (%10,9) ve anemi/hemoglobin azalmasıdır (%9,9). Karaciğer aminotransferazlarındaki doza bağlı yükselmeler hemoglobin konsantrasyonundaki düşüşler ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle karaciğer aminotransferaz seviyeleri BOS ile tedaviye başlamadan önce, tedavi sonrasında ve tedavi süresince aylık aralıklarla ölçülmelidir. Ek olarak herhangi bir doz artışından 2 hafta sonra karaciğer aminotransferaz seviyeleri ölçülmelidir (FDA, 2003). Çok sık ve sık görülen diğer yan etkiler ise Çizelge 2.4'te verilmiştir (EMA, 2012).

Çizelge 2.4. Referans ürün ile tedavide çok sık ve sık görülen yan etkiler (EMA, 2012)

Etkilenen organ/sistem	**Yan etki**
Kan ve lenfatik sistem bozuklukları	Kansızlık, hemoglobinde düşüş
İmmün sistem bozuklukları	Aşırı duyarlılık reaksiyonları
Sinir sistemi bozuklukları	Baş ağrısı, senkop
Kardiyak bozukluklar	Çarpıntı
Vasküler bozukluklar	Al basması, hipotansiyon
Solunum, göğüs ve mediastinal bozukluklar	Rinit
Gastrointestinal bozukluklar	Reflü, ishal
Deri ve derialtı doku hastalıkları	Eritem
Genel bozukluklar ve uygulama yeri reaksiyonları	Bitkinlik, ödem

2.3.3. Bosentanın farmakokinetik özellikleri

BOS yüksek değişkenlik gösteren bir ilaç olmakla birlikte ve farmakokinetiğinin cinsiyet, vücut ağırlığı, ırk veya yaştan etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir (FDA, 2003; Moreno, Ochoa, Roman, Cabaleiro ve Abad-Santos, 2016; Volz, Krause, Haefeli, Dingemanse ve Lehr, 2017). Çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı bireyler arası değişkenlik yüksektir (~%30) (Dingemanse ve van Giersbergen, 2004).

BOS klinik çalışmalar için oral ve intravenöz (iv) olarak verilmiştir. İlaç pazarında oral film kaplı tabletleri yer almaktadır (RxMediaPharma, 2021). Oral yoldan sağlıklı gönüllülere verilmesini takiben doruk plazma konsantrasyonlarına 3-5 saatte ulaşır. Mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %50'dir. Terminal yarı ömrü yaklaşık 5 saattir (Beghetti ve diğerleri, 2009). Dağılım hacmi küçüktür (18 litre); başta albümin olmak üzere plazma proteinlerine yüksek oranda (>%98) bağlanır; eritrositler içine penetre olmaz (FDA, 2003). Gıda alımının BOS'un emilim oranı ve miktarı üzerinde etkisi (gıda alımı ile C_{maks} %22 ve AUC %10 artmıştır) bulunmakla birlikte bu etki klinikte anlamlı görülmemiştir (Dingemanse, Bodin, Weidekamm, Kutz ve van Giersbergen, 2002).

BOS doza ve zamana bağlı farmakokinetik gösterir. Zamanla klirens artarken artan dozlarla klirens azalır. Oral uygulamadan sonra AUC yaklaşık 500 mg'a kadar doz orantılı olarak artmaktadır (EMA, 2005). Artan dozlarda gözlenen daha uzun eliminasyon yarı ömrü eğilimi, muhtemelen sınırlı emilimle ilişkilidir (flip-flop farmakokinetiği) (Dingemanse ve van Giersbergen, 2004). İV verilişte ise iki kompartmanlı nonlineer farmakokinetik görülür (Sato ve diğerleri, 2018).

İV ve oral uygulamadan sonra pulmoner arteriyel hipertansiyonu olan yetişkin hastalarda sağlıklı yetişkin deneklere göre BOS'a ait farmakokinetik sonuçlar yaklaşık 2 kat daha fazladır (Çizelge 2.5) (EMA, 2005). Ayrıca farmakokinetik parametrelerin farklı veriliş yolu, doz ve popülasyonlardaki etkilerinin belirlenebilmesi için sağlıklı yetişkin denekler ve pediyatrik hastalarda çoklu klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.6) (Zisowsky ve diğerleri, 2017).

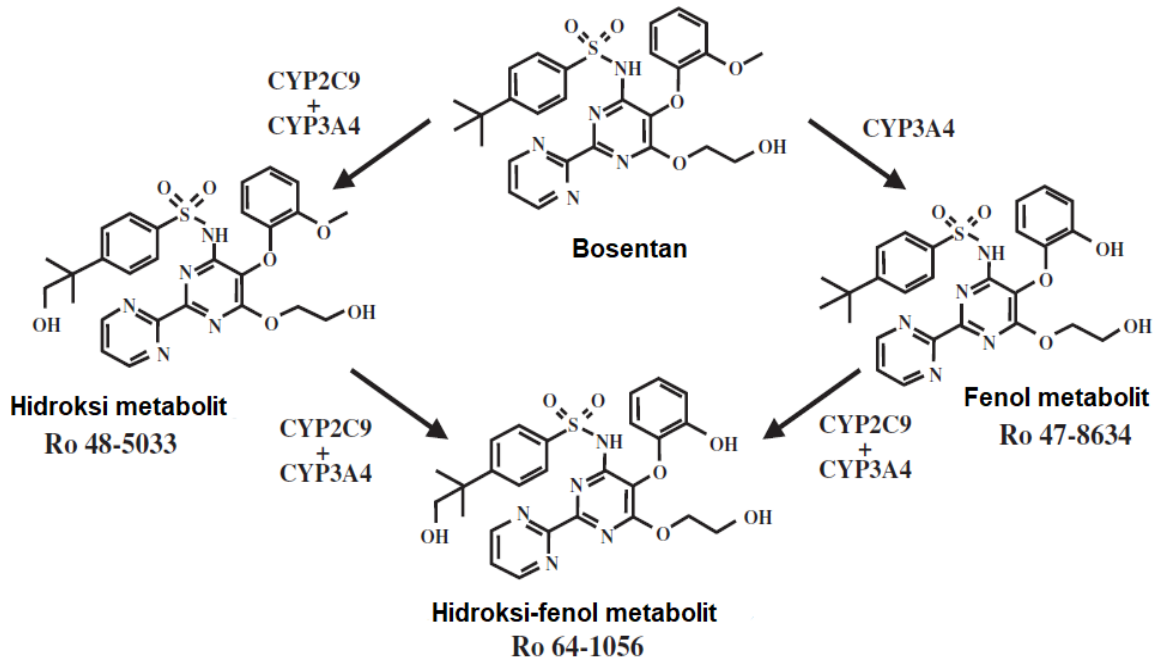
Çizelge 2.5. Oral uygulamadan sonra sağlıklı gönüllü ve PAH'lı hastalarda farklı dozlara ait farmakokinetik parametreler (EMA, 2005)

Popülasyon	Doz	AUC (ng.h/mL)	C_{max} (ng/mL)
Sağlıklı gönüllü	62,5 mg günde 2 kez	2857	544
PAH'lı hasta	62,5 mg günde 2 kez	6232	1187
Sağlıklı gönüllü	125 mg günde 2 kez	4804	1083
PAH'lı hasta	125 mg günde 2 kez	8912	2286

Çizelge 2.6. BOS için sağlıklı yetişkin gönüllülerde ve pediyatrik hastalarda yapılan farmakokinetik klinik çalışma örnekleri

Çalışma kodu	Veriliş yolu ve dozu	Çalışılan popülasyon ve denek sayısı	Referans
B-162287	IV, tek doz	64 sağlıklı denek	(Weber ve diğerleri, 1996)
AC-052-106	Oral, tek doz	16 sağlıklı denek	(Dingemanse ve diğerleri, 2002)
B-159037	Oral, artan çoklu dozlarda	24 sağlıklı denek	(Weber ve diğerleri, 1999)
FUTURE-1	Oral, günde iki kez 2 mg/kg	11 pediyatrik PAH hastası	(Beghetti ve diğerleri, 2009)
FUTURE-3	Oral, günde iki kez veya üç kez 2 mg/kg	64 pediyatrik PAH hastası	(Berger ve diğerleri, 2017)

BOS organik anyon taşıyan polipeptitler (OATP1B1 ve OATP1B3) yoluyla hepatositlere alındıktan sonra sitokrom P450 (CYP) izozimleri CYP3A4, CYP2C9 ve CYP2C19 tarafından metabolize edilir (Volz ve diğerleri, 2017). Metabolizasyon sonrası üç metaboliti (Ro 48-5033, Ro 47-8634 ve Ro 64-1056) oluşmaktadır (Oldfield ve Lyseng-Williamson, 2006). Bu metabolitlerden Ro 48-5033 BOS'un etkisinin %10-%20'sine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Dingemanse ve diğerleri, 2002). Karaciğerdeki metabolizmasını takiben safradan atılır. Verilen dozun %3'ten düşük bir bölümü idrardan geri kazanılır.



Şekil 2.4. BOS metabolizması (Dingemanse ve diğerleri, 2002)

BOS CYP2C9 ve CYP3A4'ün bir indükleyicisi olması nedeni ile muhtemel ilaç etkileşimi açısından önem taşımaktadır. Çizelge 2.7'de BOS ile etkileşim gösteren bazı ilaçlar verilmiştir (FDA, 2003).

Çizelge 2.7. BOS-ilaç etkileşimleri (FDA, 2003)

Birlikte verilen ilaç	BOS üzerine etkisi	Birlikte verilen ilaç üzerine etkisi	Öneriler
CYP3A4 substratları			
Siklosporin	↑AUC_{12}	↓C_{max} ve AUC_{12} ↓AUC_{τ}	Kontraendikedir.
Glibenklamid	↓AUC_{τ}	↓AUC_{τ} β-hidroksiasit ve simvastatin	Aminotransferazları arttırdığı için kullanılamamalı (AB); kontraendike (ABD).
Simvastatin	Değişiklik yok		Kolesterol seviyelerinin izlenmesi ve doz ayarlaması düşünülmelidir.
CYP3A4 inhibitörleri			
Ketokonazol	↑C_{max} ve AUC_{τ}		BOS için dozaj ayarlamasına gerek yoktur. BOS'ın etkisinde artış gözlemlenebilir. Kombinasyon önerilmez.
CYP2C9 ve CYP3A4 substratları			
Varfarin		↓ AUC_{∞} ve $t_{1/2}$ R-varfarin ve S-varfarin	Varfarin için doz ayarlanmasına gerek yoktur. Varfarin ve benzeri antikoagülanlar ve bosentanın tedavide birlikte kullanıldığı durumlarda kan pıhtılaşması için uluslararası standardize oran (International Normalized Ratio – INR) izlemi önerilmektedir
CYP2C9 ve CYP3A4 indükleyicileri			
Rifampisin	↓AUC_{τ}		Tavsiye edilememektedir (AB); ilk 4 hafta karaciğer fonksiyonlarının izlenmesi ardından normal gözlem önerilmektedir (ABD).
CYP2C9 ve CYP3A4 inhibitörleri			
Flukonazol	BOS plazma konsantrasyonlarında artış		Kombinasyonu önerilmez.
Antiretroviral Ajanlar			
Lopinavir+ritonavir	↑C_{min}	↓ AUC	BOS'ın tolere edilebilirliği ve HIV tedavisinin izlenmesi önerilir (AB); BOS için doz ayarlanması önerilir (ABD).
Diğerleri			
Digoksin		↓C_{max}, C_{min} ve AUC_{24}	Klinik açıdan ilişki olası değildir
Epoprostenol	AUC_{τ} ve C_{max}'ta değişiklik yok.		
Sildenafil	↑C_{max} ve AUC_{τ}	↓C_{max} ve AUC_{∞} veya AUC_{τ}	Dikkat edilmesi önerilir (AB); doz ayarlaması gerekli değildir (ABD).
Takrolimus/Sirolimus	Plazma konsantrasyonunu arttırabilir.		Birlikte verilmesi tavsiye edilmez (AB); BOS ve takrolimus birlikte alındığında dikkat edilmesi önerilir (ABD).

Çizelge 2.7. (devam) BOS-ilaç etkileşimleri

Etinilestradiol/ noretisteron	↓ AUC_{∞}	Bosentan hormonal kontraseptiflerin etkinliğinde azalmaya neden olduğundan hormonal kontraseptifler tek başlarına güvenilir kontrasepsiyon yöntemleri olarak kabul edilmez.
Nevirapin		Belirgin hepatotoksisitesi nedeni ile bosentanın karaciğer toksisitesini arttıracağından birlikte kombinasyonu önerilmez.

↓: azalma, ↑: artma, **AUC_T**: doz aralığında eğri altında kalan alan, **AUC_{∞}**: sonsuza kadar eğri altında kalan alan, **AUC_{12}**: 12. saate kadar eğri altında kalan alan, **AUC_{24}**: 24. saate kadar eğri altında kalan alan, **C_{max}**: maksimum plazma konstrasyonu, **C_{min}:** minimum plazma konsantrasyonu, **AB**: Avrupa ülkeleri, **ABD**: Amerika

Bu etkileşimlerin yanında verileri eksik olmakla birlikte karbamazepin, fenobarbital, fenitoin ve sarı kantaron da CYP3A4 indükleyicisi olduğundan BOS'un etkisini azaltması beklenir (Dhillon ve Keating, 2009; EMA, 2012).

BOS'un farmakokinetiği hem iv hem de oral uygulamayı takiben çeşitli hayvan türlerinde de karakterize edilmiş ve hayvan türleri arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. BOS sıçanlara, farelere ve köpeklere oral yoldan uygulandığında iyi biyoyararlanım (%50-%70) göstermiştir. Sıçan ve farede görülen etki dişilerde erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur. BOS metabolizması (insan dahil) tüm türlerde benzerdir. BOS metabolitlerinin tamamına yakını safra yoluyla atılır ve çok az değişmemiş ilaç saptanır. Böbrekten atılımı ise ihmal edilebilir düzeydedir (EMA, 2005).

2.4. Suda Çözünürlüğü Düşük Olan İlaçların Çözünürlük ve Biyoyararlanımlarını Arttırma Stratejileri

Yeni geliştirilen aday ilaç moleküllerin sadece %8'i yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite gösterirken, yaklaşık %40'ı suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle formülasyon zorluğu göstermekte ve ilaç geliştirme çalışmalarında başarısız olmaktadır (Kansara, Panola ve Mishra, 2015). Oral bir formülasyon verildiği zaman sistemik dolaşıma ulaşması için önce mide ve/veya bağırsak sıvılarında çözünmesi sonra gastrointestinal kanal (GIK) membranlarından emilmesi gerekir. Etkin maddelerin zayıf suda çözünürlüğü ise sınırlı ilaç emilimi

ve ilaçların düşük biyoyararlanım göstermesi ile sonuçlanmaktadır. Bu oral yoldan bir etkin madde verildiğinde karşılaşılabilecek potansiyel problemler arasında en önemli sorundur. Bir ilacın terapötik etkinliği biyoyararlanımına ve nihayetinde ilaç moleküllerinin çözünürlüğüne bağlıdır.

BCS bir ilaç etkin maddesinin sudaki çözünürlüğüne ve bağırsak geçirgenliğine dayanarak sınıflandırılması için bilimsel bir temel sunar (Vranikova ve Gajdziok, 2013). Bir ilaç adayının makul bir membran geçirgenliği varsa genellikle emilim oranını sınırlayan basamak ilacın çözünme aşamasıdır. Bu BCS Sınıf 2 olan suda düşük çözünürlük, yüksek membran permeabilitesi gösteren ilaçların karakteristiğidir. Membran geçirgenliği zayıf ve suda çözünürlüğü düşük hidrofobik ilaçlar ise BCS Sınıf 4 ilaçlar olarak kategorize edilir (Pouton, 2006). BCS Sınıf 2 ve Sınıf 4 ilaçlarda hız sınırlayıcı adım dozaj formundan ilacın salımı ve mide sıvılarındaki çözünürlüktür (Kumar ve Singh, 2016). Dolayısıyla etkin maddelerin oral biyoyararlanımını geliştirmeye odaklanan farmasötik çalışmalar suda çözünür olmayan ilaçların çözünürlüğünün ve çözünme hızının arttırılmasını veya bir dozaj formu kullanılarak çözünme problemini önlemeye odaklanır (Fricker ve diğerleri, 2010; Patel, Kamble, Katedeshmukh, Zarikar ve Kulkarni, 2013).

Yukarıda bahsedilen çözünürlük ve biyoyararlanım ile ilgili problemlerin üstesinden gelmek için kullanılan formülasyon yaklaşımları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Chatterjee, Almurisi, Dukhan, Mandal ve Sengupta, 2016; Feeney ve diğerleri, 2016; Pathak ve Raghuvanshi, 2015):

- Mikronizasyon veya nanonizasyon yoluyla partikül boyutunun küçültülmesi
- Ön ilaç yaklaşımı
- Tuz oluşumu
- Permeasyon arttırıcıların kullanımı
- pH ayarlaması
- Katı dispersiyonlar
- Siklodekstrin kompleksleri
- Katı çözeltilerin veya amorf katıların oluşumu
- Kristal davranışlarının modifikasyonu

- Sürfaktan-kosürfaktan kullanımı

2.5. Bosentanın Çözünürlük ve Çözünmesinin Arttırılması ile İlgili Çalışmalar

BOS Bölüm 2.3'te belirtilen lipofilik yapıya sahip olması, düşük çözünürlük göstermesi ve çok sık görülen doza bağlı karaciğer fonksiyon testlerindeki anormal değişiklikler gibi yan etkiler nedeni ile tedavide bazı sınırlamalara sahiptir. Bu sınırlamaların yanı sıra zayıf asidik özellik ve pH'ya bağlı çözünürlük göstermesi çözünme, oral emilim ve bunların da sonucunda bireylerarası değişkenlik üzerine önemli ölçüde etki etmektedir (Sato, 2016).

Literatüre bakıldığında BOS'un bu problemlerine yönelik sınırlı sayıda kapsamlı formülasyon çalışması olmadığı görülmektedir. Gerçekleştirilen çalışmaların çoğu BOS'un tedavide kullanımına yönelik tedavi etkinliğinin araştırıldığı klinik çalışmalardır.

BOS'un çözünürlüğü/çözünme hızının arttırılması ve böylelikle biyorarlanımının arttırılması amacı ile osmotik kontrollü tablet (Hussain, Krishna ve Anjum, 2015), katı dispersiyon (Harish, Murthy ve Chandrasekhar, 2017), sentetik/doğal polimerler kullanılarak hazırlanan uzatılmış salımlı matriks tabletler (Kumar, Sreekanth ve Satyavati, 2014a, 2014b), mukoadezif mikroküre (Vani ve Maravajala, 2016), transdermal yama (Mannam ve Yallamalli, 2015), inhale kontrollü salım polimerik kolloidi (Hanna, Basalious ve ELGazayerly, 2017), kendiliğinden mikroemülsifiye sistem (Vadlamudi, Yalavarthi, Basaveswara Rao, Rasheed ve Tesejwari, 2017) ve kendiliğinden nanoemülsifiye sistem (Panigrahi, Jena, Jena, Patra ve Rao, 2018) gibi farklı veriliş yolları için geliştirilmiş olan formülasyon yaklaşımları bulunmaktadır. BOS'un oral formülasyonlarının geliştirilmesine ait diğer örnek çalışmalar ise Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.8. BOS ile yapılan oral formülasyon geliştirme çalışmalarına ait literatür örnekleri

Geliştirilen formülasyon	Sonuçlar	Referans
Kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SNEDDS)	Tavşanlarda etkin madde ile karşılaştırıldığında AUC'de 2,5 kat, C_{max}'da 3 kat artış. t_{max} açısından etkin madde 6 saat iken SNEDDS 3 saat bulunmuştur.	(Panigrahi ve diğerleri, 2018)
Graft kopolimer taşıyıcı (nanokompozit)	Soluplus: Bosentan (5:1) fiziksel karışımı BOS'un çözünürlüğünü 5,08 kat, Soluplus: Bosentan (5:1) nanokompoziti 6,83 kat artırmıştır. Nanokompozit formda biyoyararlanım 1,41 kat artırmıştır.	(Kendre ve Chaudhari, 2018)
Nanosüspansiyon	Geliştirilen nanosistem bosentanın çözünürlüğünü 7 kat artırmıştır.	(Ghasemian, Motaghian ve Vatanara, 2016
Katı dispersiyon	Gelucire 50/13 ve Poloksamer 188 ile hazırlanan katı dispersiyonlar bosentanın çözünürlüğünü sırasıyla 8 ve 10 kat artırmıştır.	(Panda, Das ve Panigrahi, 2016)
İnklüzyon kompleksi	Elde edilen iki farklı kompleks saf BOS'un çözünürlüğünü sırasıyla 999 ve 7167 kat arttırmıştır.	(Jadhav ve Pore, 2017)
Katı dispersiyon	Gelucire44/14, Poloxomer407 ve BOS (1:1,5:0,75) ile hazırlanan katı dispersiyonu bosentanın çözünürlüğünü 14 kat, çözünme hızını ticari tablete göre %30 oranında artırmıştır.	(Saudagar ve Patil, 2016)

2.6. Lipit Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler

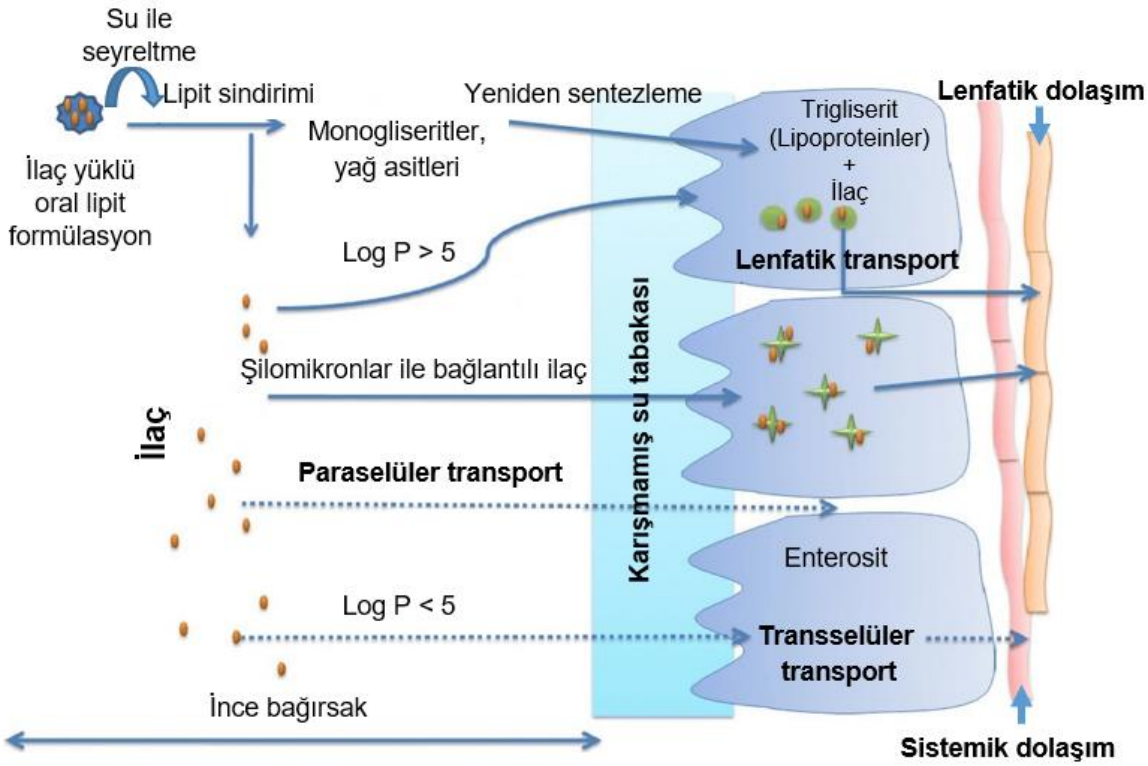
Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler (Lipid-based Drug Delivery Systems-LBDDS), suda az çözünen bileşiklerin çözünürlüğünü, emilimini, değişken gıda etkisini en aza indirmek ve biyoyararlanımını artırmak için iyi bilinen ve yaygın kullanılan bir formülasyon stratejisi olarak önem kazanmıştır (Elgart, Cherniakov, Aldouby, Domb ve Hoffman, 2013; Rehman ve diğerleri, 2017). Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler suda çözünürlüğü düşük ve lipofilik ilaçların oral yoldan etkili bir şekilde verilmesini amaçlamaktadır. (Gabbay ve diğerleri, 2007). Oral uygulama için lipit temelli formülasyonlar basit yağ çözeltilerinden, sürfaktan, kosürfaktan veya yardımcı çözücüye ve yağ karışımlarına kadar çok çeşitlilik gösterir ve lipit

formülasyonu terimi bazı ortak özellikleri paylaşan çok sayıda formülasyondan biri anlamına gelmektedir.

Oral lipit temelli formülasyonlar farmasötik pazara 1980'lerde basit lipit çözeltileri formunda girmiş ve zamanla bu sistemler, BCS Sınıf 2 ilaçlar için iyileştirilmiş terapötik potansiyel sağlayan mikro ve nano boyutta formülasyonların geliştirilmesini sağlamıştır (Tan, Rao ve Prestidge, 2013). Günümüzde farmasötik nanotaşıyıcı olarak tasarlanan çeşitli multifonksiyonel nanotaşıyıcılar arasında lipit temelli nanotaşıyıcılar, in vivo uygulama için en az toksisiteye sahiptir. Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenen ilaçların biyoyararlanım arttırma stratejileri ve avantajları ise şu şekilde sıralanabilir (Cerpnjak, Zvonar, Gasperlin ve Vrecer, 2013; Dahan ve Hoffman, 2008):

- Çözünürlüğün arttırılması
- Gastrik boşalma zamanın artması ile midede uzun süreli tutulma
- Bağırsakta lenfatik taşınımın uyarılması ve intestinal permeabiliteyi arttırması
- Metabolizma ve effluks etkisinin azaltılması gibi fiziksel ve biyokimyasal bariyerdeki değişiklikler ile lipofilik ilaçların çözünürlüğünü ve absorpsiyonunu arttırması şeklindedir.

Lipitler ve lipofilik yardımcı maddeler oral veriliş sonrasında ilacın emilimini ve dağılmını 3 temel mekanizma ile etkiler. Bu mekanizmalar intestinal ortamın karakterizasyonun ve bileşiminin değişmesi, lenfatik ilaç geçişinin etkisi ve enterosit kaynaklı geçiş sistemi ile ilişkilidir (Gürsoy ve Çevik, 2011; Porter, Trevaskis ve Charman, 2007). Oral verilen formülasyonların çoğu portal ven ile sistemik dolaşıma geçmektedir. Ancak ekzojen olarak verilen lipit temelli sistemler enterositlerde bulunan CYP450 metabolizmasını azaltarak, Peyer plakları ile ilk geçiş etkisini elimine ederek ve bağırsak duvarından paraselüler ve transelüler yol ile emilimi arttırarak lenfatik sistem ile sistemik dolaşıma katılabilir (Patel, Lalani, Bardoliwala, Ghosh ve Misra, 2018). Şekil 2.5'te oral lipit formülasyonların GİS'te transportunun şematik gösterimi verilmektedir (Patel ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.5. Oral lipit formülasyonların GİS'te transportu (Patel ve diğerleri, 2018)

2.6.1. Lipit formülasyon sınıflandırma sistemi

Lipit sistemleri trigliseritler, mono ve digliseritler, lipofilik sürfaktanlar, hidrofilik sürfaktanlar, yardımcı çözücüler ve çok çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip yardımcı maddeleri içermektedir. Benzer bileşen parçalarına sahip formülasyonların sınıflandırılmasını sağlamak amacıyla Pouton tarafından 2000 yılında Lipit Formülasyon Sınıflandırma Sistemi (Lipid Formulation Classification System-LFCS) oluşturulmuş, 2006 yılında bu sınıflandırma sistemi güncellenmiştir (Chatterjee ve diğerleri, 2016). LFCS bileşimlerine, seyreltme ve sindirimin ilaç çökmesini önleme yetenekleri üzerindeki olası etkisine bağlı olarak dört gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.9) (Cerpnjak ve diğerleri, 2013; Katteboina, Chandrasekhar ve Balaji, 2009; Pouton, 2000).

Çizelge 2.9. LFCS için Tip I, II, IIIA, IIIB ve IV lipit formülasyonlarının tipik özellikleri (Pouton, 2000)

Kompozisyon Karakterizasyon	Formülasyon İçeriği (% a/a) Tip I	Tip II	Tip IIIA	Tip IIIB	Tip IV
Trigliserid veya karışık gliseridler	100	40-80	40-80	<20	-
Sürfaktanlar	-	20-60 (HLB<12)	20-40 (HLB>11)	20-50 (HLB>11)	Suda çözünmeyen; 0-20 Suda çözünebilir; 30-80
Hidrofilik yardımcı çözücüler	-	-	0-40	20-50	0-50
Dispersiyonun damlacık büyüklüğü (nm)	Kaba	100-250	100-250	50-100	<50
Su ile seyrelmenin önemi	Sınırlı	Çözücü kapasitesi etkilemez	Çözücü kapasitesinde bir miktar kayıp	Önemli faz değişiklikleri ve potansiyel çözücü kapasitesinde kayıp	Dispersiyon halinde çözücü kapasitesi kaybı
Sindirimin önemi	Önemli bir gereklilik	Önemli değil ama gerçekleşmesi muhtemel	Önemli değil ancak inhibe edilebilir.	Gerekli değil ama gerçekleşmesi muhtemel	Gerekli değil, sindirilemeyebilir

HLB: Hydrophilic–Lipophilic Balance

LFCS'nin temel amacı in vivo çalışmaların daha kolay yorumlanmasını sağlamak ve spesifik ilaçlar için en uygun formülasyonların oluşturulmasını yani fizikokimyasal özelliklerine referansla tanımlanmasını kolaylaştırmaktır (Pouton ve Porter, 2008).

Tip I formülasyonlar - Dağılmayan sistemler

Tip I sistemler sadece mono-, di- ve/veya tri-gliseritler içeren yüzey aktif madde içermeyen basit yağ çözeltilerinden oluşur. Uygulamayı takiben şilomikron ve miseller gibi daha amfifilik sindirim ürünlerinin kolloidal sulu faza ilaç transferinin

gerçekleşmesi için GIK'da pankreatik lipaz/ko-lipaz ile sindirimi gerektirir (Kovvasu, Kunamaneni, Joshi ve Betageri, 2019). Tip I lipit formülasyonları gerekli ilaç dozunun yüklenebilmesi için yağda ilaç çözünürlüğünün yeterli olduğu potent ilaçlar veya yüksek oranda lipofilik bileşikler için nispeten basit bir formülasyon seçeneğini temsil eder (Porter, Pouton, Cuine ve Charman, 2008).

Tip II kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları - Suda çözünür olmayan bileşen sistemleri

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler (Self-emulsifying Drug Delivery Systems-SEDDS) olarak tanımlanan Tip II formülasyonları sulu ortama ilave edildiğinde su içinde kaba yağ emülsiyonları oluşturmak için kendiliğinden emülsifiye olan orta zincirli trigliseritler gibi lipitlerin ve digliseril monooleat gibi suda çözünmeyen lipofilik sürfaktanların (Hidrofilik-Lipofilik denge (Hydrophilic–Lipophilic Balance-HLB) <12) izotropik karışımlarıdır (Kovvasu ve diğerleri, 2019; Mullertz, Ogbonna, Ren ve Rades, 2010). Kendiliğinden emülsifikasyon genel olarak %25'in (a/a) üzerindeki sürfaktan içeriklerinde elde edilir. Bununla birlikte daha yüksek sürfaktan içeriklerinde (bileşenlere bağlı olarak %50-60'tan (a/a) daha büyük) emülsifikasyonun ilerlemesi yağ/su ara yüzeyinde viskoz sıvı kristal jellerin oluşumu ile bozulabilir (Porter ve diğerleri, 2008). Suda çözünür olmayan ilaçlar SEDDS içinde çözülebilir ve uygun tek ünite dozaj formları üretmek için sert veya yumuşak jelatin kapsüller içinde kapsüllenebilir.

Tip III SEDDS formülasyonlar - Suda çözünür bileşen sistemleri

Genellikle kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç verme sistemleri (Self-microemulsifying Drug Delivery Systems-SMEDDS) olarak anılan Tip III lipit temelli formülasyonlar etanol, propilen glikol ve polietilen glikol gibi yardımcı çözücülerin yanı sıra ek hidrofilik sürfaktanları (HLB>12) içerirler (Mullertz ve diğerleri, 2010). Tip III formülasyonları için A ve B alt tipleri mevcuttur, burada ayırt edici faktör suda çözünür kısımların ve yardımcı çözücülerin toplam formülasyonun ne kadarını meydana getirdiğidir (Khan, Rades ve Boyd, 2016). Tip III formülasyonlar çeşitli hidrofobik/lipofilik ilaçların emilimini artırmak ve formülasyon zorluklarının üstesinden gelmek için umut vaat eden sistemlerdir.

Tip IV formülasyonlar - Dispersiyon sistemler (Yağsız misel sistemleri)

Tip IV formülasyonlar doğal lipitler içermez ve hidrofilik formülasyonları temsil eden, sadece sürfaktanların ve yardımcı çözücülerin kombinasyonlarını içerirler (Feeney ve diğerleri, 2016). Basit gliserit lipitleri içeren formülasyonlara kıyasla yaygın olarak artan ilaç yüklemesi (sürfaktanlar ve yardımcı çözücülerde daha yüksek ilaç çözünürlüğü nedeniyle) sunar. Sulu ortam ile temas ettiğinde küçük damlacık boyutlu dispersiyonlar üretirler. Bunun da hızlı ilaç salımına ve artan ilaç emilimine yol açtığı ileri sürülmüştür (Porter ve diğerleri, 2008). Bununla birlikte kullanılan yüksek konsantrasyondaki sürfaktanların kronik kullanımda mide rahatsızlığına yol açabileceği unutulmamalıdır.

LFCS göz önüne alındığında en popüler ve ticari olarak uygulanabilir formülasyon yaklaşımlarından biri, özellikle suda çözünür olmayan ilaçların oral biyoyararlanımını artırmak için büyük ilgi gören kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemleridir (Kelan ve Khutle, 2015). 1990'dan sonra lipit ve sürfaktan bazlı kendiliğinden emülsifiye formülasyonların ticarileştirilmesi ve patentlenmesi bu sistemlerin önemini daha çok ortaya çıkarmıştır (Tan ve diğerleri, 2013). Bugün piyasada pazarlanan ürünlerin çoğu LFCS'ye göre Tip III SEDDS formülasyonlarıdır.

2.7. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler veya kendiliğinden emülsifiye yağ formülasyonları doğal veya sentetik yağların, katı veya sıvı sürfaktanların veya alternatif olarak bir veya daha fazla hidrofilik çözücü ve yardımcı çözücü/sürfaktan izotropik karışımları olarak tanımlanırlar (Katteboina ve diğerleri, 2009). Üretimleri kolaydır ve ölçek büyütme kolaylıkla uygulanabilir. Lipofilik özellikli BCS Sınıf 2 ilaçların çözünmesi ve emilimini iyileştirmek için sıklıkla kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Kohli, Chopra, Dhar, Arora ve Khar, 2010).

SEDDS formülasyonlar GİS lümenine salındığında buradaki sıvılarda seyrelerek sistemin düşük serbest enerjisine bağlı olarak hızla kendiliğinden emülsifiye bir y/s emülsiyonu oluşturur. Böylece lipofilik ilaç GİK içindeki çözeltide kalır ve hidrofobik

ilaçların emilimindeki hız sınırlayıcı adım olan çözünme aşamasını atlar (Karwal, Garg, Rath ve Markandeywar, 2016). Damlacık büyüklüğüne bağlı olarak 150 ila 200 nm arasında değişen damlacık büyüklüğüne sahip SMEDDS veya 100 nm'den küçük damlacık büyüklüğüne sahip kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler (Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems-SNEDDS) olarak sınıflandırılabilir.

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerde kullanılan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan gibi maddeler çözünme hızı, çözünürlük ve permeabilitede kayda değer bir artış göstermekle birlikte P-gp effluksını, karaciğerden ilk geçiş etkisini ve GIK'daki koşullara bağlı olan birey içi ve bireyler arası değişkenliği önemli ölçüde azaltmaktadır (Singh ve diğerleri, 2014).

2.7.1. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları ve dezavantajları

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları şu şekilde özetlenebilir (Karwal ve diğerleri, 2016; Sri ve Muzib, 2015):

- Ağızdan alınan birçok ilaç için uygulanabilir olması
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olması
- İlaçların yağ ve su arasında partisyonu için diğer yağlı formülasyonlara kıyasla daha geniş bir ara yüzey alanına sahip olması
- İlacın GİS'ten ortamından korunması
- Termodinamik olarak kararlı sistemler olması
- Sıvı ve katı dozaj formu olarak kullanılabilmesi
- Üretim ve ölçek büyütme kolaylığı
- Sterilize edilebilir olması
- GİK'te spesifik absorpsiyon bölgesine ilaçların seçici olarak hedeflenmesi
- Hepatik ilk geçiş etkisinin aşılması
- P-gp effluksunun, birey içi-bireyler arası değişkenliğin ve gıda etkisinin azalması

- Çözünme hızı sınırlı emilim gösteren lipofilik ilaç bileşikleri için bu sistemler emilim oranında ve derecesinde, oral biyoyararlanımda bir iyileşme sağlayabilir ve daha tutarlı kan zaman profilleri ile sonuçlanabilir, doz sıklığını azaltabilir ve bu durum maliyetin düşmesini sağlayabilir.

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerin pek çok avantajı olmakla birlikte dezavantajları da şu şekilde sıralanabilir (Shukla, Koli, Ranch ve Parikh, 2010; Shukla, Modi ve Shah, 2016):

- Formülasyonlardaki büyük miktarda sürfaktan GİK'te iritasyon yapması
- Ambalajlanmaları ve taşınmaları sırasında yağlı sistemden sızmanın görülebilme olasılığı
- Düşük stabilite göstermesi
- Sıvı SEDDS formülasyonların dolum yapılacağı yumuşak jelatin kapsül teknolojisinin pahalı bir teknoloji olmasıdır.

Kendiliğinden emülsifiye sistem kavramı, ilk olarak zayıf suda çözünür pestisitlerin ve kimyasalların çözündürülmesi için lipidik ve hidrofilik yardımcı maddelerin karışımlarının kullanıldığı 1960'ların başlarında ortaya çıkmıştır (Hartley, 1967). Farmasötik alandaki çalışmalar ise 1985'te Pouton'un ilk kez lipofilik ilaçlarda karşılaştığı çeşitli zorlukları aşmak için SEDDS geliştirmesi ile başlamıştır (Pouton, 1985). 1990'lardan bu yana SEDDS'nin biyoyararlanımı geliştirme potansiyeli çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır, bu da bazı laboratuvar araştırma çalışmalarının endüstriye aktarılmasıyla sonuçlanmıştır. Siklosporin A içeren Sandimmune (Sandoz), 1983 yılında FDA tarafından organ nakil reddi için onaylanan (ABD patenti 4388307) ilk kendiliğinden emülsiyon formülasyonudur. O zamandan beri, çeşitli etkin maddelerin kendiliğinden emülsiyon formülasyonları üzerinde uluslararası patentler verilmiştir (Talegaonkar ve diğerleri, 2008; Yılmaz Usta ve Teksin, 2021). İlaç pazarında bulanan ticari SEDDS formülasyonlarına ait ürün örnekleri, nihai dozaj formu, yardımcı madde yapısı, patent ve pazarlama durumlarıyla birlikte Çizelge 2.10'da gösterilmektedir (Singh ve diğerleri, 2014).

Çizelge 2.10. Oral lipit temelli kendiliğinden emülsifiye formülasyonların ticari ürünleri, patentleri ve patent durumları

Ticari ürün (Firma) / FDA onay tarihi	Etkin madde	Pazarlanan formu (doz/dozları)	Yardımcı madde(ler)	Patent numarası	Patent durumu
Accutane® (Roche) 7 Ocak 1982	Isotretinoin	Yumuşak jelatin kapsül (10, 20, 40 mg)	Balmumu, Hidrojene soya yağı	-	Süresi dolmuş
Sandimmune® (Sandoz) 14 Kasım 1983	Siklosporin	Yumuşak jelatin kapsül (25, 50, 100 mg)	Etanol, Polihidroksi hint yağı, LabrafilM-2125CS	US4388307	Süresi dolmuş
Solufen® (Sanofi-Aventis) 11 Ağustos 1989	İbuprofen	Sert jelatin kapsüller	Soya fosfolipitlerini içeren yağlı çözelti	US4105776	Süresi dolmuş
Neoral® (Novartis) 31 Mart 1995	Siklosporin	Yumuşak jelatin kapsül (25, 100 mg)	Mısır yağı, Cremophor RH 40, PG, DL-tokoferol	US5342625	Korumalı
Depakin® (Abbott) 29 Haziran 1983	Valproik asit	Yumuşak jelatin kapsül (250, 500 mg)	Mısır yağı, orta zincirli trigliseritleri, Polisorbat 80	-	Süresi dolmuş
Vesanoid® (Roche) 22 Kasım 1995	Tretinoin	Yumuşak jelatin kapsül (10 mg)	Balmumu, BHA, EDTA, Hidrojene soya yağı	-	-
Norvir® (Abbott, Abbvie) 1 Mart 1996	Ritonavir	Oral çözelti (80 mg/mL)	Kaprilik/kaprik orta zincirli trigliseridler, Olioksil 35 hint yağı, Polisorbat 80, PG	US8268349	Süresi dolmuş
Rokaltrol® (Roche) 20 Kasım 1998	Kalsitriol	Yumuşak jelatin kapsül (0,25,0,5 µg)	Orta zincirli trigliseridler, BHT	-	-
Ageneraz® (GlaxoSmithKline) 15 Nisan 1999	Amprenavir	Yumuşak jelatin kapsül (50 mg)	TPGS, PG, PEG 400	US5585397	Korumalı
Rapamun® (Wyeth) 15 Eylül 1999	Sirolimus	Oral çözelti (0.5, 1,2 mg)	Phosal 50 PG, Fosfotidilkolin	US5100899	Süresi dolmuş
Targretin®/ Beksaroten® (Ligand) 29 Aralık 1999	Beksaroten	Yumuşak jelatin kapsüller (75 mg)	Makragol, Polisorbat, Povidon, BHT	US5780676	Korumalı

Çizelge 2.10. (devam) Oral lipit temelli kendiliğinden emülsifiye formülasyonların ticari ürünleri, patentleri ve patent durumları

Gengraf® (Abbott) 12 Mayıs 2000	Siklosporin A	Sert jelatin kapsül (25, 100 mg)	PEG, Cremophor EL, Polisorbat 80, Sorbitan monooleat	-	-
Zipsor® (Xanodyne Pharma) 16 Haziran 2000	Diklofenak sodyum	Yumuşak jelatin kapsül (25 mg)	Trigliserid içeren sıvı kendiliğinden emülsifiye sistem	-	Korumalı
Kaletra® (Abbott) 15 Eylül 2000	Lopinavir Ritonavir	Oral çözelti (20 mg/mL, 80 mg/mL)	Cremophor RH40, PEG	US5541206	Korumalı
Fortovaz®, Inviraz® (Hoffmann-LaRoche) 24 Aralık 2003	Sakunavir	Yumuşak jelatin kapsül (200 mg)	Orta zincirli trigliseridler, DL-α-tokoferol	US5196438	Korumalı
Aptivus® (Boehringer Ingelheim) 5 Ekim 2007	Tipranavir	Yumuşak jelatin kapsül (250 mg)	Cremophor EL, kaprilik/kaprik asitin mono/digliseritleri	US5852195	Korumalı
Panimun Bioral® (Panacea Biotec) -	Siklosporin	Yumuşak jelatin kapsül (50, 100 mg)	Cremophor RH40, hidrojene hint yağı	US5945398	Korumalı
Lipirex® (Genus) -	Fenofibrat	Sert jelatin kapsül (10 mg)	Soya fasulyesi yağı, hidrojene hint yağı	EP0330532	-
L-OROS SOFTCAP™ (Alza) -	Guaiphenesin	Osmotik pompa (200 mg)	Yağlı sıvı kendiliğinden emülsifiye sistem	US4609675	Korumalı
Konvuleks® (Pfizer, Byk Madaus) -	Valproik asit	Yumuşak jelatin kapsül (150, 300, 500 mg)	Orta zincirli trigliseritler içeren hidroksi metil selüloz ftalat	-	Korumalı

PG: Propilen glikol, **BHA:** Bütillenmiş hidroksianisol, **EDTA:** Etilendiamin tetraasetik asit, **BHT:** Bütillenmiş hidroksitoluen, **TPGS:** D-alfa-tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat, **PEG:** Polietilen glikol

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri ile çözünürlük ve biyoyararlanım artışı ise Çizelge 2.11'de verilmiştir.

Çizelge 2.11. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri

Etkin madde	Bileşenler	Çözünürlük/Biyoyararlanım	Referans
Exendin-4	Etil oleat Cremophor® EL/Labrasol® Propilen glikol	Diyabetik sıçanlarda, Exendin-4 çözeltisine göre Exendin-4 yüklü SNEDDS AUC_{0-3}'ü 0,8 kat, C_{max}'ı 1,3 kat artırmıştır.	(Celik-Tekeli, Celebi, Tekeli ve Aktaş, 2021)
Silostazol	Capryol® 90 Cremophor® EL Transcutol®	Pazarlanan tablete kıyasla biyoyararlanımda 3,94 kat artmıştır.	(Mahmoud, Shukr ve Bendas, 2014)
Karvedilol	Capmul® MCM Nikkol® HCO	C_{max} (%134) ve AUC (%85,2)'deki artışlar, biyoyararlanımın artmasını sağlamıştır.	(Singh, Singh, Bandyopadhyay, Kapil ve Garg, 2013)
Sefpodoksim	Tween® 80 Tokoferil PEG süksinat Capmul® MCM	Biyoyararlanımdaki artış (AUC'de 5,36 kat artış) ilacın artan çözünürlüğü ve geçirgenliği ile sağlanmıştır.	(Bajaj, Rao, Khole ve Munjapara, 2013)
Sefiksim	Tarçın yağı Tween® 80 PEG® 400	C_{max} ve AUC'yi 2 kat artırmıştır.	(Saifullah ve diğerleri, 2021)
Atazanavir	Maisine® Transcutol® P Span® 20	Çözünmenin artmasıyla AUC 2,57 kat artmıştır.	(Singh ve Pai, 2014)
(R)-α-lipoik asit	Orta zincirli trigliserit Tween® 80 PEG® 400	C_{max} ve $AUC_{0-\infty}$'yi sırasıyla 4 ve 7 kat arttırmıştır.	(Banik, Halder, Sato ve Onoue, 2021)
Valsartan	Capmul® MCM Tween® 20 Cremophor® EL	SMEDDS-T20 %262 SMEDDS-T80 %470 SMEDDS-Cremophor® EL %458 bağıl biyoyararlanımı artırmıştır.	(Goo ve diğerleri, 2020)
İrbesartan	Cremophor® EL Carbitol® Capryol® 90	Artan çözünme ile saf etkin maddeye kıyasla oral biyoyararlanımda 7,50 kat artış görülmüştür.	(Patel, Patel, Raval ve Sheth, 2011)
Rosuvastatin kalsiyum	Tarçın yağı Labrasol® Capmul® MCM C8	2,45 kat biyoyararlanımda artış gözlemlenmiştir.	(Balakumar, Raghavan, Selvan, Prasad ve Abdu, 2013)
Iloperidon	Labrafac® WL 1349 Lauroglycol® 90 PEG® 600	Bağıl biyoyararlanımı 3,80 kat artırmıştır.	(Suram, Narala ve Veerabrahma, 2020)

2.7.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunu etkileyen faktörler

Formülasyonu etkileyen faktörler göz önününe alındığında başarılı bir formülasyon geliştirilebilmesi için var olan çok sayıdaki yardımcı maddeden uygun bileşenlerin seçiminin önemi ortaya çıkmaktadır. Formülasyona girecek olan yardımcı maddelerin stabilite, biyoyararlanım ve üretilebilirlik gibi süreç açısından kritik ve klinik olarak önemli ilaç ürününün performans sonuçlarını etkileyeceği göz önünde bulundurulmalıdır. Aynı zamanda bu yardımcı maddelerin karıştırılabilirlik, çözücü kapasitesi, kendiliğinden disperse olabilme, sindirilebilirliği, iritanlığı, toksisitesi, saflığı, kimyasal stabilitesi, erime noktası ve maliyeti gibi faktörler de formülasyon için seçilmesinde önem taşımaktadır. Bu faktörlerden bazıları aşağıda sunulmaktadır (Shukla ve diğerleri, 2016; Sri ve Muzib, 2015):

- Yağ/sürfaktan çiftinin özellikleri
- Sürfaktan konsantrasyonu, yağ/sürfaktan oranı, sürfaktan/kosürfaktan oranı
- Kendiliğinden emülsifikasyonun meydana geldiği sıcaklık
- İlacın dozu önemlidir. Çok yüksek dozda uygulanan ilaçlar SEDDS için uygun değildir.
- İlacın yağ fazındaki çözünürlüğü ve log P değeri, log P değerinin 2 <log P> 4 olması
- Emülsiyonun polaritesi, damlacık boyutu ve yükü olarak sıralanabilir.

2.7.3. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşum mekanizmaları

Kendiliğinden emülsifikasyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalar incelendiğinde emülsiyon oluşumu için çeşitli yaklaşımların olduğu görülmektedir.

Reiss'e göre, sistemde dispersiyonu destekleyen entropi, dispersiyonun yüzey alanını artırmak için gereken enerjiden daha büyük olduğunda kendiliğinden emülsifikasyon meydana gelir (Reiss, 1975). Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde,

ara yüzey gerilimi, ara yüzey enerjisinin benzer hale gelmesi, dağılım entropisini azaltması ve oluşumun serbest enerjisinin sıfır veya negatif bir değer olması için yeterince düşük olması ile sağlanır. Geleneksel bir emülsiyon oluşumunun serbest enerjisi, iki faz arasında yeni bir yüzey oluşturmak için gereken enerjinin doğrudan bir fonksiyonudur ve aşağıdaki eşitlikle açıklanabilir (Eş. 2.1) (Karwal ve diğerleri, 2016).

$$\Delta G = \Sigma N \pi r^2 \sigma \qquad \text{(Eş. 2.1)}$$

Burada G; serbest enerjiyi, N; yarıçap r olan damlacıkların sayısını ve σ; ara yüzey enerjisini göstermektedir.

Rieger'e göre ise kendiliğinden emülsifiye sistemlerin oluşum mekanizması üç teori ile açıklanmaktadır (Rieger, 1986):

- Ara yüzey gerilimini azaltmak ve termodinamik stabilizasyonu sağlamak
- Ara yüzey filmi oluşturmak ve koalesansa karşı mekanik bir bariyer sağlamak
- Elektriksel çifte tabaka oluşturmak ve elektriksel bir bariyer sağlamak

Yani su ile seyrelme sonrası ortaya çıkan emülsiyon, sürfaktanlar tarafından emülsiyon damlacıklarını çevreleyen tek bir tabaka oluşturmak suretiyle stabilize edilir, bu da ara yüzey enerjisinin azalmasına neden olur ve koalesansa karşı bir bariyer sağlar (Sri ve Muzib, 2015).

2.7.4. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan bileşenler

Yağlar

Yağlar lipofilik ilacın gerekli dozunu çözebilen veya kendiliğinden emülsifikasyonu kolaylaştırabilen temel bileşendir. Biyoyararlanım için genellikle ilaç çözünürlüğünü artırmak ve lenfatik taşınım üzerinde etkisinin olması gibi iki büyük olumlu etkisi vardır.

Kendiliğinden emülsifiye formülasyonların tasarımı için farklı doygunluk derecelerine sahip uzun zincirli trigliserit ve orta zincirli trigliserit yağları kullanılır (Bagadi, 2015). SEDDS'lerin formülasyonunda çeşitli bitkisel yağ türleri ve bitkisel yağ türevleri de kullanılabilir. Ancak yenilebilir yağlar büyük miktarlarda lipofilik ilaçları çözme yeteneklerinin zayıf olması nedeniyle SEDDS'nin geliştirilmesi için çoğunlukla tercih edilmezler (Shukla ve diğerleri, 2016).

Ticari olarak temin edilebilen yağ bileşenleri arasında yağ asitleri (oleik asit, kaprilik asit), doğal bitkisel yağlar (soya fasulyesi yağı, ayçiçek yağı, hint yağı, zeytinyağı), yarı sentetik mono-di-tri gliseritler (Miglyol® 810, Labrafac®, Captex® 300, Capmul® MCM, Imwitor® 742, Maisine®, Peceol®), polioksietilen glikoller (PEG) türevleri veya makrogolgliseritler (Labrasol®, Labrafil®, Gelucire®), propilen glikol yağ asidi esterleri (Capryol® 90, Capmul® PG-8) bulunur (Mohsin, Shahba ve Alanazi, 2012; Pouton, 2007).

Sürfaktanlar

Sürfaktanlar yüzey gerilimini azaltma ve yağ ile sulu faz arasında tek tabaka oluşturma yeteneklerinden ötürü SEDDS formülasyonuna ilave edilen ikinci grup bileşenlerdir. Sürfaktanların özellikleri bir ilacın termodinamik aktivitesini, çözünürlüğünü, difüzyonunu, parçalanmasını ve çözünme hızını değiştirebilecek şekildedir ve bu parametrelerin her biri ilaç emiliminin oranını ve derecesini etkiler (Bagadi, 2015). Aynı zamanda formülasyona ilave edilen bu sürfaktanlar SEDDS'in daha kararlı hale gelmesini ve ilacın emilmesi için çözünür formda daha uzun süre GİK'te kalmasını sağlar.

Sürfaktan molekülleri, moleküller içindeki hidrofilik grubun doğasına göre anyonik, katyonik, amfifilik ve iyonik olmayan (noniyonik) olarak sınıflandırılırken, HLB değerlerine göre de lipofilik (HLB≤10) veya hidrofilik (HLB>10) olarak kategorize edilebilirler (Akkuş Aslan, 2013). Noniyonik sürfaktanlar anyonik ve katyonik olanlara kıyasla daha düşük toksisitesinin yanı sıra, daha geniş bir iyonik kuvvet ve pH aralığında emülsiyonların stabilizasyonunu da sağlarlar (Cerpnjak ve diğerleri, 2013).

Sık kullanılan ve önerilen sürfaktanlar HLB değeri yüksek olan noniyonik sürfaktanlardır. Genellikle sürfaktan konsantrasyonu, kararlı SEDDS oluşturmak için %30-60 a/a arasında değişmektedir ve damlacık boyutu kullanılan sürfaktan konsantrasyonu arttıkça küçülmektedir (Patel ve diğerleri, 2013). Ancak yüksek miktarlarda sürfaktan varlığı GİK'te tahrişe neden olacağından sürfaktan konsantrasyonunun doğru bir şekilde belirlenmesi çok önemlidir. Aynı zamanda bazı noniyonik sürfaktanların yaygın olarak bilinen effluks taşıyıcılarından biri olan P-gp'yi inhibe ettiği bilinmektedir. Effluks taşıyıcısının sürfaktanlar tarafından inhibisyonu, bileşiğin bağırsak lümenine geri alınma şansını en aza indirerek biyoyararlanımı arttırmaya katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilir. Çeşitli tipte kullanılan sürfaktanlara Cremophor® RH 40 (HLB: 14-16), Cremophor® EL (HLB: 12-14), Tween® 80 (HLB: 15), Tween® 60 (HLB: 14,9), Tween® 20 (HLB: 16,7) örnek olarak verilebilir (Bagadi, 2015).

Kosürfaktanlar

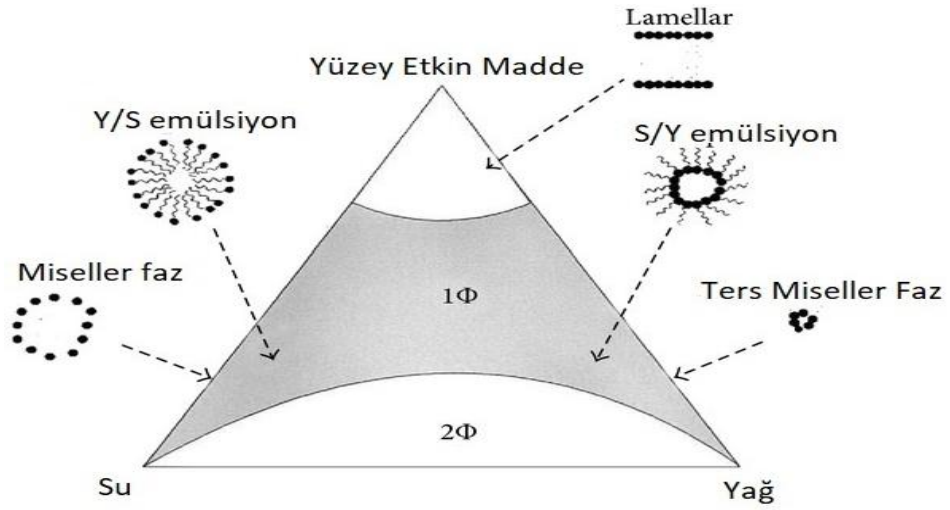
Kosürfaktanlar esas olarak ilaç yükleme kapasitesinin arttırılmasına yardımcı olur ve formülasyona eklendiğinde sürfaktan konsantrasyonunun azalmasını sağlar. Kosürfaktanlar sürfaktanların akışkanlığını arttrır, dispersiyon işlemini kolaylaştırır ve lokal tahriş olasılığını azaltırlar. Böylece formülasyon homojenliğini ve stabilitesini arttırılmasına yardımcı olur. Yaygın olarak kullanılan kosürfaktanlar HLB değeri 10-14 arasında olan etanol, propilen glikol, polietilen glikol, Transcutol® P, lauroglikoldur.

2.7.5. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

Faz diyagramları

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde üçgen faz diyagramları esas olarak emülsiyon alanlarını (kompozisyon aralıklarını) haritalamak için kullanılmaktadır. Faz diyagramları fazların sayısını ve tiplerini, her fazın ağırlıkça %'sini ve her bir fazın bileşimini belirli bir sıcaklıkta ve sistemin bileşiminde belirlemek için yararlı araçlardır. Bu diyagramlar üç boyutludur, ancak

çizim ve yorum kolaylığı için iki boyutta gösterilmiştir (Şekil 2.6) (Lawrence ve Rees, 2000; Sanghai, Aggarwal ve HariKumar, 2013).



Şekil 2.6. Üçgen faz diyagramının iki boyutlu gösterimi (Lawrence ve Rees, 2000; Sanghai ve diğerleri, 2013)

Sürfaktan-kosürfaktan karışımı yağ fazı ile farklı oranlarda titre edilip üçgen faz diyagramları oluşturularak yağ fazını en fazla alan bölge belirlenir. Yağ fazını en fazla alan bölgeden hareketle K_m (sürfaktan: kosürfaktan) oranı seçilir (Beg ve diğerleri, 2013; Weerapol, Limmatvapirat, Kumpugdee-Vollrath ve Sriamornsak, 2015). K_m oranına göre belirlenen sürfaktan: kosürfaktan ve yağ fazı su ile titre edilir. Oluşturulan üçgen faz diyagramlarından hareketle emülsiyon oluşturma alanları belirlenir. Üçgen faz diyagramının ağırlık merkezi veya alan içinden rastgele seçilen formülasyonların damlacık büyüklüğü, damlacık büyüklüğü dağılımı, transmittans ve viskozite gibi özellikleri incelenerek en uygun formülasyonun elde edilmesi sağlanır.

Deney tasarımı

Deney tasarımı farmasötik ürün gelişimi, etkin maddeler, yardımcı maddeler ve üretim işlemi değişkenlerinin birbiriyle komplike bir etkileşim içinde olduğu bir gelişim sürecidir. Bu süreçte istenen kalitenin ve ürün özelliklerinin sağlanmasında tüm değişkenlerin optimum düzeyde olması için deney tasarımı ve optimizasyon çalışmaları yapılır. Bu amaçla farmasötik geliştirme sürecinde uzun yıllardır deney

tasarımlarından faydalanılmaktadır. Deney tasarımı gün geçtikçe pahalılaşan araştırma ve geliştirme giderlerini en düşük seviyede tutmak için ‘’en az’’ deney yapma prensibine dayanmaktadır (Bulut ve Özer, 1991; Özensoy, 1982). Farmasötik deney tasarımı işlemlerinde ise genel olarak iki parametre önemlidir (Abu-Izza, Garcia-Contreras ve Lu, 1996):

- Bağımsız değişkenler ve formülasyon cevapları arasındaki ilişkinin tanımlanması ve tayin edilmesi
- Bu formülasyon değişkenlerinin en iyi cevabı oluşturabilecek seviyelerinin belirlenebilmesi

Deney tasarımı (Design of Experiment-DoE) kritik işlem parametrelerinin belirlenmesi ve tasarım alanının oluşturulması aşamalarından oluşur. DoE istastiksel olarak birçok avantajının yanı sıra optimum cevabın belirlenmesine de yardımcı olur. Bir seferde bir değişken yerine, bir seferde birkaç değişkeni değiştirmek etkin sonuçlar alınmasını sağlar. Değişkenler arasındaki etkileşimler değişim yapılana kadar görülemeyecek olan sorunlara neden olabilir. DoE sayesinde birçok faktör eş zamanlı olarak değiştirilirken, her bir faktör birbirinden bağımsız olarak değerlendirilir. DoE herhangi bir deney yapmadan önce ayrıntılı bir deney planı oluşturmak için etkin bir işlemdir. İyi seçilen tasarımlar belirli bir miktarda deneysel çalışma için elde edilebilecek bilgi miktarını en üst düzeye çıkarır (Aksu, 2013). Sık kullanılan deney tasarımları aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

- Tam faktöriyel tasarım
- Kısmi faktöriyel tasarım
- Plackett-Burman tasarımı
- Yanıt yüzey tasarımı

Tez çalışmasında kullanılan tasarım aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Yanıt yüzey tasarımları

Yanıt yüzey tasarımları bağımsız değişkenlerle cevaplar arasındaki bağlantıyı hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlayan istatistiksel ve matematiksel temellere dayanan değişik alanlarda kullanılan bir yaklaşımdır (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar ve Escaleira, 2008). Yanıt yüzey tasarımlarında bağımsız değişkenlere karşı yanıt değişkenlerini daha kesin ve doğru tahmin edebilmek için etkileşim karesel ya da kübik modeller kurularak gerçekleştirilir. Yanıt yüzey tasarımları üç grupta incelenmektedir (Zolgharnein, Shahmoradi ve Ghasemi, 2013):

- Box-Behnken tasarım
- Doehlert tasarım
- Merkezi birleşik tasarım

Box-Behnken tasarım

Box-Behnken tasarımı (Box-Behnken Design-BBD) bir veya daha fazla olan bağımlı faktörler ile cevap değişkenleri olan bağımsız faktörler arasındaki bir dizi kantitatif deneysel parametre arasındaki ilişkiyi incelemek için önerilmektedir ve pek çok çalışmada başarı ile kullanılmıştır (D. W. Lee ve diğerleri, 2014; Poudel ve diğerleri, 2012; Shaji ve Lodha, 2008; Taha, Samy, Kassem ve Khan, 2005; Yang, Gursoy, Lambert ve Benita, 2004).

Genel olarak tasarımın oluşturulabilmesi için üç seviyeli üç bağımsız faktör gerektirir. Her deneysel nokta, orta değeri bulunan düşük ve yüksek olmak üzere 2 uç faktör seviyesine sahiptir ve tüm tasarım noktaları güvenli bölge içerisinde kalmaktadır.

BBD'ın merkezi kompozit tasarım (Central Composite Design-CCD), Doehlert tasarım ve üç seviyeli tam faktöriyel tasarım gibi diğer tasarımlardan daha verimli ve güçlü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca CCD ve üç seviyeli tam faktöriyel tasarımdan daha az deneysel çalışma gerektirir ve daha ekonomiktir (Marasini ve diğerleri, 2012).

Deney tasarımı sonucu elde edilen cevaplar Design Expert® 10 programına yüklenerek tasarımı ifade eden en uygun model belirlenir. A, B ve C bağımsız değişkenler olmak üzere lineer modelde bağımsız değişkenler tek başına cevabı etkilerken (A, B ve C), 2FI (İkili etkileşim-Two-Factor Interaction) modelinde bağımsız değişkenlerle beraber iki farklı bağımsız değişkenin etkileşimleri de cevabı etkileyebilmektedir (A, B, C, AB, BC, AC). Kübik ve kuadratik modellerde bağımsız değişkenlerin kendileriyle olan etkileşimlerinin de (A^2, B^2 ve C^2) cevap üzerine etkisi incelenmektedir. Uygun modelin "lack of fit tests" bölümündeki Prob>F değerinin istatistiksel olarak anlamsız ($p>0,05$) olması gerekmektedir. Bağımsız değişkenlerden hangilerinin cevapları istatistiksel olarak etkilediğinin belirlenmesi için varyans analizi (Analysis of Variance-ANOVA) program tarafından yapılır. Prob>F kısmındaki $p<0,05$ olan bağımsız değişkenler cevapları istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilemektedir. Bağımsız değişkenlerden F değeri büyük olan cevabı istatistiksel açıdan en çok etkilemektedir. Program bağımsız değişkenlere ve cevaplara göre 3 boyutlu (three-dimensional-3D) yanıt yüzey grafikleri çizebilmektedir. Bu grafikler iki bağımsız değişkenin etkileşimleriyle birlikte cevapların değişimini göstermektedir.

2.7.6. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde yapılan kalite denetimleri

Damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımı

Damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımı ilacın çözünme hızını ve absorpsiyonunu etkilemektedir. Damlacık büyüklüğü küçüldükçe yüzey alanı artarak ilacın emiliminde artış sağlar (Gershanik ve Benita, 2000). Damlacık büyüklüğünün ve damlacık büyüklüğü dağılımının ölçülmesinde foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılımı tekniğine göre çalışan (partiküllerin Brown hareketine bağlı olarak ışık saçılımındaki dalgalanmaları analiz eder) cihazlar kullanılmaktadır (Sharma ve diğerleri, 2010).

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğini değerlendirme çalışmaları

Formülasyonların in vitro performasının değerlendirilmesi disperse olabilme ve kendiliğinden emülsifikasyon zamanının belirlenmesi ile gerçekleştirilir. Su ile seyrelme sonucu şeffaf ve homojen bir sistem ve emülsiyon oluşumu için gerekli olan süre değerlendirilir.

Seyreltmeye dayanıklılık

Formülasyonların in vivoda davranışını tahmin etmek için GİS'teki farklı koşulları taklit eden, farklı oranlarda ve farklı ortamlarda seyreltilmesi sonucunda emülsiyon damlacıklarının birleşmesi, çökmesi veya faz ayrılması gibi fiziksel değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalardır.

% Transmittans

Formülasyonun damlacık boyutu hakkında bilgi vermektedir. %100'e yakın elde edilen bir trsansmittans değeri açık ve şeffaf bir emülsiyon oluşumuna işaret eder (Khedekar ve Mittal, 2013).

Reolojik özellikler

Emülsiyonların vizkozitesi stabilitesi ve formülasyonun kapsül dışında verilmesi durumunda akışkanlığı açısından önemlidir. Emülsiyonların gerilim altında viskozitesi artabilir veya azalabilir.

Morfolojik çalışmalar

Hazırlanan formülasyonların seyreltilmesiyle oluşturulan emülsiyonların yapı ve morfolojisini araştırmak için gerçekleştirilen çalışmalardır. Formülasyonların morfolojik açıdan görüntülenmesinde genel olarak Cryo-transmisyon elektron mikroskobu (Cryo-TEM) (Lee, Morrison, Frethem, Zasadzinski ve McCormick, 2014; Li, Tan, Prestidge, Nielsen ve Mullertz, 2014; Tran, Siqueira, Amenitsch, Rades ve Mullertz, 2017) veya transmisyon elektron mikroskobu (Transmission

Electron Microscope-TEM) (Parmar, Patel ve Sheth, 2015; Patel, Dhingani, Garala, Raval ve Sheth, 2014; Senapati, Sahoo ve Sahu, 2016) kullanılmaktadır.

Etkin madde yükleme çalışmaları

Hazırlanan SNEDDS formülasyonlara etkin maddelerin yüklenmesi sistemin bulanık hale geldiği noktaya kadar farklı miktarların denenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Sistemin berrak olduğu son noktada bileşenler homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılır. Daha sonra nihai formülasyon 37°C'de bir manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılır ve kullanılana kadar 25°C'de muhafaza edilir.

Stabilite çalışmaları

Termodinamik stabilite çalışmaları (ısıtma-soğutma, santrifüjleme ve dondurma-çözme çalışmaları) ve uzun süreli ve hızlandırılmış stabilite çalışmaları (4°C, 25±2°C/%60±5 bağıl nem ve 40±2°C/%75±5 bağıl nem ortamlarında) yapılmaktadır (Shafiq-un-Nabi ve diğerleri, 2007).

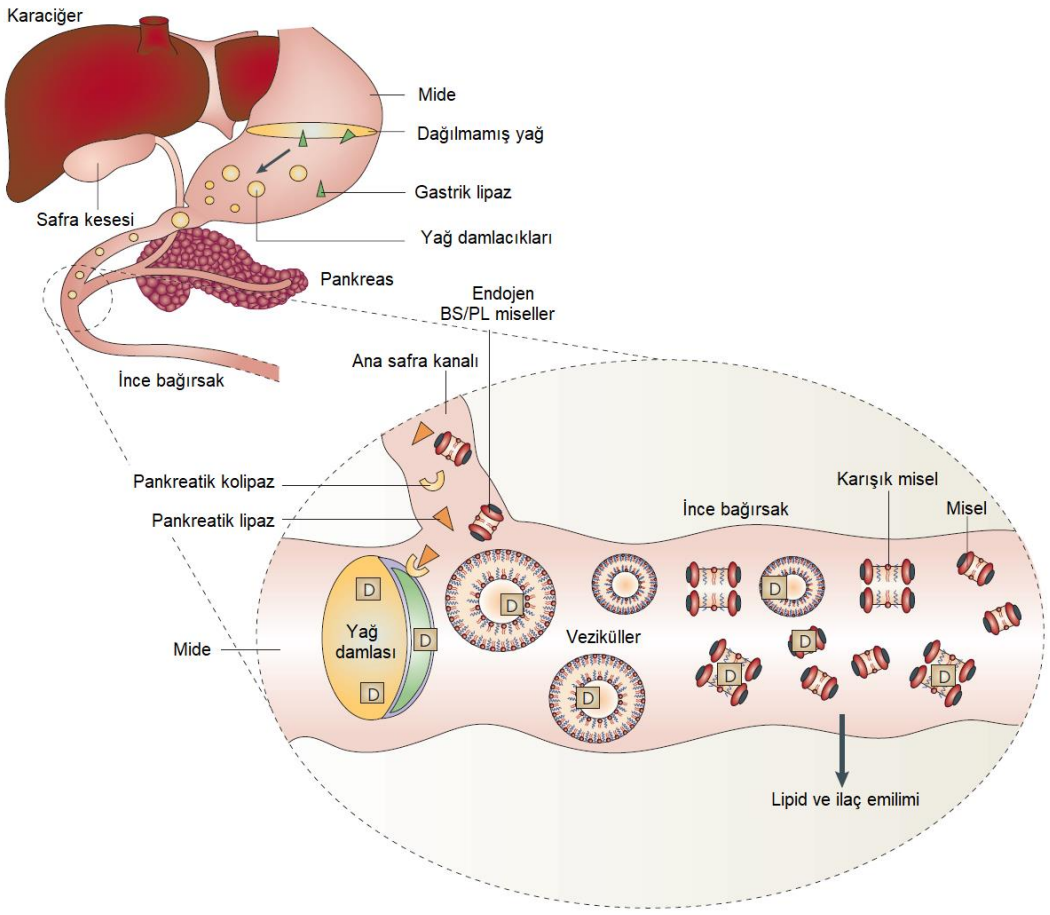
İn vitro çözünme hızı çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarında yapılan salım/çözünme hızı çalışmalarında genellikle palet (Kazi, Al-Qarni ve Alanazi, 2017; Snela ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2010) ya da sepet yöntemi (Syukri, Martien, Lukitaningsih ve Nugroho, 2018; Yadav, Rastogi ve Verma, 2020) kullanılmaktadır. Ayrıca formülasyonu çözünme ortamına koyabilmek için diyaliz membran (Leichner, Menzel, Laffleur ve Bernkop-Schnurch, 2017; Menzel ve diğerleri, 2018) ya da kapsül de kullanılabilmektedir (Cetkovic, Cvijic ve Vasiljevic, 2018; Karim ve diğerleri, 2015; Rajesh ve diğerleri, 2018).

İn vitro lipoliz çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları her ne kadar ilacın performans ve kalitesinin bir göstergesi olsa da lipit temelli sistemlerin değerlendirilmesinde yeterli değildir.

SNEDDS'ler oral olarak alındıklarında in vivo koşullarda içerdikleri yağ yapısındaki yardımcı maddeler nedeniyle gastrointestinal sıvılarla karıştıktan sonra lipaz/kolipaz enzimleri tarafından sindirime uğrayabilmektedir (Şekil 2.7) (Porter ve diğerleri, 2007). Sindirim lipit temelli formülasyonlardaki sindirilebilir bileşenlerin ilaç absorpsiyonuna etkisini ve gastrointestinal lümenin çözünürlük kapasitesindeki değişiklikleri anlamak için önemli bir fizyolojik süreçtir. Bu süreçte oluşan kolloidal sistemler sindirim boyunca değişmektedir. Sindirim sonucu oluşan lipolitik ürünlerin, safra tuzları ve fosfolipitler ile etkileşime girerek etkin maddenin çökmesini önleyen emülsiyon damlalarına, veziküllere ve son olarak misellere dönüşümünün incelenmesi gereklidir. Bu aşamada in vitro çözünme testleri lipitlerin sindirimi ve emilen kısım olan misel karışımları ve bunların çözünmeleri hakkında bir bilgi vermez. Bu nedenle lipit temelli formülasyonların in vitro değerlendirilmesi ve in vivo performansının tahmini için in vitro lipoliz modelleri geliştirilmiştir (Larsen, Sassene ve Mullertz, 2011).



Şekil 2.7. Lipitlerin GİK'teki sindirim süreci (Porter ve diğerleri, 2007)

2.8. Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler

Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (Solid Self-emulsifying Drug Delivery System-S-SEDDS) kavramı sıvı SEDDS ile ilişkili sıvı ilaç-ilaç etkileşimleri, ilaç-yardımcı madde etkileşimleri, sıvı sistem ve kapsül kabuğu arasındaki reaksiyonlar, düşük sıcaklıkta çökme, yüksek maliyet, tat, üretim, sürfaktanın GİK mukozası üzerindeki tahriş edici etkisi, kullanım ve düşük formülasyon stabilitesi gibi dezavantajların üstesinden gelmek için geliştirilmesi amaçlanan yeni teknolojik yaklaşımlardır (Rehman ve diğerleri, 2017; Shukla ve diğerleri, 2016; Singh ve diğerleri, 2014).

S-SEDDS'ler sıvı SEDDS'leri farklı katı dozaj formlarına dönüştürmek için lipidik ve katılaştırıcı yardımcı maddelerin karşılıklı etkileşimini içerir (Feeney ve diğerleri, 2016). Sıvı SEDDS'nin katılaştırılması ile hem sıvı SEDDS'in hem de geleneksel katı dozaj formlarının avantajları birleştirilerek var olan sınırlamalar aşılmıştır. S-SEDDS gelişmiş çözünürlük ve biyoyararlanım, üretim süreci üzerinde kontrol, daha düşük üretim maliyetleri, gastrik geçişin bağımsızlığı, doz bölünmesinde esneklik, bireyiçi ve bireylerarası değişkenlikte azalma, tekrarlanabilirlik, daha iyi taşınabilirlik, yüksek stabilite, sağlamlık, ölçeklenebilirlik, güvenirlik ve artan hasta uyuncu gibi önemli avantajlara sahiptir (Kazi, 2017; Rehman ve diğerleri, 2017). Ayrıca S-SEDDS formülasyonları uygulama hacminde olası azalmaya, hassas dozlamaya, ilaç yükleme kapasitesi ve biyoyararlanımdan kayıp yaşanmadan elde edilmeye olanak tanır. Mevcut olan çeşitli katılaştırma teknikleri ilaç yükleme kapasitesi ve katı formülasyonun sıvıdan katı hale dönüştürüldükten sonra geri kazanılması bakımından birbirinden farklı olma eğilimindedir. Dolayısıyla karakteristik bir katılaştırma tekniğinin seçimi sıvı formülasyonun doğasına, ilacın özelliklerine ve bunların seri boyutuna bağlı olacaktır (Singh ve diğerleri, 2014). Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri ve biyoyararlanım değerlendirmeleri Çizelge 2.12'de verilmiştir:

Çizelge 2.12. Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışma örnekleri

Etkin madde	Kullanılan sistem		Çözünürlük/Biyoyararlanım	
Lopinavir (Antiviral) (Patel, Shelat ve Lalwani, 2016)	Campul® MCM C8 Cremophor® RH 40 Propilen glikol	Aerosil® 200 Aerosil® 300 Neusilin® US2 Maltodekstrin Spray-dried laktoz	Biyoyararlanım Artışı Süspansiyon/S-SNEDDS Piyasa ürünü/S-SNEDDS Bağıl Biyorarlanım (%) LPV süspansiyonu S-SNEDDS Ticari ürün	 2,97 kat 1,54 kat - 297 193
Nelfinavir (Antiviral) (Patel, Shelat ve Lalwani, 2014)	Maisine® 35-1 Labrasol® Cremophor® RH 40	Neusilin® US2 Aerosil® 200	Biyoyararlanım Artışı Süspansiyon/S-SNEDDS Süspansiyon/SNEDDS	 2,45 kat 1,99 kat
Tizanidin hidroklorür (Kas gevşetici) (Pramanik ve Thakkar, 2020)	Capmul® G Tween® 20 Propilen glikol	Neusilin® US2	Biyoyararlanım Artışı Piyasa preparatı/S-SMEDDS	 4,61 kat
Avanafil (Erektil disfonksiyon) (Soliman, Ibrahim ve Ghorab, 2016)	Labrafil® Tween® 80 Transkutol® HP	Aeroperl® 300	Biyoyararlanım Artışı Spedra® tablet / S-SNEDDS Bağıl Biyorarlanım (%) Spedra® tablet S-SNEDDS	 3,2 kat 130 533
Darunavir (Antiviral) (Inugala ve diğerleri, 2015)	Campul® MCM C8 Transcutol® P Tween® 80 Labrafil® Transcutol® Tween® 80	Neusilin® US2 Aeroperl® 300	Bağıl Biyorarlanım (%) Darunavir dispersiyonu L-SNEDDS S-SNEDDS	 - 203 285
Sinnarizin (Antihistaminik) (Aboutaleb, Kharshoum ve Ismail, 2016)	Labrafil® Transcutol® Tween® 80	Aeroperl®300 Aerosil® 200 Hidrofilik nanosilika Neusilin® US2	Bağıl Biyorarlanım (%) Stugeron® tablet/S-SNEDDS	 190
Ondansetron (Antiemetik) (Beg ve diğerleri, 2013)	Campul® MCM Labrasol® Tween® 20	Sylysia® 350 Sylysia® 550 Sylysia® 730 Neusilin® US2	Bağıl Biyorarlanım (%) Ondansetron süspansiyonu Zofran ODT L-SNEDDS SSNEGs	 - 99,4 580 534
Aripiprazol (Antipsikotik) (Mahajan, Singh, Sharma, Singh ve Bedi, 2021)	Labrafil® M 1944 CS Cremophor® EL PEG® 400	Maltodekstirin Laktoz Mannitol β-siklodekstrin	Bağıl Biyorarlanım (%) Süspansiyon/ S-SMEDDS Piyasa preparatı/S-SMEDDS	 226 113

2.8.1. SEDDS'i S-SEDDS'e dönüştürmek için kullanılan katılaştırma teknikleri

Sıvı SEDDS'lerin katı SEDDS'lere dönüştürülmesi için:

- Sıvı ve yarı katı SEDDS formülasyonların kapsüllere dolumu
- Püskürterek kurutma
- Püskürterek dondurma
- Liyofilizasyon
- Süperkritik akışkan yatak metodu
- Eriyik granülasyonu
- Katı taşıyıcılara adsorbsiyon
- Eriyik ekstrüzyon/siferonizasyon
- Kuru emülsiyon
- Katı lipit nanopartikül ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar
- Kendiliğinden emülsifiye dozaj formları
    - Kendiliğinden emülsifiye kapsüller
    - Kendiliğinden emülsifiye uzatılmış ve kontrollü salım tabletler
    - Kendiliğinden emülsifiye supozituvarlar
    - Kendiliğinden emülsifiye uzatılmış ve kontrollü salım pelletler
    - Kendiliğinden emülsifiye nanopartiküller
    - Kendiliğinden emülsifiye boncuklar
    - Kendiliğinden emülsifiye katı dispersiyonlar
    - Kendiliğinden emülsifiye uzatılmış salımlı mikroküreler
    - Kendiliğinden emülsifiye implantlar

olmak üzere pek çok yöntem geliştirilmiştir (Karwal ve diğerleri, 2016; Patel ve diğerleri, 2013). Bu yöntemlerle elde edilen dozaj şekillerine ait örnekler Çizelge 2.13'te verilmiştir.

Çizelge 2.13. Farklı katılaştırma teknikleri ile elde edilen çeşitli S-SEDDS formülasyonlarına ait örnekler

SEDDS tipi	Etkin madde	Kullanılan yağ/sürfaktan/kosürfaktan	Katılaştırıcı yardımcı madde(ler)	Referans
Tozlar	**Lerkanidipin**	Capmul® MCM8, Tween® 80, PEG® 400	Neusilin®	(Kallakunta, Bandari, Jukanti ve Veerareddy, 2012)
	Ubikinon	Cremophor® EL, Capmul® MCM	MCC	(Nazzal, Zaghloul ve Khan, 2002c)
Granüller	**Ondansetron**	Capmul® MCM, Labrasol®, Tween 20	Aerosil® 200, Sylysia® 350, Neusilin® US2	(Beg, Swain, Singh, Patra Ch ve Rao, 2012)
	Ezetimib	Capryol® 90, Lauroglycol® FCC, Cremophor® EL, Transcutol® P	Aerosil® 200	(Dixit ve Nagarsenker, 2008)
Pelletler (Eriyik ekstrüzyon)	**Karvedilol**	Kaprilik trigliseritler, Plurol®, Transcutol® HP	Aerosil® 200, MCC pH 101, HPMCAS/HPC, Talk	(Silva ve diğerleri, 2018)
Pelletler (Yaş granülasyon)	**Nitrendipin**	Miglyol® 812, Cremophor® RH 40, Tween® 80, Transcutol® P	Silikon dioksit, laktoz, krospovidon, MCC	(Wang ve diğerleri, 2010)
	Isradipin	Oleik asit, Brij® 98, Triasetin	Poloksamer 407, HPMC	(Trana ve diğerleri, 2013)
Pelletler (Ekstrüzyon/ sferizasyon)	**Puerarin**	Tween® 800 gliserin, etil oleat	Akasya zamkı, Mannitol	(Yu, Zhai, Cui ve Liu, 2006)
	Progesteron		MCC	(Abdalla, Klein ve Madder, 2008)
Pelletler (Akışkan yatak kaplama)	**Siklosporin A**	Orta zincirli trigliseritler, Solutol® HS 15 Labrafil® M1944 CS, Cremophor EL, Transcutol P	PVP® K30	(Lei ve diğerleri, 2011)
Kontrollü salım tabletler	**Koenzim Q 10**	Capmul® MCM-C8, Cremophor EL	Avicel® PH-112, Maltodekstrin, Kollidon VA64	(Nazzal ve Khan, 2006)
	Karvedilol	Orta zincirli trigliseritler, HCO-40, Transcutol® HP	HPMC, MCC, Ac-Di-Sol®, Aeroperl®, Magnezyum stearat	(Mahmoud, Bendas ve Mohamed, 2009)
Midede tutulan SEDDS	**Takrolimus**	Cremophor® RH40, Monokaprilin gliserat	Polietilenoksit, Kitozan, olivinilpirolidon	(Wang, Gan ve Zhang, 2011)
	Halofantrin	Fıstık yağı, Maisine® 35-1, Span® 20, oleik asit	HPMC, sitrik asit, Na bikarbonat	(Khoo, Humberstone, Porter, Edwards ve Charman, 1998)
Püskürterek kurutulmuş SEDDS	**Kurkumin**	D, L-Sülforafan, Cremophor® EL, kaprik gliseritler	Soluplus® veya Neusilin® US2	(Kamal ve diğerleri, 2020)
Ötektik SEDDS	**Ubikinon**	Capmul® MCM, Cremophor®, Limon yağı	HPMC	(Nazzal, Smalyukh, Lavrentovich ve Khan, 2002b)

Çizelge 2.13. (devam) Farklı katılaştırma teknikleri ile elde edilen çeşitli S-SEDDS formülasyonlarına ait örnekler

Osmotik SEDDS	**Karvedilol**	Gelucire® 44/14, Lutrol® F68, Transcutol® P	Silikon dioksit, Mannitol, Sitrik asit, Sodyum bikarbonat	(Wei ve diğerleri, 2007)
	Siklosporin A	Labrafil® M 1944CS, Cremophor® EL, Transcutol® P	Sükroz, Laktoz, Polietilen oksit, prejelatinize nişasta	(Zhang ve diğerleri, 2013)
Osmotik SEDDS	**Furosemid**	Miglyol® 812, Labrasol®, Plurol® oleik	Kolloidal silika, kalsiyum klorür	(Zvonar, Berginc, Kristl ve Gasperlin, 2010)
	Loratidin	Captex® 200, Capmul® MCM, Cremophor® EL	Polisitiren	(Patil ve Paradkar, 2006)

Bu tekniklerden katı taşıyıcılar üzerine adsorpsiyon katılaştırma için kullanılan en umut verici tekniktir. Sıvı kendiliğinden emülsifiye formülasyonları katı taşıyıcılara adsorbe edildiğinde serbest akışlı bir toz elde edilir. Adsorpsiyon işlemi kolaydır ve sadece bir havanda karıştırma ile taşıyıcılara sıvı bir formülasyon ilave edilmesini içerir. Elde edilen toz daha sonra doğrudan kapsüllere doldurulabilir veya alternatif olarak tabletlere sıkıştırılmadan önce uygun eksipiyanlarla karıştırılabilir. Adsorpsiyon tekniğinin en önemli avantajı içerik tek düzeliğidir (Kelan ve Khutle, 2015). Uygun bir taşıyıcı üzerine, SEDDS yüksek seviyelerde (~%70 ağırlık/ağırlık) adsorbe edilebilir (Katteboina ve diğerleri, 2009).

2.8.2. SEDDS'i S-SEDDS'e dönüştürmek için kullanılan taşıyıcı materyaller

S-SEDDS tekniğinde taşıyıcı maddeler ilacın sıvı halden kuru toz formunun elde edilmesinde ana rol oynar. Her taşıyıcının kendine özgü özellikleri vardır, ancak her biri sıvılar için yeterli adsorplama kapasitesine sahip gözenekli bir yapıda olmalıdır. Taşıyıcının spesifik yüzey alanının sistemlerin formülasyonunda önemli bir faktör olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.14) (Vranikova ve Gajdziok, 2013). Taşıyıcı seçimi sıvı bağlama kapasitesine, tozların akışkanlığına ve sıkıştırılabilirliğine bağlıdır. Kimyasal yapılarına bağlı olarak da taşıyıcılar dört kategoriye ayrılabilir (Çizelge 2.14) (Agarwal, Siddiqui, Ali ve Nazzal, 2009; Hentzschel, Sakmann ve Leopold, 2011; Kahr ve Madsen, 1995; Van Speybroeck ve diğerleri, 2010).

Çizelge 2.14. Spesifik yüzey alanlarına ve kimyasal yapılarına göre taşıyıcı materyallerin sınıflandırılması (Van Speybroeck ve diğerleri, 2010; Vranikova ve Gajdziok, 2013)

Taşıyıcı grubu	**Taşıyıcı**	**Spesifik yüzey alanı (m^2/g)**
Selüloz ve selüloz türevleri	Mikrokristalin selüloz	~ 1,18
	Hidroksipropil metilselüloz	-
Şekerler	Laktoz	~ 0,35
	Sorbitol	~ 0,37
Silikatlar	Magnezyum aluminometasilikat	110-300
	Kaolin	~ 24
	Yapılandırılmış mezoporus silikatlar	1500'e kadar
Diğerleri	Anhidrus dibazik kalsiyum fosfat	30
	Polimetakrilat	-
	Nişasta	~ 0,60
	Magnezyum karbonat	~ 10

SEDDS'lerin adsorbsiyonu için uygun bir taşıyıcı seçiminde silika, silikatlar, magnezyum trisilikat, magnezyum hidroksit, talk, krospovidon, çapraz bağlı sodyum karboksi metil selüloz ve çapraz bağlı metil metakrilat gibi mikro gözenekli inorganik maddeler, yüksek yüzey alanlı kolloidal inorganik adsorban maddeler, çapraz bağlı polimerler veya nanopartikül adsorbanlar kullanılabilir.

Magnezyum alüminometasilikatlar (Neusilin®, Pharmsorb®, Veegum®) çok çeşitli uygulamalar için çeşitli grup ve pH seçeneği bulunan bir sınıftır (FujiChemical, 2021). Bu tez çalışması kapsamında adsorban olarak Neusilin® US2 seçilmiştir. Neusilin® US2 magnezyum alüminometasilikatın ($Al_2O_3 \cdot MgO \cdot 1.7SiO_2 \cdot xH_2O$) sentetik ve amorf şeklidir Geniş bir spesifik yüzey alan, yüksek gözeneklilik ve yüksek yağ adsorbsiyon kapasitesine sahiptir (Çizelge 2.15) (FujiChemical, 2021). Neusilin® US2 antibiyotikler, lipofilik etkin maddeler, az çözünür etkin maddeler, bitkisel karışımlar ve vitaminleri içeren formülasyonlar için dünya çapında kabul görmüştür. Farmasötik uygulamalarda tabletler, tozlar, granüller ve kapsüllerin kalitesini artırmak için taşıyıcı ve dolgu maddesi ayrıca katı dispersiyonlar ve kendiliğinden emülsifiye ilaç sistemleri için taşıyıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Çizelge 2.15. Neusilin® US2'nin karakteristik özellikleri (FujiChemical, 2021)

Görünüş		Beyaz granül
Beyazlık derecesi (%)		>95
Kurutmada kayıp (%)		<7
Dansite	**Küme dansitesi (g/mL)**	0,13-0,18
	Sıkıştırılmış dansite (g/mL)	0,16-0,22
Gerçek özgül ağırlık		2,2
Spesifik yüzey alanı (m^2/g)		300
Ortalama parçacık boyutu (µm)		106
Yığın açısı (°)		30
Yağ adsorbsiyon kapasitesi (mL/g)		2,7-3,4
Su adsorbsiyon kapasitesi (mL/g)		2,4-3,1

Neusilin® US2'nin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Adsorpsiyon kapasiteleri lipofilik yağların veya etkin maddelerin formüle edilebilmesi
- Neme hassas etkin maddelerin stabilitesinin artırılması
- Tozların sıkıştırılabilirliğinin ve akıcılığının artırılması
- Düşük sıkıştırma kuvvetlerinde bile tabletlerin sertliğinin artırılması şeklindedir.

2.8.3. Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerde yapılan kalite denetimleri

Mikromeritik

Toz akışı (akış özelliği) bir tabletin veya kapsüllerin tekrarlanabilir bir şekilde doldurulmasının yanı sıra homojen bir doz elde etmek için katı dozaj formlarının formülasyonunda ve endüstriyel üretiminde önemlidir. Elde edilen S-SEDDS formülasyonlarında bu amaçla ilgili farmakopelerde yer alan ve toz özelliklerinin karakterizasyonunda ana parametreler olan küme dansitesi, sıkıştırılmış dansite, yığın açısı, Carr basılabilirlik indeksi ve Hausner oranı gibi kritik parametreler belirlenmelidir.

Katı hal karakterizasyonu

S-SEDDS elde edilmesiyle sistemin içerdiği etkin maddenin katılaştırma ve formülasyonda kullanılan diğer yardımcı maddeler ile etkileşimlerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi amacı ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalardır.

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (Differential Scanning Calorimetry-DSC), ilacın termal davranışlarını (erime noktası, camsı geçiş sıcaklığı), formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin yapısının, ilaç ve yardımcı maddeler arasındaki olası etkileşimleri ve hazırlanan sistemin yapısının değerlendirilmesi için gerçekleştirilir. Numuneler kullanılan etkin maddeye göre tarama sıcaklığı aralığında sabit bir ısıtma hızında değerlendirilir. Sonraki çalışmaların başarısını sağlamak için herhangi bir uyumsuzluğun varlığının belirlenmesi çok önemlidir.

Etkin maddenin S-SEDDS içinde kristal yapısını kontrol etmek için X-ışını toz kırınımı (X-Ray Powder Diffraction-X-RPD) çalışmaları, etkin maddeye ait karakteristik moleküler bağların durumunun belirlenmesi için fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (Fourier Transform Infrared-FT-IR) analizi hem etkin maddenin hem de S-SEDDS'in morfolojilerinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscope-SEM) önerilmektedir. İlacın karakteristik piklerinin veya kristallerinin kaybolması genellikle ilacın amorf forma dönüştürüldüğünü ve/veya sıvı formülasyonda çözündürüldüğünü ve/veya başarılı bir şekilde S-SEDDS'e yüklendiğini gösterir. Kullanılan adsorbanın porozitesinin belirlenmesi, gözenek hacminin incelenmesi ve adsorblama kapasitesi hakkında bilgi edinilmesi için Brunauer, Emmett ve Teller (BET) tekniği kullanılarak analizler gerçekleştirilir. Elde edilen sonuçlar sistemlerin adsorbana başarılı bir şekilde yüklenmesi hakkında da bilgi sağlamaktadır.

Etkin madde yükleme kapasitesi kullanılan adsorbana, yükleme yöntemine ve yüklenecek formülasyon içeriğine göre değişkenlik göstermektedir. Tüm bunların değerlendirilmesi için yüklenen etkin maddenin sistem içindeki miktarı uygun analiz yöntemi ile analiz edilmelidir.

Tüm bunların yanında yine geliştirilen S-SEDDS tablet formülasyonlarında in vitro çözünme hızı çalışmaları, in vitro lipoliz çalışmaları, ex vivo permeabilite çalışmaları ve uzun ve kısa süreli stabilite çalışmaları da gerçekleştirilmektedir.

2.9. İn Vitro - İn Vivo İlişki (IVIVR) Kurulması

İn vitro-in vivo korelasyon (IVIVC) terimi biyolojik bir özellik veya dozaj formu tarafından üretilen biyolojik bir özellikten türetilen parametre ile aynı dozaj formunun fizikokimyasal bir özelliği veya karakteristiği arasında matematiksel ilişkinin kurulması olarak tanımlarken ilk olarak farmasötik literatürde biyoyararlanım ve in vitro çözünme hızı kavramlarının farkındalığının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Scheubel, 2010).

En yaygın olarak kullanılan biyolojik özellikler dozaj formunun uygulanmasından sonra elde edilen C_{max} veya AUC gibi bir veya daha fazla farmakokinetik parametredir. En yaygın olarak kullanılan fizikokimyasal özellik ise bir dozaj formunun in vitro çözünme davranışıdır (örneğin; belirli bir koşulda salınan ilacın yüzdesi). Biyolojik ve fizikokimyasal bu iki özellik arasındaki ilişki daha sonra nicel olarak ilişkilendirilerek kurulmaktadır.

IVIVC ve IVIVR in vitro ve in vivo veriler arasında bağlantı kurmanın farklı iki yoludur. Formülasyonu etkinlik ve performans özellikleriyle ilişkilendirmede bir çözünme testinin değerli olması için IVIVC veya IVIVR'nin oluşturulabilmesi çok önemlidir (Rojas Gomez ve Restrepo Valencia, 2015).

İlişki ve korelasyon terimleri birbirine çok yakın olmakla birlikte aynı anlamı taşımazlar ve biyofarmasötik bir bakış açısından, iki terim genellikle şu şekilde tanımlanır:

IVIVC: Bir dozaj formunun (genellikle çözünme veya salınma) in vitro özelliği ve ilgili bir in vivo yanıt (genellikle "absorpsiyon" eğrisi veya plazma zaman-konsantrasyon eğrisinden türetilen parametreler) ile ilgili "kantitatif" doğrusal bir matematiksel modeli

IVIVR: Kalitatif eğilimleri gösteren in vitro ve in vivo veriler arasında "niteliksel" bir sıralamayı ifade eder.

Uygulamada korelasyon genellikle doğrusal bir ilişkiyi ifade etmektedir (Kachigan, 1991). "korelasyon" yerine doğrusal olmayan ilişkilere izin verecek daha genel bir terim olan IVIVR'nin kullanılması (özellikle IR ürünler için) IVIVC tipi analizinin geliştirilmesine yardımcı olabilir (Polli, 2000).

IVIVR'nin amacı bir ürünün genel absorpsiyon kinetiğine çözünmenin nispi katkısını öğrenmektir ve IVIVR değerlendirmesi formülasyon özelliklerinin ve etkin maddenin biyofarmasötik özelliklerinin, çözünmenin genel absorpsiyon kinetiklerini kontrol etme derecesini etkilediğini göstermiştir (Mendyk, Tuszynski, Polak ve Jachowicz, 2013; Polli, 2000). Bu nedenle çalışmamızda IVIVR değerlendirmesi MathLab® 9.10 ile gerçekleştirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

4-bromobenzeneboronik asit	Sigma-Aldrich, Fransa
Antibody diluent	Thermo Scientific, ABD
Antisedan®	Orion Pharma, Finlandiya
(Son kullanma tarihi: 03/22 Seri numarası: 1903567)	
Aqua mont	Thermo Scientific, ABD
Ayçiçek yağı	Bizim yağ, Türkiye
Ayçiçek yağı	Yudum, Türkiye
Asetonitril	Merck, Almanya
Bosentan monohidrat	Abdi İbrahim, Türkiye
Capmul® MCM C8	Abitec, ABD
Captex® 355	Abitec, ABD
Capryol® 90	Gattefossé, Fransa
Cremophor® RH 40	Sigma, ABD
Çörek otu yağı	Zade Vital, Türkiye
Dimetilsülfoksit	Merck, Almanya
Domitor®	Orion Pharma, Finlandiya
(Son kullanma tarihi: 12/23 Seri numarası: 1903567)	
Fosforik asit	Sigma-Aldrich, Fransa
Fosfat tamponu (PBS 10X)	Biooptica, ABD
Fosfotungustik asit	Sigma, ABD
Formaldehit (%10)	Tekkim, Türkiye
Hidrojen peroksit blok	Thermo Scientific, ABD
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, Almanya
Imwitor® 948	Olechemicals, Almanya
Imwitor® 988	Olechemicals, Almanya
Isoflurane – USP	Piramal, ABD

Kalsiyum klorür	Sigma, ABD
Keta-Control®	Doğa İlaç, Türkiye
(Son kullanma tarihi: 12/23 Seri numarası: 210034)	
Keten tohumu yağı	Zade Vital, Türkiye
Ksilen	Tekkim, Türkiye
Labrafac®	Gattefossé, Fransa
Labrafil® M 1944 CS	Gattefossé, Fransa
Labrasol®	Gattefossé, Fransa
Maisine®	Gattefossé, Fransa
Mayer hematoksilen	Atomsci, Türkiye
Metanol	Sigma-Aldrich, Fransa
Mısır yağı	Zade Vital, Türkiye
Miglyol® 812	Sigma, ABD
Miglyol® 818	Sigma, ABD
Miglyol® 840	Sigma, ABD
Monokrotalin	Cayman Chemical, ABD
Oleik asit	Sigma-Aldrich, Fransa
Pankreatin	Sigma-Aldrich, ABD
Pamuk yağı	Zade Vital, Türkiye
Peceol®	Gattefossé, Fransa
PEG® 400	Sigma-Aldrich, Fransa
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Referans ürün (Tracleer®)	Actelion, İsviçre
(Son kullanma tarihi 10/20 Parti numarası IW067A0401)	
SIF powder	Biorelevant, ABD
Sitrat tampon çözeltisi	Thermo Scientific, Türkiye
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Sodyum lauril sülfat (SLS)	Merck, Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, Almanya
Susam yağı	Zade Vital, Türkiye
Teksol	Tekkim, Türkiye
Trietilamin	Merck, Almanya

Transkutol® P	Gattefossé, Fransa
Tween® 20	Merck, Fransa
Üzüm çekirdeği yağı	Zade Vital, Türkiye
Xylazinbio®	Bioveta, Çek Cumhuriyeti
(Son kullanma tarihi: 05/22 Seri numarası: 815527A)	
Zeytinyağı	Zade Vital, Türkiye

3.1.2. Kullanılan antikor ve kitler

AEC kromojen kit	Thermo Scientific, ABD
Anti-Caspase-3 antibody	Bios, ABD
Anti-IL-6 antibody	Bios, ABD
Anit-eNOS antibody	Abcam, ABD
Anti-TNF-α antibody	Bios, ABD
Anti-TROP2 antibody	Abcam, ABD
DAB plus kit	Thermo Scientific, ABD
Rat Alb (Serum albümin) ELISA kit	Fine test, Türkiye
UltraVision polyvalent (Rabbit-mouse)	Thermo Scientific, ABD
HPR kit	Thermo Scientific, ABD

3.1.3. Kullanılan floresans boyalar

VivoTag® 680XL	PerkinElmer, ABD
XenoLight™ DIR	PerkinElmer, ABD

3.1.4. Kullanılan araç ve gereçler

12S-RS prob	GE Healthcare, Çin
24x50 lamel	Isotherm, Çin
-80°C derin dondurucu	Thermo Scientific
0,45 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
Alüminyum pan	Shimadzu, Japonya
Bidistile su cihazı	Barnstead D11901

Yüzey karakterizasyon cihazı (BET)	Quantachrome Autorb 6B, ABD
Çözünme hızı cihazı	Agilent 708-DS, ABD
Dağılma testi cihazı	Pharma Test-DIST 3, Almanya
Diferansiyel tarama kalorimetresi	Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	Nüve NS112, İngiltere
Ekokardiyografi cihazı	GE Vingmend Ultrasound AS, Norveç
Enjektör	Ayset, Türkiye
Eppendorf tüp	Isolab, Almanya
Franz difüzyon hücresi	Çalıkan cam, Türkiye
Friabilitör	Roche, ABD
FT-IR spektrometre	Perkin Elmer, ABD
HPLC	Agilent 1220 LC, Almanya
IVIS®	Caliper LifeSciences, PerkinElmer, ABD
İnsülin enjektörü	Beybi, Çin
İklimlendirme dolabı	Sanyo, ABD
İklimlendirme dolabı	Nüve, Türkiye
Kumpas	Vernier Caliper, Rusya
Kübik toz karıştırıcı	Pharmag, Almanya
LC-MS/MS	Shimadzu, Japonya
Masson trikrom boyama seti	Biooptica, Türkiye
Membran filtre	Sartorius, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
Mikrosantrifüj	Isolab, Türkiye
Mikroskop	Olympus CH40, Almanya
Otomatik pipet seti	Eppendorf, Almanya
Plastik numune kabı	LP, Türkiye
Pappen	Sigma-Aldrich, Japonya
Partikül büyüklüğü ölçme cihazı	Sympatec HELOS 0728, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm aleti	Malvern Zetasizer Nano, İngiltere
pH metre	Ohaus, ABD
Polilizinli lam	Isotherm, Çin
Preparat saklama kutusu	Isolab, Türkiye

Rodajlı lam	Isotherm, Çin
Rotasyonel viskozimetre	Brookfield DV III+ Rheometer, ABD
Santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Santrifüj	Allegra X-30R, Almanya
Sert jelatin kapsül (00el)	Capsugel®, Belçika
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Tablet makinesi	Erwaka AR 401-Korsch, Almanya
Tablet sertlik ölçüm cihazı	CGS-HDT 1V-3, Almanya
Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	FEI Quanta 400 FEG, ABD
Transmisyon elektron mikroskopu (TEM)	FEI Tecnai G2 Spirit, ABD
Tek kullanımlık küvet	Isolab, Almanya
Terazi	Phoenix Instrument, Almanya
Termostatlı ısıtıcı	Nüve NB 20, Türkiye
Titrando 902	Metrohm, İsviçre
Türbidimetre	Velp Türbidimeter, İtalya
Ultrasonik banyo	Isolab Laborgeräte GmbH, Almanya
UV spektrofotometre	Agilent Cary 60 UV-Vis, Almanya
Vorteks	Firlabo, Fransa
X ışını difraktometre	Rigaku Ultima IV, Almanya

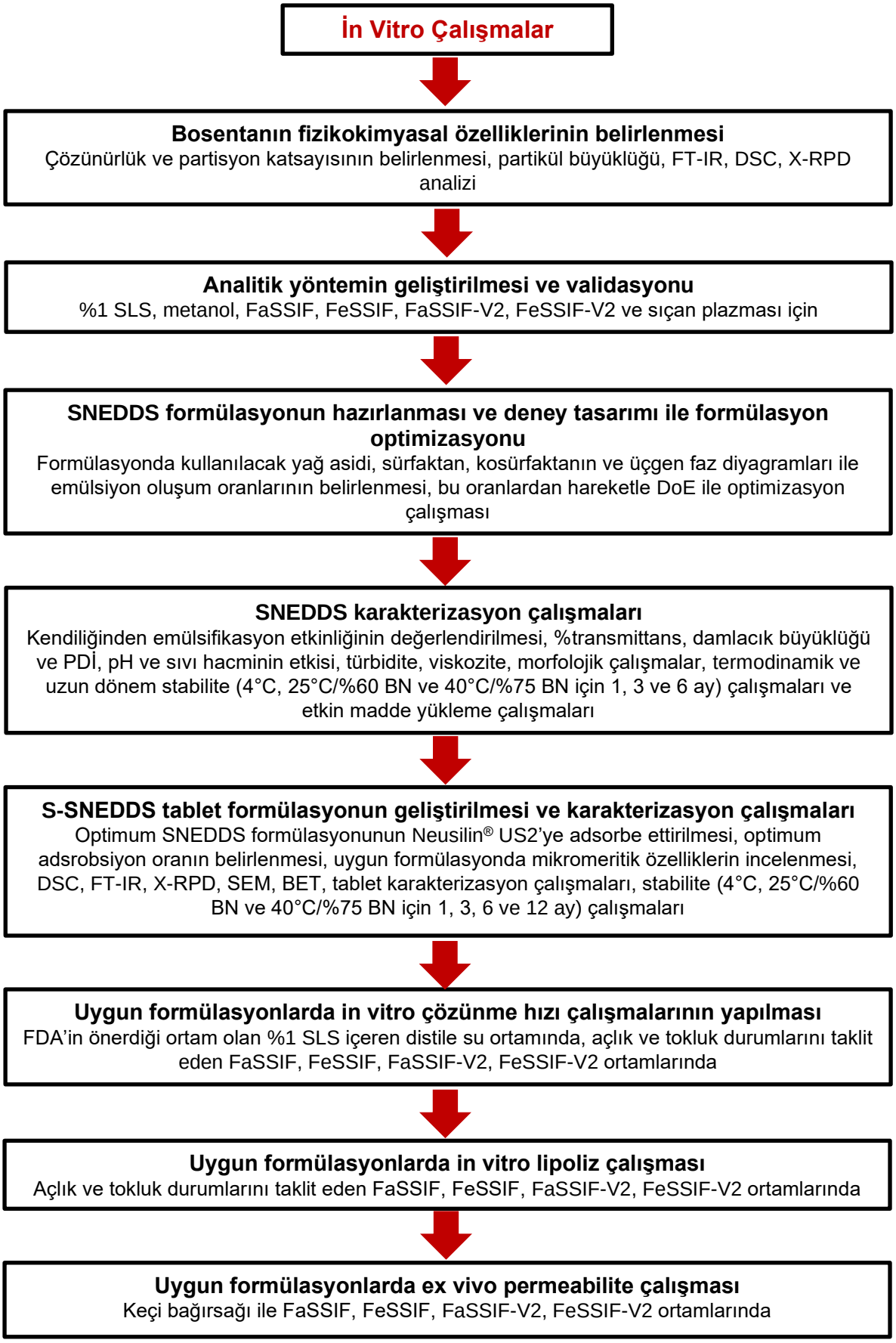
3.1.5. Kullanılan yazılımlar

DDSolver®
Design Expert® 10
IBM® SPSS® Statistics 24
ImageJ 1.53o
Living Image® 4.0
WinNonlin™ 8.3
MathLab® 9.10

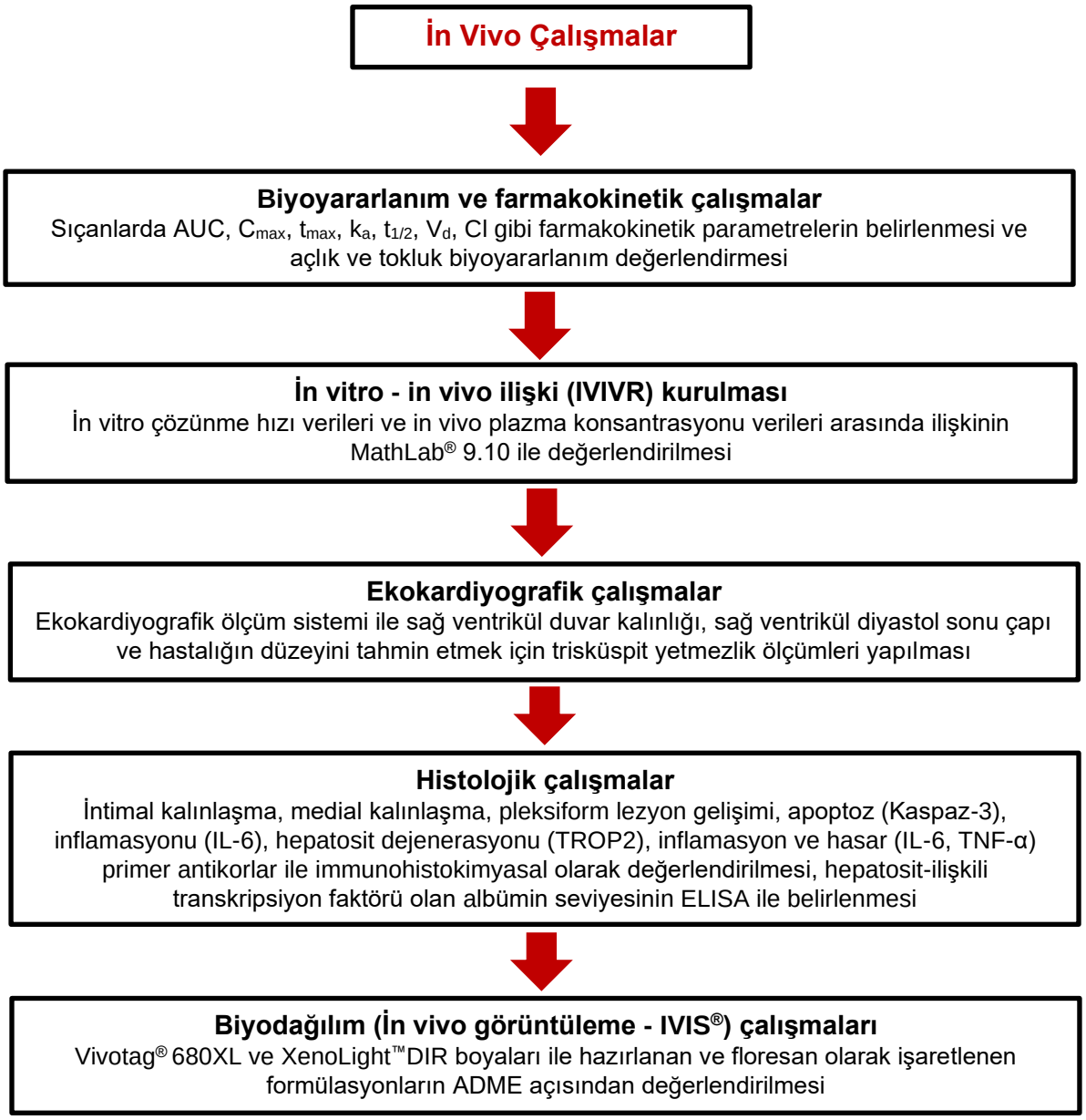
3.2. Yöntem

Bu tez çalışması in vitro ve in vivo olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. İn vitro çalışmalar BOS'un fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, çözünürlük çalışmaları, SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonların hazırlanması, bu formülasyonların karakterizasyonu, in vitro çözünme hızı çalışmaları, in vitro lipoliz çalışmaları ve ex vivo permeabilite çalışmalarını içermektedir. İn vivo çalışmalar ise geliştirilen SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonun referans ürün ile yapılan karşılaştırmalı farmakokinetik ve biyoyararlanım, in vitro-in vivo ilişki kurulması, farmakodinamik ekokardiyografi, histoloji ve biyodağılım çalışmalarını kapsamaktadır.

Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de in vitro ve in vivo olmak üzere yapılan çalışmalara ait yöntem akış şeması verilmiştir.



Şekil 3.1. İn vitro çalışmalara ait yöntem akış şeması



Şekil 3.2. İn vivo çalışmalara ait yöntem akış şeması

3.2.1. Bosentanın fizikokimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar

BOS'un fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla çözünürlük ve partisyon katsayısı değerlerinin bulunması, partikül büyüklüğü analizi, FT-IR analizi, DSC ve X-RPD analizi gerçekleştirilmiştir.

%1 SLS içeren distile su ortamındaki çözünürlük çalışması

BOS'un FDA'nın önerdiği çözünme hızı ortamı olan %1 SLS içeren distile suda çözünürlüğünün belirlenebilmesi için örnekler üç paralel olacak şekilde 25±0,5°C'de ve 37±0,5°C'de 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Aşırı doymuş çözelti hazırlayabilmek için ortamlara çözünebileceğinden fazla etkin madde eklenmiştir. Cam flakonlara konulan örneklere 10 mL çözünme ortamı eklenmiş ve ağzı kapatılmıştır. Örneklerden 1 ve 24. saat sonunda 5 mL alınarak 0,45 µm filtreden süzülmüş, UV spektrofotometrede maksimum dalga boyunda absorbansından hareketle konsantrasyonu analiz edilmiştir. Doygunluk çözünürlüğünden hareketle çözünme hızı çalışması için bağıl sink koşul hesaplanmıştır (Eş. 3.1).

Bağıl sink koşul = C_S/C_D (Eş. 3.1)

C_S: Doygunluk çözünürlüğü (mg/mL)

C_D: Çözünme ortamındaki ilaç konsantrasyonu (ilacın dozu/çözünme ortamı hacmi) (mg/mL)

Partisyon katsayısının belirlenmesi

BOS'un partisyon katsayısının belirlenmesi amacıyla 20 mL su ve 20 mL oktanol birbiri ile 25°C'de 24 saat doyurulmuş, 24 saatin sonunda etkin maddenin fazlası (~30-35 mg) eklenerek 25°C ve 37°C'de manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda ayırma hunisine alınarak 6 saat bekletilmiş ve fazların ayrımı sağlanmıştır. Ayrılan su fazlarının derişimleri UV spektrofotometrede maksimum dalga boyunda absorbansından hareketle konstrasyonu analiz edilerek logP değeri hesaplanmıştır. Partisyon katsayısı hesaplanması çalışmaları iki sıcaklık için üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Elde edilen derişimlerden hareketle partisyon katsayısını hesaplamak için Eş. 3.2 kullanılmıştır.

$\log P = \log [C_{oktanol}/C_{Distile\ Su}]$ (Eş. 3.2)

P: Partisyon katsayısı
C: Konsantrasyon (mg/mL)

Partikül büyüklüğü analizi

BOS'un partikül büyüklüğü tayini için etkin madde çözünmediği distile su ortamı içinde disperse edilmiş Sympatec HELOS 0728 aleti kullanılarak partikül büyüklüğü ve dağılımı belirlenmiştir. Ölçümler üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

FT-IR analizi

BOS'un Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR spektrofotometresi ile toz halinde 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektrumu çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

Erime derecesi tayini

BOS'un DSC analizi Shimadzu DSC-60 diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum pan içine yerleştirilen örneğin 10°C/dk'lık artışlarla 20-300°C aralığında analizi gerçekleştirilmiştir.

X-RPD analizi

BOS'un X-RPD analizi Rigaku Ultima IV cihazı kullanılarak 40 kV/30 mA X-ray parametreli, 2-60 derece tarama aralığında tarama hızı 0,02 derece/dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Bosentanın in vitro miktar tayini

BOS'un miktar tayini UV spektrofotometre ve UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography–HPLC) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Bosentanın UV spektrofotometrede dalga boyunun belirlenmesi

BOS'un çözünürlüğünün belirlenmesi için (çözünme hızı testinde de FDA'nın önerdiği ortam olan) %1 SLS içeren distile su, partisyon katsayısı deneyi için distile su ve yağ çözünürlük deneyleri için kullanılacak olan metanol için sırasıyla 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve 200-800 nm dalga boyu aralığında Agilent Cary 60 UV-Vis ile UV spektrumu, 1x1 cm'lik kuvartz küvetler içerisinde taranarak BOS'a ait maksimum dalga boyu (λ_{maks}) değerleri saptanmıştır.

Kalibrasyon doğrularının çizilmesi

BOS'un çözünürlük, çözünme hızı deneylerinde, miktar tayininde, partisyon katsayısının hesaplanmasında ve farklı yağlardaki çözünürlük tayinlerinde kullanılmak üzere %1 SLS içeren distile suda, in vitro çözünme hızı ortamlarında (%1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2), distile suda (5 mg etkin madde için 10 mL metanol kosolvan olarak kullanılarak) ve metanolde standart doğruları ve standart doğru denklemleri bulunmuştur. BOS'un çözünürlük deneyi %1 SLS içeren distile su için 50 µg/mL, in vitro çözünme hızı ortamları için 40 µg/mL, distile su ortamı ve metanol için 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Uygun seyreltmeler yapılarak çözünürlük deneyi %1 SLS içeren distile su için (UV) 4-18 µg/mL, %1 SLS içeren distile su çözünme hızı ortamı için (HPLC) 0,0195 µg/mL-10 µg/mL, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için 0,5 µg/mL-20 µg/mL, distile su için (UV) 10-40 µg/mL ve metanol için (UV) 10-35 µg/mL arasında çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir ortam için 3 ayrı seri çözeltisi hazırlanmış, önceden belirlenen λ_{maks}'ta bu derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri okunmuştur. HPLC çalışmalarında BOS derişimine karşı ortalama pik alanı, UV spektrofotometre çalışmalarında ise derişime karşı ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır.

Miktar tayini için kalibrasyon doğrularının bulunmasında en küçük kareler yöntemi uygulanmış, standart doğru denklemi elde edilmiştir. Korelasyon katsayısı (R^2), kesişim ve regresyon doğrusunun eğimi hesaplanmıştır. Miktar tayini yöntemleri

için sonuçlar ortalama, standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (% VK) olarak verilmiştir.

Bosentanın UV spektrofotometre ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu

Doğrusallık

Bir analitik yöntemde çalışılan aralıkta doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı değerlendirilmelidir (ICH, 1994). ICH Q2B'de doğrusallığın gösterilmesi için en az beş nokta önerilmektedir. Bu amaçla BOS'un 100 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile farklı konsantrasyonlar değerlendirilmiştir.

Doğruluk ve geri elde

Analitik yöntemin doğruluğu analiz ile elde edilen değerlerin gerçek değerlere olan yakınlığıdır. Doğruluk, deneyde bilinen miktar ilave edilmiş örnekle % geri kazanılan veya belirlenen güven aralığında ortalama değer ve gerçek değer arasındaki fark olarak değerlendirilebilmektedir. BOS'un in vitro miktar tayini için kullanılan yöntemin doğruluğunun test edilmesinde 3 farklı konsantrasyonda toplam 6 farklı seri çözelti hazırlanarak analiz edilmiş ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır (Eş. 3.3) (ICH Q2B, 1996).

% Geri Elde = (Ölçülebilen Konsantrasyon/Eklenen Konsantrasyon) x 100 (Eş. 3.3)

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği önceden belirlenen şartlar altında aynı numuneden alınan birden fazla örnek için elde edilen bir dizi ölçüm sonuçlarının yakınlığı ile değerlendirilmektedir. Kesinlik üç düzeyde incelenmektedir: Tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik.

Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik kısa bir zaman aralığında aynı şartlar altındaki kesinliği ifade etmektedir. Bu aynı zamanda örnek içi kesinlik olarak da bilinmektedir. Tekrar edilebilirlik için belirlenen aralıkta en az 9 ölçüm (örneğin; 3 konsantrasyon/3 tekrar) veya test konsantrasyonun %100'ünde en az altı ölçüm önerilmektedir (ICH, 1994). BOS'un miktar tayini yöntem validasyonu için 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı ölçüm yapılmıştır.

Ara kesinlik

Bu parametre ile rastgele seçilen değişkenlerin analitik yöntemin kesinliği üzerindeki etkileri saptanmalıdır. Bu değişkenlere farklı günler, farklı analistler ve farklı ekipmanlar örnek olarak verilebilir. Bu amaçla 3 farklı konsantrasyonda BOS içeren çözeltiler 3 farklı gün içinde hazırlanarak ölçülmüştür.

Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik laboratuvarlar arası denemenin değerlendirilmesi ve bir yöntemin standardizasyonu durumunda önem taşır ve deneyler arası kesinliğin saptanmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla 3 farklı konsantrasyonda 6 çözelti hazırlanarak analiz edilmiştir.

Özgünlük ve seçicilik

Yöntemin özgünlüğü numune içinde bulunabilecek maddeler (bozunma ürünleri ve safsızlıklar gibi) varlığında, analiti doğru şekilde ölçme yeteneğinin ölçüsüdür (Thompson, Ellison ve Wood, 2002; van Zoonen, Hoogerbrugge, Gort, van de Wiel ve van 't Klooster, 1999). Yöntemin etkin maddeye olan özgünlüğünü göstermek amacıyla aynı dalga boyu aralığında BOS etkin maddesini içeren ve içermeyen örneklerin UV spektrumu alınarak BOS ile aynı dalga boyunda maksimum absorbans verip vermediği incelenmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Bir analitik yöntemin tayin aralığı numune içindeki analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte tayin edilebileceği en düşük konsantrasyonudur. Saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük konsantrasyon değeri (LOQ) ile ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı Eş. 3.4 ve Eş. 3.5 hesaplanmıştır (EMA, 1995):

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

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

σ: kalibrasyon doğrusunun standart hatası
S: kalibrasyon doğrusunun eğimi

Stabilite

BOS'un çalışma süresi boyunca çözelti içindeki stabilitesi göstermek amacıyla 25°C metanol ortamında 15 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra 1, 2 ve 24. saat sonundaki miktarları tayin edilmiştir.

Bosentanın HPLC ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu

BOS'un miktar tayini çalışmalarının diğer bir kısmı ise UV dedektörlü HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. HPLC yöntemleri FDA'nın önerdiği %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı çalışmaları için kullanılmıştır.

BOS'un miktarının tayin edildiği in vitro deneylerin gerçekleştirilmesinde monograftaki analiz yöntemi temel alınmış (USP, 2012) ve Agilent 1220 Infinity LC HPLC kullanılmıştır. HPLC'de mobil faz oranları, akış hızı, dalga boyu gibi parametreler değiştirilerek en uygun çalışma şartları belirlenmiştir. FDA'nın önerdiği ortam, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında HPLC yöntemi ile yapılan miktar tayini validasyonu için kullanılan cihaz ve yöntem koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı ortamlar için kullanılan HPLC yöntem koşulları

	%1 SLS içeren distile su	FaSSIF	FeSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
Cihaz	Agilent 1220 Infinity LC	Agilent 1220 Infinity LC	Agilent 1220 Infinity LC	Agilent 1220 Infinity LC	Agilent 1220 Infinity LC
Kolon	XSelect® HSS C 18 5 µm, 4,6x250 mm	XSelect® HSS C 18 5 µm, 4,6x250 mm	XSelect® HSS C 18 5 µm, 4,6x250 mm	XSelect® HSS C 18 5 µm, 4,6x250 mm	XSelect® HSS C 18 5 µm, 4,6x250 mm
Mobil faz	Asetonitril: Tampon (55:45 h/h)	Asetonitril: Tampon (55:45 h/h)	Asetonitril: Tampon (55:45 h/h)	Asetonitril: Tampon (55:45 h/h)	Asetonitril: Tampon (55:45 h/h)
Kolon sıcaklığı	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Akış hızı (mL/dk)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enjeksiyon hacmi (µL)	100	100	100	100	100
Dalga boyu (nm)	220	220	220	220	220
Stok hazırlanması	1 mg BOS %1 SLS içeren distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (20µg/mL).	2 mg BOS, 2 mL metanolde çözülüp FaSSIF ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (40µg/mL).	2 mg BOS, 2 mL metanolde çözülüp FeSSIF ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (40µg/mL).	2 mg BOS, 2 mL metanolde çözülüp FaSSIF-V2 ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (40µg/mL).	2 mg BOS, 2 mL metanolde çözülüp FeSSIF-V2 ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (40µg/mL).
Stok numuneler (µg/mL)	10; 8; 5; 4; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0781; 0,0391; 0,0195	20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 5; 4; 2; 1; 0,5	20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5	20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 5; 4; 2; 1; 0,5	20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 6; 4; 2; 1; 0,5
Alıkonma zamanı (dk)	5,5	5	4,7	5,1	4,9

Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığı hazırlanan numunedeki etkin madde miktarının belli bir değer aralığı içerisindeki derişimi ile elde edilen yanıtın doğru orantılı olduğunun ifadesidir. Doğrusallığın kurulması için en az 5 konsantrasyon kullanılmalıdır (ICH Q2, 2005). Doğrusallık parametresini göstermek için %1 SLS, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 içerisinde BOS'un stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 12 farklı derişim hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilmiştir. Üç ayrı stok çözeltiden elde edilen farklı konsantrasyonlar analiz edilmiştir.

Doğruluk ve geri elde

Bir analiz yönteminin doğruluğu, bu yöntem kullanılarak ölçülen değerin gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu, konsantrasyonu bilinen örneklerin analiz edilmesiyle elde edilen geri elde etme yüzdesine bağlıdır. Bu değer %95 olasılıkla daha önceden kabul edilen ölçütler arasında kalmalıdır. BOS'un %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında hazırlanan %80, %100 ve %120'lik çözeltilerinde kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Analitik yöntemin kesinliğini tayin etmek amacıyla deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır

Tekrar edilebilirlik

BOS'un deney içi kesinliği, %1 SLS içeren distile su ortamı için stok çözeltiden 0,625 µg/mL derişimde, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için stok çözeltilerden 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltilerinin arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Tekrar elde edilebilirlik

BOS'un deneyler arası kesinliğinin belirlenmesinde %1 SLS içeren distile su ortamı için stok çözeltiden 0,625, 5, 10 µg/mL derişimlerde, FaSSIF ve FaSSIF-V2 ortamları için stok çözeltiden 5, 10, 16 µg/mL derişimlerde, FeSSIF ve FeSSIF-V2 ortamları için stok çözeltiden 6, 10, 16 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu örnekler birbirini takip eden 3 gün içinde HPLC'ye 3 kez enjekte edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Özgünlük ve seçicilik

Özgünlük ve seçicilik analiz edilecek maddeleri matristeki diğer maddelerin varlığında doğru olarak ayırt edebilmesidir ve kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla etkin madde içermeyen SNEDD sistem çözeltilerinin ortamları ve etkin madde içeren çözeltilerinin ortamları 220 nm dalga boyunda HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Duyarlıklık ve saptama sınırı

Duyarlılık bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup LOD ve kantitatif olarak tayin edilebileceği LOQ ile ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı Eş. 3.4 ve Eş. 3.5 ile hesaplanır.

Stabilite

BOS'un %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda hazırlanır hazırlanmaz ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. Numuneler hazırlanır hazırlanmaz ve 24. saatte HPLC ile analiz edilmiştir.

3.2.3. Bosentanın in vivo miktar tayini

Farmakokinetik çalışmaların değerlendirilebilmesi için sıçanlardan elde edilen plazma örneklerinden BOS'un in vivo miktar tayini, analizi ve validasyonları LC-MS/MS yöntemi ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'da yapılmıştır.

LC-MS/MS yöntemiyle analizler Shimadzu UFLC sistemi & Shimadzu MS/MS 8060 cihazı ile yapılmıştır. LC-MS/MS sistemi maddelerin kütlesine (kütle spektrum: mass spectrum-MS) göre ayırım yapan bir sistemdir. Maddeler MS kısmında kütle/yük oranlarına göre moleküllerine ayrılırken sıvı kromatografi (LC) yardımıyla hızlı, hassas ve seçici şekilde analiz gerçekleştirir. Böylelikle her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemini oluşturur.

LC-MS/MS sistemi çalışma koşulları

Çalışmanın bu aşamasında miktar tayini analizinin optimum parametrelerini bulmak için çeşitli çalışmalar yaparak en yüksek intensiteyi (hassasiyeti) elde edilecek metot geliştirilmiştir. LC kısmında kullanılacak uygun mobil fazı bulabilmek için formik asitin iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalanılmıştır. En uygun intensite %0,1'lik formik asitli su ve asetonitril ile hazırlanan mobil faz ile elde edilmiştir. LC-MS/MS ile yapılan analizlerde kullanılan sistem özellikleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. LC-MS/MS sistem özellikleri

Donanım	Shimadzu UFLC
Dedektör	MS/MS 8060
Kolon	Zorbax® Eclipse XDB-C18, 150 x 4,6 mm 5µ
Mobil Faz A	%0,1'lik formik asitli su
Mobil Faz B	Asetonitril
Kolon fırını sıcaklığı	40°C
Mobil faz akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Polarite	Pozitif
Analiz süresi	6 dk

LC-MS/MS sisteminin LC kısmında kullanılan akışa ait mobil fazın gradienti Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. LC-MS/MS sisteminin HPLC kısmında kullanılan akış gradienti

Zaman (dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Hız (mL/dk)
0,01	10	90	1,000
1,50	10	90	
1,70	90	10	
4,00	90	10	
4,10	10	90	
6,00	10	90	

LC-MS/MS sistemindeki cihaz şartları Çizelge 3.4'te verilmiştir. Analizlerde etadolak iç standart (Internal standart-IS) olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. LC-MS/MS sistemi cihaz şartları

	Bosentan	Etadolak
m/z (kütle/yük)	552,000	288,300
MS/MS	508,200	270,200
Zaman (msaniye)	50	50
CE (volts)	-25	-15
Isıtma gazı akışı	10 L/dk	
Kurutucu gaz akışı	10 L/dk	
Arayüz sıcaklığı	300°C	
DL sıcaklığı	250°C	
Polarite	Pozitif	
Tarama tipi	MRM (MRM)	

LC-MS/MS sistemiyle analizde plazma ekstraksiyon yöntemi

BOS'un LC-MS/MS sistemiyle analiz edilebilmesi için plazma örneklerinden ekstraksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- Sıçan plazmasından 200 µL alınarak üzerine 1 µg/mL derişimindeki iç standardından (etadolak) 4 µL eklenir.
- Üzerine 40 µL %0,1'lik formik asitli su ilave edilir ve 30 saniye karıştırılır.
- Üzerine 1,2 mL etil asetat: asetonitril (3/1; h/h) ilave edilir.

- Beş dakika karıştırılır.
- Santrifüjleme işlemi +4°C'de 4500 rpm'de 10 dakika boyunca gerçekleştirilir.
- Üst faz 40°C' de azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulur.
- Mobil fazdan 200 µL (%0,1'lik formik asitli su/asetonitril; 50/50, h/h) eklenerek 15 dakika ultrasonik bonyada çözündürülür.
- Santrifüjleme işlemi +4°C'de 15300 rpm' de 10 dakika boyunca gerçekleştirilir.
- HPLC viyaline alınır ve enjeksiyon yapılır.

LC-MS/MS sisteminin miktar tayini yöntem validasyonu

BOS'un LC-MS/MS sisteminde miktar tayini yöntem validasyonunda incelenen validasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Stok çözelti kararlılığı
- Gün içi doğruluk ve kesinlik
- Günler arası doğruluk ve kesinlik
- Seçicilik ve seçimlilik
- Carry-over (taşınma)
- Matriks etkisi
- Dilüsyon doğruluğu
- En düşük miktar saptama alt sınırı (LLOQ)
- Kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı
- Donma erime kararlılığı (DEK)

3.2.4. SNEDDS formülasyonu geliştirme çalışmaları

Formülasyon geliştirme çalışmaları optimum formülasyonun geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların tümünü kapsayan çalışmalardır. Katı kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemlerin geliştirilmesinde ilk aşama kendiliğinden nanoemülsifiye olan sıvı sistemin oluşturulmasıdır. SNEDDS olarak adlandırılan bu sistemler yapısında su bulundurmayan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan içeren

izotropik karışımlar olarak bilinmektedir ve bu sistemler su ile bir araya geldiğinde kendiliğinden y/s tipinde nanoemülsiyon oluşturmaktadır. Bu amaçla öncelikli olarak BOS'un farklı yağ gruplarındaki çözünürlüğü için deneyler gerçekleştirilmiş daha sonra formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Farklı yağlardaki çözünürlük çalışmaları

BOS'un orta zincirli trigliseritler (Miglyol® 812, Miglyol® 818, Miglyol® 840, Captex® 355, Labrafac®), orta zincirli mono ve digliseritler (Capmul® MCM C8, Imwitor® 948, Imwitor® 988), uzun zincirli yağ asitleri (Mısır yağı, ayçiçek yağı, çörek otu yağı, susam yağı, zeytinyağı, üzüm çekirdeği yağı, oleik asit, keten tohumu yağı, pamuk yağı), uzun zincirli mono ve digliserit karışımları (Maisine®, Peceol®) ve propilen glikol esteri (Caproyl® 90) gruplarındaki çözünürlüğünün belirlenmesi için etkin maddenin fazlası 5 mL yağ içeren viyale ilave edilmiş ve 30 saniye karıştırılmıştır. Daha sonra 25°C'de 72 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda 3000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek berrak kısmı alınmıştır. Alınan berrak kısmın metanol ile stok çözeltisi hazırlanmış ve uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek metanol için belirlenen λ_{maks} değerinde UV spektrofotometrede analiz edilmiştir. Çözünürlük değeri yüksek çıkan yağlar için çözünürlük çalışması üç paralel olacak şekilde tekrarlanmıştır.

Hidrofilik-lipofilik balans (HLB) değeri

HLB değeri sürfaktan özellikli maddelerin suda çözünen moleküler ucun (baş) molekül ağırlığının, yağda çözünen moleküler kısmın (kuyruk) molekül ağırlığına oranıdır. Sürfaktan özellikli maddelerin 1-20 arasında olan HLB değerleri 9'un üzerinde hidrofilik, 9'un altında ise lipofilik özellik gösterir.

HLB değerinin hesaplanması

Emülsiyonun özelliklerini ve tipini önceden belirlemek için ampirik bir hesaplama yöntemi olarak geliştirilmiştir. Yağ-sürfaktan-kosürfaktan karışımı kullanarak emülsiyonun oluşması için istenilen HLB değeri Eş. 3.6 ile hesaplanabilir (Im-Emsap, Paeratakul ve Siepmann, 2002).

$HLB_{karışım} = Yağ_{HLB}$ x % Yağ + $Sürfaktan_{HLB}$ x % Sürfaktan +$Kosürfaktan_{HLB}$ x % Kosürfaktan (Eş. 3.6)

Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması etkin maddenin çözünürlük çalışmalarından elde edilen veriler ve HLB değerleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Sürfaktan ve kosürfaktan oranı 9:1'den 1:9'a olacak şekilde taranarak tek tür karışımlar elde edilmiştir. Elde edilen bu homojen karışımlar daha sonra yine 9:1–1:9 oranlarında yağ ile karıştırılarak homojen bir sistem oluşturulmuştur. Oluşturulan bu sistemler daha sonra su ile titre edilerek nanoemülsiyon alanını içeren üçgen faz diyagramlarının sınırları belirlenmiştir. Oluşturulacak olan SNEDD sistemlerde yağ oranının %20'den az, geriye kalan kısmın ise sürfaktan ve kosürfaktan içermesi gerektiği belirtilmiştir (Pouton, 2006). Dış fazı su olan kendiliğinden emülsifiye sistemlerin oluşturulmasında arzu edilen HLB değeri ise 8-18 arasında olmalıdır, bu nedenle bileşenler belirlenirken HLB değerleri göz önünde bulundurulmalıdır (Subramanian ve Siddalingam, 2017b).

Üçgen faz diyagramları Microsoft Visual Basic kullanılarak geliştirilen bir yazılım programı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu yazılım programı ile nanoemülsiyon içerisindeki su, yağ ve sürfaktan: kosürfaktan yüzde değerleri girilir ve otomatik olarak üçgen faz diyagramları ağırlık merkezleri ile elde edilir (Akartas ve Karasulu, 2020).

Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları

Formülasyon geliştirme çalışmaları için etkin maddenin yağlardaki çözünürlüğü, sürfaktan ve kosürfaktanın HLB değerleri dikkate alınarak bileşenler seçilmiş ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Formülasyonda kullanılan bileşenler ve HLB değerleri

Yağ	YEM	YYEM
Maisine® (1)	Cremophor® RH 40 (15)	Labrasol® (14)
Peceol® (1)	Cremophor® RH 40 (15)	Labrasol® (14)

Yağ, sürfaktan ve kosürfaktanın karışabilirliğini saptamak amacıyla, çeşitli oranlarda (9:1-1:9) sürfaktan:kosürfaktan karıştırılmış, farklı oranlarda (9:1-1:9) sürfaktan: kosürfaktan ve yağ karışımı ile oluşturulan kaba emülsiyonlar su ile karıştırılarak, emülsiyonların su alma kapasitesi incelenmiştir. Bu iki aşama K_m oranının (sürfaktan:kosürfaktan oranı) belirlenmesine yardımcı olmuştur.

Deney tasarımı ile optimum formülasyonların bulunması

Çalışmanın bu aşamasında deney tasarım modeli oluşturmak (DoE) ve formülasyon optimizasyonu sağlamak hedeflenmiştir. Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları olan Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için üçgen faz diyagramları oluşturulduktan sonra, önce nanoemülsiyon alanın ağırlık merkezi daha sonra ağırlık merkezi etrafında rastgele noktalar seçilerek ve bu noktalara karşılık gelen su, yağ ve sürfaktan:kosürfaktan yüzdeleri kullanılarak nanoemülsiyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan formülasyonlar damlacık büyüklüğü ve dağılımı, türbidite, viskozite olarak değerlendirilerek, hedef formülasyona en yakın formülasyonun belirlenmesi gerçekleştirmiştir. Üçgen faz diyagramı nanoemülsiyon oluşturma alanındaki her noktayı rastgele seçimler ve ölçümlerle denememiz zor olacağı ve uzun zaman alacağı için deney tasarım modeli kullanılmıştır.

SNEDDS formülasyonu için yağ, sürfaktan ve kosürfaktan çalışmanın bağımsız değişkenleridir. Üçgen faz diyagramındaki nanoemülsiyon bölgesinden yağ, sürfaktan ve kosürfaktana karşılık gelen alt-üst değerler (program girdi olarak verilen alt-üst değerlerden orta değeri kendisi belirlemektedir) dikkate alınıp 3 merkezli Box-Behnken deney tasarımı (BBD) kullanılarak istatiksel deney tasarım

modeli oluşturulmuştur (Çizelge 3.6). Hedeflenen formülasyonun belirlenmesinde bağımlı değişken olarak damlacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDİ) seçilmiştir.

Çizelge 3.6. 3 merkezli BBD parametreleri

Bağımsız değişken	**Formülasyonlarda kullanılacak faktör seviyeleri**		**Yanıtlar**
Yağ (Maisine®) miktarı (g)	**Alt Değer**	**Üst Değer**	
Sürfaktan (Cremophor® RH 40) (g)	0,90	2,00	
Kosürfaktan (Labrasol®) (g)	4,95	7,20	
	0,55	0,80	Damlacık boyutu PDİ
Yağ (Peceol®) miktarı (g)	**Alt Değer**	**Üst Değer**	
Sürfaktan (Cremophor® RH 40) (g)	0,90	2,00	
Kosürfaktan (Labrasol®) (g)	4,50	7,20	
	0,50	0,80	

BBD ile 3 faktörlü (alt, orta, üst değer), 3 değişken (yağ-sürfaktan-kosürfaktan), 3 merkez noktası tekrarlı model kullanılmıştır ve 15 formülasyon Design Expert® 10 yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Çizelge 3.7 ve 3.8).

Design Expert® tarafından önerilen formülasyonların değerlendirilmesi

Programın önerdiği 15 formülasyon hazırlanmış formülasyonlara 250 mL su eklenerek nanoemülsiyonlar oluşturulmuştur. Hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutu ve PDİ'leri Malvern Zetasizer Nano ZS ile 25±0,5°C sıcaklıkta ölçülmüştür. Bu amaçla tek kullanımlık küvetler kullanılmış ve çalışma üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar kullanılan yağa göre isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.7. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri

Std	Formülasyon	Bağımsız değişkenler		
		Maisine® (X_1)	Cremophor® RH 40 (X_2)	Labrasol® (X_3)
14	1	1,45	6,075	0,675
9	2	1,45	4,95	0,55
1	3	0,9	4,95	0,675
2	4	2	4,95	0,675
3	5	0,9	7,2	0,675
8	6	2	6,075	0,8
12	7	1,45	7,2	0,8
5	8	0,9	6,075	0,55
10	9	1,45	7,2	0,55
4	10	2	7,2	0,675
7	11	0,9	6,075	0,8
13	12	1,45	6,075	0,675
11	13	1,45	4,95	0,8
6	14	2	6,075	0,55
15	15	1,45	6,075	0,675

Std: Standart design

Çizelge 3.8. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri

Std	Formülasyon	Bağımsız değişkenler		
		Peceol® (X_1)	Cremophor® RH 40 (X_2)	Labrasol® (X_3)
1	1	0,9	4,5	0,65
13	2	1,45	5,85	0,65
3	3	0,9	7,2	0,65
12	4	1,45	7,2	0,8
4	5	2	7,2	0,65
9	6	1,45	4,5	0,5
11	7	1,45	4,5	0,8
5	8	0,9	5,85	0,5
6	9	2	5,85	0,5
8	10	2	5,85	0,8
10	11	1,45	7,2	0,5
7	12	0,9	5,85	0,8
15	13	1,45	5,85	0,65
2	14	2	4,5	0,65
14	15	1,45	5,85	0,65

Std: Standart design

Etkin madde yükleme çalışmaları

BBD ile elde edilen ve bileşenlerin oranları belirlenmiş optimum Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarından hareketle BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları hazırlanmıştır. Farklı miktarlarda etkin madde denenerek boş formülasyonlar ile karıştırılmış, homojen karışımlar elde edilene kadar karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra 24 saat boyunca 37°C'de bir su banyosunda tamamen çözünmesi sağlanmış, elde edilen BOS yüklü SNEDDS formülasyonları kullanılana kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

Geliştirilen etkin madde içermeyen ve bosentan yüklü SNEDDS formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmaları

Design Expert® 10 ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimum Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için aşağıdaki kontroller yapılmıştır.

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için disperse olabilme ve kendiliğinden emülsifiye olma zamanı çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

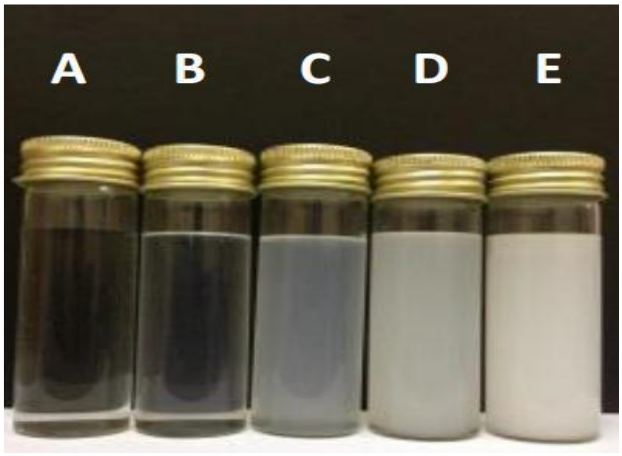
Disperse olabilme çalışmaları

Her bir formülasyondan 1 mL alınarak 37±0,5°C 500 mL suya ilave edilerek 50 rpm'de karışması sağlandıktan sonra formülasyonların in vitro performansı aşağıdaki derecelendirme sistemi kullanılarak görsel olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.1) (Beg ve diğerleri, 2013; Shukla ve diğerleri, 2016).

Seviye A: Şeffaf veya mavimsi bir görünüme sahip, hızlı bir şekilde (1 dakika içinde) nanoemülsiyon oluşturur.
Seviye B: Hızlıca oluşan, biraz daha az şeffaf emülsiyon, mavimsi beyaz bir görünüme sahip olabilir.
Seviye C: 2 dakika içinde oluşan homojen sütsü görünümündeki emülsiyonlardır.

Seviye D: Emülsiyon yavaş yavaş (2 dakikadan uzun) oluşur ve hafif yağlı görünüme sahip donuk, grimsi beyaz olabilir.

Seviye E: Yüzeyde büyük yağ damlacıkları ile zayıf veya minimal emülsifikasyon gösteren formülasyonlardır.



Resim 3.1. Dipserse olabilme çalışmalarında kullanılan sınıflandırma sistemi görseli

Kendiliğinden emülsifiye olma zamanı

Formülasyonların kendi kendine emülsifikasyon zamanını belirlemek için, (seyreltme ile şeffaf homojen bir sistem ve emülsiyon oluşumu için gerekli olan süre) 1 mL SNEDDS, 37±0,5°C'de 250 mL su içinde 50 rpm'de karışım süresinin ve emülsiyonun sonuç görünümüne bakılarak değerlendirilir (Basalious, Shawky ve Badr-Eldin, 2010; Kallakunta ve diğerleri, 2012).

% Transmittans

Formülasyonu oluşturan sistemin % transmittansı kör olarak distile su kullanılarak UV spektrofotometrede 638 nm dalga boyunda ölçülür (A. Patel ve diğerleri, 2014). Çalışma hem formülasyonlar seyreltilmeden hem de 250 mL distile su ile seyreltildikten sonra % transmittans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Damlacık büyüklüğü ve PDİ

Formülasyonlara 250 mL su eklenmesiyle oluşturulan nanoemülsiyonların damlacık büyüklüğü ve PDİ ölçümleri Malvern Zetasizer Nano ZS ile 25±0,5°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tek kullanımlık küvetler kullanılmış ve çalışma üç paralel gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel değeri formülasyonda kullanılan yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde yüküne bağlı olarak değişebilmektedir. Ancak SNEDDS'ler in vitro ortamda içeriklerinde su bulundurmadıklarından ve in vivo ortamda nanoemülsifikasyon çok kısa bir süre içerisinde gerçekleşip formülasyon emildiğinden zeta potansiyeli ölçümü yapılmamıştır.

Damlacık büyüklüğü ve PDİ'ne pH ve sıvı hacminin etkisi

Formülasyonların seyreltilmesinde kullanılan sulu ortamların pH değişiminin ve hacminin damlacık boyutu ve PDİ üzerine olan etkisi incelenmiştir. Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü formülasyonlar enzim içermeyen pH 1,2, pH 6,8 ve su ortamlarında 1:100, 1:250, 1:500 oranlarında seyreltilmiş, farklı pH'ların ve farklı hacimlerin damlacık büyüklüğü ve PDİ üzerine etkisi incelenmiştir (Patel ve diğerleri, 2016; Prajapat, Patel, Bariya, Patel ve Butani, 2017).

Türbidite

Türbidite ölçümleri sistemin bulanıklığını belirleyen ve SNEDDS karakterizasyonunda kullanılan bir diğer parametredir (Nazzal ve diğerleri, 2002a). Bulanıklık ölçümünde dağılan ışığın miktarı (gelen ışığın küçük parçacıklara çarpması sonucunda) ölçülür ve Rayleigh teorisine göre hesaplanır (Pouton, 1985). Bulanıklık ölçümleri Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için 25±0,5°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Velp Tubidimeter). Ölçümler 0-200 NTU aralığında yapılmıştır. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Viskozite

SNEDDS'in viskozitesi reolojik yetenekleri açısından çok önemlidir. Düşük viskoziteye sahip SNEDDS'in y/s tipi nanoemülsiyon sistemi oluşturma eğiliminde olduğu düşünülmektedir. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonların viskozite ölçümleri için Brookfield rotasyonel koni viskozimetresi kullanılmıştır. Bu çalışma için her bir ölçüm % dönme momenti (% torque) değeri 2-100 arasında, 0,5 mL örnek kullanılarak 70 rpm'de 15 dakika sonunda viskozite cp (centipoise) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Beg ve diğerleri, 2012).

Termodinamik stabilite çalışmaları

Termodinamik stabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesi için iklim dolaplarından yararlanılmıştır. Çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir:

Isıtma-soğutma

Formülasyonlar her bir döngü 48 saatten az olmamak kaydı ile 3 döngü boyunca 4°C ila 45°C arasındaki sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bu döngü sonucunda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilmiş, stabil olan formülasyonlarla santrifüj çalışmasına devam edilmiştir.

Santrifüj

Isıtma-soğutma döngüsünden başarı ile geçen formülasyonlar 3500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Bu döngü sonucunda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilmiş, stabil olan formülasyonlarla satrifüj çalışmasına devam edilmiştir.

Dondurma-çözme (Freeze thaw)

Santrifüj çalışmasından başarı ile geçen formülasyonlar her bir döngü 48 saatten az olmamak kaydı ile 3 döngü boyunca -21°C ila 25°C arasındaki sıcaklığa maruz bırakılımıştır. Bu döngü sonucunda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilmiş, stabil olan formülasyonlarla diğer karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir

(Ali ve Hussein, 2017). Ayrıca etkin madde içermeyen ve BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonların damlacık büyüklükleri döngü öncesi ve sonrasında 250 mL su ile seyreltildikten sonra damlacık büyüklüğü ve PDİ açısından da incelenmiştir.

Morfolojik çalışmalar

Nanoemülsiyonların oluşumunun izlenmesi için TEM'den yararlanılmıştır. Optimize edilmiş Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları, distile su ile 1:250 oranında seyreltilmiş, manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve 1 damla numune %1 a/h fosfotungustik asit ile grid üzerine damlatılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra incelenmiştir (Parmar ve diğerleri, 2015). TEM görüntüleri 120 kV FEI, Tecnai, G2 Spirit Biotwin ile elde edilmiştir. Ayrıca TEM görüntüleri üzerinde ImageJ 1.53o programı kullanılarak damlacık boyutları hesaplanmıştır (ImageJ, 2022). ImageJ bir görüntü analiz programı olup, TEM görüntüsüne ait skala programa tanıtılmış ve kullanılmıştır. Böylelikle Malvern Zeta Sizer ile ölçülen damlacık boyutları doğrulanmıştır.

Uzun dönem stabilite çalışmaları

BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarının kimyasal ve fiziksel stabilitesi 4°C, 25±2°C/%60±5 bağıl nem (BN) ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulları altında değerlendirilmiştir. Formülasyonlar 0, 1, 3 ve 6. ayda fiziksel görünüm, damlacık boyutu ve PDİ açısından incelenerek değerlendirilmiş ve çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. S-SNEDDS tablet formülasyonu geliştirme çalışmaları

Tablet basımı için toz kütlesinin hazırlanması

Optimum formülasyon olarak seçilen BOS yüklü SNEDDS formülasyonu adsorban olarak seçilen Neusilin® US2 ile katılaştırılarak (S-SNEDDS) toz formuna getirilmiştir. Bu amaçla farklı çalışmalarda kullanılan Neusilin® US2 oranları temel alınarak BOS yüklü SNEDDS: Neusilin® US2'nin 1:1, 1,25:1, 1,5:1 olmak üzere üç

farklı oranı denenmiştir (Gumaste ve diğerleri, 2013; Krupa, Szlek, Jany ve Jachowicz, 2015). Oranlar BOS yüklü SNEDDS formülasyonunun havanda Neusilin® US2 ile homojen olarak karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

S-SNEDDS için toz özelliklerinin incelenmesi

Toz özelliklerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi ise Avrupa Farmakopesi 8.0 Bölüm 2.9.34 ve 2.9.36'ya göre gerçekleştirilmiştir.

Küme dansitesi

Tozun küme dansitesi miktarı tam olarak bilinen tozun 1 mL'ye kadar okunabilen 100 mL'lik bir dereceli silindire dökülmesiyle belirlenmiş ve Eş. 3.7'a göre hesaplanmıştır:

$D_a = D/V_a$ (Eş. 3.7)

D_a: Küme dansitesi (g/mL)

D: Tozun ağırlığı (g)

V_a: Tozun görünür hacmi (mL)

Sıkıştırılmış dansite

Miktarı tam olarak bilinen toz 1 mL'ye kadar okunabilen 100 mL'lik bir dereceli silindire dökülerek başlangıç hacmi ölçülmüştür. Mezür dikey olarak 2 cm yükseklikten 2-3 sn aralıklarla serbestçe bırakılarak 10, 250, 500 ve 1250 defa vurarak her vuruş sonrasında hacim tekrar ölçülmüştür. Vuruş 500 ve 1250 arasındaki hacim farkı 2 mL veya daha az ise hesaplama 1250. vuruştaki hacime göre yapılır. Eğer fark 2 mL'den fazlaysa işlem tekrarlanır. Sıkıştırılmış dansite Eş. 3.8'e göre hesaplanmıştır:

$D_c = P/V_c$ (Eş. 3.8)

D_c: Sıkıştırılmış dansite (g/mL)

P: Tozun ağırlığı (g)

V_c: Sıkışmadan sonraki hacim (mL)

Yığın açısı

Yirmi gram toz tartılarak 4 cm yüksekliğe yerleştirilmiş ve akış deliği kapatılmış huniye koyulmuş, kronometreye bakılarak akma deliği açılmış ve toz düz zemin üzerindeki kâğıda akıtılmıştır. Oluşan yığının taban çapı ve tozun yüksekliğinden Eş. 3.9'a göre yığın açısı hesaplanmış ve yığın açısına göre akış özellikleri Çizelge 3.9'a göre değerlendirilmiştir.

$$\tan \alpha = h/r \qquad \text{(Eş. 3.9)}$$

α: Yığın açısı (°)

h: Yükseklik (cm)

r: Yığın yarıçapı (cm)

Çizelge 3.9. Yığın açısına göre akış özellikleri

Akış Özellikleri	**Yığın açısı (°)**
Mükemmel	25-30
İyi	31-35
Uygun	36-40
Orta	41-45
Az	46-55
Çok az	56-65
Çok kötü	>66

Basılabilirlik (Carr) indeksi

Carr indeksi ya da basılabilirlik indeksi hazırlanan tozun tabletlenebilirliğini gösteren bir parametredir. Küme ve sıkıştırılmış dansiteden hareketle Eş. 3.10'a göre hesaplanırken değerlendirme Çizelge 3.10'a göre yapılmıştır.

$$CI = ((D_c - D_a) / D_c) \times 100 \qquad \text{(Eş. 3.10)}$$

CI: Carr indeksi (%)

D_c: Sıkıştırılmış dansite (g/mL)

D_a: Küme dansitesi (g/mL)

Çizelge 3.10. Basılabilirlik (Carr) indeksine göre akış özellikleri

Akış Özellikleri	**Carr indeksi (%)**
Mükemmel	1-10
İyi	11-15
Uygun	16-20
Orta	21-25
Az	26-31
Çok az	32-37
Çok kötü	>38

Hausner oranı

Hausner oranı da tozun akış özelliklerinin bir karakteristiği olup küme ve sıkıştırılmış dansiteden hareketle Eş. 3.11'e göre hesaplanmış ve değerlendirme Çizelge 3.11'e göre yapılmıştır.

$$HR = D_c/D_a \quad \text{(Eş. 3.11)}$$

D_c: Sıkıştırılmış dansite (g/mL)

D_a: Küme dansitesi (g/mL)

Çizelge 3.11. Hausner oranına göre akış özellikleri

Akış Özellikleri	**Hausner oranı**
Mükemmel	1-1,11
İyi	1,12-1,18
Uygun	1,19-1,25
Orta	1,26-1,34
Az	1,35-1,45
Çok az	1,46-1,59
Çok kötü	>1,60

Uzun dönem stabilite çalışmaları

S-SNEDDS için hazırlanan toz kütlesinin stabilitesi ise 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulları altında 1, 3, 6 ve 12. ay

için görsel olarak değerlendirilmiş, toz kütleleri başlangıç ve 12. ay sonunda toz özellikleri açısından incelenmiştir.

S-SNEDDS tozun katı hal karakterizasyonu

SEM görüntüleme

Etkin madde, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2'ye adsorbe ettirilerek hazırlanmış S-SNEDDS'in 1:1, 1,25:1, 1,5:1 oranları ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2'ye adsorbe ettirilerek hazırlanmış S-SNEDDS'in 1:1, 1,25:1, 1,5:1 oranlarının morfolojik olarak görüntülenmesi yüksek vakum altında FEI Quanta 400 FEG ile gerçekleştirilmiştir. Elektriksel iletkenliği sağlamak için Au-Pd ile kaplama yapılmıştır. Formülasyon yüklemesi sonrası morfolojik olarak yapısı incelenerek değerlendirilmiştir.

DSC analizi

Tablet basımında kullanılan yardımcı maddelerin, Neusilin® US2'nin, etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyon ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonun, etkin madde ve birbirileri ile olan geçimlilik durumlarının araştırılması için DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Alüminyum panlar içine yerleştirilen örnekler 10°C/dk'lık artışlarla 20-300°C aralığında analiz edilmiştir.

FT-IR analizi

Tablet basımında kullanılan yardımcı maddelerin, Neusilin® US2'nin ve SNEDD sistemi oluşturan bileşenlerin, etkin madde ile 1:1 oranında olan geçimlilik durumlarının araştırılması için toz halinde FT-IR spektrofotometresi ile 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektrumu çekilmiştir.

X-RPD analizi

Etkin madde, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2'ye adsorbe ettirilerek hazırlanmış S-SNEDDS'in 1:1, 1,25:1, 1,5:1

oranları ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2'ye adsorbe ettirilerek hazırlanmış S-SNEDDS'in 1:1, 1,25:1, 1,5:1 oranları X-ışını toz kırınımı analizi Rigaku Ultima IV cihazı kullanılarak 40 kV / 30 mA X-ray parametreli, 2-60 derece tarama aralığında tarama hızı 0,02 derece/dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

BET analizi

Neusilin® US2, etkin madde içermeyen SNEDDS: Neusilin® US2 (1:1, 1,25:1, 1,5:1) ve BOS yüklü SNEDDS: Neusilin® US2 (1:1, 1,25:1, 1,5:1) için Brunauer, Emmett ve Teller (BET) tekniği Quantachrome Autorb 6B cihazı kullanılarak 300°C'de 24 saat boyunca azotun kesit alanı 16,2°A2/molekül olarak alınarak gerçekleştirilmiş çok noktalı yüzey alanı, mezogözenek boyut dağılımı, toplam gözenek hacmi analiz edilmiştir.

S-SNEDDS tablet basımı

Tablet hazırlamak için, toz akış özellikleri ve katı hal karakterizasyon çalışmalarından sonra uygun oran belirlenmiş, uygun oranda elde edilen toz kütlesi yardımcı madde olarak ana kütlenin %5'i dağıtıcı Ac-Di-Sol®, %1'i lubrikan magnezyum stearat olacak şekilde belirlenmiştir. Tozlar Pharmag UAM 400 kübik karıştırıcıda karıştırılmış ve karışım sabit bir sıkıştırma kuvveti altında 22x11 mm'lik zımba kullanılarak Erwaka AR 401-Korsch tek zımbalı tablet makinesinde doğrudan basım yöntemi ile elde edilmiştir.

S-SNEDDS toz ile geliştirilen tablet formülasyonlarında ve referans tablette yapılan kalite denetimleri

Sertlik

S-SNEDDS ve referans tabletlerden 10 tane alınmış, tablet sertlik ölçüm aleti (CGS HighSpeed Hardness Tester HDT, 1V-3, Almanya) ile ölçülmüştür. Ölçümler Newton (N) cinsinden belirlenerek, sonuçlar ortalama, SS ve % VK ile

değerlendirilmiştir. Farmasötik tabletler amacına göre 7-20 kg.kuvvet (68,6-196 N) değerinde olabilirler.

Çap-kalınlık

10 adet S-SNEDDS ve referans tabletlerin çap ve kalınlığı kumpas kullanılarak ölçülmüş, sonuçlar ortalama, SS ve % VK olarak değerlendirilmiştir.

Ağırlık sapması

Rastgele olarak seçilen 20 adet S-SNEDDS ve referans tabletler alınarak teker teker tartılmış ve ortalama ağırlık hesaplanmıştır. Tartılan bu tablet ağırlıklarından en fazla iki tablet ortalama tablet ağırlığının %7,5'inden fazla sapma gösterebilir ancak hiçbir tablet ortalamanın %15'inden fazla sapma göstermemelidir.

Ufalanma-aşınma

Tozlarından temizlenen 20 adet S-SNEDDS ve referans tabletler tam olarak tartılarak friabilitöre (Pharma Test PTF E, Almanya) konulmuştur. Friabilitör 25 devir/dakika hızda 4 dakika çalıştırılmıştır. Sonra dışarı alınan tabletler tozlarından kurtarılmış ve tekrar tartılmıştır. İlk tartım ile son tartım arasında tabletlerde meydana gelen ağırlık kaybı toplam ağırlığın %1'inden fazla olmamalıdır.

Dağılma süresi

Deney USP 26'ya göre yapay mide ortamında 37±2°C'de dağılma testi cihazının sepetine her birine kontrolü yapılacak olan adet S-SNEDDS ve referans tabletler bir adet olacak şekilde 6 adet tablet konularak gerçekleştirilmiştir (Pharma Test, DIST 3, Almanya). Tabletlerin tam dağılması için geçen süre belirlenerek ortalama ve SS hesaplanmıştır.

İçerik tek düzeliği

10’ar adet S-SNEDDS ve referans tabletler toz haline getirilmiş, bu toz kütlesinden bir tablet ağırlığına eşdeğer miktar tartılarak alınmış ve %1 SLS ile 100 mL’de çözülerek seyreltilip bilinen konsantrasyonda HPLC’ye enjekte edilmiştir. Her bir tablet içerisinde bulunan etkin madde miktarının etikette yazan miktarın %85'inden az %115'inden fazla olmaması gerekmektedir.

Uzun dönem stabilite çalışmaları

S-SNEDDS tablet formülasyonun stabilitesi 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulları altında, 0, 1, 3, 6 ve 12. ayda fiziksel olarak bütünlük, renk ve şekil ve etkin madde içeriği açısından FDA tarafından in vitro çözünme hızı ortamı olarak önerilen %1 SLS içeren distile su ortamında HPLC ile analiz edilmiş, konsantrasyona karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Daha önce elde edilen denklemde pik alanları yerine konularak etkin madde içereği bulunmuş ve % olarak değerlendirilmiştir.

S-SNEDDS tablet rekonstitüsyon çalışması

Sıvı SNEDDS'in toz haline getirilip tablet formuna dönüştürüldükten sonra katılaştırma işleminin, tekrar sulu faz ile temas ettiğinde oluşan nanoemülsiyonların damlacık boyutları üzerine olan etkisini incelemek amacıyla rekonstitüsyon çalışması yapılmıştır. S-SNEDDS tabletler 250 mL distile suda çözülmüş ve 25°C’de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırılmıştır. Elde edilen içerik 0,45 mm Sartorius filtresinden süzülmüştür. S-SNEDDS tablet formülasyonu ile oluşturulan nanoemülsiyonun damlacık boyutu ve PDI ölçümleri, 25±0,5°C'de Malvern Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, UK) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama ± SS olarak verilmiştir.

3.2.6. İn vitro çözünme hızı çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilmiş olup, öncelikle elde edilen optimum Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonundan hangisinin katı

forma dönüştürüleceğinin karar verilmesi açısından BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar ve referans tablet FDA çözünme hızı veri tabanında BOS için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi (Çizelge 3.12) olan %1 SLS içeren distile su ortamının yanı sıra gastrointestinal ortamı taklit eden biyouyumlu FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında da çözünme hızı çalışmaları yapılarak çözünme hızı profilleri elde edilmiştir. FaSSIF ve FeSSIF ortamlarının yanı sıra bu ortamların V2'lerinin kullanılmasının amacı, içerik bileşenleri ve bileşen miktarları açısından farklılık göstermesidir. V2 bileşimlerinde maleik asit bulunmakta ve lesitini daha az miktarlarda içermektedir. Bu ortamlar kullanılarak çözünme hızı ve çözünme profilleri arasında bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir (Klumpp, Leigh ve Dressman, 2020; Yılmaz Usta ve Teksin, 2017).

Çözünme hızı profili değerlendirilmesi sonrasında uygun SNEDDS için katı forma dönüştürme işlemine devam edilmiştir. Elde edilen S-SNEDDS tabletler, BOS yüklü SNEDDS ve referans ürün tekrar in vitro çözünme hızı çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla öncelikle kalibrasyon ve validasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

Çizelge 3.12. FDA çözünme hızı veri tabanında BOS için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi (FDA, 2010)

İlaç	**Dozaj formu**	**Cihaz**	**Hız (rpm)**	**Çözünme ortamı**	**Hacim (mL)**	**Örnekleme zamanı (dk)**	**Güncelleme tarihi**
Bosentan	Tablet	II (Palet)	50	%1 SLS içeren su	900	15,30,45 ve 60	09/02/2010

İn vitro çözünme hızı ortamlarının hazırlanması

Referans ürün ve geliştirilecek formülasyonlar için FDA'nın önerdiği ortam ve açlık-tokluk durumunu taklit etmek için biyouyumlu FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları hazırlanmıştır (Çizelge 3.13). Ortamlar için gereken miktarlarda maddeler tartılmış ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, hazırlanan çözeltilerin pH değerlerinin uygunluğu pH-metre ile kontrol edilmiştir.

FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlar SIF toz üreticisi Biorelevant firmasının hazırlama adımları uygulanmıştır (Biorelevant, 2022). FaSSIF ve FeSSIF çözeltiler hazırlandıktan iki saat, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlar ise bir saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 48 saat içinde tüketilmiştir. Hazırlanan FaSSIF ve FaSSIF-V2 bulanık bir görünüme sahipken, FeSSIF ve FeSSIF-V2 çözeltilerinin görünüşü berraktır.

Çizelge 3.13. %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 çözünme hızı ortamlarının içerikleri

%1 SLS içeren FDA ortamı

SLS……1 g

Distile su……..…….ym 100 mL

FaSSIF tampon (pH 6.5)

NaOH…….. 0,420 g

$NaH_2PO_4.2H_2O$…..... 4,470 g

NaCl……... 6,186 g

Distile su……ym 1000 mL

FaSSIF çözeltisi

SIF tozu…… 2,240 g

FaSSIF tampon…….ym 1000 mL

FeSSIF tampon (pH 5.0)

NaOH ……... 4,040 g

Glasiyel asetik asit….. 8,650 g

NaCl…….. 11,874 g

Distile su……..ym 1000 mL

FeSSIF çözeltisi

SIF tozu……. 11,2 g

FeSSIF tampon……...ym 1000 mL

FaSSIF-V2 tampon (pH 6.5)

NaOH……. 1,392 g

$C_4H_4O_4$……..... 2,220 g

NaCl……... 4,010 g

Distile su…… ym 1000 mL

FaSSIF-V2 çözeltisi

FaSSIF-V2 tozu……...1,790 g

FaSSIF-V2 tampon….. ym 1000 mL

FeSSIF-V2 tampon (pH 6.5)

NaOH……. 3,270 g

$C_4H_4O_4$……..... 6,390 g

NaCl……... 7,330 g

Distile su…… ym 1000 mL

FeSSIF-V2 çözeltisi

FeSSIF-V2 tozu…… 9,760 g

FeSSIF-V2 tampon…… ym 1000 mL

Referans ürün - uzun zincirli mono ve digliserit karışım formülasyonlarının ve referans ürün - SNEDDS - S-SNEDDS tablet formülasyonunun in vitro çözünme hızı çalışmaları

Referans ürün, Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar ile gerçekleştirilen in vitro çözünme hızı deney koşulları Çizelge 3.14'te verilmiştir.

Çizelge 3.14. İn vitro çözünme hızı test koşulları

Yöntem	USP Cihaz II (Palet yöntemi)
Çözünme ortamı	%1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2
Ortam hacmi	900 mL
Dalga boyu	220 nm
Analiz yöntemi	HPLC
Hız	50 rpm
Sıcaklık	37°C±0,5°C
Numune alma aralıkları	15, 30, 45, 60 ve 90. dk
Tablet-kapsül sayısı	3

Geliştirilen uzun zincirli mono ve digliserit karışım yağ asidi içeren formülasyonlar (BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS) 00el sert jelatin kapsüllere (Capsugel®, Belçika) 1 g olacak şekilde konularak çözünme hızı ortamlarında çalışılmıştır. Çözünme hızı deneyinde Agilent 708-DS çözünme hızı aleti kullanılmıştır. Paletler örnek kabın tabanından 2,5 cm yüksekte olacak şekilde yerleştirilerek, in vitro çözünme ortamları (900 mL) cam kaplara doldurulmuştur. Çözünme hızı ortamından 15, 30, 45, 60 ve 90. dakika zaman aralıklarında 5 mL örnek alınmış, 0,45 µm membran filtreden süzülmüş ve alınan her örnek için yerine 5 mL çözünme hızı ortamında kullanılan çalışma ortamından ilave edilmiştir.

Alınan örnekler Bölüm 3.2.2'de anlatılan yöntemler ile analiz edilmiştir ve zamana karşı % kümülatif çözünen BOS miktarları grafiğe geçirilmiştir. % kümülatif çözünen ortalama BOS miktarları ve her zaman noktası için % SS değerleri hesaplanmıştır.

Çözünme hızı profilleri referans tablete göre geliştirilen S-SNEDDS tablet için excel uzantılı DDSolver® programı ile hem model bağımsız yöntem f_2 testi (benzerlik testi) (Eş. 3.12) hem de model bağımlı olan yöntemler ile karşılaştırılarak kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

$$f_2 = 50 \,.\log\left\{\left[1 + \left({}^{1}/_{n}\right)\sum_{t=1} n\ (R_t - T_t)^2\right]^{-0.5}.100\right\} \qquad \text{(Eş. 3.12)}$$

R_t : Referansın çözünen yüzdesi
T_t : Testin çözünen yüzdesi
n : Kaç noktada çözünme örneği alındığının sayısı

3.2.7. İn vitro lipoliz çalışmaları

Lipit temelli formülasyonların sindiriminin değerlendirilmesi lipoliz çalışması kapsamında incelenmiştir. Lipoliz deneyleri Titrando 902-Metrohm titrasyon cihazında, ortalama ince bağırsak geçiş süresi düşünülerek 90 dakika boyunca 37±0,5°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışma ortamı olarak biyouyumlu ortamlar tercih edilmiştir (Ortamların hazırlanışı Bölüm 3.2.6'da anlatılmıştır). Bunun sebebi klasik çözünme ortamlarında safra tuzu, fosfolipit ve lipaz enzimi bulunmazken, GİS açlık ve tokluk durumunda konsantrasyonları değişmek üzere pankreas ve safra kesesinden safra tuzu ve fosfolipit salgılanmaktadır. Safra tuzu ve fosfolipitler lipit sistem içerisinde bulunan orta ve uzun zincirli digliserit, trigliserit, sürfaktan ve kosürfaktanlar ile ilacın çözünürlük ve biyoyararlanımını arttıran misel karışımlar oluşturmaktadır.

Ortam pH'sı cihaz tarafından 0,1 M NaOH ile pH 6,5'e getirilmiştir. pH ayarlamasını takiben 30 mg BOS içeren 1 g SNEDDS/S-SNEDDS formülasyonu veya referans tablet ve enzim aktivitesi 1000 USP olan 4 mL pankreatin lipaz ilave edilerek lipoliz başlatılmıştır. Deneyde ortam pH'sını 6,5'te tutmak için harcanan NaOH miktarı kaydedilmiştir. Örnekler 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 ve 90. dakikalarda 2 mL olacak şekilde alınmıştır. Alınan her bir örneğe enzim aktivitesini durdurmak için 1 M 4-bromobenzeneboronik asit (4-BBBA) eklenmiştir. Bu çözelti 0,4 g 4-BBBA'nın 4 mL metanolde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Örnekler 15000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası fazlardaki BOS miktarını

belirlemek için toplam sulu faz hacmi şırınga ile belirlenmiştir. Üst fazdan 100 µL alınarak 2,8 mL asetonitril ile seyreltilmiştir. Seyreltme sonrası çözelti 15000 rpm'de 15 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Deney parametreleri daha önce yapılan çalışmalar üzerinden optimize edilmiştir (Bektaş, 2019; Aktaş, Tekeli ve Çelebi, 2020). BOS içeriğinin belirlenmesi için üstteki sulu faz HPLC ile analiz edilmiştir. Çalışma üç paralel olarak yürütülmüştür.

pH-stat lipoliz modeli formülasyonun sindirimi ile açığa çıkan yağ asitlerinin NaOH çözeltisi ile titre edilmesi sonucu ortam pH'sının sabit tutulmasına dayanmaktadır. Ayrıca lipoliz çalışması boyunca belirli zamanlarda alınan örneklerin santrifüjlenmesi ile elde edilen fazlardaki ilaç miktarı ise formülasyonun sindirimden nasıl etkilendiği hakkında bilgi vermektedir.

BOS yüklü SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonlarının ve referans tabletin FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında yapılan lipoliz çalışmasında sulu ve pellet faz olmak üzere iki farklı faz gözlenmiştir. Sulu faz ilacı çözünmüş halde tutmayı sağlayan karışık misel ve veziküller içerirken, pellet faz çöken ilaç moleküllerini ve yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarını içermektedir (Larsen ve diğerleri, 2011). Lipoliz çalışması sulu faz ilaç miktarının emilim için uygun olduğu hipotezine dayandığından dolayı sulu faz ilaç miktarının belirlenmesi önemlidir. Sulu faz ilaç miktarının yüksek olması formülasyonun düşük çözünürlüklü ilacı açlık veya tokluk ortamlarında çözünmüş durumda tutabileceğini göstermektedir.

3.2.8. Ex vivo permeabilite çalışması

SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların ve referans ürün için ex vivo geçirgenlik çalışması Franz difüzyon hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Difüzyon kesit alanı 1 cm^2 ve alıcı hücre kapasitesi 2,5 mL'dir. Permeabilite çalışmaları için keçi bağırsağı, permeasyon ortamı olarak ise FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 kullanılmıştır. Keçi bağırsağı verici ve alıcı bölme arasında yerleştirilerek sabitlenmiştir. SNEDDS doğrudan, S-SNEDDS tablet ve referans ürün uygun ortam kullanılarak disperse edilip 1 mL olacak şekilde verici bölmesine yerleştirilmiştir. Çalışma 37°C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve

çalışma sırasında sıvıların homojen kalmasını sağlamak için ortam sürekli karıştırılmıştır. Belirlenen zaman noktaları olan 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600 ve 1440. dakikalarda 2,5 mL numune alınıp 0,45 µm'lik bir filtreden süzülmüş ve 220 nm'de HPLC kullanılarak analiz edilmiştir. Permeabilite profili zamana karşı bağırsak yüzey alanına nüfuz etmiş olan ilaç miktarının çizilmesiyle oluşturulmuştur. Akı (J) değerleri eğrilerin kararlı durum kısmından, geçirgenlik katsayısı (P) verici bölmedeki akı/konsantrasyon oranından elde edilmiştir. J ve P değerleri Eş. 3.13 ve Eş. 3.14 kullanılarak hesaplanmıştır.

$J = dQ/Adt$ (µg/cm^2 dk) (Eş. 3.13)

Q: Bağırsaktan geçen madde miktarı (µg)
A: Yüzey alanı (cm^2)
T: Maruz kalma süresi (dk)

$P = J/C_o$ (cm/dk) (Eş. 3.14)
C_o: Donör bölmesindeki ilk ilaç konsantrasyonu (µg/cm^3)
J: Akı değeri (µg/cm^2 dk)

3.2.9. İn vivo çalışmalar

İn vitro çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda en uygun olan sıvı SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon ile in vivo çalışmalara devam edilmiştir.

İn vivo çalışmalar iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşaması olan farmakokinetik ve biyoyararlanım, farmakodinamik ve histoloji çalışmaları Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan 21.08.2017 tarihli, 66332047-604.01.02- E.118760 sayılı yerel etik kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (GÜEDAM) yapılmıştır.

İn vivo çalışmaların ikinci aşaması olan biyodağılım çalışmaları ise Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan 23.08.2017

tarihli, 2017-088 sayılı yerel etik kurul onayı ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'da gerçekleştirilmiştir.

Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları

Çalışmada kullanılan deney hayvanları

İn vivo farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları için literatür araştırmaları sonucunda yaklaşık 250-300 g ağırlığında erkek Wistar sıçan kullanılması uygun bulunmuştur (Coste ve diğerleri, 2017; Maarman, Lecour, Butrous, Thienemann ve Sliwa, 2013). Çalışma için toplam 48 sıçan kullanılmış, çalışma grupları temel olarak iki gruba ve her iki grup kendi arasında 3 gruba (n=6) ayrılmıştır. Farmakokinetik çalışmalarda kullanılan sıçanlar Resim 3.2'de görülmektedir:



Resim 3.2. Farmakokinetik çalışmalarda kullanılan sıçan grupları

Biyoyararlanım çalışma tasarımı

Farmakokinetik ve bioyararlanım çalışmaları açlık ve tokluk olarak 2 grup şeklinde yürütülmüştür (Çizelge 3.15). Deney tasarımında açlık ve tokluk gruplarının oluşturulmasının nedeni BOS'un açlık/tokluk durumunda lipit temelli sistemin emilime olan etkinliğinin ve biyoyararlanımının değerlendirilmesinin istenmesindendir. Gruplardan elde edilen sonuçlar uygun istatistiksel analizler yardımıyla değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.15. Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışma tasarımı

	Açlık grubu		**Ad libitum beslenen grup (Tokluk grubu)**		
Grup no	**Denek sayısı**	**Uygulama**	**Grup no**	**Denek sayısı**	**Uygulama**
1	6	Kontrol grubu	**1**	6	Kontrol grubu
2	6	BOS yüklü SNEDDS	**2**	6	BOS yüklü SNEDDS
3	6	BOS yüklü S-SNEDDS tablet	**3**	6	BOS yüklü S-SNEDDS tablet
4	6	Referans tablet	**4**	6	Referans tablet

Açlık grubundaki sıçanlar metabolik kafeslerde ayrı ayrı tutulurken ad libitum beslenen sıçanlar ise standart laboratuvar kafeslerinde tutulmuştur. Sıçanlar 18-22°C sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyodunda bulundurulmuştur. Açlık grubu için sıçanlar formülasyonlar uygulanmadan 12 saat öncesinden aç bırakılmış, uygulamadan 6 saat sonra yem verilmiştir. Suya erişimleri serbest olmuştur. Tokluk grubu üzerinde ilaç uygulaması sabah erken saatlerde gerçekleştirilmiş, bu şekilde gece beslenen sıçanların hepsinin benzer tokluk düzeyine sahip olması ve grup içi varyasyonun en aza indirgenmesi planlanmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlara ise hiçbir uygulama yapılmamış deney sonunda sakrifiye edilerek kan plazmaları analizlerde kör olarak kullanılmıştır.

Sıçanlara uygulanmış formülasyonlarda yalnız BOS aktif bileşik olup formülasyonun geri kalanı farmakolojik olarak aktif değildir. Sıçanlar için BOS'un

uygulanan günlük maksimum dozu 300 mg/kg sıçan ağırlığı şeklindedir (EMA, 2005). Hayvanlar deneye başlamadan önce tartılmış ve formülasyonlar 50 mg/kg dozda BOS içerecek şekilde ağırlıklarına bağlı olarak doz ayarlaması yapılarak SNEDDS doğrudan, S-SNEDDS tablet formülasyonlar ve referans ürün süspande edilerek oral gavaj ile sıçanlara uygulanmıştır (Resim 3.3). Uygulanan doz literatürdeki çalışmalardan hareketle belirlenmiştir (Clozel ve diğerleri, 2006; Visnagri, Kandhare, Ghosh ve Bodhankar, 2013).



Resim 3.3. Sıçanlara oral gavaj uygulaması

Uygulamanın ardından 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 10 ve 24. saatlerde kan alım işlemleri için sıçanlar, hareketlerinin kısıtlanmasını sağlayan plastik engelleyiciye (restrainer) konulmuştur. Kuyruklar sıcak su ile bir bez yardımıyla silinerek kuyruk venlerinin belirli hale gelmesi sağlanmış ve ardından heparin içeren insülin enjektörleri ile 250 µL kuyruk veninden kan alım işlemleri gerçekleştirilmiştir (Resim 3.4). Alınan kanlar pıhtılaşmanın engellenmesi amacıyla heparinli ependorf tüplere aktarılmış ve 7000 rpm'de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı ayrılarak analize kadar -80˚C'de saklanmıştır.



Resim 3.4. Sıçanlarda kuyruk veninden kan alınması işlemi

Plazma örneklerinde BOS miktarının belirlenebilmesi için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Analizler Ege Üniversitesi ARGEFAR bünyesinde TÜBİTAK 217S602 numaralı proje kapsamında hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen konsantrasyonlardan hareketle plazma-zaman profilleri çizilmiş, verilerden hareketle WinNonlin™ 8.3 yazılımı aracılığı ile C_{maks} (plazmadaki maksimum konsantrasyon), t_{maks} (C_{maks}'a ulaşmak için geçen süre), AUC_{0-24} (sıfırdan 24. saate kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan), $AUC_{0-\infty}$ (sıfırdan sonsuza kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan), k_d (uzaklaşma hız sabiti), $t_{1/2}$ (biyolojik yarı ömür), V_d (dağılım hacmi) ve Cl (klirens) gibi farmakokinetik parametreler nonkompartımantal analiz (Non-compartmental analysis - NCA) ile hesaplanmış ve biyoyararlanım değerlendirmesi yapılmıştır.

İn vitro – in vivo ilişki (IVIVR) kurulması

İn vitro-in vivo ilişki kurulması amacıyla MathLab® 9.10 ile parçalı kübik hermite interpolasyon polinomları (Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomials-PCHIP) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle bilinmeyen herhangi bir ara zaman noktasında bilinmeyen ara değerler (eksik noktalar) bulunmuştur ve 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 55 ve 60. dakikaya interpolasyon uygulanarak veri

seti oluşturulmuştur. BOS yüklü SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonları ve referans tablet için belirlenen zaman noktalarında açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu ile FaSSIF, FaSSIF-V2, FDA tarafından önerilen ortam (%1 SLS içeren distile su ortamı) arasındaki ilişki ve tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu ile FeSSIF, FeSSIF-V2, FDA tarafından önerilen ortam (%1 SLS içeren distile su ortamı) arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

IVIVR değerlendirilmesinin gerçekleştirilebilmesi için bazı gereklilikler bulunmaktadır. İn vitro çözünme hızı çalışmasında zamana karşı % çözünen ilaç grafiği çözünme hızı çalışmasının son zaman noktasında genellikle %100'e ulaşmalıdır (Karakucuk, Teksin, Eroglu ve Celebi, 2019). Ancak in vitro çözünme verilerinin son noktasında en az %80 çözünme gösteren formülasyonlarda karşılaştırma amacıyla kullanılabilmektedir (Zhou ve Qiu, 2010). Ayrıca uygun çözünme hızı yöntemi pH, iyonik şiddet, enzim, safra tuzları ve fosfolipit konsantrasyonu açısından in vivo koşulları taklit etmelidir (Cardot, Beyssac ve Alric, 2007). Son zaman noktasında %100'e çözünme sağlayan ortam bosentan için FDA tarafından önerilen %1 SLS içeren distile su ortamıdır. Ancak in vivo ortamı içerik açısından daha iyi taklit eden biyouyumlu ortamlarda da formülasyonlar in vitro çözünme hızı çalışmasının son zaman noktasında %80'lere ulaştığından IVIVR açısından değerlendirilmiştir.

Farmakodinamik ve histolojik çalışmalar

Araştırma için 250-300 g 30 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Kontrol grubuna (n=3) serum fizyolojik çözeltisi verilirken, hayvanlarda (n=27) PAH modeli tek doz intraperitonel (ip) (60 mg/kg) monokrotalinin (MCT) uygulamasının ardından formülasyonlarla tedaviye 4 hafta sonra başlanmıştır (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. Farmakodinamik ekokardiyografi çalışma tasarımı

Grup no	Denek sayısı	Uygulama
1	3	Kontrol grubu
2	9	BOS yüklü SNEDDS
3	9	BOS yüklü S-SNEDDS tablet
4	9	Referans tablet

Kontrol grubunun biri (n=3) histolojik çalışmaların gerektiği gibi değerlendirilebilmesi için hiçbir uygulamaya maruz bırakılmamıştır. Tedavi grupları ise MCT ile PAH oluşturulmuş hayvanların (n=27) rastgele 3 gruba bölünmesiyle elde edilmiştir. Birinci tedavi grubuna (n=9) BOS yüklü SNEDDS, ikinci tedavi grubuna (n=9) BOS yüklü S-SNEDDS tablet, üçüncü tedavi grubuna (n=9) ise referans tabletin 4 hafta süreyle verilmesi planlanmıştır. Tedavi süresinin sonunda farmakodinamik ve histolojik değerlendirmeler yapılmıştır.

MCT çözeltisinin hazırlanması

MCT çözeltisi Hayashi ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. 200 mg 1,2 mL 1 N HCl içinde çözülmüş, distile su ile yaklaşık 5 mL'ye seyreltilmiş ve 0,5 N NaOH ile pH 7,4'e ayarlanmış ve distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır (Hayashi, Hussa ve Lalich, 1967).

Ekokardiyografik çalışma

Ekokardiyografik çalışma başlangıç, tek doz MCT uygulamasının ardından hastalık modeli oluşturulduktan sonra ve optimum formülasyonlar ile tedavi sonunda olmak üzere üç kez gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar anesteziye 0,5 mg/kg medetomidin hidroklorid (Domitor®) ile alınmış, göğüsleri tıraş edildikten sonra sırt üstü pozisyonda olacak şekilde yatırılıp, vücut sıcaklığı bir lamba yardımıyla 36,5-37,5°C'de tutulmuş, GE Vivid S5 ve kardiyak sektör prop 12S-RS (4-12 MHz) ekokardiyografik ölçüm sistemi ile sağ ventrikül duvar kalınlığı, sağ ventrikül diyastol sonu çapı ve hastalığın düzeyini tahmin etmek için trisküspit yetmezlik

ölçümleri yapılmıştır (Resim 3.5) (Karpuz ve diğerleri, 2017). Hayvanları anesteziden çıkarmak için Antisedan® (0,5 mg/kg) kullanılmıştır.



Resim 3.5. Ekokardiyografik ölçüm işlemi

Ekokardiyografik ölçümler sonrası aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilen parametreler ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir (Meinel, Koestenberger, Sallmon, Hansmann ve Pieles, 2021).

Triküspit yetmezlik akımı: Artan pulmoner arter basıncı ve dolayısıyla artan sağ ventrikül basıncının yansımasıdır.

Sağ ventrikül (Right Ventricle-RV) sonu diastolik çap: Sağ ventrikülün diastol sonu çapıdır.

Triküspit kapak anuler plane sistolik ekskursiyonu (Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion-TAPSE): Sağ ventrikülün sistolik işlevini değerlendirmede kullanılan bir parametredir.

Pulmoner yetmezlik akımı: Artan pulmoner arter basıncı dolayısıyla pulmoner kapaktan sağ ventriküle doğru olan akımdır.

Pulmoner arter akselerasyon zamanı (Pulmonary Artery Acceleration Time-PAAcT): Pulmoner akımın başlangıcından tepe noktaya ulaştığı ana kadar geçen süredir.

Sağ ventrikül ön duvar sistolik kalınlığı: Artmış pulmoner arter direnci ve pulmoner arter basıncına bağlı olarak artan sağ ventrikül yükünün göstergesidir.

Sağ ventrikül ön duvar diastolik kalınlığı: Artmış pulmoner arter direnci ve pulmoner arter basıncına bağlı olarak artan sağ ventrikül yükünün göstergesidir.

Aorta anülüs ve pulmoner arter anülüs çap: Kalpten çıkan bu iki büyük damarın çaplarıdır ve ventriküller önündeki yükün artışının önemli bir göstergesidir.

Histolojik çalışmalar

Çalışma kapsamında tek doz ip 60 mg/kg MCT ile indüklenmiş PAH'lı sıçanlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonları ve referans tablet ile uygulanacak tedavi sonrasında kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında oluşabilecek olası histopatolojik değişimlerin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ile incelenmesi amaçlanmış ve histolojik çalışma tasarımı Çizelge 3.17'de verilmiştir. Ayrıca hepatositlerde oluşan hasarı ve uygulanan tedavilerin olası iyileştirici etkileri kan plazmasından elde edilen ve hepatosit ilişkili transkripsiyon faktörü olan albümin seviyesi ile enzime bağlı immune sorbent deneyi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.17. Histolojik çalışma tasarımı

Grup adı	Denek sayısı	Uygulama	2 doz	4 doz	6 doz	7 doz	8 doz	11 doz	13 doz	14 doz	15 doz	17 doz	20 doz
G1	6	Hiçbir müdahale yapılmayan grup	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
G2	6	Tedavi uygulanmayan grup	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
G3	9	SNEDDS formülasyonu uygulanan grup	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**-**	**+**
G4	9	S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup	**+**	**+**	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**+**
G5	9	Referans tablet uygulanan grup	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**-**	**-**

Deney bitiminde sıçanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edilmiştir. Sıçanların kan örnekleri ile birlikte oluşturulan hastalık modeli ile ilişkili olduğu düşünülen kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi dokuları alınmıştır (Aghamohammadzadeh ve diğerleri, 2016; Huetsch, Jiang, Larrain ve Shimoda, 2016).

Dokular kuru ağırlıklarının tartılmasının ardından ışık mikroskobu incelemesi için ilk olarak %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda en az 72 saat tespit edilmiş ve rutin takip işlemlerinin ardından parafin bloklar elde edilmiştir (Kalem ve diğerleri, 2018). Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan doku örnekleri histolojik olarak değerlendirilmek üzere Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanmıştır. Akciğere ve böbreğe ait kesitlerde ait kesitlerde Kaspaz-3 ve IL-6; karaciğere ait kesitlerde ise TROP2 ve TNF-α primer antilorları ile ayrı ayrı immunohistokimyasal (Immunohistochemical-IHC) boyama yapılmıştır.

H&E boyama

Akciğer, karaciğer ve böbreğe ait kesitler 37ºC'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 57ºC'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletilmiştir. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'er dakika ksilolde bırakıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %80, %70 ve %60'lık) 10'ar dakika geçirilerek sudan, 10 dakika akar suda yıkanarak alkolden kurtarılmıştır. Hematoksilen solüsyonu içinde 10 dakika bekletilen kesitler tekrar 10 dakika akar suda yıkanmış ve daha sonra %70 alkol + 3 damla glasiyel asetik asit karışımına batırılıp 2-3 kez dip yapılan kesitler tekrar 10 dakika akar suda yıkanmıştır. Eozin solüsyonu içinde 5-10 dakika bekletilen ve sonrasında 10 dakika akar suda yıkanan kesitler artan alkol serilerinden (sırasıyla %60, %70, %80, %96 ve %100'lük) ve 2 kez 15'er dakika ksilolden geçtikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Kesitlerin Olympus CH40 bilgisayar destekli görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

Akciğer, karaciğer ve böbrek hasarının şiddetinin histopatolojik değerlendirilmesinde semi-kantitatif bir yöntem kullanılmıştır. Buna göre patoloji kriterleri akciğer için intimal kalınlaşma, fibrozis ve distal arterlerin dilatasyonu;

karaciğer için sinüzoidal dilatasyon, fibrozis, vasküler konjesyon, hücresel vakuolizasyon; böbrek için vasküler konjesyon, glomerular dejenerasyon, tübüler dilatasyon ve nötrofil infiltrasyonu olarak belirlenmiştir. Her bir deneğe ait kesitten rastgele altı alan seçilmiş ve her alan Çizelge 3.18'de belirtilen ölçek kullanılarak 0'dan 5'e kadar puanlanmıştır (Leemans ve diğerleri, 2005)

Çizelge 3.18. Karaciğer ve böbrek dokularının H&E boyamasında kullanılan histopatolojik değerlendirme ölçeği

Ölçek	Değerlendirme
0	%0, normal
+1	%0-10, zayıf hasar
+2	%11-25, orta şiddetli hasar
+3	%26-49, yoğun hasar
+4	%50-75, yüksek şiddetli hasar
+5	%75, ağır hasar

IHC boyama

Dokulara ait kesitler 37ºC'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 57ºC'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletilmiş, camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 15'er dakika ksilolde bırakıldıktan sonra sırasıyla %100'lük, %96'lık, %80'lik, %70'lik ve %60'lık alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek sudan, 2 kez 10'ar dakika distile sudan geçirilerek alkolden kurtarılmıştır. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 2 kez 5'er dakika sitrat tamponuna etkin bırakılmıştır. Oda ısısında soğutulduktan sonra Pappen ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizilmiş, dokular 3x3 dakika fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmalarının ardından, %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile 15 dakika inkübe edilmiş, 3x3 dakika PBS ile tekrar yıkanan dokular 5 dakika süresince Ultra V Block solüsyonu ile blocking aşamasına etkin bırakılmıştır. Ardından yıkama işlemi yapılmadan akciğer ve böbreğe ait kesitler Kaspaz-3 ve IL-6; karaciğere ait kesitler ise TROP2 ve TNF-α primer antilorlarına etkin bırakılmıştır. İlgili süre sonunda PBS ile yıkanan dokular, uygun biyotinli sekonder antikor ve Streptavidin

solüsyonlarına 10'ar dakika süresince etkin bırakılmıştır. Dokular PBS ile yıkanmalarının ardından DAB ile çekirdek boyaması yapılarak entellan ile kapatılmış ve Olympus CH40 bilgisayar destekli görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

IHC boyamalar sonrasında, karaciğer ve böbrek dokusuna ait kesitlerin primer antikor ekspresyonlarının değerlendirilmesi ve immünreaktivite yoğunluğunu belirlemek için H-Score yöntemi kullanılmıştır. Buna göre; tüm gruplarda her bir hayvana ait akciğer ve böbrek dokusundan alınarak Kaspaz-3 ve IL-6 primer antikorları ve karaciğer dokusundan alınarak TROP2 ve TNF-α primer antikorları ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerden bir merkez ve beş perifer olmak üzere rastgele altı bölge seçilmiş ve bu bölgelerde immüno-reaktivite yoğunluğunu değerlendirmek için Çizelge 3.19'da verilen semi-kantitatif puanlama sistemi kullanılmıştır (Mazières ve diğerleri, 2013).

Çizelge 3.19. Karaciğer ve böbrek dokularının IHC boyama için değerlendirilmesinde kullanılan H-Score yöntemi

Ölçek	Değerlendirme
0	%0, boyama yok
+1	≤ 30%, zayıf boyanma
+2	%30-%60, orta şiddetli boyanma
+3	> %60, yoğun boyanma

Tüm değerlendirmeler bağımsız iki araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Biyodağılım çalışmaları

SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların biyodağılım ve vücutta kalış sürelerinin in vivo olarak incelenmesi

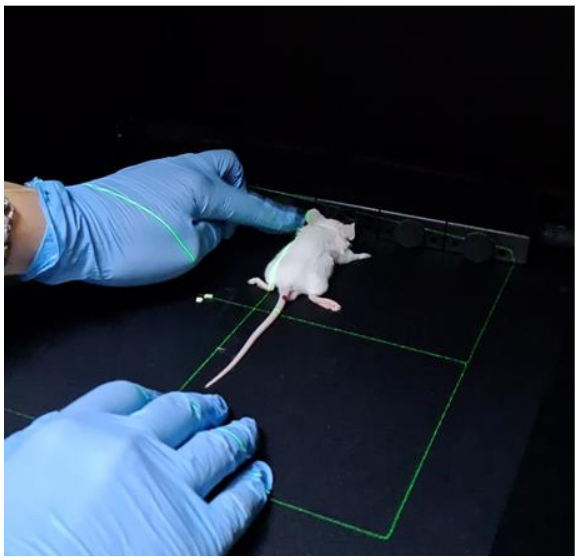
Biyodağılım çalışmaları doğrultusunda VivoTag® 680XL ve XenoLight™ DIR boyaları ile hazırlanan ve floresan olarak işaretlenen SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyon ve kontrol boya çözeltileri 8 haftalık Balb/c farelere (XenoLight™ DIR

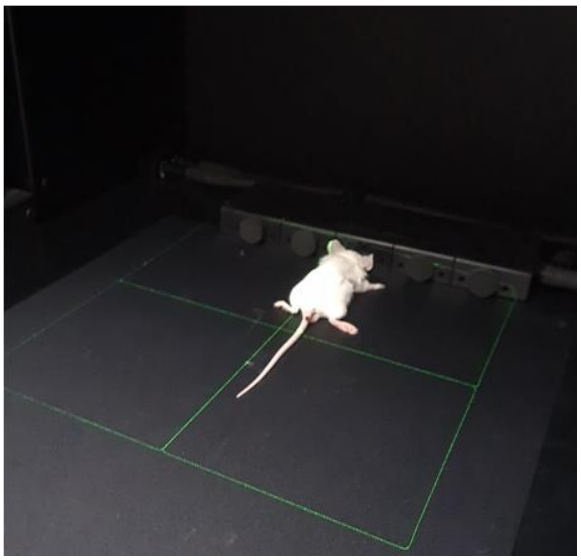
için: kontrol boya grubu 2 mg/mL, SNEDDS grubu 0,3 mg/mL, S-SNEDDS tablet grubu 1 mg/mL; VivoTag® 680XL için: kontrol boya grubu 3 mg/mL, SNEDDS grubu 0,45 mg/mL, S-SNEDDS tablet grubu 1,5 mg/mL) oral gavaj ile verilmiş (Resim 3.6) ve floresan boyanın dağılımı kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak In Vivo Imaging System® (IVIS®) cihazında görüntüleme yapılarak incelenmiştir (Resim 3.7) (Panthani ve diğerleri, 2013). Cihazın hassasiyet sınırlarındaki dalga boyunda alınan görüntüler, dakika dakika karşılaştırılarak kontrol boya grubu ve formülasyonların absorpsiyon, dağılım, metobolizma ve eliminasyonuna (ADME) dair bir görsel profil oluşturulması amaçlanmıştır.



Resim 3.6. Balb/c farelere gavaj uygulaması



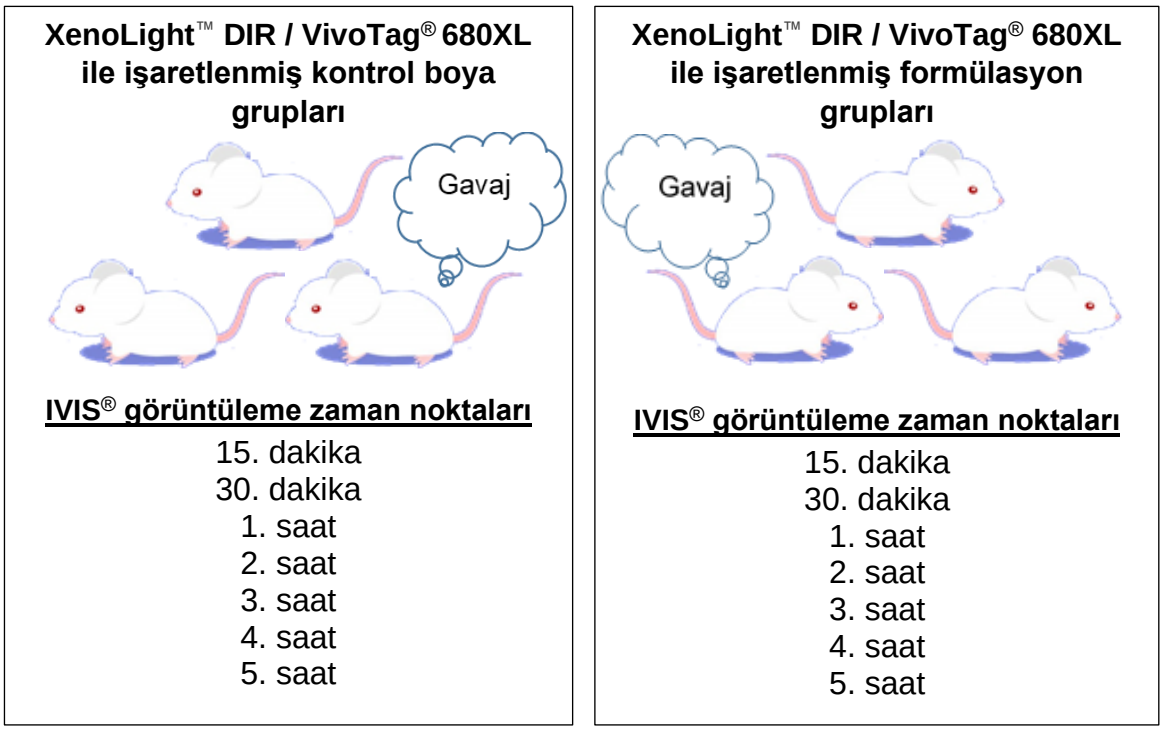




Resim 3.7. IVIS® cihazına ait görseller

BOS'un biyolojik yarı ömrü 5 saat olduğundan farelere 5 saat boyunca yedi görüntüleme yapılmıştır. Her bir boyanın kontrol ve formülasyon grupları için biyodağılım ve ex vivo görüntüleme çalışmaları Şekil 3.3'te şematize edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası farelere cihaza entegre anestezi sistemi aracılığıyla (Resim 3.8) görüntü almadan hemen önce %5'lik izofluran ile anestezi uygulanmıştır, izofluranın çok kısa yarı ömürlü olması nedeni ile tüm çalışma boyunca görüntü süreleri hariç fareler haraketli ve canlı olarak bekletilmiştir. Deney

tasarımı sonuçların anlamlı olarak kabul edilebilmesi açısından her bir gruptaki hayvan sayısı en az olacak (n=3) şekilde planlanmıştır (Çizelge 3.20).



Şekil 3.3. İn vivo ve ex vivo görüntüleme (biyodağılım) çalışmalarına ait akış şeması



Resim 3.8. IVIS® cihazına entegre anestezi sistemi ve işlem anından bir görüntü

Çizelge 3.20. İn vivo ve ex vivo görüntüleme (biyodağılım) çalışma tasarımı

Grup no	Fare sayısı	Uygulama
1	3	Kontrol Grubu (VivoTag® 680XL için)
2	3	BOS yüklü SNEDDS + VivoTag® 680XL
3	3	BOS yüklü S-SNEDDS tablet+ VivoTag® 680XL
4	3	Kontrol Grubu (XenoLight™ DIR için)
5	3	BOS yüklü SNEDDS + XenoLight™ DIR
6	3	BOS yüklü S-SNEDDS tablet + XenoLight™ DIR

Ex vivo çalışmalar

ADME çalışmaları tamamlandıktan sonra hayvanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiş (8 mg/kg Ksilazin + 100 mg/kg Ketamin ve boyanın dokulardaki

tutulumunu belirlemek amacıyla organlar çıkartılmıştır. Tek tek tablaya belirlenen sıra (mide, kalp, karaciğer, akciğer, böbrekler ve kolon) ile yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri belirlenmiştir. Daha iyi görüntü alabilmek için, midede yoğun absorbsiyon olduğu durumlarda, diğer organların daha iyi görüntülenmesini sağlamak amacı ile mide ortamdan uzaklaştırılarak yeniden görüntü alınmıştır.

In vivo görüntüleme çalışmalarında iki boya kullanılmıştır. Çalışma için seçilen ilk boya küçük moleküllere güçlü şekilde bağlanan (BOS'a bağlanma) VivoTag® 680XL, ikinci boya ise lipitlere selektif olarak bağlanan ve nanooemülsiyonun lipit yapısını boyama amacı ile kullanılan XenoLight™ DIR'dır.

XenoLight™ DIR çözeltilerinin hazırlanması

Stok boya çözeltisinin hazırlanması

Stok boya çözeltisi 25 mg XenoLight™ DIR'ın 2,5 mL etanolde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Kontrol boya çözeltisinin hazırlanması

Bir fare için 30 µL XenoLight™ DIR stok çözelti ve 120 µL fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak kontrol boya çözeltisi hazırlanmıştır.

XenoLight™ DIR ile işaretlenmiş SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların çözeltilerinin hazırlanması, IVIS® ve ex vivo görüntüleme çalışmaları

Bir fare için 30 µL XenoLight™ DIR stok çözelti ve 120 µL formülasyonlar kullanılarak işaretli formülasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere 150 µL fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilerek karıştırılmıştır. Gerekli seyreltmeler işlem sırasında gerçekleştirilmiştir.

Floresan olarak işaretlenen formülasyonlar ve serbest boya içeren kontrol çözeltileri her grupta 3'er adet olmak üzere Balb/c farelere her bir fareye 150 µL

olacak şekilde oral gavaj yolu ile verilmiş, dağılımı IVIS® cihazında 710/780 nm ekzitasyon/emisyon dalga boyunda incelenmiştir. Çözeltilerin verilmesinden sonra 15 dakika, 30 dakika, 1, 2, 3, 4 ve 5. saatlerde görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme esnasında formülasyonların absorpladığı ışık saat baz alınarak kontrol grubu ile eşzamanlı gözlenmiş ve floresan boyanın dokularda gösterdiği yoğunlaşma ölçülmüştür.

Gerçek zamanlı (Real-time) görüntüleme çalışmalarında 5. saatin ardından hayvanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiş boyanın dokulardaki tutulumunu belirlemek amacıyla organlar çıkartılmıştır. Tek tek tablaya belirlenen sıra (mide, kalp, karaciğer, akciğer, böbrekler ve kolon) ile yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri belirlenmiştir.

VivoTag® 680XL çözeltilerinin hazırlanması

Stok boya çözeltisinin hazırlanması

Stok boya çözeltisi 5 mg VivoTag® 680XL'ın 500 µL dimetilsülfoksitte çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

50 mM $NaHCO_3$ tampon çözeltisinin hazırlanması

2,52 g $NaHCO_3$ 100 mL suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

Kontrol boya çözeltisinin hazırlanması

Bir fare için 45 µL VivoTag® 680XL stok çözelti, 25 µL $NaHCO_3$ (50 mM) tamponu ve 80 µL distile su kullanılarak kontrol boya çözeltisi hazırlanmıştır.

VivoTag® 680XL ile işaretlenmiş SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların çözeltilerinin hazırlanması, IVIS® ve ex vivo görüntüleme çalışmaları

Bir fare için 45 µL VivoTag® 680XL stok çözelti, 25 µL $NaHCO_3$ (50 mM) tamponu ve 80 µL formülasyonlar kullanılarak işaretli formülasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltilere 150 µL fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilerek karıştırılmıştır. Gerekli seyreltmeler işlem sırasında gerçekleştirilmiştir.

Floresan olarak işaretlenen formülasyonlar ve serbest boya içeren kontrol çözeltileri her grupta 3'er adet olmak üzere Balb/c farelere her bir fareye 150 µL olacak şekilde oral gavaj yolu ile verilmiş; dağılımı IVIS® cihazında 640/700 nm ekzitasyon/emisyon dalga boyunda incelenmiştir. Çözeltilerin verilmesinden sonra 15 dakika, 30 dakika, 1, 2, 3, 4 ve 5. saatlerde görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme esnasında formülasyonların absorpladığı ışık saat baz alınarak kontrol grubu ile eşzamanlı gözlenmiş ve floresan boyanın dokularda gösterdiği yoğunlaşma ölçülmüştür.

Gerçek zamanlı (Real-time) görüntüleme çalışmalarında 5. saatin ardından hayvanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiş boyanın dokulardaki tutulumunu belirlemek amacıyla organlar çıkartılmıştır. Tek tek tablaya belirlenen sıra (mide, kalp, karaciğer, akciğer, böbrekler ve kolon) ile yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri belirlenmiştir.

3.2.10. İstatistiksel değerlendirmeler

Tez çalışmasından elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesinde IBM® SPSS® Statistics 24 programından yararlanılmıştır. Verilerin ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Tüm değerlendirmeler için $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

İn vitro, in vivo açlık/tokluk farmakokinetik ve biyoyararlanım, gerçek zamanlı ve ex vivo biyodağılım çalışmalarında gruplar arası karşılaştırmalar için ANOVA testi, anlamlı çıkan gruplar arasında farkın değerlendirilmesi için ise Games-Howell testi kullanılmıştır.

Ekokardiyografi çalışmaları için normal dağılım varlığını saptamak amacıyla Shapiro-Wilk testi ve histogramlar kullanılmış, normal dağılan sayısal değişkenler ortalama ± standart sapma, normal dağılmayan sürekli değişkenler ortanca (min-max) değerleri ile gösterilmiştir. Olgu sayıları (n), yüzde (%) ile ifade edilmiş,

normal dağılmayan bağımlı değişkenlerin karşılaştırılması için Wilcoxon testi kullanılmıştır.

Histoloji çalışmaları için H&E ve IHC boyamaların değerlendirilmesinde gruplar arası karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi, anlamlı çıkan gruplar arasında farkın değerlendirilmesi için Post-hoc Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testleri yapılmıştır. ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde ise gruplar arası karşılaştırma için Tukey testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Bosentanın Fizikimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.1.1. %1 SLS içeren distile su ortamındaki çözünürlük çalışması

BOS'un çözünürlüğünün belirlenmesi Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bulunan absorbanslar standart doğru denkleminde yerine konularak elde edilen derişimlere ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. %1 SLS içeren distile su ortamına ait bağıl sink koşul değerleri çözünme hızı çalışmalarının yapıldığı sıcaklık olan 37°C'e için 24. saate göre değerlendirilmiştir ve in vitro çözünme hızı sonuçları ile Bölüm 4.5'te verilecektir.

Çizelge 4.1. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında çözünürlük sonuçları

Ölçüm zamanı	Çözünürlük (mg/mL)	
	25±0,5°C	37±0,5°C
1. saat	1,11 ± 0,01	1,26 ± 0,02
24. saat	1,21 ± 0,02	1,48 ± 0,08

X_{ort} ± SS, n=3

4.1.2. Partisyon katsayısının belirlenmesi

25°C ve 37°C'de partisyon katsayıları su fazına geçen BOS konsantrasyonunun UV spektrofotometrede 271 nm dalga boyunda analiz edilmiş ve Bölüm 3.2.1'de belirtilen Eş. 3.2 ile hesaplanmıştır. Partisyon katsayısı çalışmaları iki sıcaklık için üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

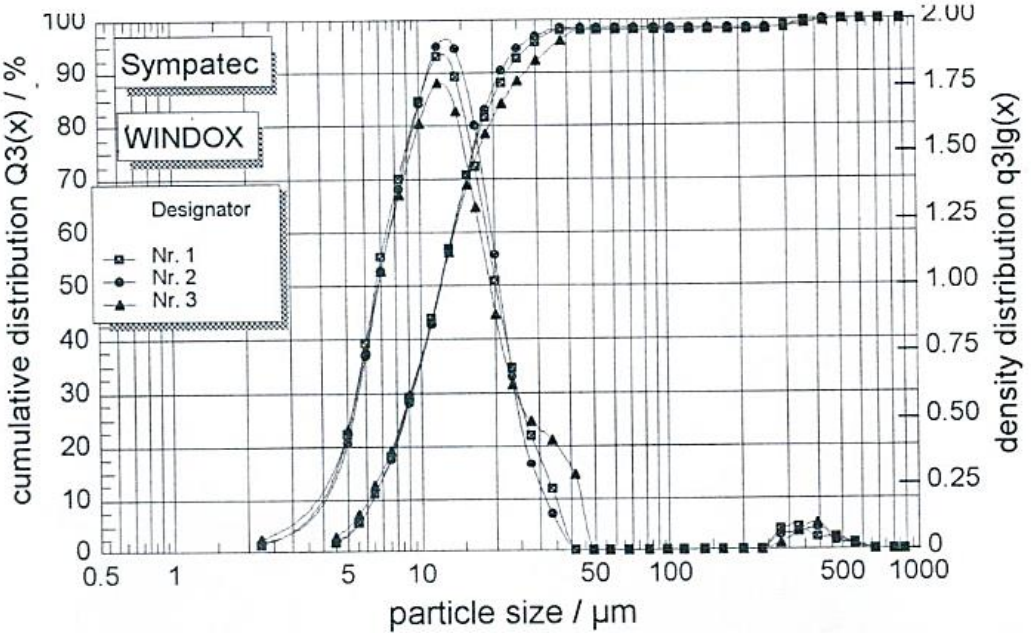
Çizelge 4.2. Partisyon katsayısı sonuçları

	Partisyon katsayısı (logP)
25±0,5°C	3,33 ± 0,08
37±0,5°C	3,44 ± 0,06

X_{ort} ± SS, n=3

4.1.3. Partikül büyüklüğü analizi

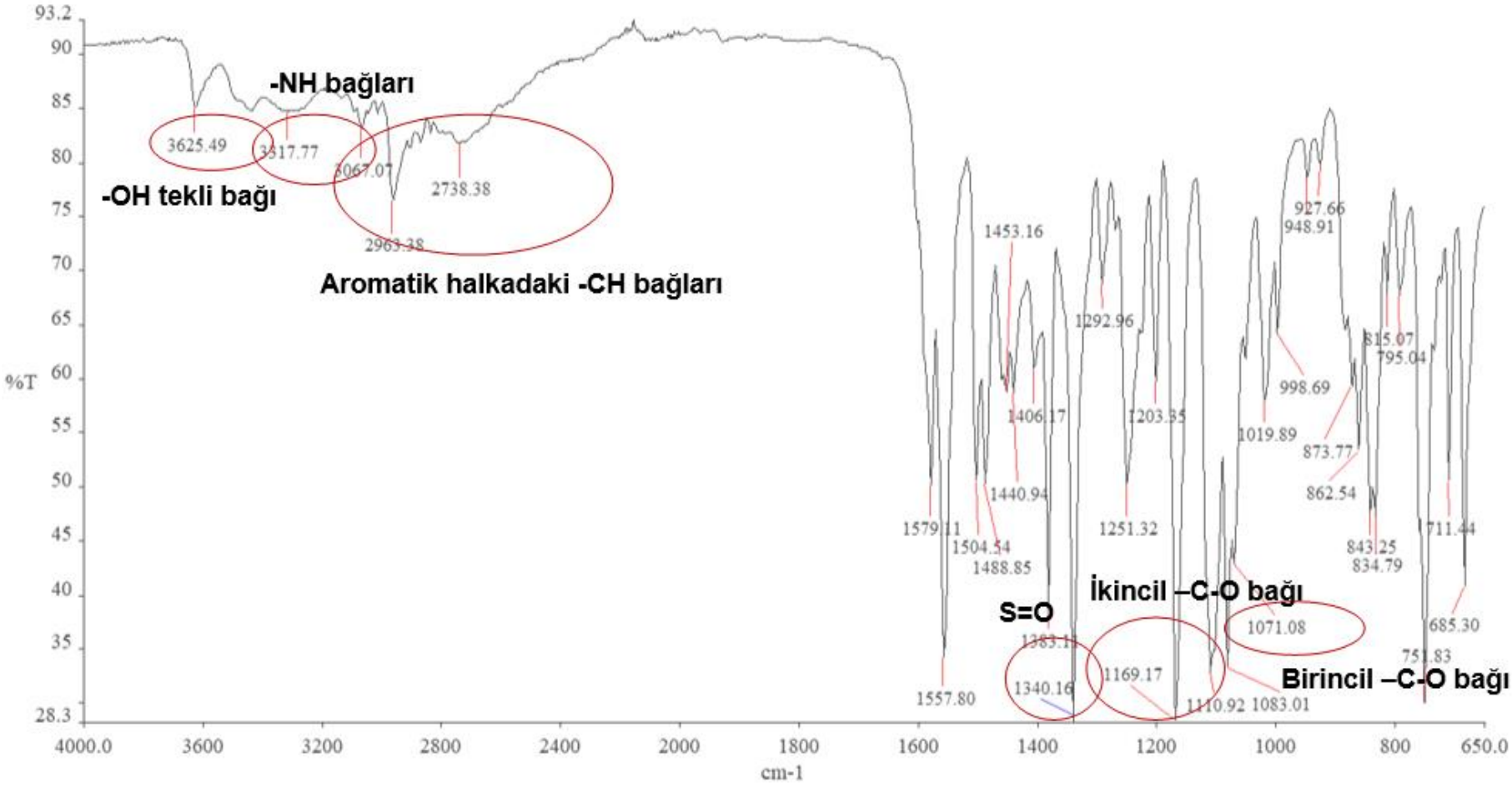
BOS'un partikül büyüklüğü analizi Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. BOS'un ortalama partikül büyüklüğü 12,07 ± 0,06 µm olarak bulunmuştur. Partikül büyüklüğü ve dağılımına ilişkin grafik Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. BOS'un partikül büyüklüğü analiz grafiği

4.1.4. FT-IR analizi

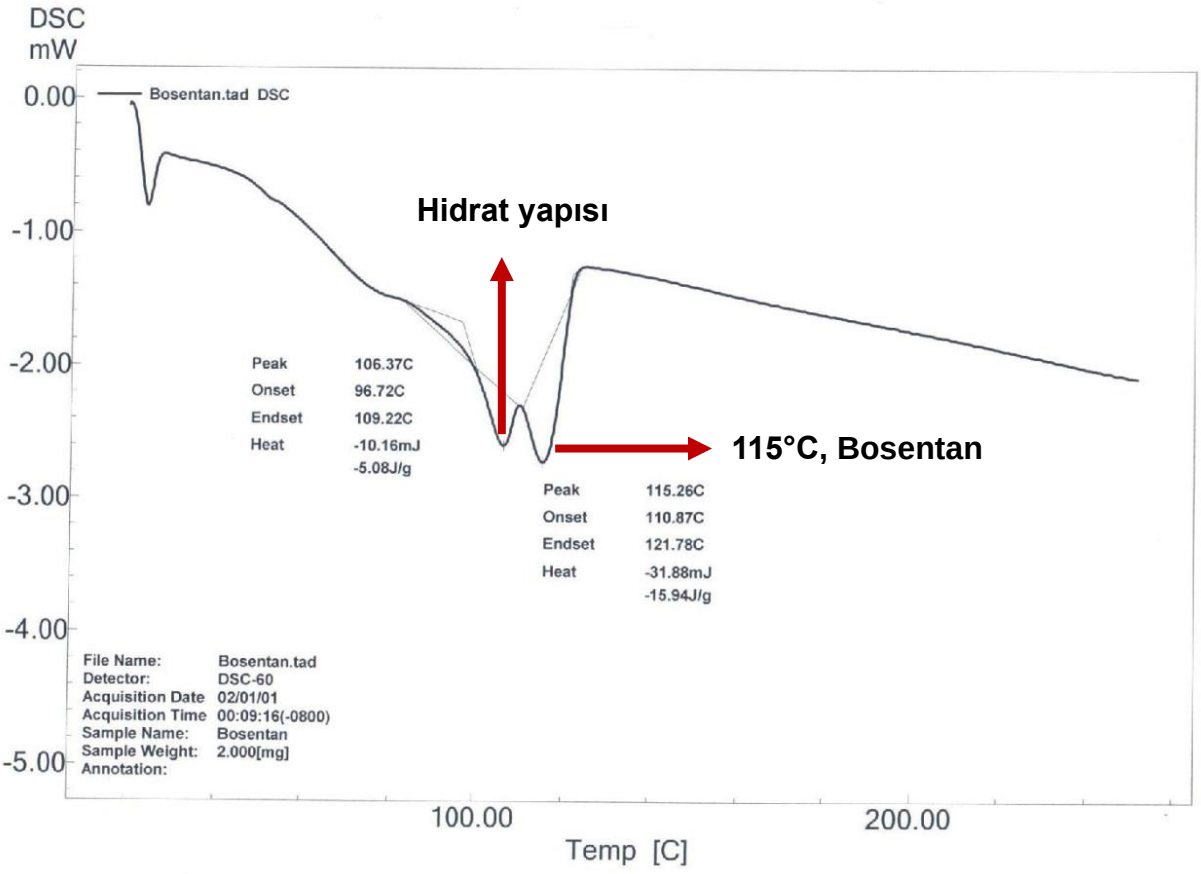
BOS'un Bölüm 3.2.1'de belirtilen şekilde gerçekleştirilen FT-IR spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir. BOS'a ait karakteristik -OH tekli bağı 3625 cm^{-1}, N-H bağları 3317 cm^{-1}, aromatik halkadaki -CH bağları 2900-3100 cm^{-1} aralığında, aromatik halkadaki C=C bağı 1558 cm^{-1}, S=O bağı 1340 cm^{-1}, ikincil -C-O bağı 1169 cm^{-1} ve birincil -C-O bağı 1071 cm^{-1} bantlarında gözlenmiştir.



Şekil 4.2. BOS'un FT-IR spektrumu

4.1.5. Erime derecesi tayini

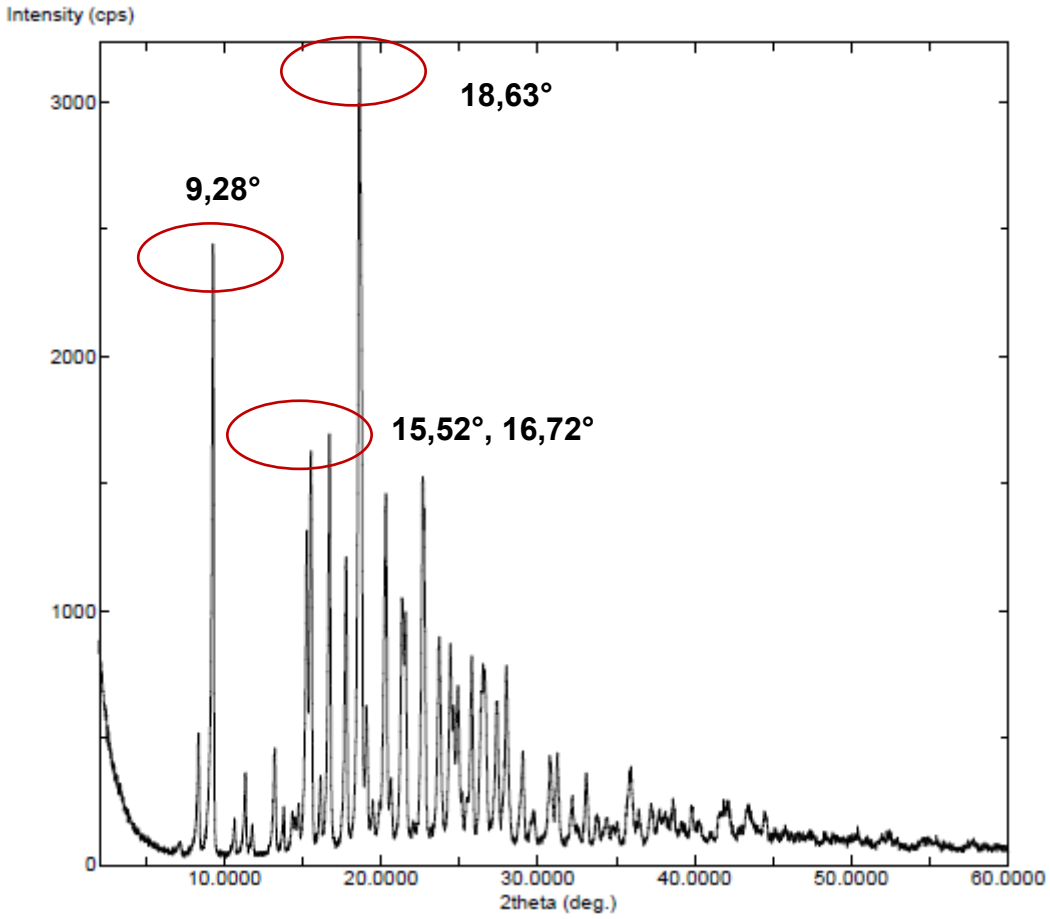
BOS'un Bölüm 3.2.1'de belirtilen şekilde yapılan DSC analizine ait DSC termogramı Şekil 4.3'te verilmiş ve termogramda iki tepeli bir pik elde edilmiştir. İlk pik BOS'un yapısındaki suya aittir ve BOS'un erime derecesi 115°C olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. BOS'un DSC termogramı

4.1.6. X-RPD analizi

BOS'un Bölüm 3.2.1'de belirtilen şekilde yapılan X-RPD analizine ait X-RPD diyagramı Şekil 4.4'te verilmiştir. BOS'un 2θ'da 9,28°, 15,52°, 16,72° ve 18,63° ana açılarında belirgin ve güçlü kırınım pikleri ile kristal yapısı doğrulanmıştır.



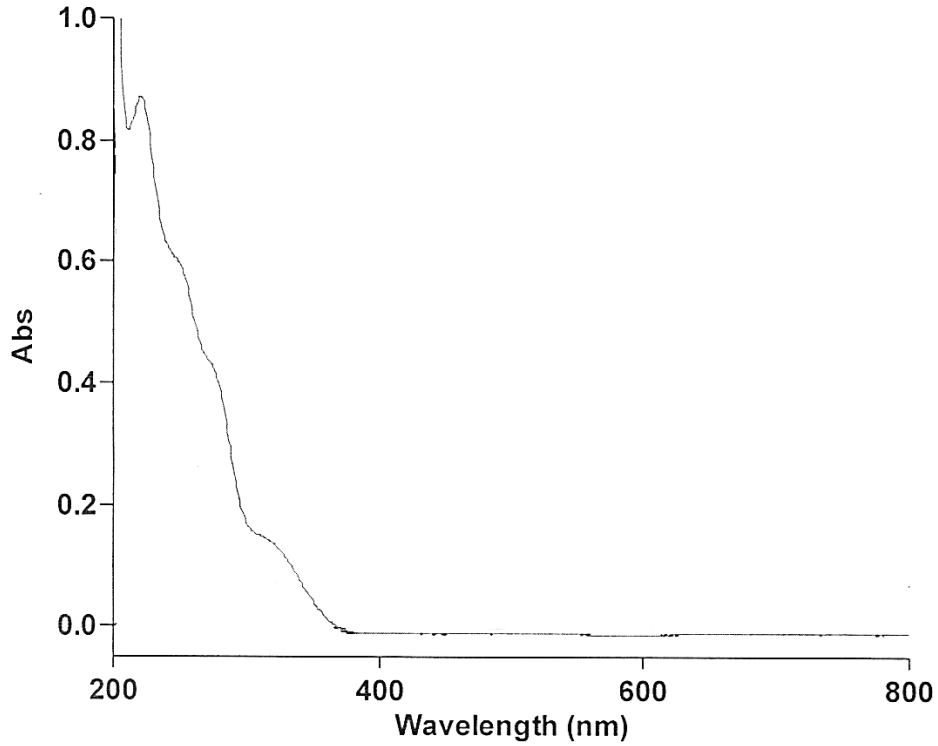
Şekil 4.4. BOS'un X-RPD diyagramı

4.9. Bosentanın İn Vitro Miktar Tayini

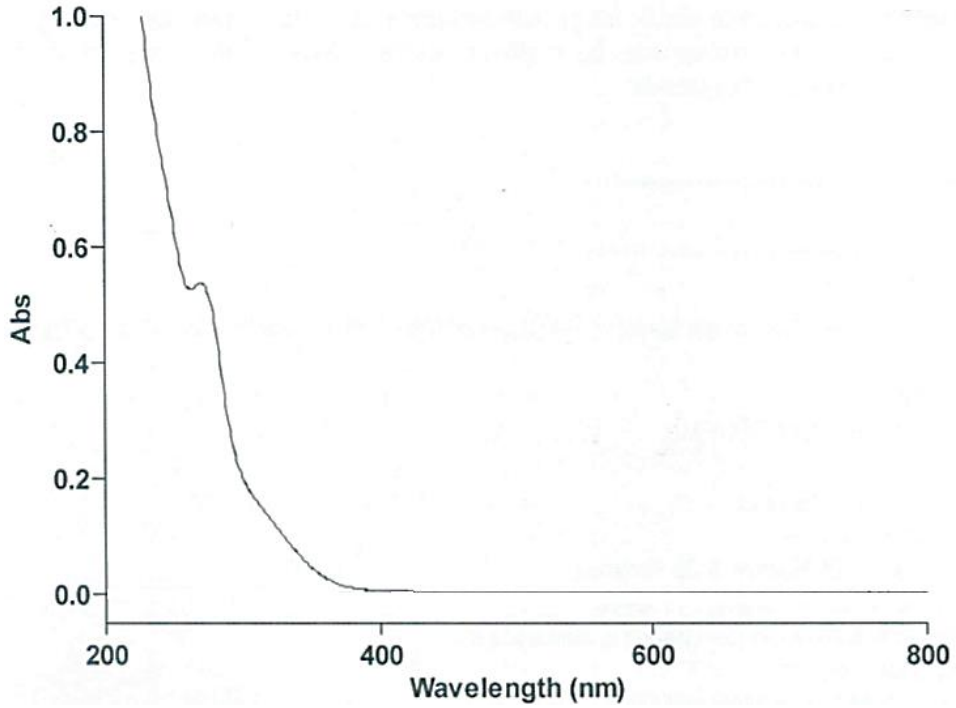
BOS'un in vitro miktar tayini Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Bosentanın UV spektrofotometrede dalga boyunun belirlenmesi

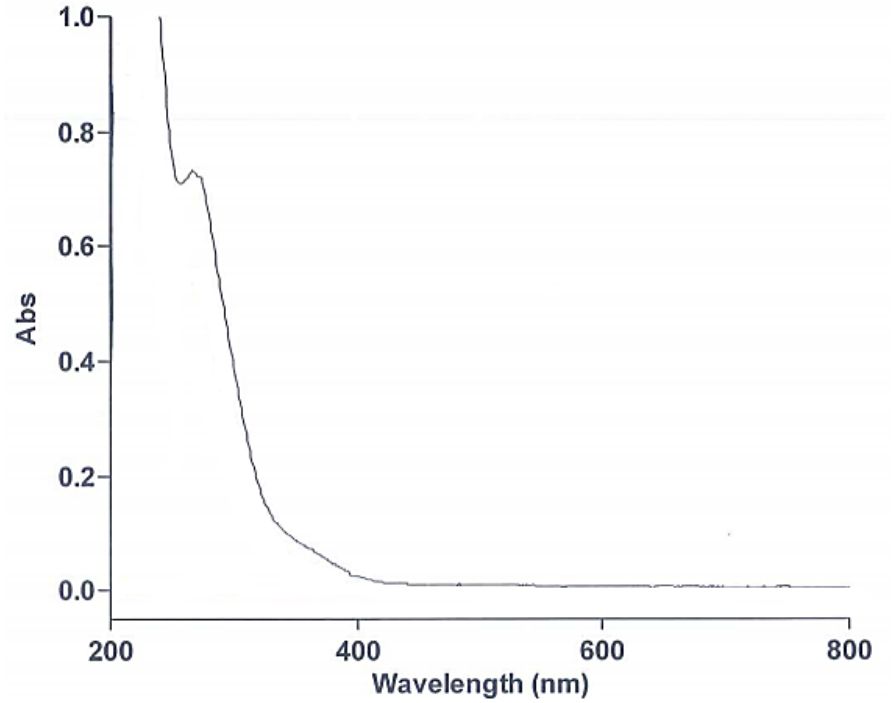
BOS'un Bölüm 3.2.2'de belirtilen ortamlarda %1 SLS içeren distile su ortamı için 10 µg/mL, disitile su ve metanol için 20 µg/mL konsantrasyonlardaki çözeltilerinin UV spektrumları Şekil 4.5 - 4.7'de verilmektedir. 200-800 nm arasında yapılan tarama sonucunda BOS'a ait maksimum dalga boyu (λ_{maks}) %1 SLS içeren distile su ortamı için 220 nm, distile su ortamı için 271 nm ve metanol için 267 nm olarak bulunmuş ve in vitro miktar tayini yöntemlerinde bu dalga boyları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu



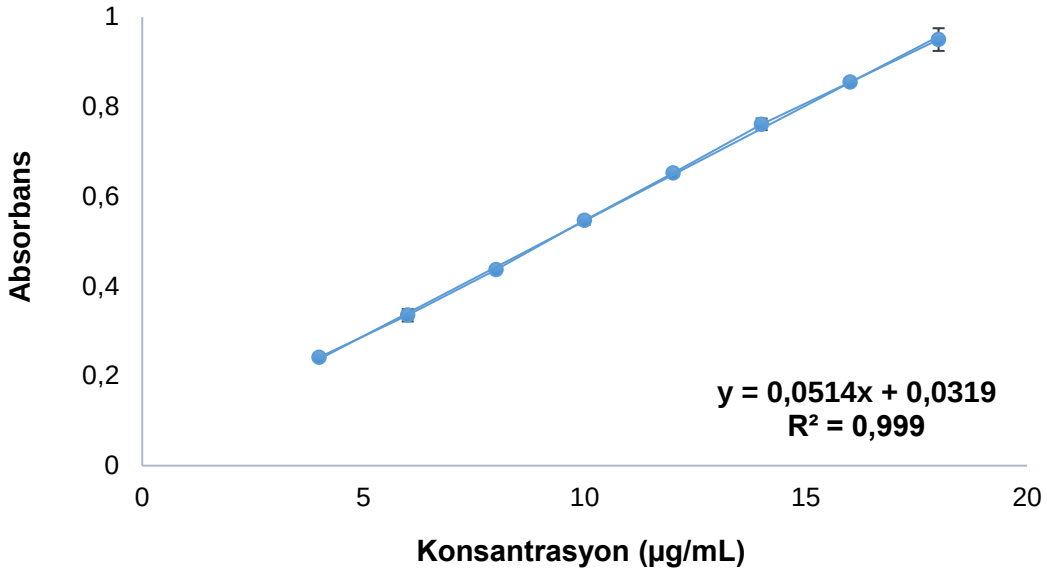
Şekil 4.6. BOS'un distile su ortamında 20 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu



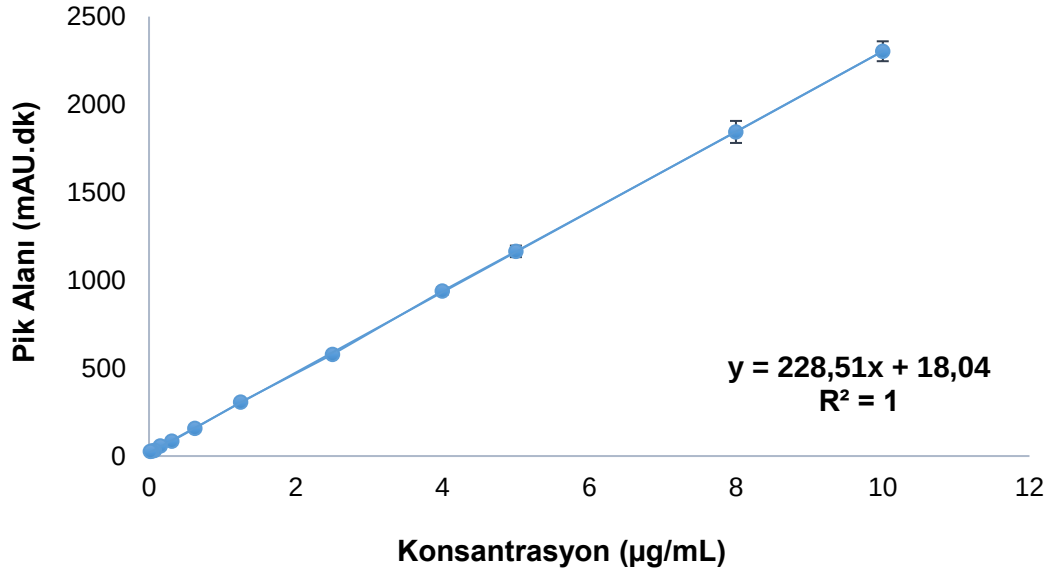
Şekil 4.7. BOS'un metanol ortamında 20 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu

4.2.2. Bosentana ilişkin kalibrasyon doğruları

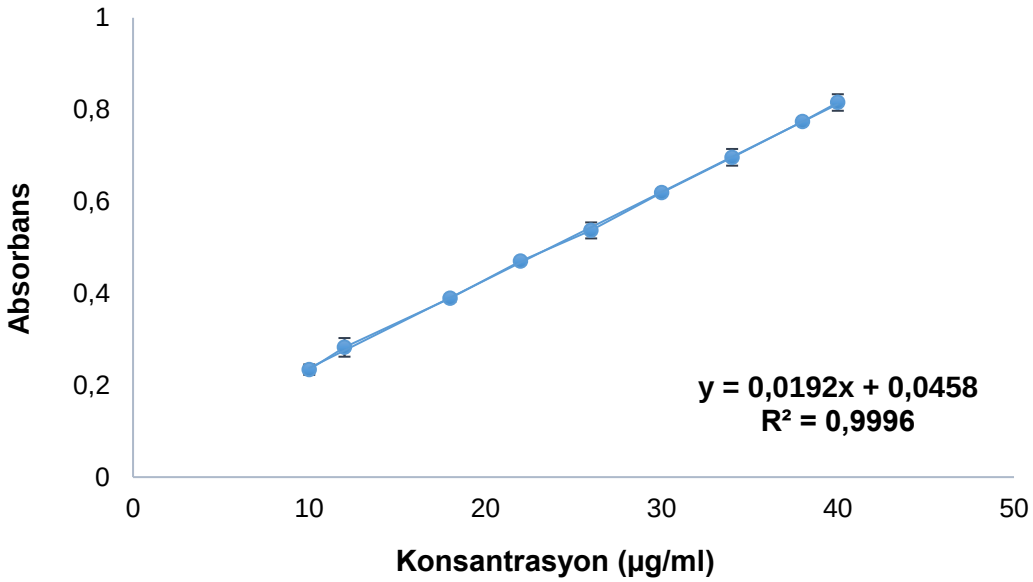
Bölüm 3.2.2'de açıklandığı gibi BOS'a ait çalışmalarda kullanılan ortamlar için kalibrasyon doğruları ve denklemleri Şekil 4.8 - 4.15'te verilmiştir.



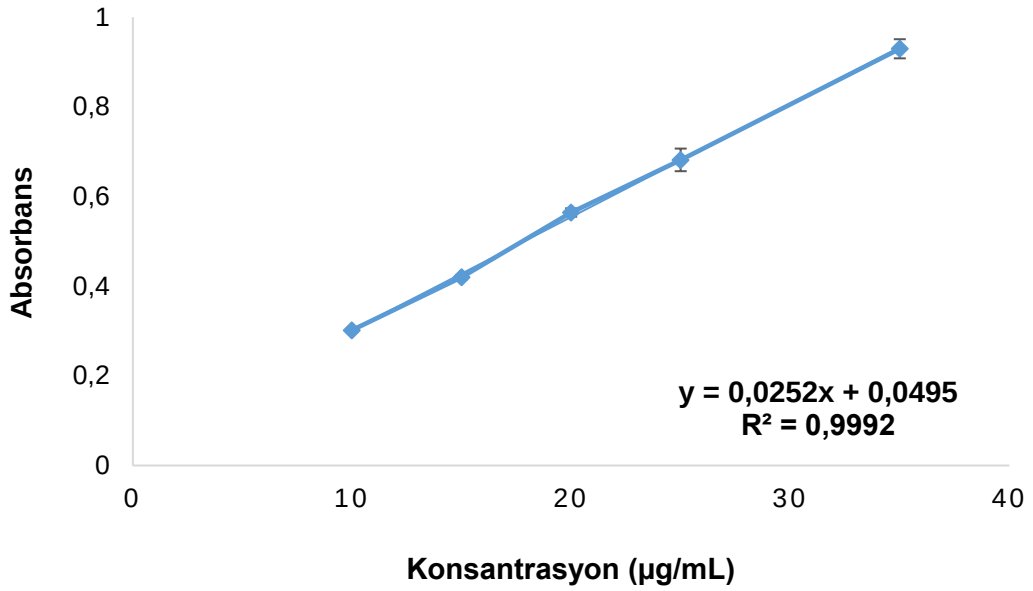
Şekil 4.8. %1 SLS içeren distile su ortamında çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=220 nm, n=6, X_{ort} ± SS)



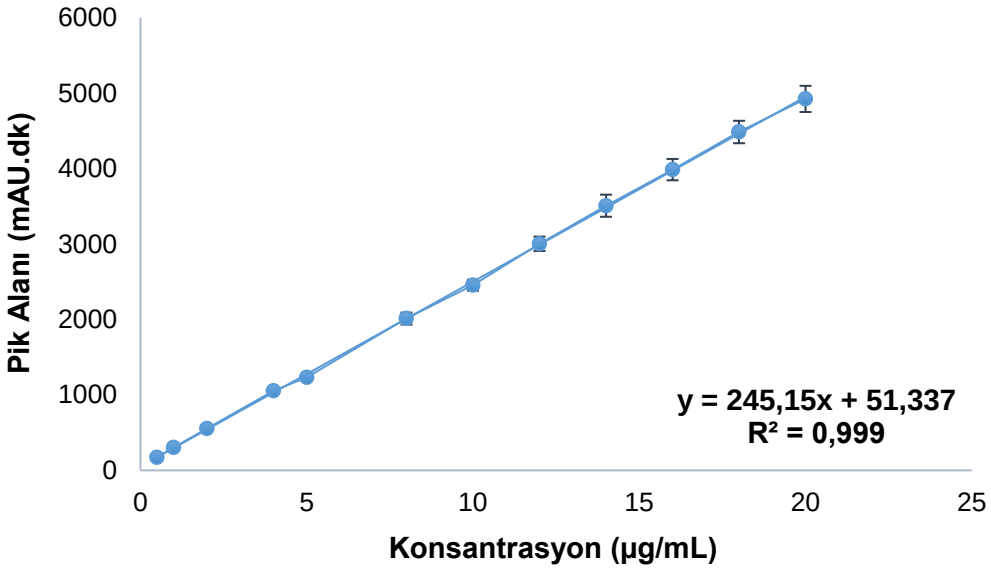
Şekil 4.9. %1 SLS içeren distile su ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH)



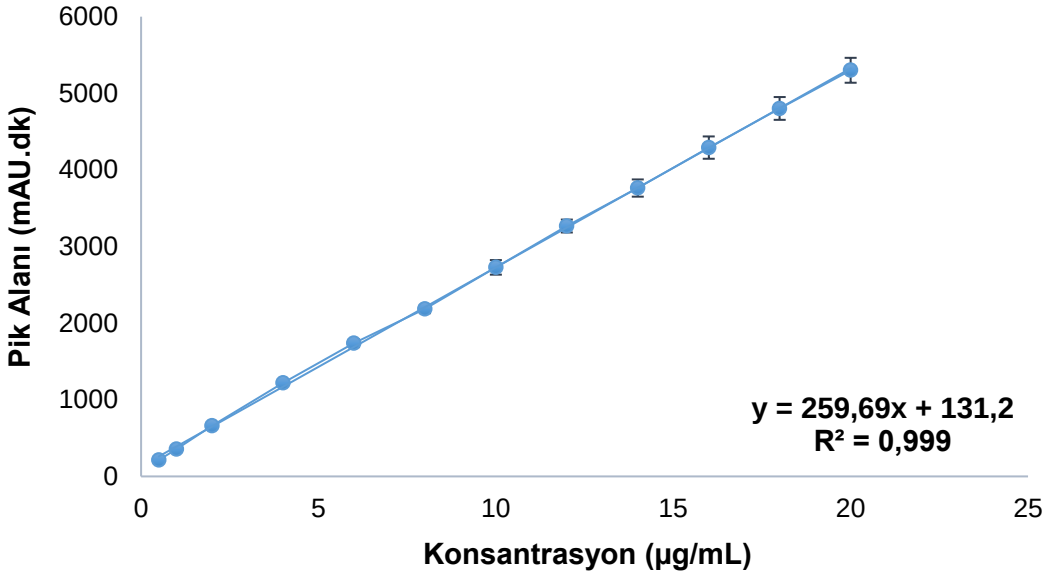
Şekil 4.10. Distile su ortamında partisyon katsayısı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=271 nm, n=3, X_{ort} ± SS)



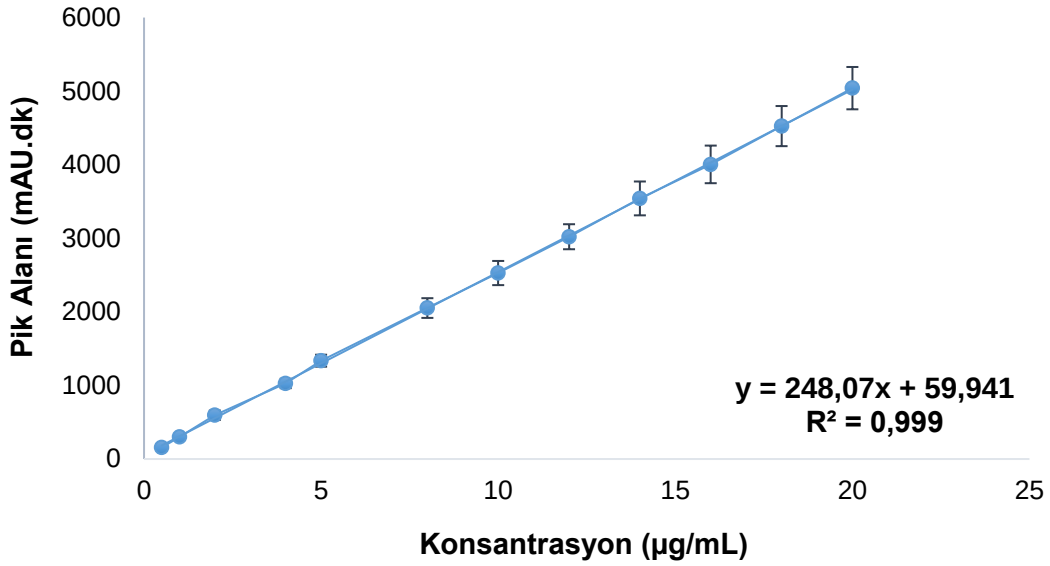
Şekil 4.11. Metanol ortamında yağ çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (UV spektrofotometre, λ_{maks}=267 nm, n=6, X_{ort} ± SS)



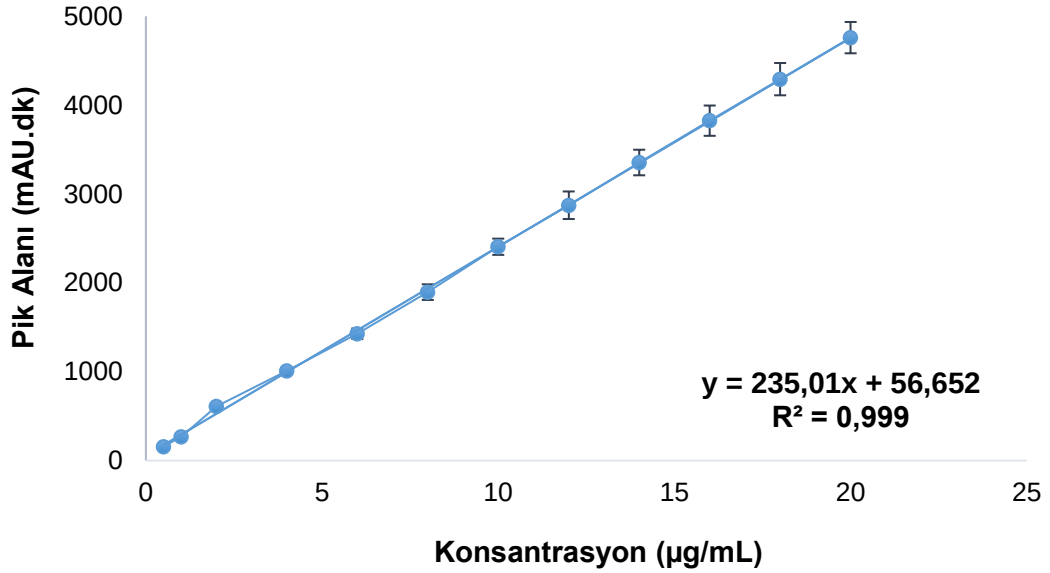
Şekil 4.12. FaSSIF ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH)



Şekil 4.13. FeSSIF ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH)



Şekil 4.14. FaSSIF-V2 ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH)

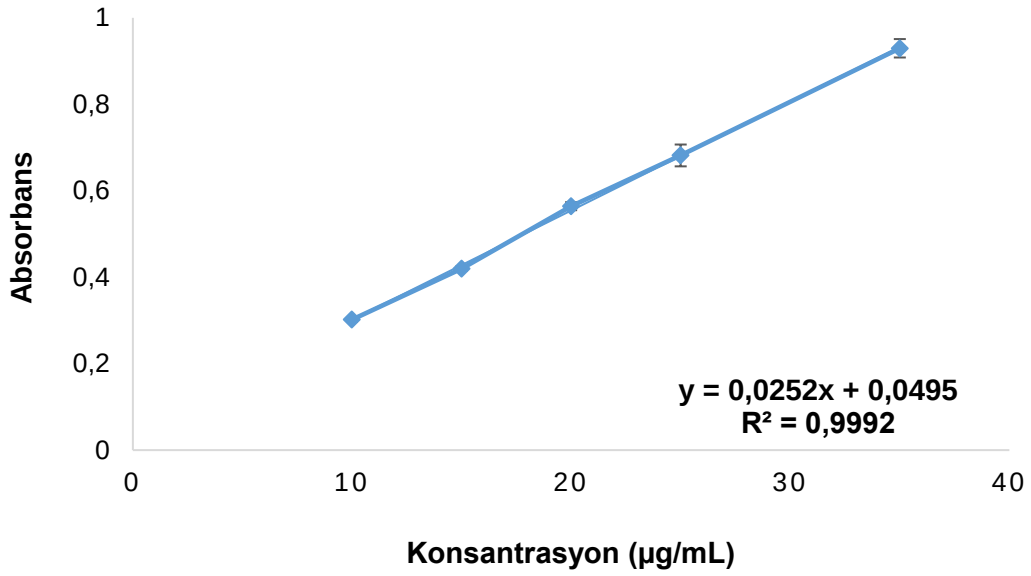


Şekil 4.15. FeSSIF-V2 ortamında in vitro çözünme hızı çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (HPLC, λ_{maks}=220 nm, n=3, X_{ort} ± SH)

4.2.3. Bosentanın UV spektrofotometre ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu

Doğrusallık

Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi BOS'un 100 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan metanol stok çözeltisinden sırasıyla 10, 15, 20, 25, 35 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Açıklayıcılık katsayısı ($R^2 \geq 0,999$) değeri hesaplanarak denklemin belirtilen aralıkta doğrusal olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. BOS'un metanol ortamında yağ çözünürlük çalışmaları için kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6, X_{ort} ± SS)

Doğruluk ve geri elde

Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi metanol için 10 µg/mL, 15 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında BOS içerecek şekilde hazırlanan örneklerden hareketle % geri kazanım miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. BOS'un metanol ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Eklenen konsantrasyon (µg/mL)			Tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)			% Geri kazanılan		
10	15	20	9,63	14,20	20,27	96,28	94,64	101,37
10	15	20	9,76	14,28	19,69	97,61	95,21	98,47
10	15	20	9,77	14,42	20,64	97,72	96,12	103,22
10	15	20	9,42	14,48	20,63	94,15	96,51	103,15
10	15	20	9,38	14,22	20,08	93,73	94,79	100,40
10	15	20	9,86	14,78	20,00	98,59	98,51	99,99
	X_{ort}		9,64	14,4	20,2	96,4	96,0	101
	SS		0,20	0,2	0,4	2,0	1,5	2
	% VK		2,07	1,45	1,85	2,07	1,51	1,85

Kesinlik

Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç düzeyde gösterilmiştir. Bu amaçla metanol için 10 µg/mL, 15 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında BOS içerecek şekilde hazırlanan örneklerin analiz sonuçları aşağıda değerlendirilmiştir.

Tekrar edilebilirlik

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı üzere analitik yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. BOS'un metanol ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Analiz no	Konsantrasyon (µg/mL)		
	10	**15**	**20**
1	9,63	14,20	20,27
2	9,38	14,22	20,08
3	9,77	14,42	20,64
X_{ort}	9,59	14,3	20,3
SS	0,20	0,1	0,3
% VK	2,09	0,860	1,41

Ara Kesinlik

Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi analitik yöntemin ara kesinliğinin değerlendirilmesinde günler arası farklılığı değerlendirmek amacıyla metanol için 10 µg/mL, 15 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan BOS çözeltileri 3 farklı günde analiz edilmiştir.

Çizelge 4.5. BOS'un metanol ortamında ara kesinlik sonuçları

Gün	**Konsantrasyon (µg/mL)**		
	10	**15**	**20**
1	10,01	14,73	20,53
2	9,80	14,52	20,60
3	9,76	14,59	20,48
X_{ort}	9,86	14,6	20,5
SS	0,13	0,1	0,1
% VK	1,35	0,720	0,290

Tekrar elde edilebilirlik

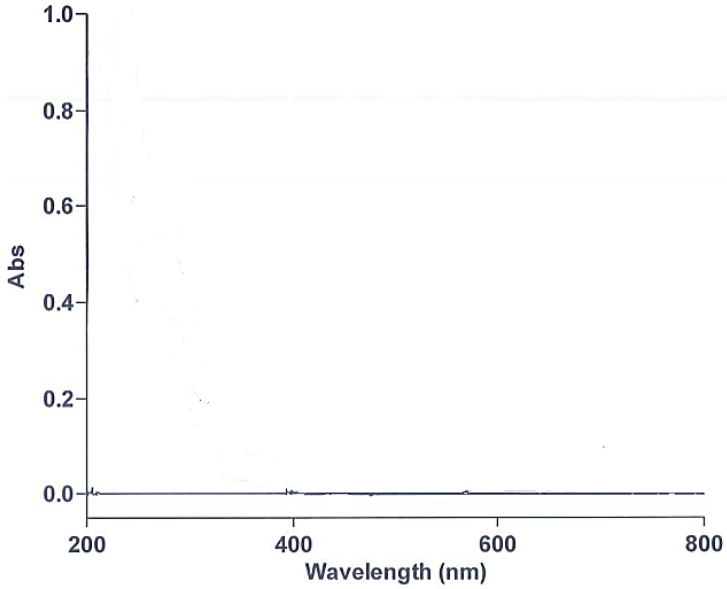
Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. BOS'un metanol ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

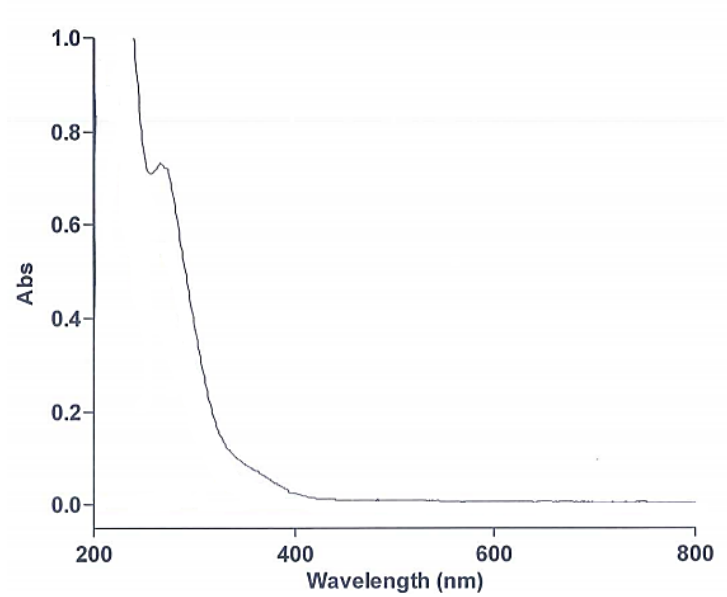
Eklenen konsantrasyon (µg/mL)			**Tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)**			**% Geri kazanılan**		
10	15	20	9,63	14,20	20,27	96,28	94,64	101,35
10	15	20	9,76	14,28	19,69	97,61	95,21	98,45
10	15	20	9,77	14,42	20,64	97,72	96,12	103,20
10	15	20	9,42	14,48	20,63	94,15	96,51	103,15
10	15	20	9,38	14,22	20,08	93,73	94,79	100,40
10	15	20	9,86	14,78	20,00	98,59	98,51	100,00
X_{ort}			9,64	14,4	20,2	96,4	96,0	101
SS			0,20	0,2	0,4	2,0	1,5	2
% VK			2,07	1,45	1,85	2,07	1,51	1,85

Özgünlük ve seçicilik

Bölüm 3.2.2'de anlatılan BOS'un maksimum absorbans verdiği dalga boyunda çalışma süresince kullanılacak ortam içeriğinin aynı koşullar altında aynı dalga boyunda maksimum absorbans verip vermediğinin belirlenmesine yönelik elde edilen UV spektrumları Şekil 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.17. BOS içermeyen metanol ortamına ait özgünlük ve seçicilik UV spektrumu



Şekil 4.18. 20 µg/mL konsantrasyondaki BOS'un metanol ortamındaki özgünlük ve seçicilik UV spektrumu

Duyarlık ve saptama sınırı

BOS'un metanoldeki UV spektrofotometrik miktar tayin yönteminin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Analitik yöntemin LOD'si 1,46 µg/mL, LOQ'su 4,41 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

Bölüm 3.2.2'de açıklandığı gibi BOS'un in vitro çözünmesinin ve in vitro çözünürlüğünün belirlenmesi çalışmaları süresince stabil olduğunu göstermek üzere metanol için 15 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltisi hazırlandıktan hemen sonra, 1, 2 ve 24. saat sonunda analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. BOS'un metanol ortamında stabilite sonuçları

Ölçüm zamanı	**Eklenen konsantrasyon (µg/mL)**	**Tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)**
0. saat	15	14,03
1. saat	15	14,08
2. saat	15	13,85
24. saat	15	15,07
X_{ort}		14,3
SS		0,6
% VK		3,86

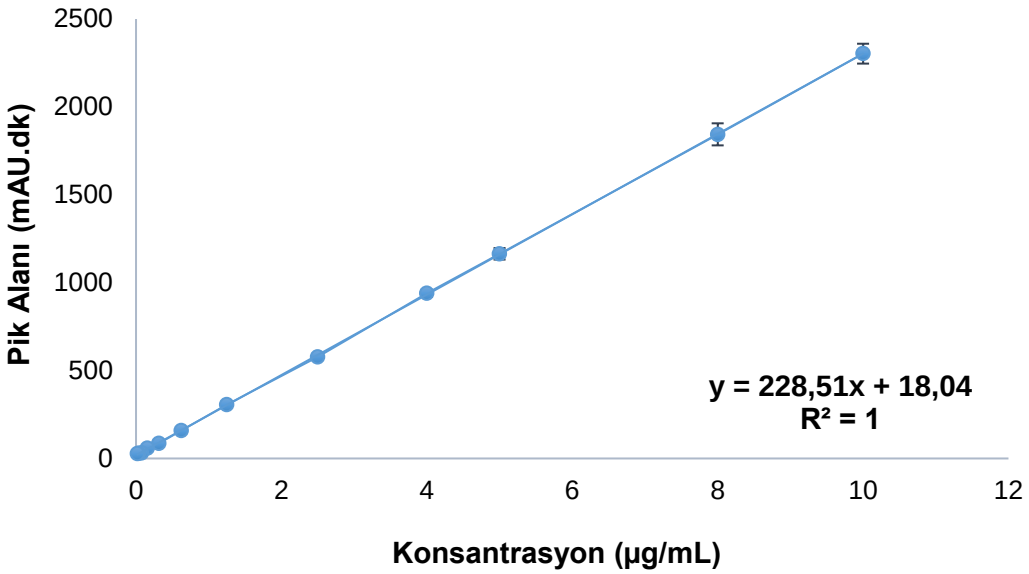
4.2.4. Bosentanın HPLC ile in vitro miktar tayini yöntem validasyonu

Bosentanın %1 SLS içeren distile su ortamındaki validasyonu

BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

BOS'un %1 SLS distile su ortamı için 0,0195 µg/mL-10 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Şekil 4.19'da kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.19. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH)

Doğruluk ve geri elde

BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında hazırlanan %80, %100 ve %120 BOS içeren çözeltilerinde geri elde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki BOS yüzdesi (µg/mL)	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL) (X_{ort}±SS)	% Geri elde	% VK
%80	2	1,95 ± 0,04	97,7	1,79
%100	2,5	2,52 ± 0,03	100	1,26
%120	3	3,04 ± 0,03	101	1,02

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik

BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki stok çözeltisinden hareketle 0,625 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek no	**Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)**	**Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)**
1	0,625	0,615
2	0,625	0,599
3	0,625	0,617
4	0,625	0,607
5	0,625	0,622
6	0,625	0,621
7	0,625	0,594
8	0,625	0,606
9	0,625	0,591
10	0,625	0,603
X_{ort}		0,608
SS		0,011
% VK		1,80

Tekrar elde edilebilirlik

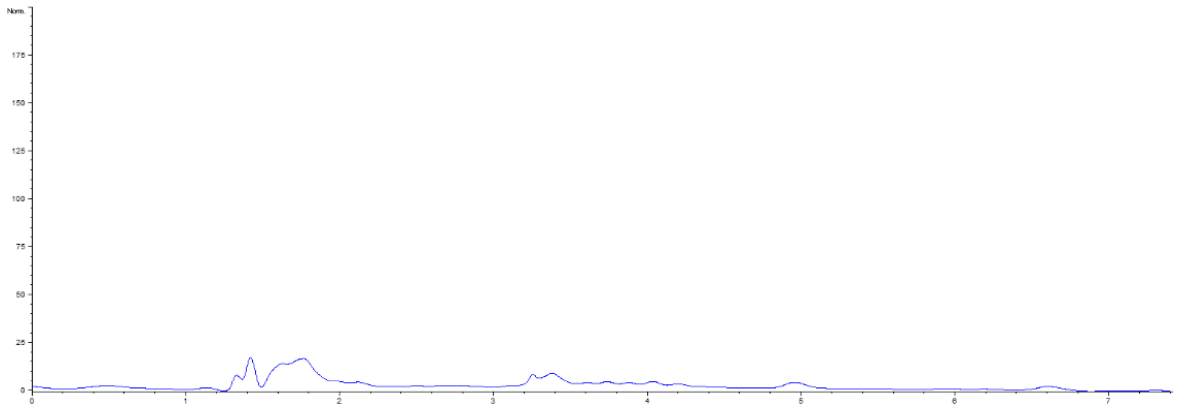
BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

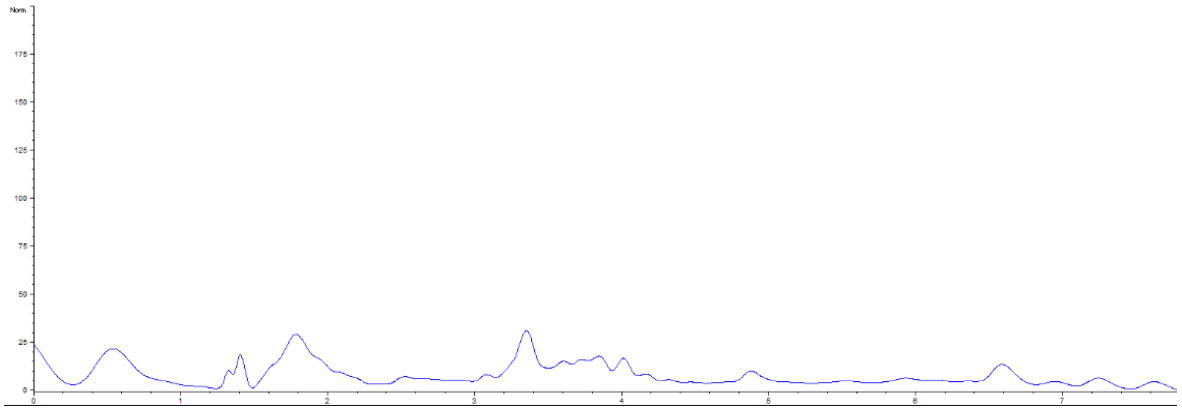
Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)			X_{ort}	SS	% VK
	1. gün	2. gün	3. gün			
0,625	0,640	0,670	0,650	0,660	0,010	1,85
5	5,02	5,13	5,05	5,07	0,06	1,16
10	10,11	9,82	9,83	9,92	0,17	1,68

Özgünlük ve seçicilik

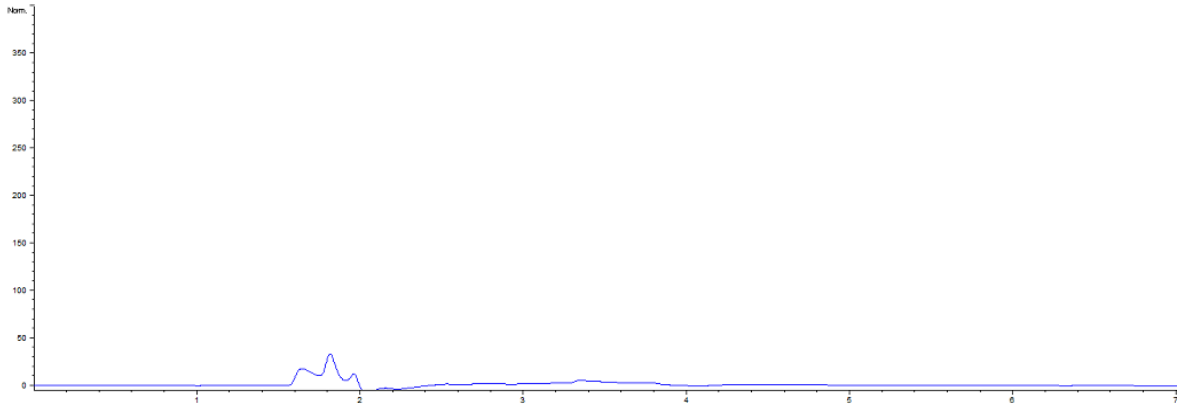
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonların %1 SLS içeren distile su ortamına, etkin madde içermeyen %1 SLS içeren distile su ortamına, etkin madde içeren %1 SLS içeren distile su ortamına ait özgünlük ve seçicilik kromotogramları Şekil 4.20 - 4.23'te gösterilmiştir.



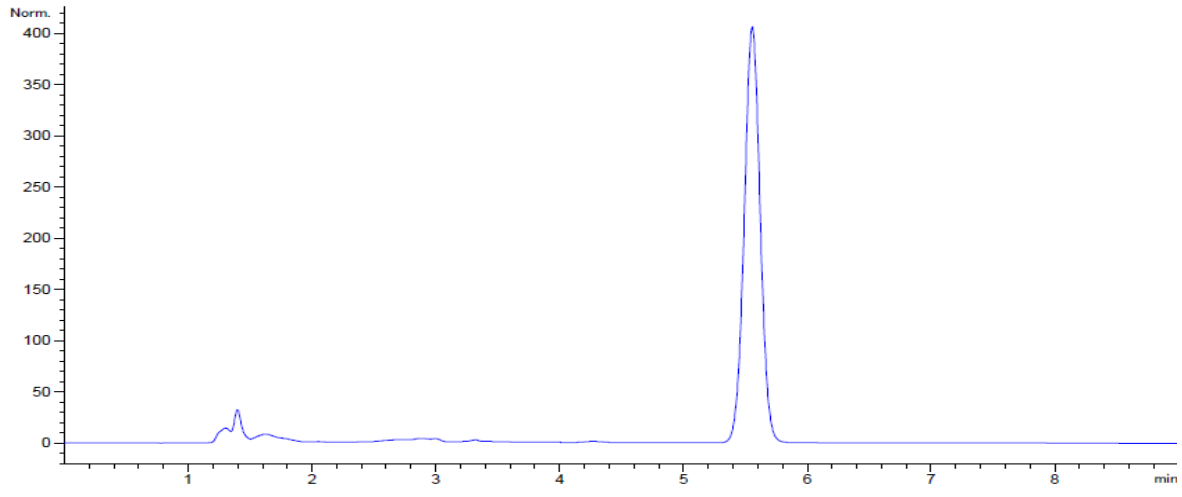
Şekil 4.20. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun %1 SLS içeren distile su ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.21. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun %1 SLS içeren distile su ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.22. BOS içermeyen %1 SLS içeren distile su ortamının kromatogramı



Şekil 4.23. 10 µg/mL BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmış, analitik yöntemin LOD'si 0,08 µg/mL, LOQ'su 0,24 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite çalışmaları

BOS'un %1 SLS içeren distile su içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 0. ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. BOS'un %1 SLS içeren distile su içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.11'de yer almaktadır.

Çizelge 4.11. BOS'un %1 SLS içeren distile su ortamı için stabilite sonuçları

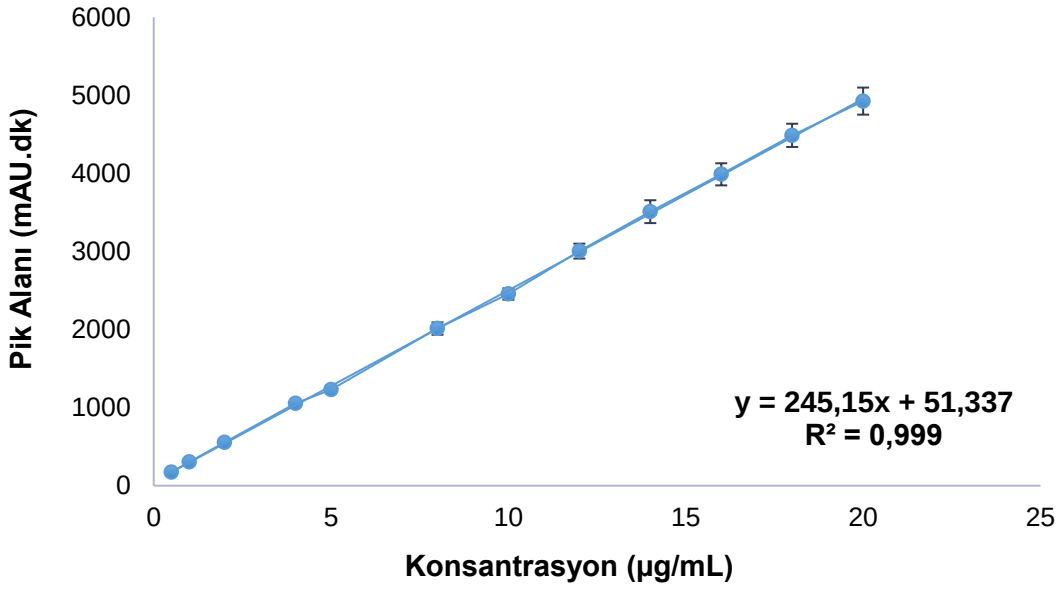
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde X_{ort} (µg/mL)	% Geri elde	SS	% VK
4°C	0	10	9,83	98,3	0,1	1,03
	24	10	9,66	96,6	0,2	1,60
	0	10	9,83	98,3	0,1	1,03
25°C	24	10	9,26	92,6	0,1	0,92
	0	10	9,83	98,3	0,1	1,03
37°C	24	10	9,73	97,3	0,2	1,59

Bosentanın FaSSIF ortamındaki validasyonu

BOS'un FaSSIF ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

BOS'un FaSSIF ortamında 0,5 µg/mL-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Şekil 4.24'te kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.24. BOS'un FaSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH)

Doğruluk ve geri elde

BOS'un FaSSIF ortamında hazırlanan %80, %100 ve %120 BOS içeren çözeltilerinde geri elde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. BOS'un FaSSIF ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki BOS yüzdesi (µg/mL)	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL) (X_{ort}±SS)	% Geri elde	% VK
%80	2	2,06 ± 0,01	103	0,530
%100	2,5	2,42 ± 0,02	96,7	0,730
%120	3	2,86 ± 0,07	95,3	2,46

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik

BOS'un FaSSIF ortamındaki stok çözeltisinden hareketle 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltisi arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. BOS'un FaSSIF ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek no	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)
1	10	10,64
2	10	10,66
3	10	10,65
4	10	10,64
5	10	10,72
6	10	10,70
7	10	10,65
8	10	10,75
9	10	10,64
10	10	10,64
X_{ort}		10,7
SS		0,1
% VK		0,370

Tekrar elde edilebilirlik

BOS'un FaSSIF ortamında farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.14'te gösterilmiştir.

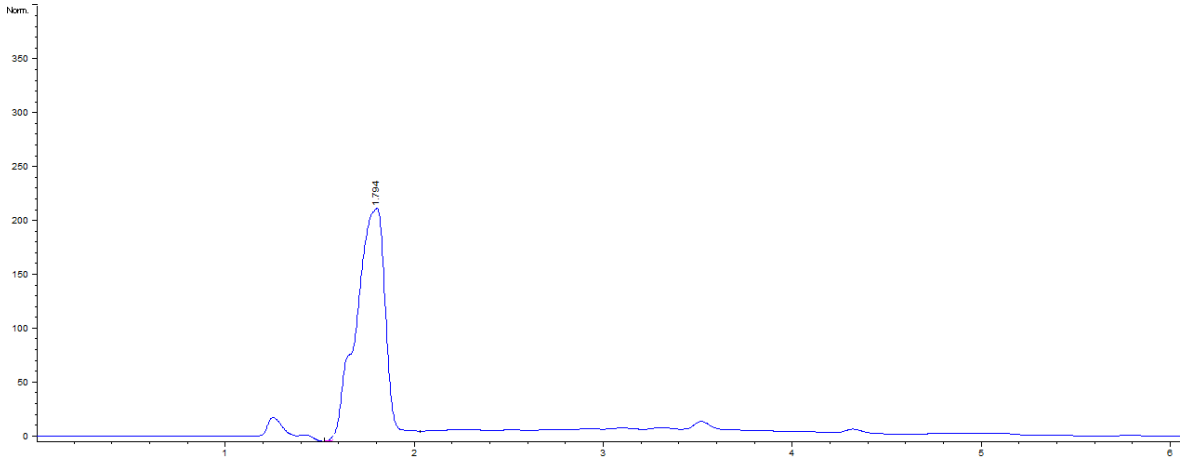
Çizelge 4.14. BOS'un FaSSIF ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)			X_{ort}	SS	% VK
	1. gün	2. gün	3. gün			
5	4,82	4,72	4,63	4,72	0,10	2,02
10	9,81	9,67	9,84	9,78	0,08	0,770
16	16,06	15,75	16,16	16,0	0,2	1,35

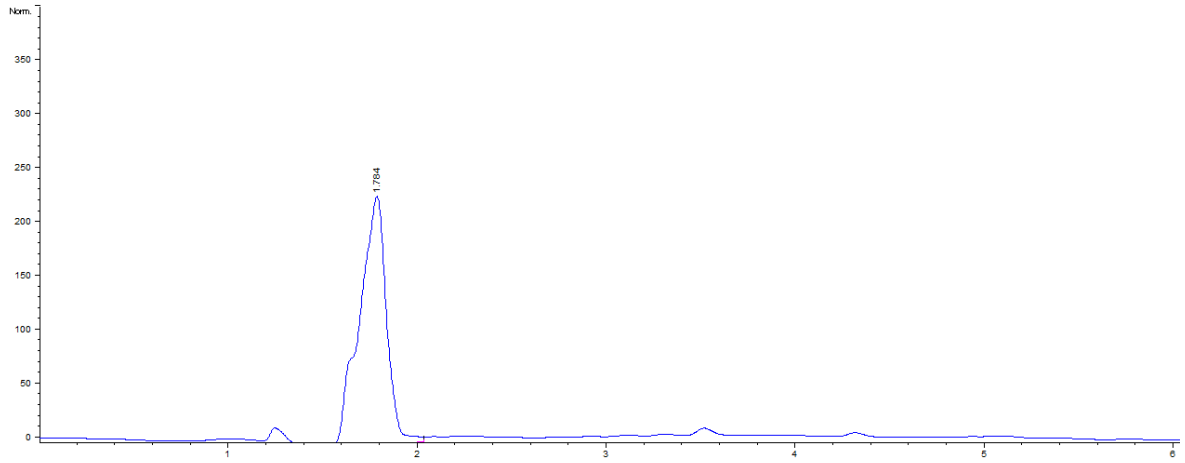
Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonların FaSSIF ortamına, etkin madde içermeyen

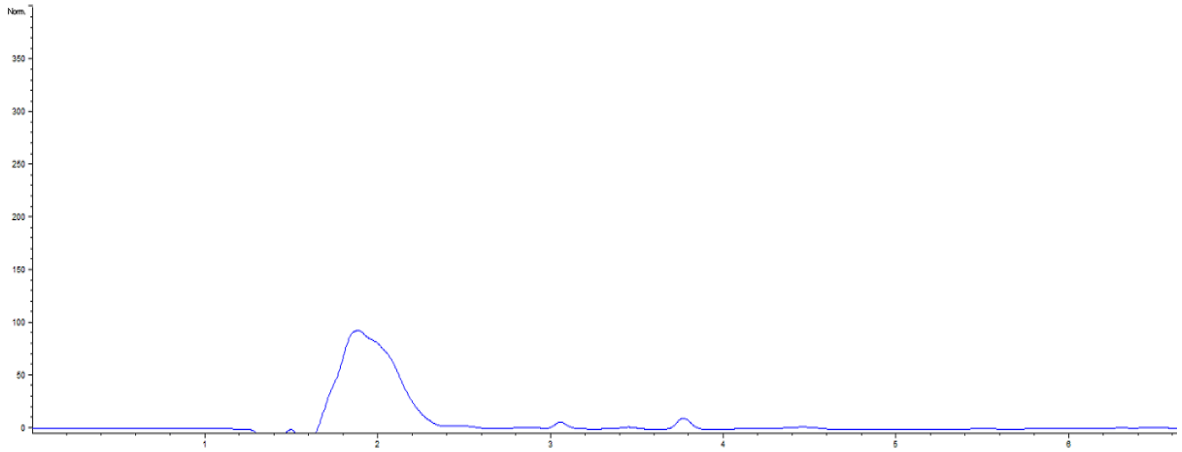
FaSSIF ortamına, etkin madde içeren FaSSIF ortamına ait özgünlük ve seçicilik kromotogramları Şekil 4.25 - 4.28'de gösterilmiştir.



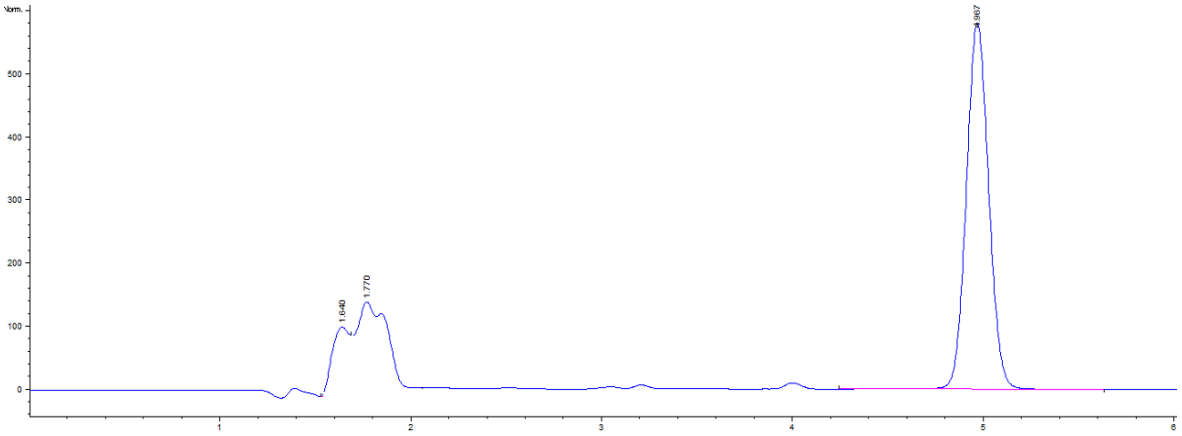
Şekil 4.25. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FaSSIF ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.26. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FaSSIF ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.27. BOS içermeyen FaSSIF kromatogramı



Şekil 4.28. 20 µg/mL BOS'un FaSSIF ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmış, analitik yöntemin LOD'si 0,37 µg/mL, LOQ'su 1,11 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite çalışmaları

BOS'un FaSSIF içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 0. ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. BOS'un FaSSIF içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.15'te yer almaktadır.

Çizelge 4.15. BOS'un FaSSIF ortamı için stabilite sonuçları

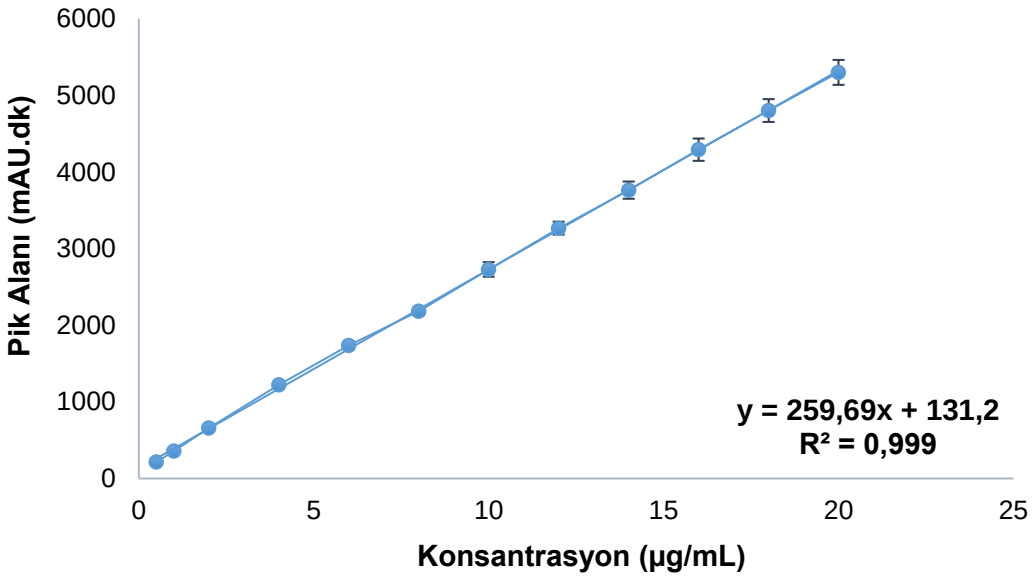
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde X_{ort} (µg/mL)	% Geri elde	SS	% VK
4°C	0	10	9,53	95,3	0,3	2,70
	24	10	9,28	92,8	0,1	0,97
25°C	0	10	9,53	95,3	0,3	2,70
	24	10	9,31	93,1	0,1	0,67
37°C	0	10	9,53	95,3	0,3	2,70
	24	10	9,38	93,8	0,0	0,35

Bosentanın FeSSIF ortamındaki validasyonu

BOS'un FeSSIF ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

BOS'un FeSSIF ortamında 0,5 µg/mL-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Şekil 4.29'da kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.29. BOS'un FeSSIF ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH)

Doğruluk ve geri elde

BOS'un FeSSIF ortamında hazırlanan %80, %100 ve %120 BOS içeren çözeltilerinde geri elde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. BOS'un FeSSIF ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki BOS yüzdesi (µg/mL)	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL) (X_{ort}±SS)	% Geri elde	% VK
%80	2	1,95 ± 0,01	97,6	0,50
%100	2,5	2,58 ± 0,03	103	1,33
%120	3	2,91 ± 0,03	97,0	0,85

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik

BOS'un FeSSIF ortamındaki stok çözeltisinden hareketle 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltisi arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Çizelge 4.17'de tekrar edilebilirlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. BOS'un FeSSIF ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek no	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)
1	10	9,71
2	10	9,62
3	10	9,63
4	10	9,67
5	10	9,64
6	10	9,68
7	10	9,67
8	10	9,70
9	10	9,74
10	10	9,67
X_{ort}		9,67
SS		0,04
% VK		0,38

Tekrar elde edilebilirlik

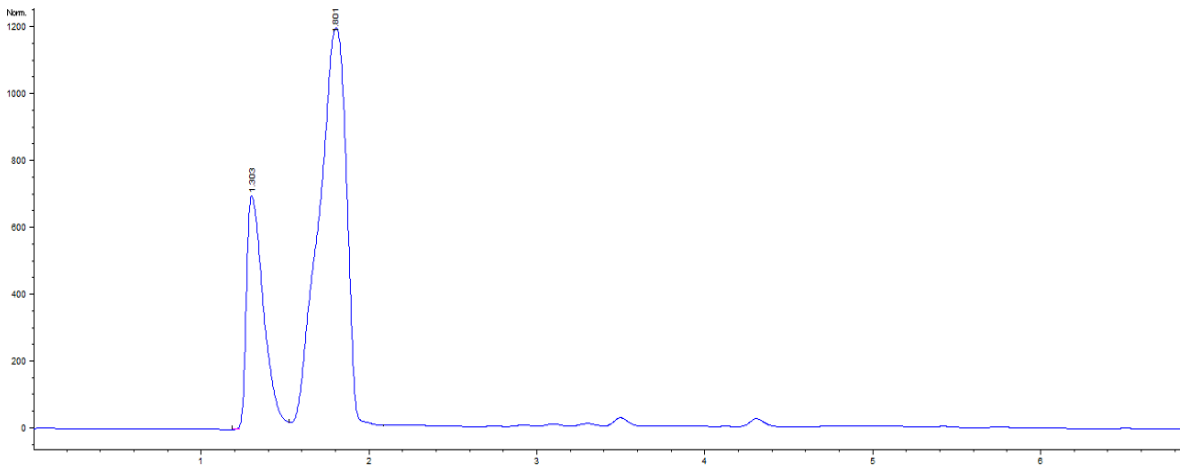
BOS'un FeSSIF ortamında farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Çizelge 4.18'de tekrar elde edilebilirlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. BOS'un FeSSIF ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

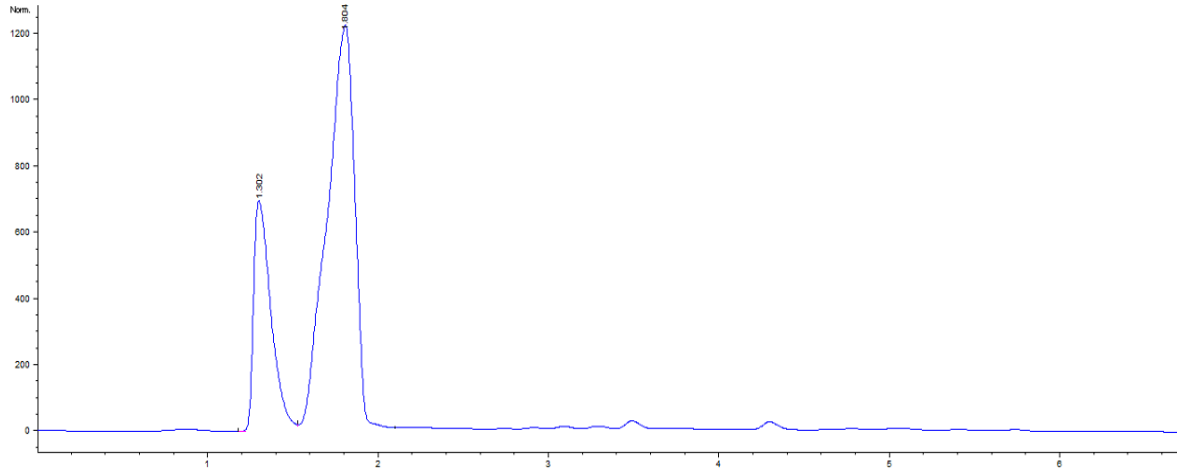
Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	**Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)**			**X_{ort}**	**SS**	**% VK**
	1. gün	**2. gün**	**3. gün**			
6	5,91	5,98	5,80	5,90	0,09	1,55
10	9,73	9,87	9,87	9,82	0,08	0,820
16	15,70	15,73	15,94	15,8	0,1	0,830

Özgünlük ve seçicilik

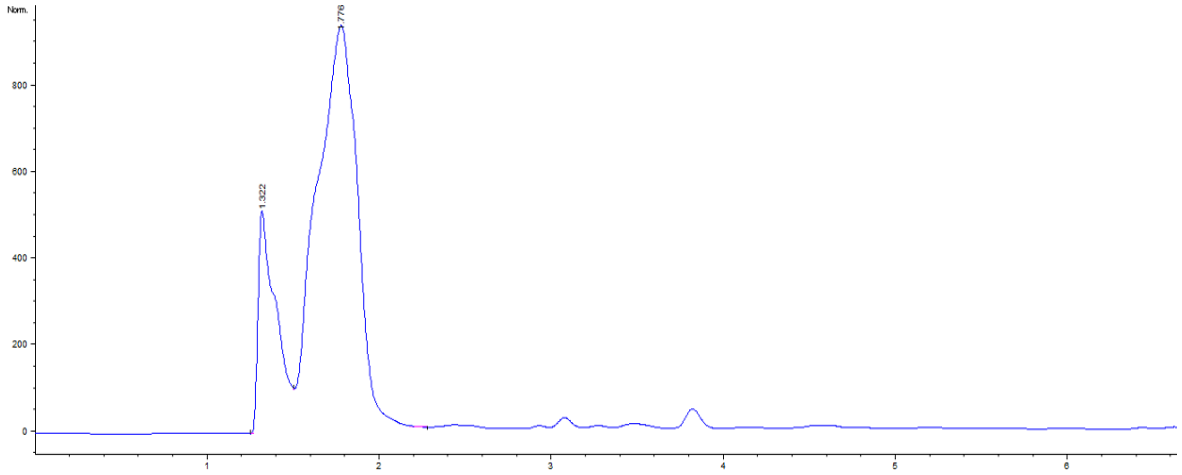
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonların FeSSIF ortamına, etkin madde içermeyen FeSSIF ortamına, etkin madde içeren FeSSIF ortamına ait özgünlük ve seçicilik kromotogramları Şekil 4.30 - 4.33'te gösterilmiştir.



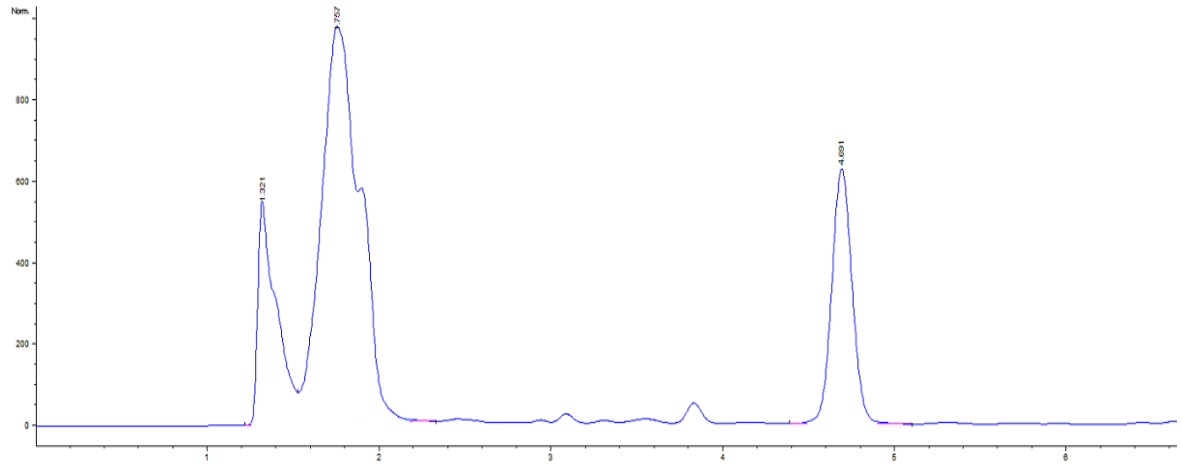
Şekil 4.30. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FeSSIF ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.31. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FeSSIF ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.32. BOS içermeyen FeSSIF kromatogramı



Şekil 4.33. 20 µg/mL BOS'un FeSSIF ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmış, analitik yöntemin LOD'si 0,40 µg/mL, LOQ'su 1,22 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite çalışmaları

BOS'un FeSSIF içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 0. ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. BOS'un FeSSIF içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.19'da yer almaktadır.

Çizelge 4.19. BOS'un FeSSIF ortamı için stabilite sonuçları

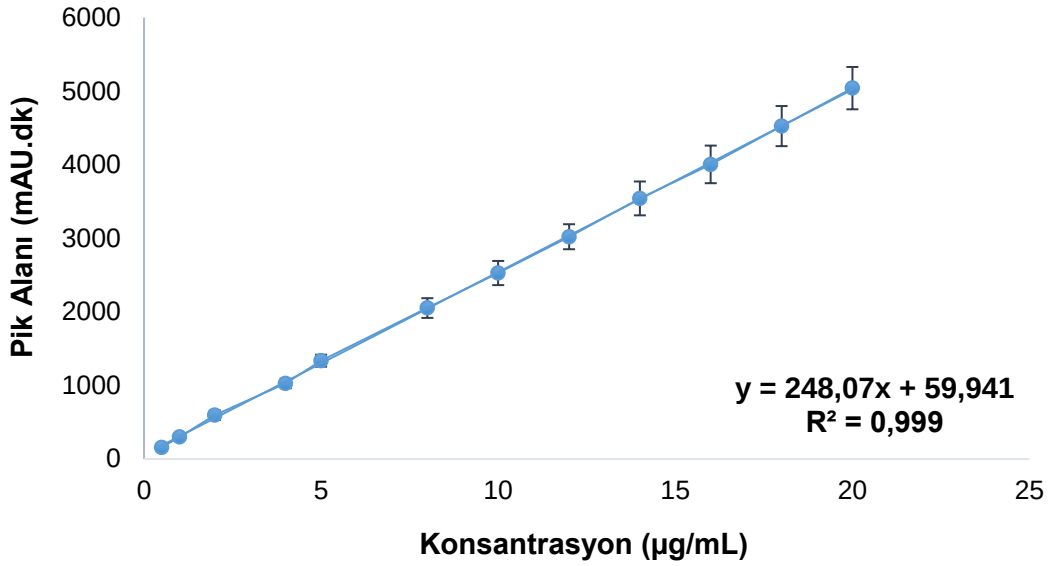
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde ort (µg/mL)	% Geri elde	SS	% VK
4°C	0	10	9,69	96,9	0,3	2,89
	24	10	9,65	96,5	0,2	2,16
25°C	0	10	9,69	96,9	0,3	2,89
	24	10	9,52	95,2	0,1	0,62
37°C	0	10	9,69	96,9	0,3	2,89
	24	10	9,59	95,9	0,2	2,48

Bosentanın FaSSIF-V2 ortamındaki validasyonu

BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

BOS'un FaSSIF-V2 ortamında 0,5 µg/mL-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Şekil 4.34'te kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.34. BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH)

Doğruluk ve geri elde

BOS'un FaSSIF-V2 ortamında hazırlanan %80, %100 ve %120 BOS içeren çözeltilerinde geri elde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki BOS yüzdesi (µg/mL)	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL) (X_{ort}±SS)	% Geri elde	% VK
%80	2	2,01 ± 0,08	101	4,09
%100	2,5	2,46 ± 0,10	98,2	4,09
%120	3	2,77 ± 0,08	92,4	3,00

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik

BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki stok çözeltisinden hareketle 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Tekrar edilebilirlik sonuçları Çizelge 4.21'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek no	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)
1	10	9,29
2	10	9,84
3	10	9,43
4	10	9,78
5	10	9,73
6	10	9,97
7	10	9,50
8	10	9,57
9	10	10,06
10	10	9,95
X_{ort}		9,71
SS		0,25
% VK		2,62

Tekrar elde edilebilirlik

BOS'un FaSSIF-V2 ortamında farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiş ve tekrar elde edilebilirlik sonuçları Çizelge 4.22'de gösterilmiştir.

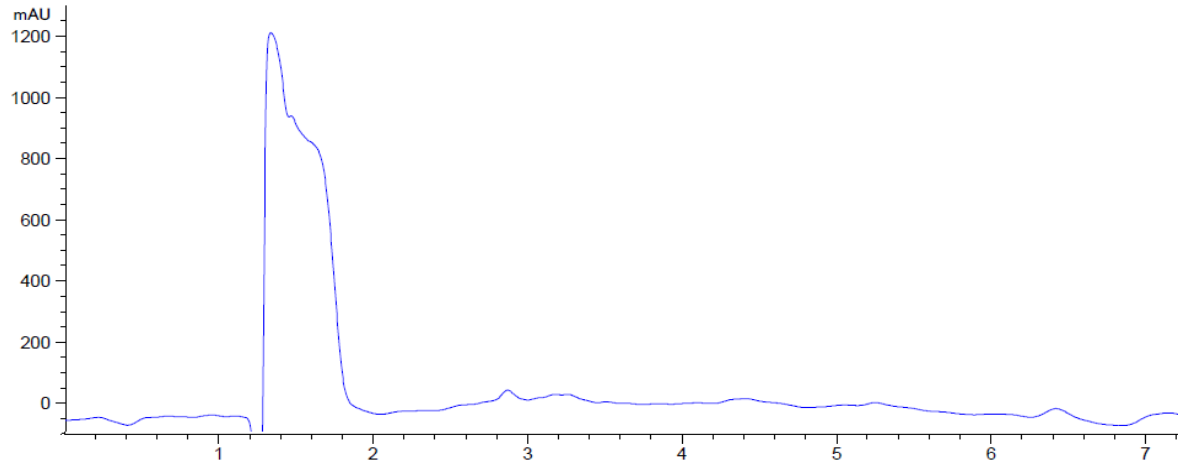
Çizelge 4.22. BOS'un FaSSIF-V2 ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)			X_{ort}	SS	% VK
	1. gün	2. gün	3. gün			
5	5,15	5,13	4,67	4,98	0,27	5,40
10	10,10	9,99	9,72	9,93	0,20	1,97
16	15,32	15,51	14,01	14,9	0,8	5,47

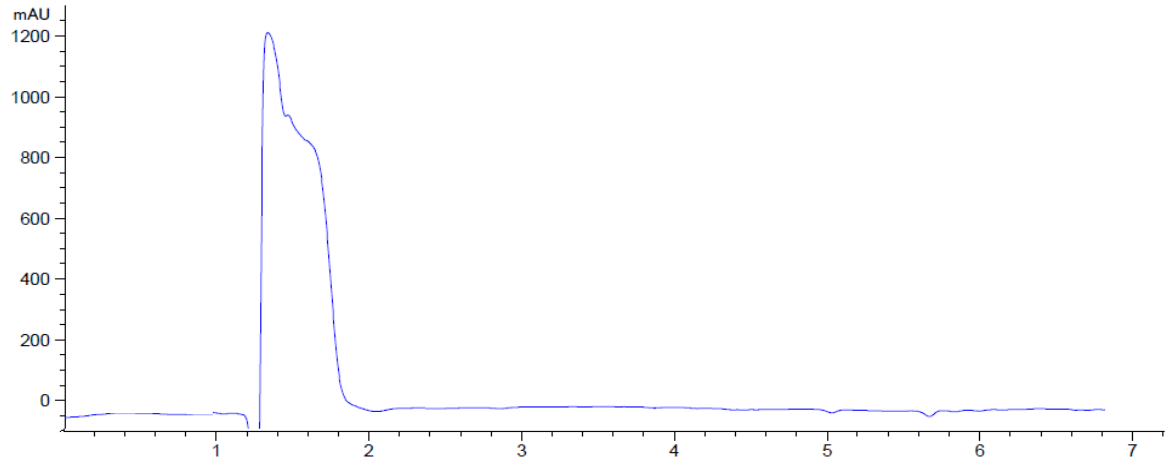
Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonların FaSSIF-V2 ortamına, etkin madde

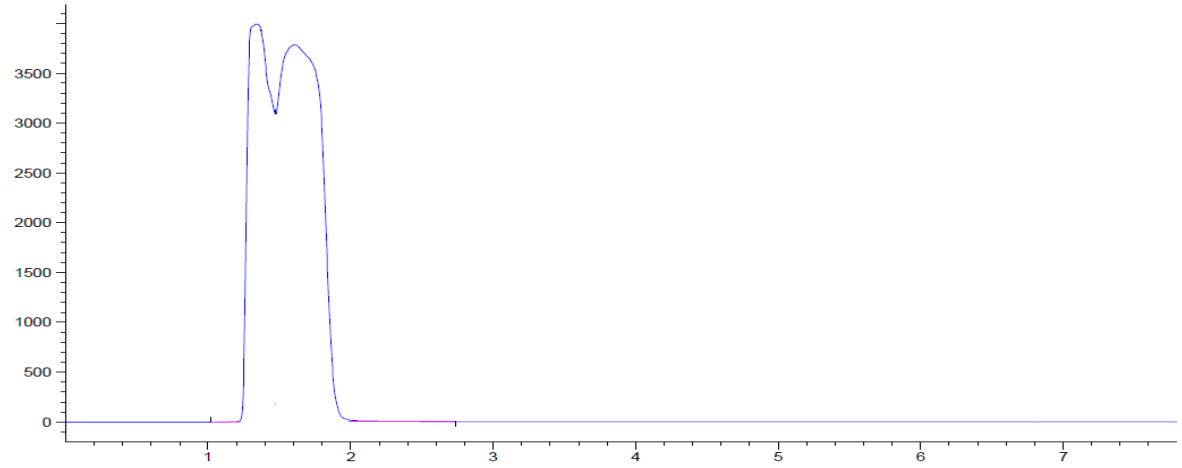
içermeyen FaSSIF-V2 ortamına, etkin madde içeren FaSSIF-V2 ortamına ait özgünlük ve seçicilik kromotogramlar Şekil 4.35 - 4.38'de gösterilmiştir.



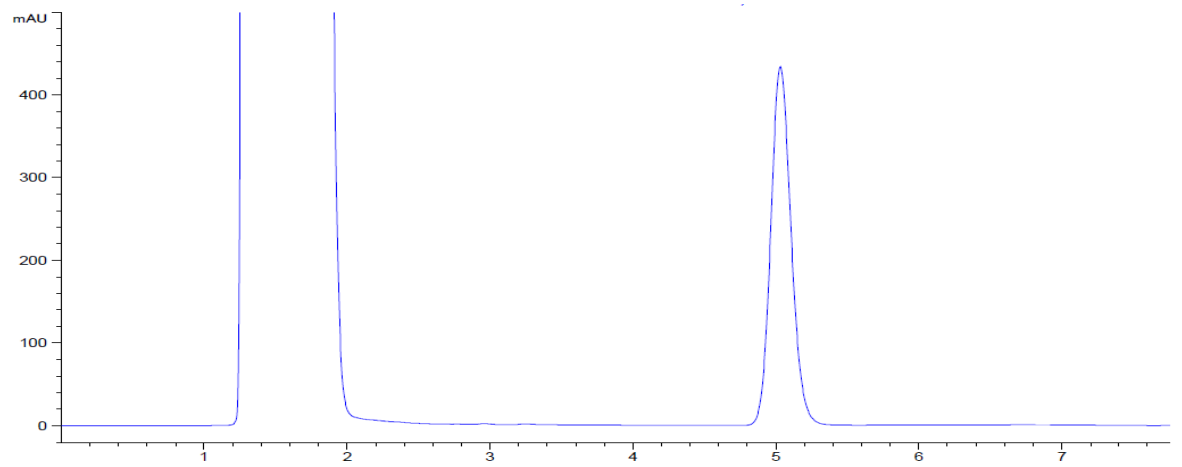
Şekil 4.35. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.36. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.37. BOS içermeyen FaSSIF-V2 kromatogramı



Şekil 4.38. 20 µg/mL BOS'un FaSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmış, analitik yöntemin LOD'si 0,32 µg/mL, LOQ'su 0,97 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite çalışmaları

BOS'un FaSSIF-V2 içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 0. ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. BOS'un FaSSIF-V2 içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.23'te yer almaktadır.

Çizelge 4.23. BOS'un FaSSIF-V2 ortamı için stabilite sonuçları

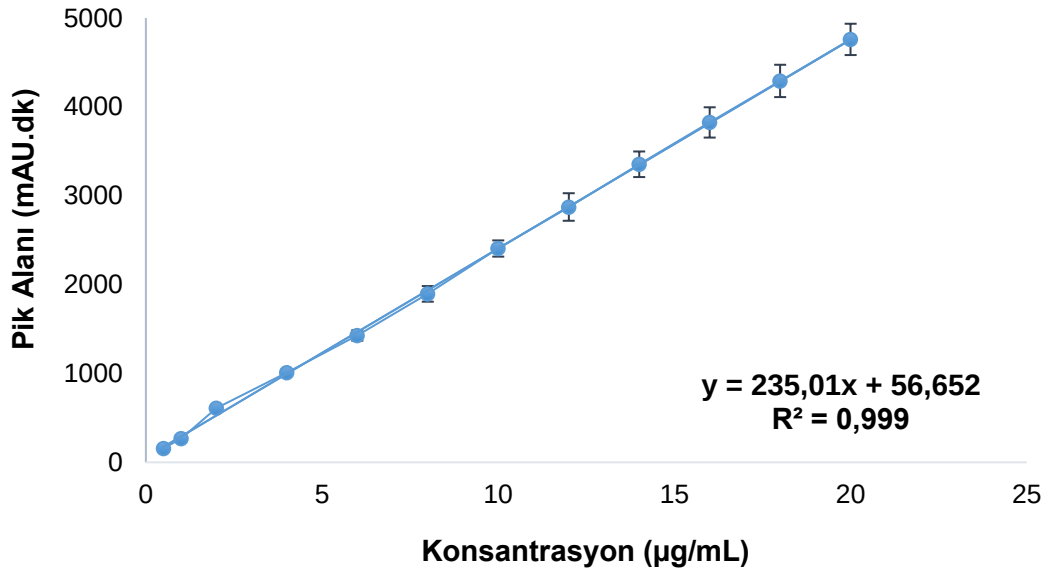
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde X_{ort} (µg/mL)	% Geri elde	SS	% VK
4°C	0	10	10,28	103	0	3,08
	24	10	8,72	87,2	0,1	1,40
25°C	0	10	10,28	103	0	3,08
	24	10	8,91	89,1	0,6	6,13
37°C	0	10	10,28	103	0	3,08
	24	10	9,51	95,1	0,1	0,590

Bosentanın FeSSIF-V2 ortamındaki validasyonu

BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki miktar tayinine ait validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

BOS'un FeSSIF-V2 ortamında 0,5 µg/mL-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 12 farklı numune hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. Şekil 4.39'da kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.



Şekil 4.39. BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, X_{ort} ± SH)

Doğruluk ve geri elde

BOS'un FeSSIF-V2 ortamında hazırlanan %80, %100 ve %120 BOS içeren çözeltilerinde geri elde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.24'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında doğruluk ve geri elde sonuçları

Çözeltideki BOS yüzdesi (µg/mL)	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL) (X_{ort}±SS)	% Geri elde	% VK
%80	2	1,94 ± 0,01	97,0	1,46
%100	2,5	2,45 ± 0,03	97,9	0,27
%120	3	3,04 ± 0,03	101	0,21

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik

BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki stok çözeltisinden hareketle 10 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti arka arkaya 10 kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Çizelge 4.25'te tekrar edilebilirlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek no	Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)
1	10	11,07
2	10	11,05
3	10	11,03
4	10	11,02
5	10	11,09
6	10	11,05
7	10	10,97
8	10	11,01
9	10	11,04
10	10	11,07
X_{ort}		11,0
SS		0,0
% VK		0,320

Tekrar elde edilebilirlik

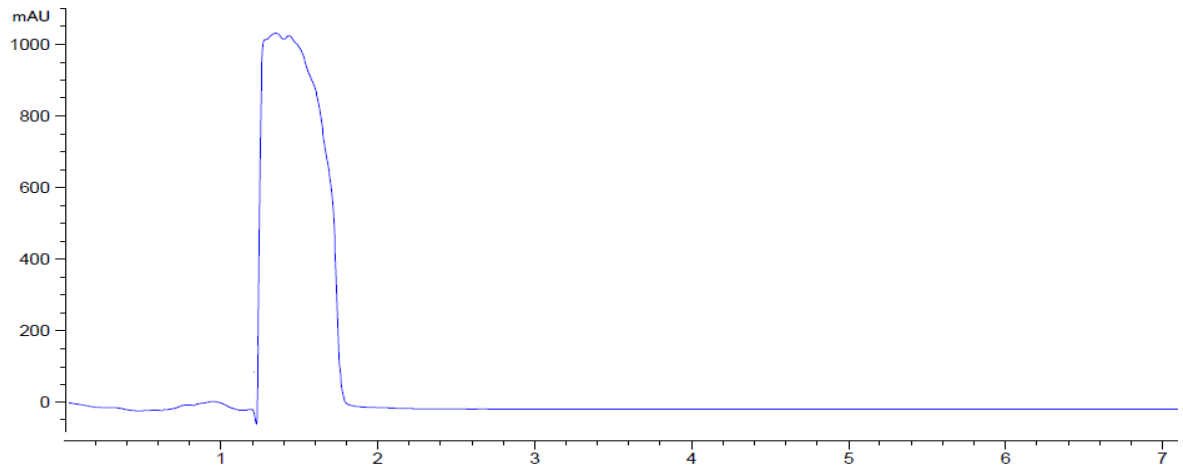
BOS'un FeSSIF-V2 ortamında farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edilmiştir. Tekrar elde edilebilirlik sonuçları Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. BOS'un FeSSIF-V2 ortamında tekrar elde edilebilirlik sonuçları

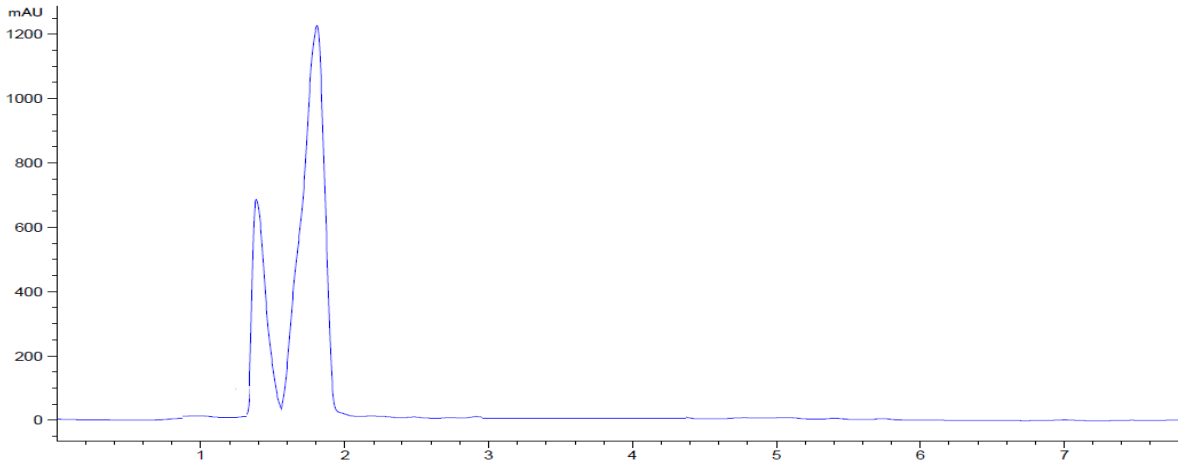
Çözeltideki BOS derişimi (µg/mL)	**Hesaplanan BOS derişimi (µg/mL)**			**X_{ort}**	**SS**	**% VK**
	1. gün	**2. gün**	**3. gün**			
6	5,96	6,14	5,51	5,87	0,33	5,54
10	10,55	10,51	9,34	10,13	0,69	6,77
16	16,04	15,87	16,07	16,0	0,1	0,670

Özgünlük ve seçicilik

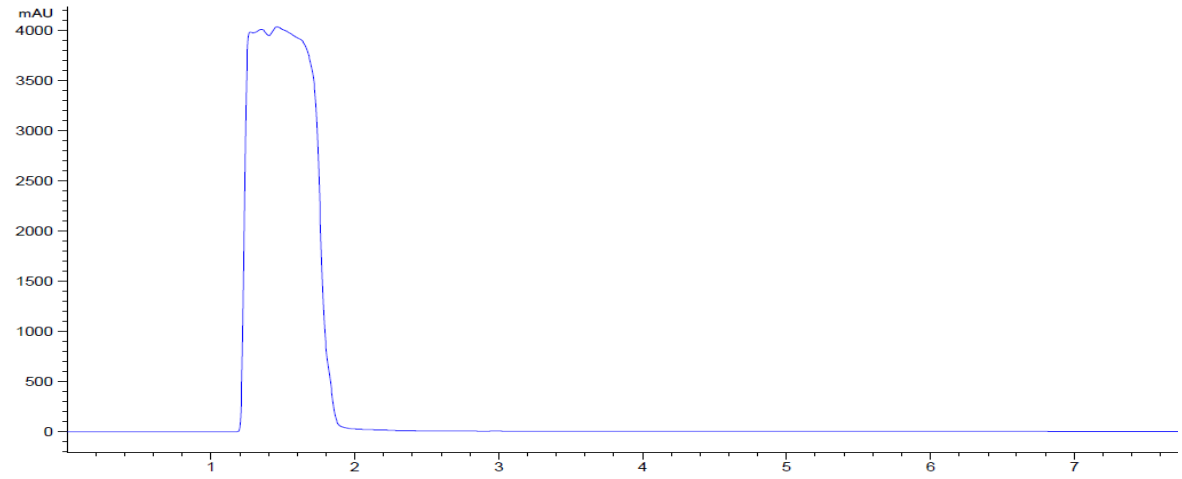
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz edilmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans gösterip göstermediğinin kontrolü yapılmıştır. Etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonların FeSSIF-V2 ortamına, etkin madde içermeyen FeSSIF-V2 ortamına, etkin madde içeren FeSSIF-V2 ortamına ait özgünlük ve seçicilik kromotogramlar Şekil 4.40 - 4.43'te gösterilmiştir.



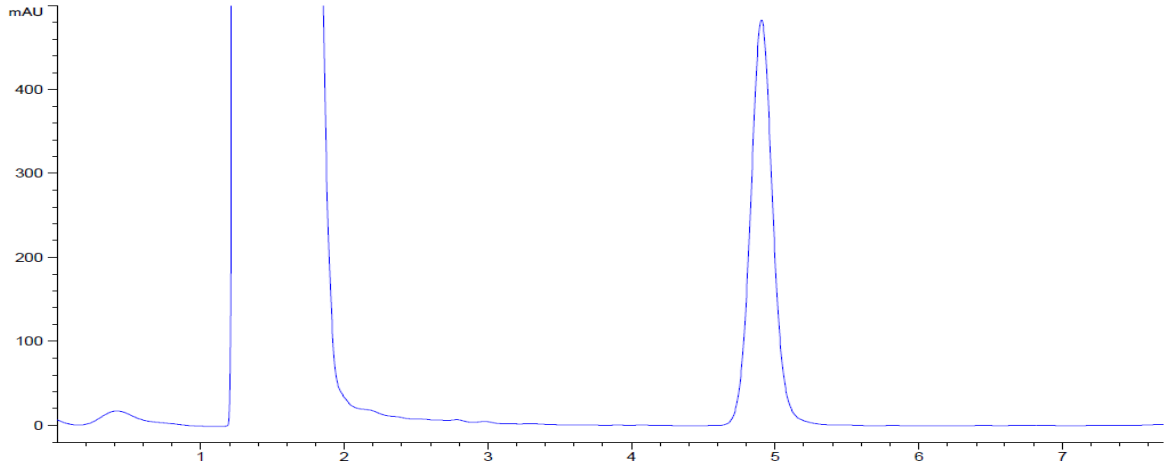
Şekil 4.40. BOS içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonun FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.41. BOS içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonun FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı



Şekil 4.42. BOS içermeyen FeSSIF-V2 kromatogramı



Şekil 4.43. 20 µg/mL BOS'un FeSSIF-V2 ortamındaki kromatogramı

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin LOD ve LOQ'su Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hesaplanmış, analitik yöntemin LOD'si 0,48 µg/mL, LOQ'su 1,44 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite çalışmaları

BOS'un FeSSIF-V2 içindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltileri stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltilerin 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarda 0. ve 24. saatteki stabiliteleri incelenmiştir. BOS'un FeSSIF-V2 içindeki çözeltilerine ait farklı sıcaklıklardaki stabilite sonuçları Çizelge 4.27'de yer almaktadır.

Çizelge 4.27. BOS'un FeSSIF-V2 ortamı için stabilite sonuçları

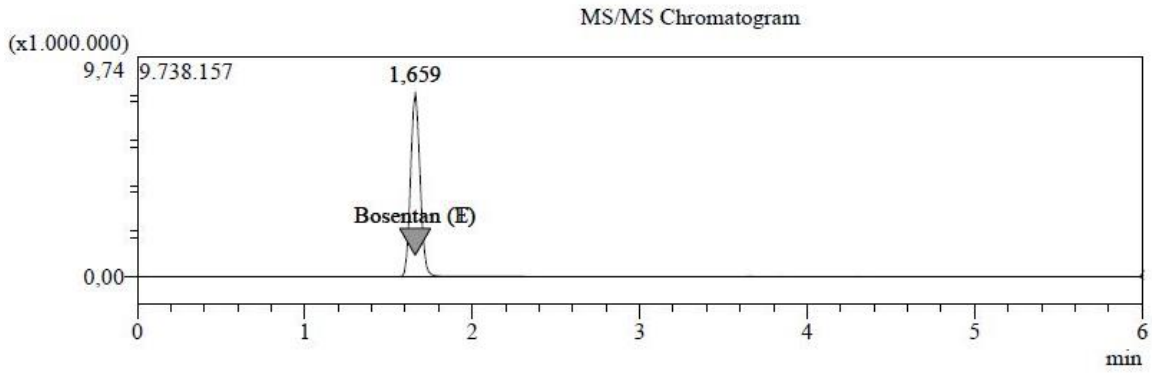
	Zaman (Saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri elde X_{ort} (µg/mL)	% Geri elde	SS	% VK
4°C	0	10	9,26	92,6	0,4	3,80
	24	10	10,32	103	0	1,46
25°C	0	10	9,26	92,6	0,4	3,8
	24	10	10,74	107	0	0,850
37°C	0	10	9,26	92,6	0,4	3,80
	24	10	10,46	105	0	2,11

4.3. Bosentanın İn Vivo Miktar Tayini

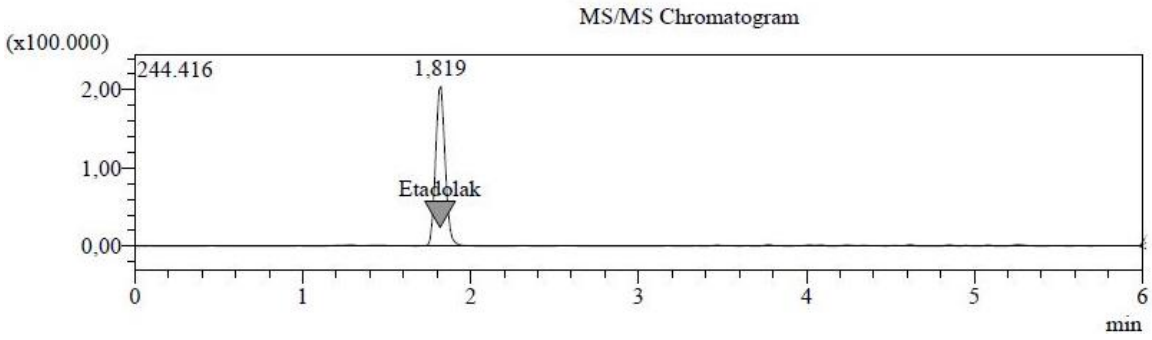
BOS'ın sıçan plazma örneklerindeki miktarını analiz etmek için LC-MS/MS cihazı ile analitik miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. Çizelge 4.28'de ve Şekil 4.44'te BOS'a ait analiz verileri ile LC-MS/MS kromotogramı, Şekil 4.45'te iç standart olan etadolaka ait LC-MS/MS kromotogramı verilmiştir.

Çizelge 4.28. BOS'a ait LC-MS/MS analiz verileri

Hedef iyon	Bosentan
Analit tutulma zamanı (dk)	1,66
Analit pik alanı	31717,184
IS pik alanı	810,551



Şekil 4.44. BOS (100 ng/mL) ait LC-MS/MS kromatogramı

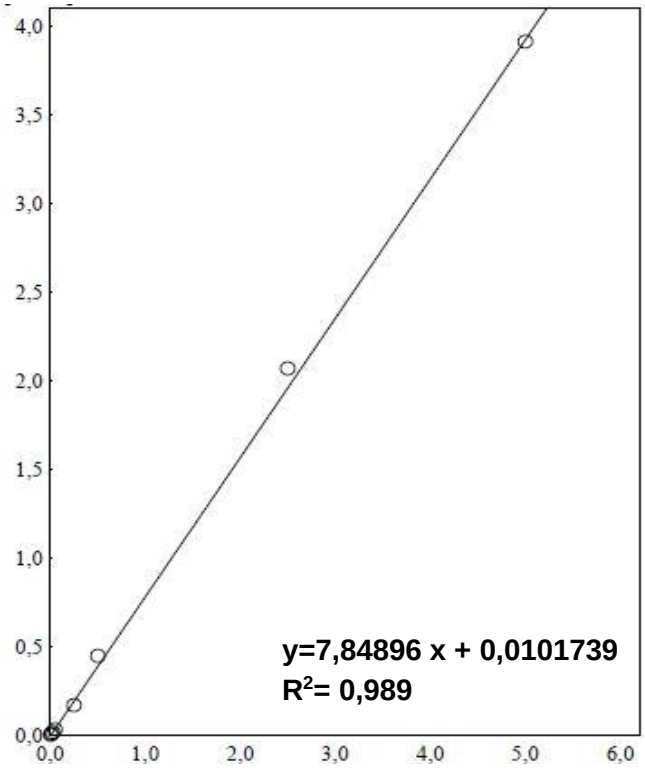


Şekil 4.45. İç standart etadolaka (20 ng/mL) ait LC-MS/MS kromatogramı

Kalibrasyon eğrisi noktalarının derişimleri 0,12 ng/mL, 0,24 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi ve derişimler cihazın yazılımı ile otamatik olarak çizdirilip hesaplatılmıştır. Hesaplanan R^2 değeri kalibrasyon doğrusunun yöntemi analiz etmek için uygun olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.46).

Çizelge 4.29. LC-MS/MS analizi için BOS kalibrasyonu konsantrasyon aralığı

Konsantrasyon (ng/mL)	Sayı	Ortalama hesaplanan konsantrasyon (ng/mL)	% Kesinlik
0,12	1	0,12	97,5
0,24	1	0,26	108,3
0,5	1	0,49	97,8
1	1	0,89	89,1
5	1	4,37	87,4
10	1	11,5	114,5
50	1	52,7	105,4
100	1	99,7	99,7



Şekil 4.46. LC-MS/MS analizi için BOS kalibrasyon eğrisi

4.3.1. Bosentanın LC-MS/MS miktar tayini yöntem validasyonu

Stok çözelti kararlılığı

LC-MS/MS miktar tayini yöntemine ait stok çözelti kararlılığı sonuçları Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.30. BOS'un stok çözelti kararlılığı sonuçları

		Düşük derişim (0,4 ng/mL)						Yüksek derişim (80 ng/mL)					
	Prl	**Derişim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**	**Derişim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**
1. gün 0. saat	1	0,41	0,38	0,02	5,84	-4,67	7,65	80,88	89,7	8,1	9,03	12,13	-11,19
	2	0,37						91,42					
	3	0,37						96,82					
1. gün 4. saat	1	0,42	0,41	0,01	2,58	2,63		76,97	79,7	2,8	3,56	-0,42	
	2	0,40						82,63					
	3	-----						79,39					

		Düşük Derişim (0,4 ng/mL)						Yüksek Derişim (80 ng/mL)					
	Prl	**Derişim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**	**Derisim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**
1. gün 0. saat	1	0,41	0,38	0,02	5,84	-4,67	8,57	80,88	89,7	8,1	9,03	12,13	-11,99
	2	0,37						91,42					
	3	0,37						96,82					
4. gün	1	0,39	0,41	0,05	10,89	3,50		82,16	78,9	2,9	3,64	-1,32	
	2	0,47						78,04					
	3	0,39						76,63					

Gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları

Gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları Çizelge 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.31. BOS'un gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları

	LLOQ derişim (0,12 ng/mL)		Düşük derişim (0,4 ng/mL)		Orta derişim (10 ng/mL)		Yüksek derişim (80 ng/mL)	
	Hesaplanan derişim	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**
$N_{1.\ enjeksiyon}$	0,2	97,50	0,39	97,50	11,33	113,31	83,96	104,95
$N_{2.\ enjeksiyon}$	0,10	85,00	0,42	104,75	10,47	104,67	87,37	109,21
$N_{3.\ enjeksiyon}$	0,11	90,00	0,40	100,50	10,79	107,88	77,49	96,86
$N_{4.\ enjeksiyon}$	0,10	83,33	0,42	104,25	12,12	121,22	88,16	110,20
$N_{5.\ enjeksiyon}$	0,10	79,17	0,40	100,00	10,72	107,23	83,35	104,19
X_{ort}	0,10	87,0	0,41	101	11,1	111	84,1	105
SS	0,01	7,0	0,01	3	0,7	7	4,2	5
% BSS	8,09	8,09	3,01	3,01	5,94	5,94	5,03	5,03
% Sapma gün içi	-13,0	-13,0	1,40	1,40	10,9	10,9	5,08	5,08

Günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları

Gün arası doğruluk ve kesinlik sonuçları Çizelge 4.32’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. BOS'un günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları

1. gün	LLOQ derişim (0,12 ng/mL)		Düşük derişim (0,4 ng/mL)		Orta derişim (10 ng/mL)		Yüksek derişim (80 ng/mL)	
	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım
$N_{1.\ enjeksiyon}$	0,11	95,00	0,44	110,00	10,90	109,01	83,37	104,21
$N_{2.\ enjeksiyon}$	0,11	90,83	0,40	100,75	11,04	110,41	83,20	104,00
$N_{3.\ enjeksiyon}$	0,10	81,67	0,39	97,75	11,61	116,11	84,29	105,37
X_{ort}	0,11	89,2	0,41	103	11,2	112	83,6	105
SS	0,01	6,8	0,03	6	0,4	4	0,6	1
% BSS	7,65	7,65	6,21	6,21	3,36	3,36	0,70	0,70
%Sapma gün içi tekrarlanabilirlik	-10,8	-10,8	2,83	2,83	11,8	11,8	4,53	4,53
2. gün	**LLOQ derişim (0,12 ng/mL)**		**Düşük derişim (0,4 ng/mL)**		**Orta derişim (10 ng/mL)**		**Yüksek derişim (80 ng/mL)**	
	Hesaplanan derişim	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**	**Hesaplanan derişim**	**% Geri kazanım**
$N_{1.\ enjeksiyon}$	0,10	79,17	0,34	84,00	9,81	98,12	72,87	91,08
$N_{2.\ enjeksiyon}$	0,09	74,17	0,36	89,25	9,76	97,63	68,69	85,86
$N_{3.\ enjeksiyon}$	0,11	88,33	0,36	89,00	9,45	94,49	70,29	87,87
X_{ort}	0,10	80,6	0,35	87,4	9,68	96,8	70,6	88,3
SS	0,01	7,2	0,01	3,0	0,20	2,0	2,1	2,6
% BSS	8,92	8,92	3,39	3,39	2,04	2,04	2,99	2,99
%Sapma gün içi tekrarlanabilirlik	-19,4	-19,4	-12,6	-12,6	-3,25	-3,25	-11,7	-11,7

Çizelge 4.32. (devam) BOS'un günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları

3. gün	LLOQ derişim (0,12 ng/mL)		Düşük derişim (0,4 ng/mL)		Orta derişim (10 ng/mL)		Yüksek derişim (80 ng/mL)	
	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım
$N_{1.\ enjeksiyon}$	0,12	103,33	0,40	100,00	11,08	110,78	83,53	104,41
$N_{2.\ enjeksiyon}$	0,12	103,33	0,40	100,50	10,84	108,35	83,81	104,76
$N_{3.\ enjeksiyon}$	0,12	98,33	0,41	101,50	10,78	107,76	87,99	109,99
X_{ort}	0,12	102	0,40	101	10,90	109	85,1	106
SS	0,00	3	0,00	1	0,16	2	2,5	3
% BSS	2,84	2,84	0,76	0,76	1,47	1,47	2,94	2,94
%Sapma gün içi tekrarlanabilirlik	1,67	1,67	0,67	0,67	8,96	8,96	6,39	6,39

	LLOQ derişim (0,12 ng/mL)		Düşük derişim (0,4 ng/mL)		Orta derişim (10 ng/mL)		Yüksek derişim (80 ng/mL)	
	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım	Hesaplanan derişim	% Geri kazanım
1. gün X_{ort}	0,11	89,17	0,41	102,83	11,18	111,84	83,62	104,53
2. gün X_{ort}	0,10	80,57	0,35	87,42	9,68	96,75	70,62	88,27
3. gün X_{ort}	0,12	101,67	0,40	100,67	10,90	108,96	85,11	106,39
X_{ort}	0,11	90,5	0,39	97,0	10,6	106	79,8	99,7
SS	0,01	10,6	0,03	8,4	0,8	8	8,0	10,0
% BSS günler arasi tekrarlanabilirlik	11,7	11,7	8,61	8,61	7,57	7,57	9,99	9,99
%Sapma günler arasi tekrarlanabilirlik	-9,54	-9,54	-3,03	-3,03	5,85	5,85	-0,273	-0,273

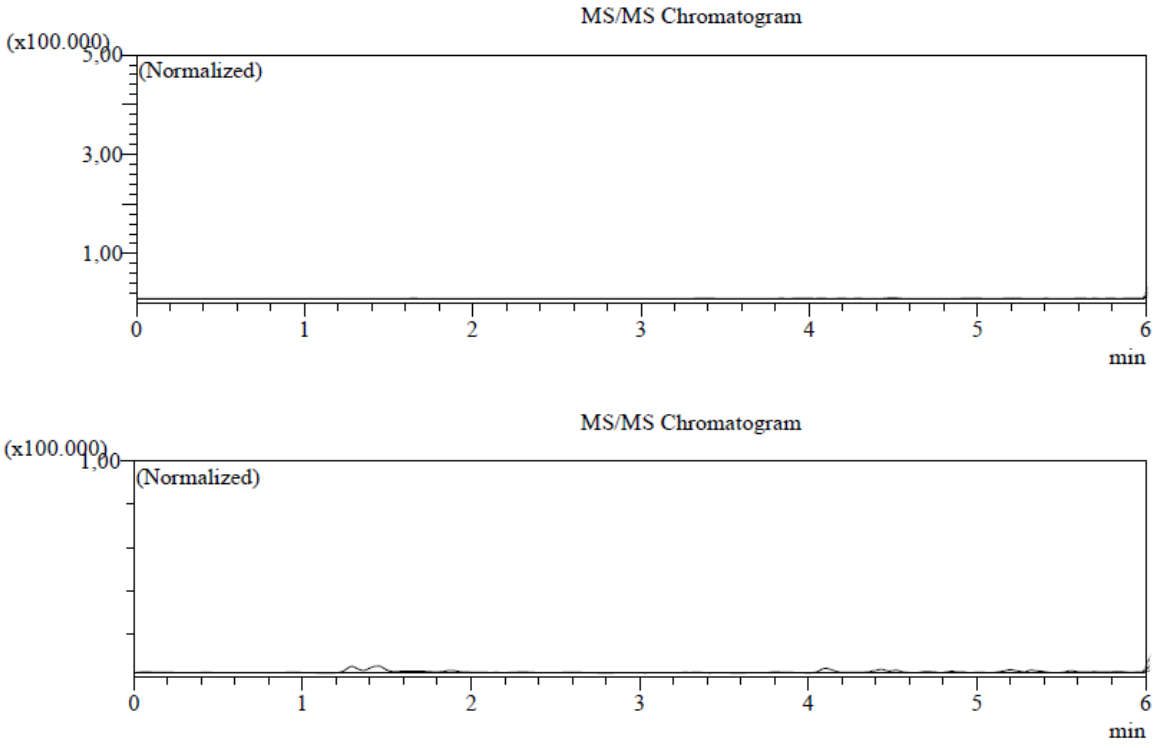
Gün içi tekrarlanabilirlik % Sapma: [(Derişim ortalama - Gerçek değer) / Gerçek değer] * 100

Yöntem seçimliği

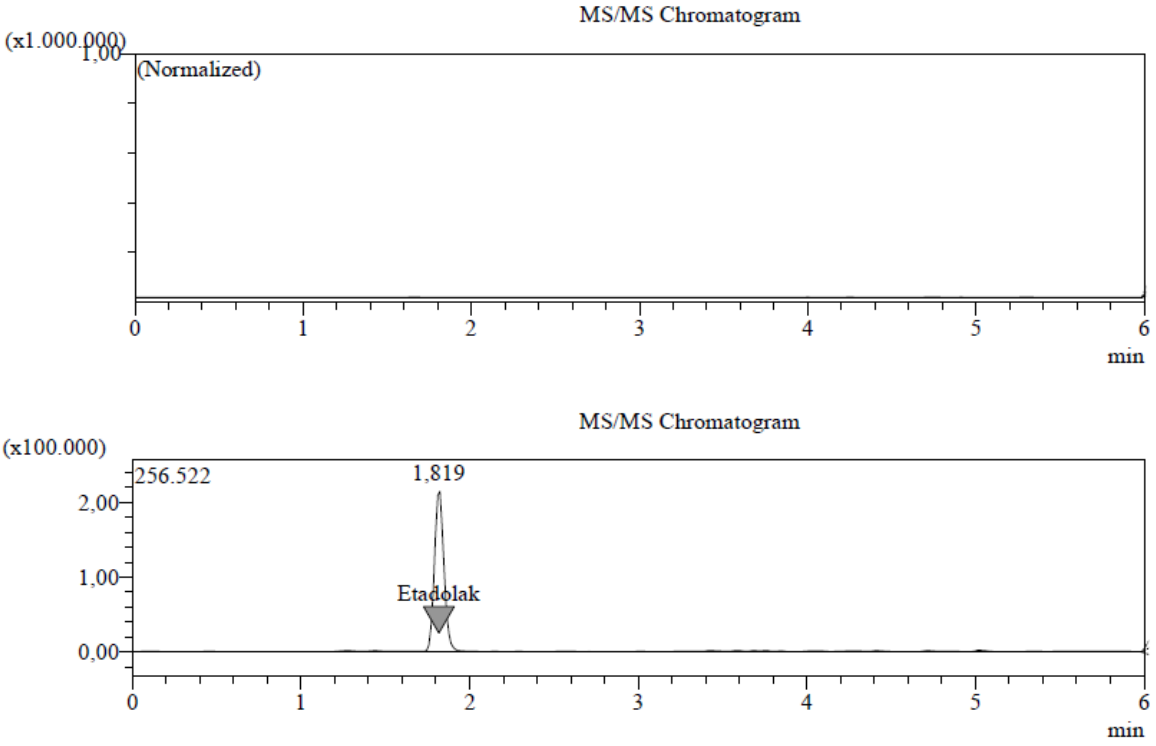
Kan plazma çalışmaları miktar tayininde kullanılan kör numune sonuçları Çizelge 4.33'te verilmiştir. Analitik standart olarak BOS ve iç standart olarak etadolak kullanılmıştır. Analitik ve iç standart içermeyen ortam, analitik standart içeremeyen iç standart içeren ortam ve her iki standartı içeren ortamlara ait özgünlük ve seçicilik kromotogramları Şekil 4.47 - 4.49'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.33. BOS'un yöntem seçimliğine ait sonuçlar

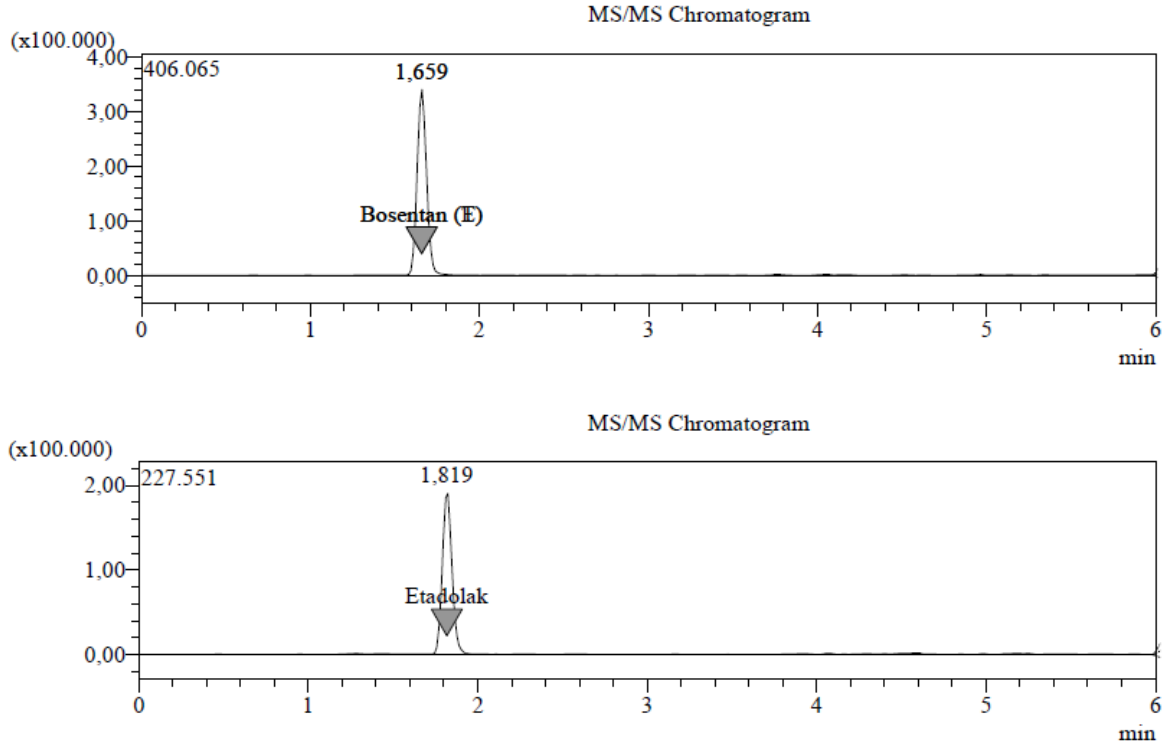
	Analitik standart			İç standart		
	RT	Alan	Alan %	RT	Alan	Alan %
LOQ	1,654	50,108	-	1,822	7,379	-
Kör - 1	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000
Kör - 2	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000
Kör - 3	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000
Kör - 4	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000
Kör - 5	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000
Kör - 6	-----	0,001	0,000	-----	0,001	0,000



Şekil 4.47. BOS ve iç standart (etadolak) içermeyen ortam kromatogramı



Şekil 4.48. BOS içermeyen, etadolak (20 ng/mL) içeren ortam kromatogramı



Şekil 4.49. BOS (5 ng/mL) ve etadolak (20 ng/mL) içeren ortam kromatogramı

Carry-over (taşınma) sonuçları

Miktar tayini yöntemine ait carry-over etkisine ait sonuçlar Çizelge 4.34'te verilmiştir. Çalışmada analitik standart olarak BOS, iç standart olarak etadolak kullanılmıştır.

Çizelge 4.34. BOS'un carry-over (taşınma) etkisi sonuçları

	Analitik standart			İç standart		
	RT	**Alan**	**Alan %**	**RT**	**Alan**	**Alan %**
PELLOQ	1,66	47072,00	-	1,82	8302,00	-
PK7	1,66	38336894,00	-	1,82	958430,00	-
PK	1,66	4133,00	8,78	-----	0,00	0,00

Matriks etkisi sonuçları

Düşük derişim (16 ng/mL) ve yüksek derişime (400 ng/mL) ait matriks etkisi bulguları Çizelge 4.35'te verilmiştir.

Çizelge 4.35. BOS'un matriks etkisi sonuçları

	Düşük derişim (16 ng/mL)			Yüksek derişim (400 ng/mL)		
	Alan			Alan		
	Anl std	**İç std**	**% Pik Alan**	**Anl std**	**İç std**	**% Pik Alan**
KE	130571,00	847378,00	**-**	25778243,00	935490,00	**-**
MF 1	133630,00	879437,00	98,61	28899830,00	857292,00	122,34
MF 2	156148,00	833101,00	121,64	28735818,00	798275,00	130,63
MF 3	161299,00	852611,00	122,78	29363246,00	785818,00	135,60
MF 4	163000,00	787448,00	134,34	27951463,00	752652,00	134,77
MF 5	160544,00	821529,00	126,82	28925433,00	731706,00	143,46
MF 6	165868,00	818366,00	131,54	29599261,00	765558,00	140,31
	X_{ort}		123	**X_{ort}**		135
	SS		13	**SS**		8
	% BSS		10,4	**% BSS**		5,55

MF: Matriks faktör, **Anl. std:** Bosentan, **İç std:** Etadolak

Dilüsyon doğruluğu

Miktar tayini yöntemine ait dilüsyon doğruluğu sonuçları Çizelge 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4.36. BOS'un dilüsyon doğruluğu sonuçları

	Hesaplanan derişim (ng/mL)
Dilüsyon - 1	468,50
Dilüsyon - 2	476,24
Dilüsyon - 3	518,00
Dilüsyon - 4	528,58
Dilüsyon - 5	504,87
X_{ort}	499
SS	26
% BSS	5,22
% Sapma	-0,15

Seyreltilen derişim: 500 ng/mL

En düşük miktar saptama alt sınırı (LLOQ)

BOS ve iç standart olan etadolak için en düşük miktar saptama alt sınırı (LLOQ) sonuçları Çizelge 4.37'de verilmiştir. BOS'a ait LLOQ değerinin ortalaması 0,015 ng/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.37. BOS ve iç standart etadolak için LLOQ sonuçları

	Analitik standart						İç standart					
	Derişim	**S Height**	**N Height**	**S/N**	**k**	**LOQ**	**Derişim**	**S Height**	**N Height**	**S/N**	**k**	**LOQ**
LOQ-1	0,12	-	-	40,47	5,00	0,02	0,20	-	-	2,45	5,00	0,41
LOQ-2	0,12	-	-	59,20	5,00	0,01	0,20	-	-	3,08	5,00	0,33
LOQ-3	0,12	-	-	40,52	5,00	0,02	0,20	-	-	2,64	5,00	0,38
LOQ-4	0,12	-	-	65,76	5,00	0,01	0,20	-	-	2,65	5,00	0,38
LOQ-5	0,12	-	-	37,95	5,00	0,02	0,20	-	-	2,98	5,00	0,34
LOQ-6	0,12	-	-	37,19	5,00	0,02	0,20	-	-	3,18	5,00	0,31
LOQ-7	0,12	-	-	24,83	5,00	0,02	0,20	-	-	2,49	5,00	0,40
					LOQ X_{ort}	0,02					**LOQ X_{ort}**	0,36

Kısa süreli oda sıcaklığı (KSOS) kararlılığı

Düşük (0,4 ng/mL) ve yüksek (80 ng/mL) derişimdeki kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığına ait sonuçlar Çizelge 4.38'de verilmiştir.

Çizelge 4.38. BOS'un kısa süreli oda sıcaklığı (KSOS) kararlılığı sonuçları

		Düşük derişim (0,4 ng/mL)						Yüksek derişim (80 ng/mL)					
	Prl	**Derişim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**	**Derişim**	**X_{ort}**	**SS**	**% BSS**	**Gerçek değerden sapma**	**% Sapma**
0. saat	1	0,34	0,35	0,01	2,32	-12,83	-	68,73	69,4	1,8	2,56	-13,29	-
	2	0,34						71,38					
	3	0,36						68,00					
24. saat	1	0,39	0,40	0,02	4,66	-0,33	14,34	77,41	79,4	2,8	3,57	-0,73	14,48
	2	0,39						81,42					
	3	0,42						-					

% Sapma: [(24. saat derişim ortalama – 0. saat derişim ortalama) / 0. saat derişim ortalama] * 100

Donma erime kararlılığı (DEK)

Donma erime kararlılığı (DEK) bulgularına ait sonuçlar Çizelge 4.39’da verilmiştir.

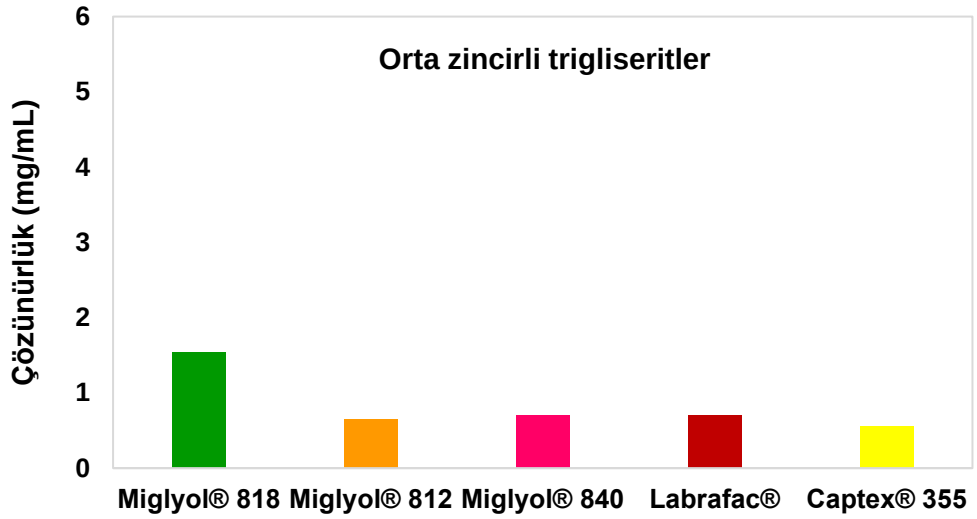
Çizelge 4.39. BOS'un donma erime kararlılığı (DEK) sonuçları

Döngü	Prl	Düşük Derişim (0,4 ng/mL) Derişim	X_{ort}	SD	% BSS	Gerçek değerden sapma	% Sapma	Prl	Yüksek Derişim (80 ng/mL) Derişim	X_{ort}	SD	% BSS	Gerçek değerden sapma	% Sapma
Karşılaştırılacak değerler	1	0,44						1	76,39					
	2	0,40	0,44	0,04	8,10	8,92		2	84,42	80,6	4,0	5,00	0,75	
(22/12/2020)	3	0,47						3	81,00					
							-8,49							-0,57
	1	0,39						1	81,62					
3. döngü (25/12/2020)	2	0,40	0,40	0,01	2,09	-0,33		2	73,29	80,1	6,3	7,80	0,18	
	3	0,41						3	85,52					

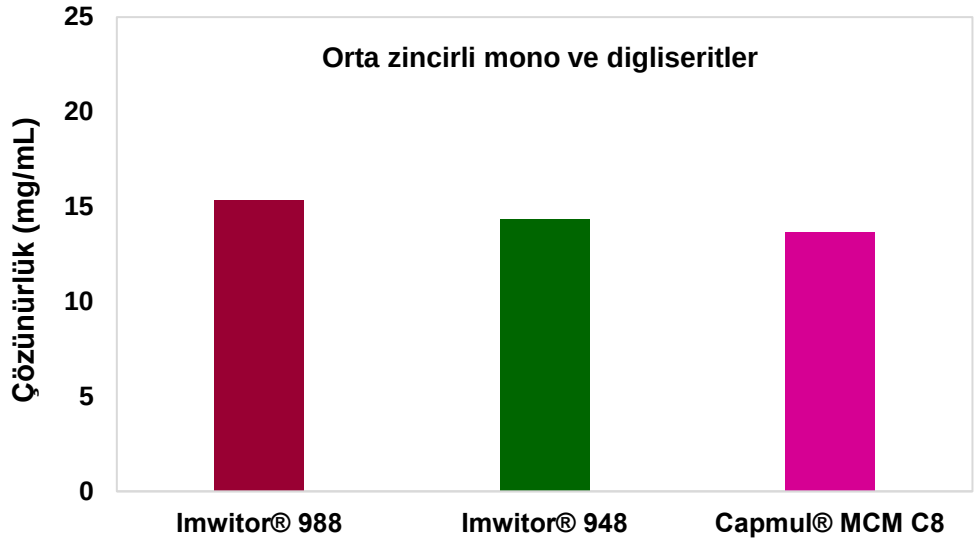
4.4. SNEDDS Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

4.4.1. Farklı yağlardaki çözünürlük çalışmaları

BOS'un farklı yağ gruplarındaki çözünürlüğünün belirlenmesi Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bulunan absorbanslar standart doğru denkleminde yerine konularak elde edilen derişimler değerlendirilmiş ve sonuçlar gruplara göre ayrı ayrı Şekil 4.50 - 4.53'te, bütün grupların birlikte değerlendirilmesi Şekil 4.54'te, sonuçları en yüksek çıkan gruplara ait yağların çözünürlükleri Şekil 4.55'te ve Çizelge 4.40'ta ortalama ± SS olarak gösterilmiştir. En iyi çıkan orta zincirli mono ve digliseritler (Capmul® MCM C8, Imwitor® 948, Imwitor® 988), uzun zincirli mono ve digliserit karışımları (Maisine®, Peceol®), propilen glikol esteri (Caproyl® 90) ve çörek otu yağı ile formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 4.50. BOS'un orta zincirli trigliseritlerdeki çözünürlüğü



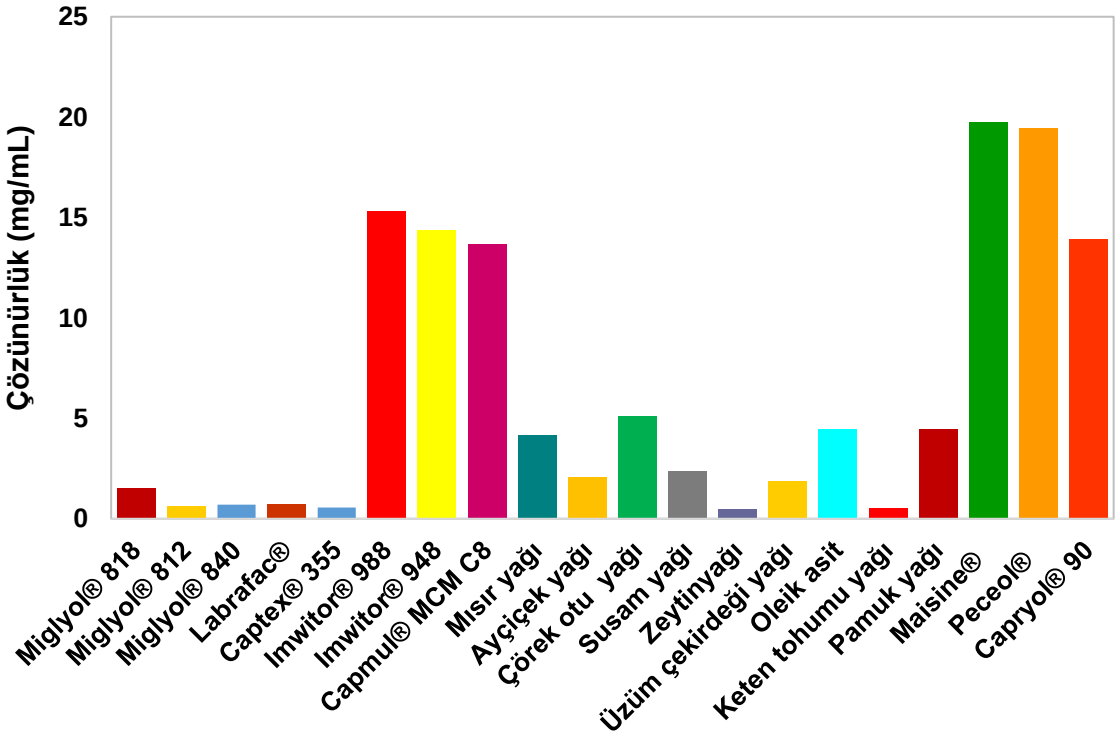
Şekil 4.51. BOS'un orta zincirli mono ve digliseritlerdeki çözünürlüğü



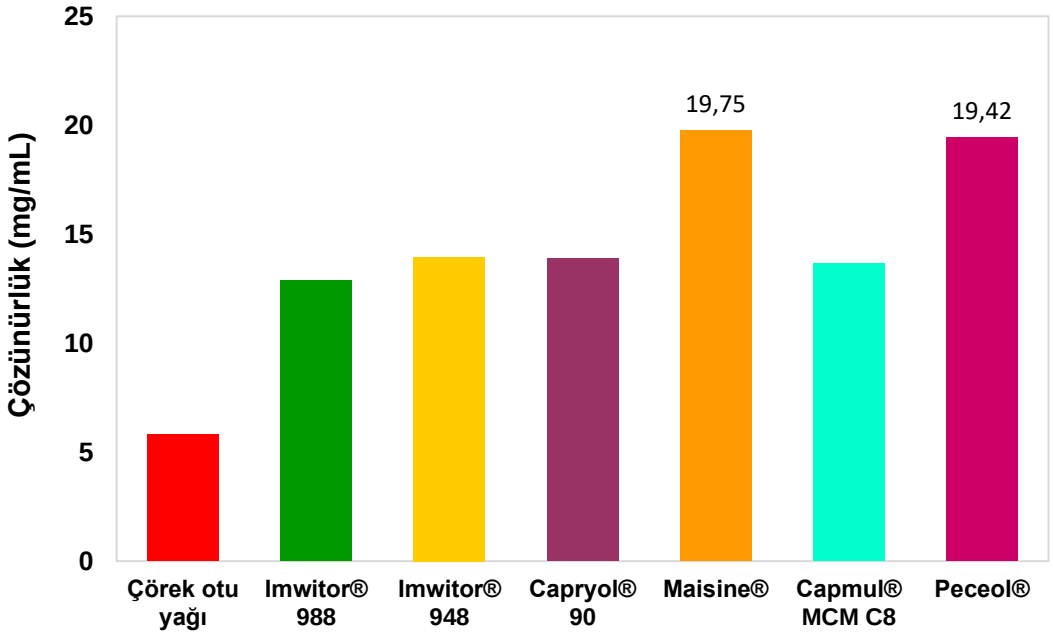
Şekil 4.52. BOS'un uzun zincirli yağ asitlerindeki çözünürlüğü



Şekil 4.53. BOS'un uzun zincirli mono ve digliserit karışımları ve propilen glikol esterindeki çözünürlüğü



Şekil 4.54. BOS'un denenen tüm yağ gruplarındaki çözünürlüğü



Şekil 4.55. BOS'un en yüksek çözünürlük gösterdiği yağlar (n=3)

Çizelge 4.40.BOS'un yüksek çözünürlük gösterdiği yağlardaki çözünürlük değerleri

		Çözünürlük (mg/mL)
Uzun zincirli yağ asidi	Çörek otu yağı	5,83 ± 0,66
Orta zincirli mono ve digliseritler	Imwitor® 988	12,86 ± 2,17
	Imwitor® 948	13,96 ± 1,00
	Capmul® MCM C8	13,67 ± 0,29
Propilen glikol esteri	Capryol® 90	13,90 ± 0,89
Uzun zincirli mono ve digliseritler	Maisine®	19,75 ± 0,69
	Peceol®	19,42 ± 2,12

X_{ort} ± SS, n=3

4.4.2. Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları ve üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları ve üçgen faz diyagramlarının oluşturulması Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Faz diyagramlarının oluşturulması için etkin maddenin çözünürlüğü yüksek olduğu yağlar Maisine® ve Peceol®, sürfaktan ve kosürfaktan bileşeni olarak ise

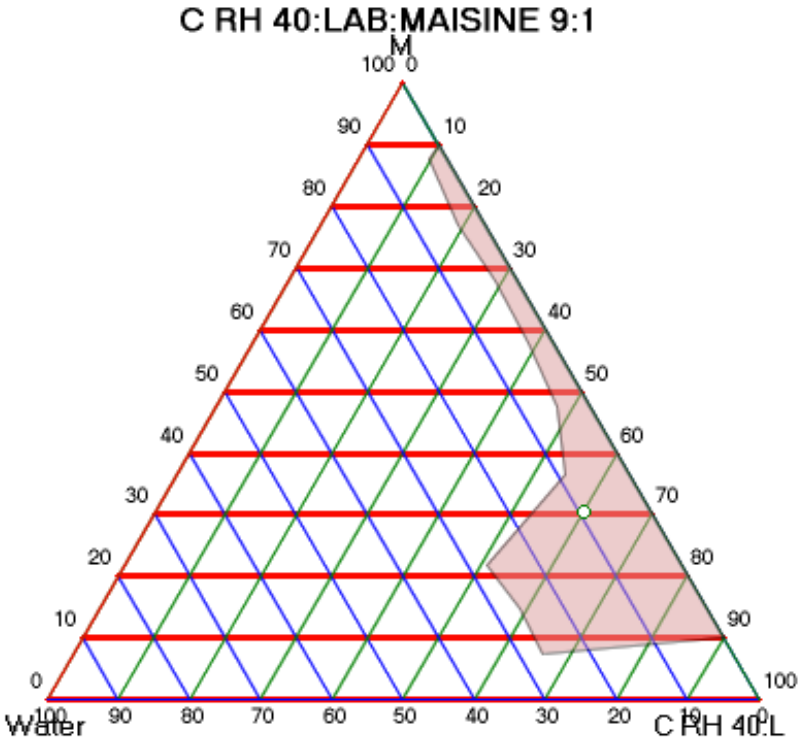
Cremophor® RH 40 ve Labrasol® seçilmiştir. Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarda kullanılacak yağ (Maisine® ve Peceol®), sürfaktan (Cremophor® RH 40) ve kosürfaktan (Labrasol®)'ün karışabilirliğini saptamak amacıyla, çeşitli oranlarda sürfaktan: kosürfaktan karıştırılarak yağlar ile titre edilmiştir. Farklı oranlarda Cremophor® RH 40: Labrasol® ve yağ karışımı ile oluşturulan kaba emülsiyonların en fazla yağı aldığı sürfaktan: kosürfaktan oranı bulunmuştur. Her iki uzun zincirli yağ formülasyonu için K_m oranı 9:1 olarak belirlenmiştir. Belirlenen oranlarda yağ ve sürfaktan: kosürfaktan karışımı su ile titre edilmiştir (Çizelge 4.41 ve 4.42). Titrasyon sonucunda elde edilen verilerle üçgen faz diyagramları Bölüm 3.2.4'te bahsedilen program ile oluşturulmuştur (Şekil 4.56 ve 4.57). Kaba emülsiyon ve nanoemülsiyon bölgeleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.41. Maisine® SNEDDS formülasyonu için yağ-sürfaktan-kosürfaktan ve su oranlarını gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (K_m: 9:1)

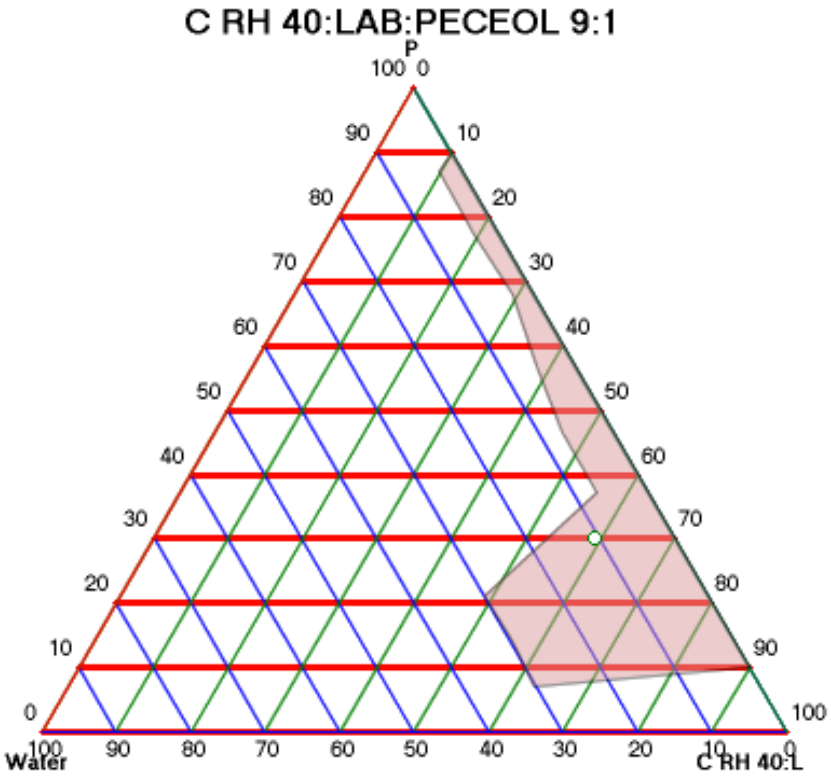
% Yağ (Maisine®)	% Sürfaktan: kosürfaktan	% Su
7,34	66,08	26,58
14,75	59,00	26,25
21,83	50,95	27,22
36,36	54,55	9,09
47,71	47,71	4,58
57,92	38,61	3,47
67,83	29,07	3,10
77,07	19,27	3,66
87,89	9,77	2,34

Çizelge 4.42. Peceol® SNEDDS formülasyonu için yağ-sürfaktan-kosürfaktan ve su oranlarını gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (K_m: 9:1)

% Yağ (Peceol®)	% Sürfaktan:kosürfaktan	% Su
6,96	62,67	30,36
14,04	56,18	29,78
20,98	48,95	30,07
37,24	55,87	6,89
46,64	46,64	6,72
56,93	37,95	5,12
67,96	29,13	2,91
77,22	19,31	3,47
87,21	9,69	3,10



Şekil 4.56. Maisine® SNEDDS formülasyonu için üçgen faz diyagramı



Şekil 4.57. Peceol® SNEDDS formülasyonu için üçgen faz diyagramı

4.4.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyonların bulunması

BBD ile 15 formülasyon hazırlanmış formülasyonlara 250 mL su eklenerek nanoemülsiyonlar oluşturulmuştur. Deney tasarımında cevap olan ortalama damlacık büyüklüğü ve PDİ'leri sonuçları Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için elde edilmiştir.

Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD verileri

Deney tasarımında cevap olan ortalama damlacık büyüklüğü ve PDİ'leri sonuçları Çizelge 4.43'te, programın verdiği BBD'ye ait model ve yanıtları Çizelge 4.44'te, damlacık büyüklüğü ve PDİ için programın tanımladığı modellere ait parametreler ise Çizelge 4.45'te verilmiştir. Formülasyondaki bağımsız değişkenlerden hangilerinin cevapları istatistiksel olarak etkilediği ANOVA testi sonucunda belirlenmiştir. BBD'ye ait damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları Çizelge 4.46'da PDİ cevabı için ANOVA sonuçları ise Çizelge 4.47'de verilmiştir.

Çizelge 4.43. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri ve cevapları

Formülasyon	Bağımsız değişkenler			Bağımlı değişkenler	
	X_1	X_2	X_3	Damlacık boyutu (nm) (Y_1)	PDİ (Y_2)
1	0	0	0	27,8 ± 2,0	0,378 ± 0,037
2	0	-1	-1	30,1 ± 1,5	0,400 ± 0,023
3	-1	-1	0	22,0 ± 1,0	0,209 ± 0,040
4	1	-1	0	38,8 ± 1,8	0,600 ± 0,097
5	-1	1	0	16,1 ± 0,8	0,153 ± 0,026
6	1	0	1	34,5 ± 1,8	0,599 ± 0,068
7	0	1	1	21,9 ± 0,9	0,274 ± 0,017
8	-1	0	-1	19,3 ± 1,3	0,196 ± 0,018
9	0	1	-1	21,5 ± 1,2	0,254 ± 0,052
10	1	1	0	31,3 ± 1,1	0,528 ± 0,061
11	-1	0	1	18,4 ± 1,6	0,185 ± 0,034
12	0	0	0	27,4 ± 2,0	0,429 ± 0,053
13	0	-1	1	32,0 ± 0,9	0,480 ± 0,076
14	1	0	-1	34,7 ± 2,9	0,562 ± 0,073
15	0	0	0	27,7 ± 2,4	0,420 ± 0,043

-1: Her bir faktör için en az değeri, **0:** Her bir faktör için orta değeri, **1:** Her bir faktör için en fazla değeri ifade etmektedir.

Çizelge 4.44. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD model ve yanıtları

Faktör	İsim	Birim	Min	Ort	Maks	SS
A	Maisine®	g	0,90	1,45	2,00	0,42
B	Cremophor® RH 40	g	4,95	6,075	7,20	0,85
C	Labrasol®	g	0,55	0,675	0,80	0,09

Yanıtlar	İsim	Birim	Min	Ort	Maks	SS	Model
Y_1	Damlacık büyüklüğü	nm	16,10	26,91	38,76	6,75	Lineer
Y_2	PDİ	-	0,153	0,378	0,600	0,157	Lineer

SS: Standart sapma

Çizelge 4.45. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü ve PDİ için modellere ait parametreler

Model	Damlacık büyüklüğü (nm)		PDİ	
	Ayarlanmış R^2	Beklenen R^2	Ayarlanmış R^2	Beklenen R^2
Lineer	**0,9817**	**0,9718**	**0,9413**	**0,9139**
2FI	0,9783	0,9447	0,9271	0,8313
Kuadratik	0,9773	0,8725	0,9311	0,6668
Kübik	0,9989	-	0,9984	-

Çizelge 4.46. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kareler	F değeri	Prob>F
Model	629,45	3	209,82	251,66	<0,0001*
A-Maisine®	501,49	1	501,49	601,50	<0,0001*
B-Cremophor® RH 40	127,76	1	127,76	153,24	<0,0001*
C-Labrasol®	0,20	1	0,20	0,24	0,6337
Residual (Kalıntı)	9,17	11	0,83		
Lack of fit (Uyum eksikliği)	9,12	10	0,91	17,81	0,1825
Pure error (Hata)	0,051	1	0,051		
Total (Genel toplam)	638,63	14			
R^2			0,9856		

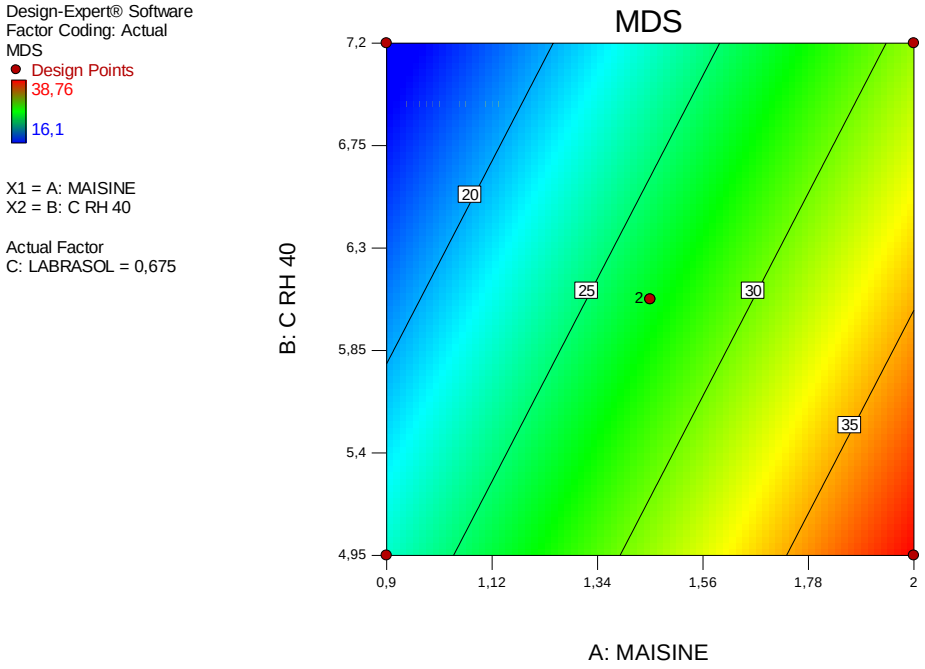
***"Prob>F"** değerleri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

Damlacık büyüklüğü cevabı incelendiğinde Lineer model Design Expert® 10 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Çizelge 4.45'te görüldüğü gibi diğer modellere ait R^2 değerleri de büyük olmakla birlikte programın tasarım için önerdiği model seçilmiştir. Modelde A ve B terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

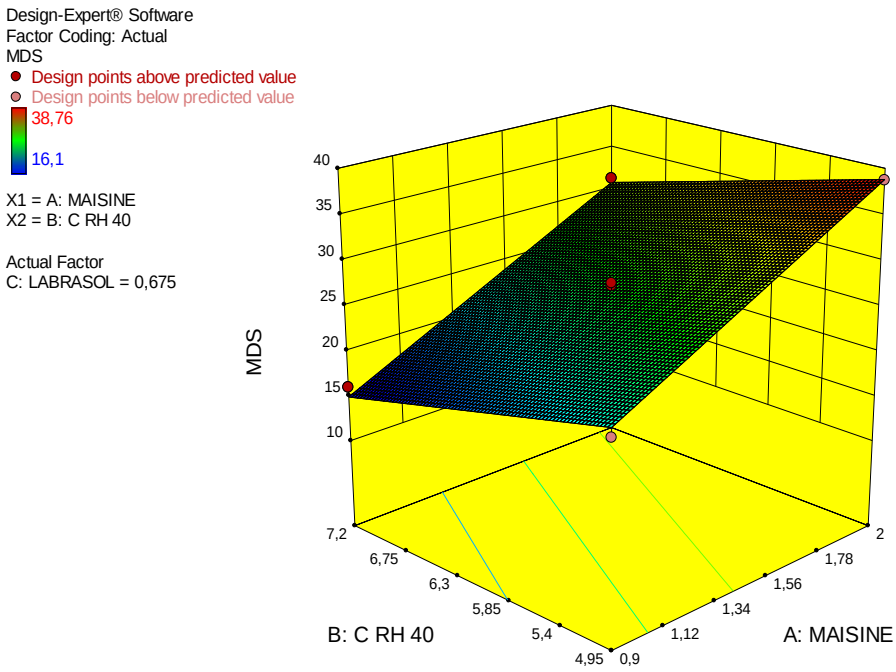
Y_1 = 26,91+7,92*A-4,00*B

Y_1: Damlacık büyüklüğü (nm)
A: Maisine®
B: Cremophor® RH 40

Tasarım sonucunda programın önerdiği model denkleminde damlacık büyüklüğü cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.58 ve 4.59'da gösterilmiştir.



Şekil 4.58. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği



Şekil 4.59. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

Çizelge 4.47. Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD PDİ cevabı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kareler	F değeri	Prob>F
Model	0,33	3	0,11	75,83	<0,0001*
A-Maisine®	0,30	1	0,30	206,23	<0,0001*
B-Cremophor® RH 40	0,029	1	0,029	19,88	0,0010
C-Labrasol®	1,984E-003	1	1,984E-003	1,37	0,2666
Residual (Kalıntı)	0,016	11	1,449E-003		
Lack of fit (Uyum eksikliği)	0,016	10	1,590E-003	39,25	0,1236
Pure error (Hata)	4,050E-005	1	4,050E-005		
Total (Genel toplam)	0,35	14			
R^2			0,9539		

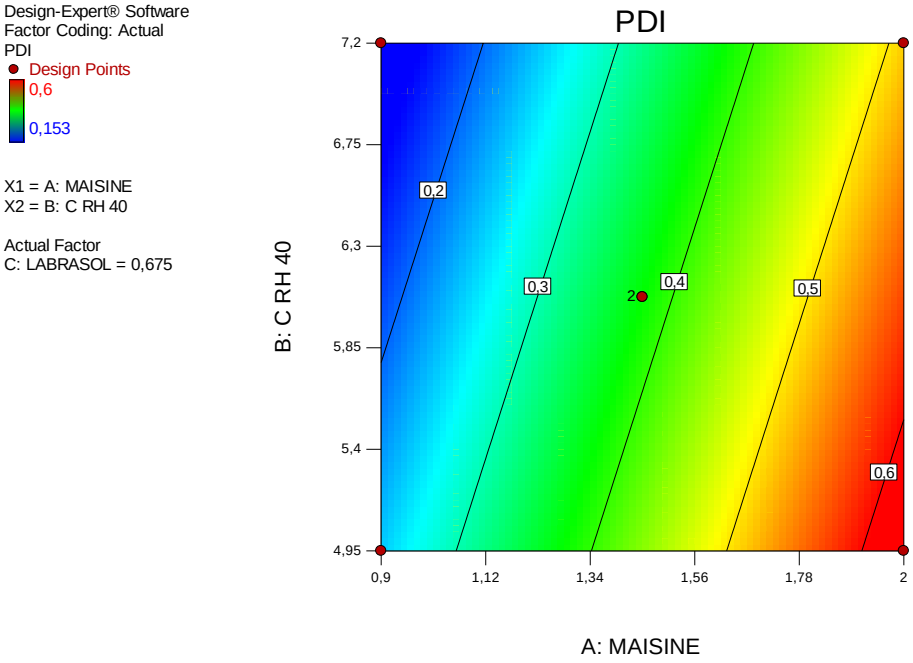
***"Prob>F"** değerleri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

PDİ cevabı incelendiğinde Lineer model Design Expert® 10 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Çizelge 4.45'te görüldüğü gibi diğer modellere ait R^2 değerleri de büyük olmakla birlikte programın tasarım için önerdiği model seçilmiştir. Modelde A ve B terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

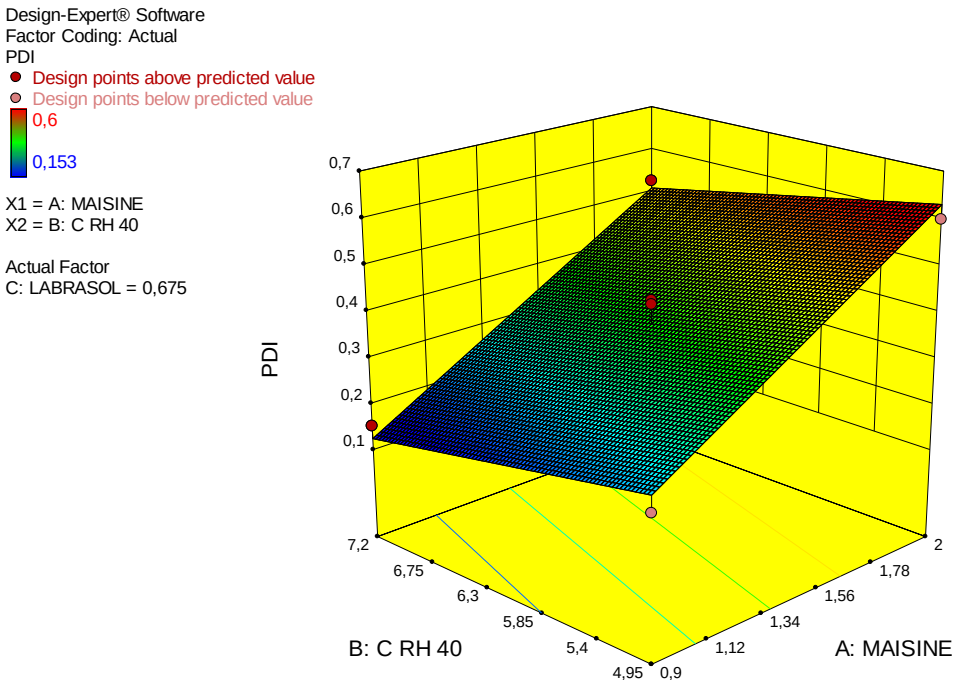
Y_2 = 0,38+0,19*A-0,060*B

Y_2: PDİ
A: Maisine®
B: Cremophor® RH 40

Tasarım sonucunda programın önerdiği model denkleminde PDİ cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.60 ve 4.61'de gösterilmiştir.

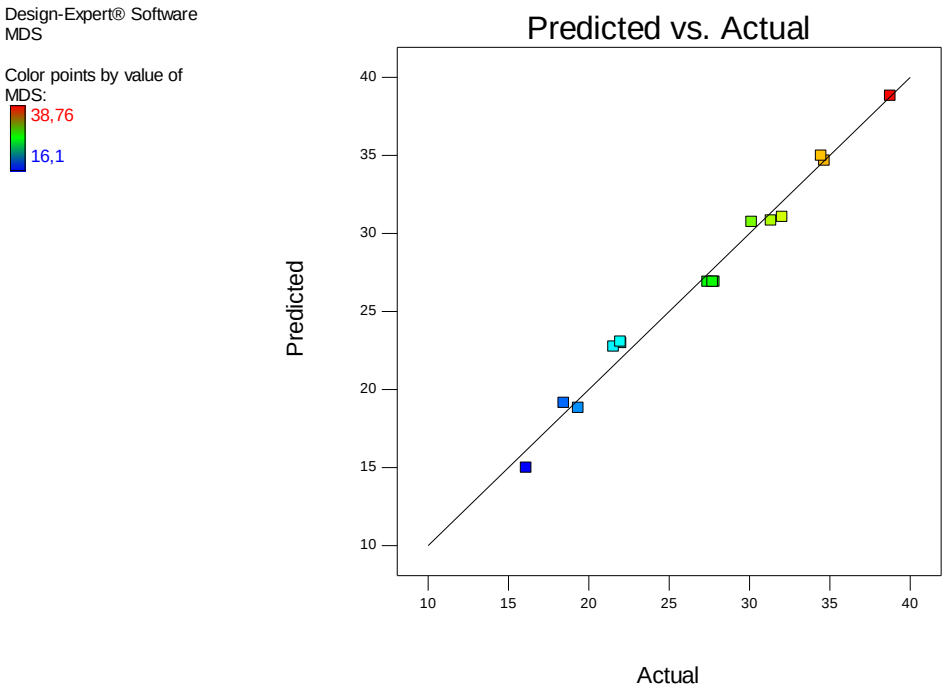


Şekil 4.60. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının PDİ üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği

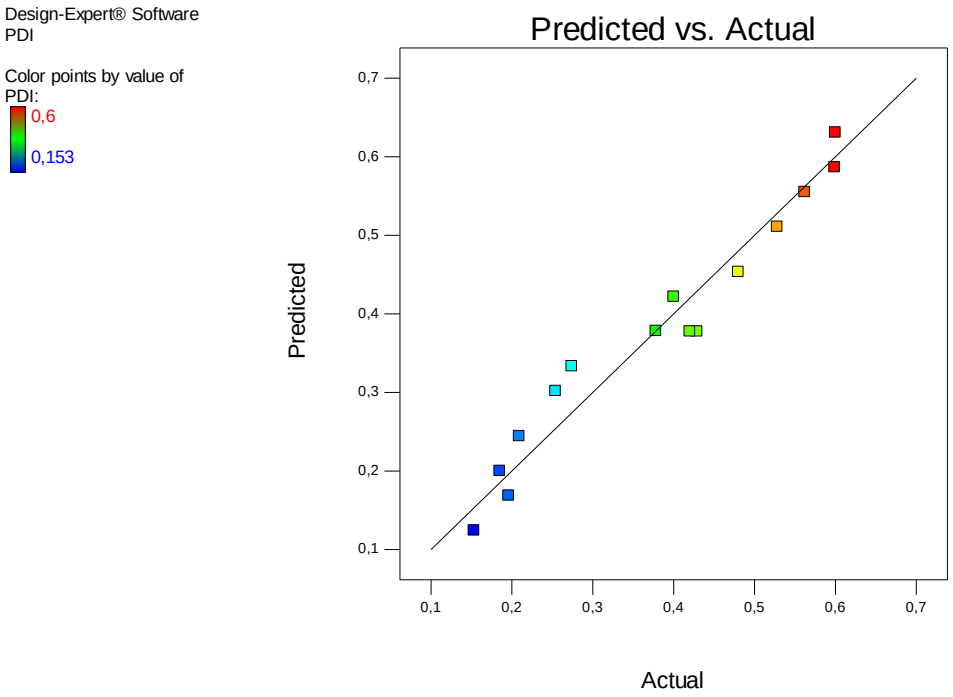


Şekil 4.61. Maisine®, Cremophor® RH 40 ve Labrasol® miktarının PDİ üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

Damlacık büyüklüğü ve PDİ deney verileri ile matematiksel model sonucunda elde edilen tahmini veriler arasındaki ilişkinin korelasyon grafiği Şekil 4.62 ve 4.63'te verilmiştir.

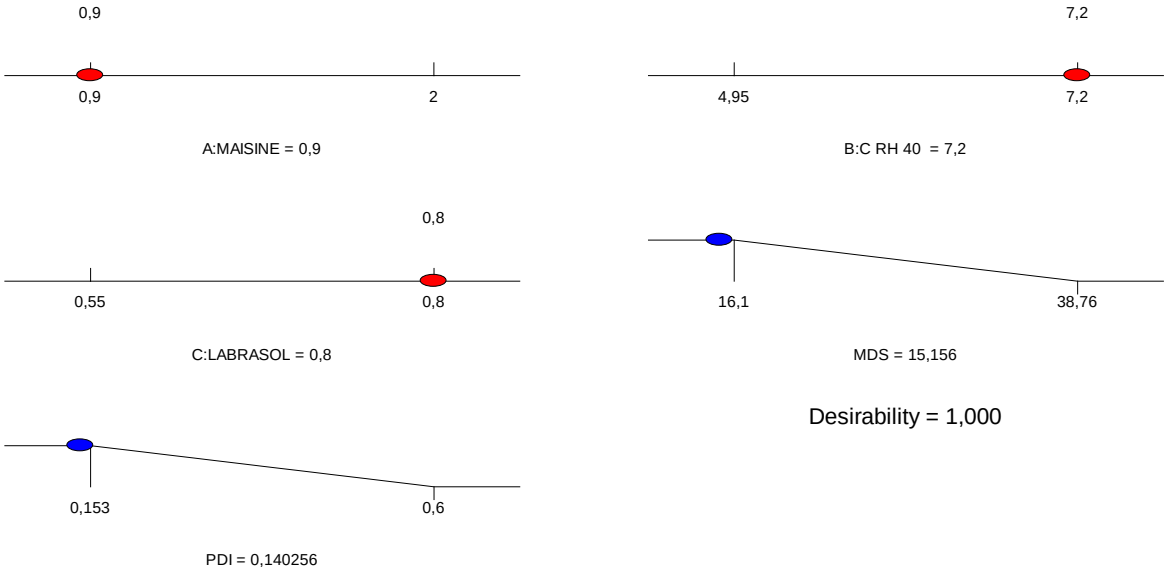


Şekil 4.62. Maisine® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğüne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği



Şekil 4.63. Maisine® SNEDDS formülasyonun PDİ'ye ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği

Geliştirilecek SNEDDS formülasyonun hedeflenen karakterizasyon özelliklerinden damlacık boyutu <100 nm ve PDİ'nin ise <0,2 olması amaçlanmaktadır. Şekil 4.64'te deney tasarımı ile model sonucu belirlenen yağ, sürfakan ve kosürfaktan miktarları ve formülasyonun karakterizasyon özellikleri ve Çizelge 4.48'te formülasyonun deney şartlarında 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.64. Maisine® SNEDDS hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri

Çizelge 4.48. Maisine® SNEDDS hedef formülasyonunun 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri

Yanıtlar	Ortalama	Medyan	SS	n	%95 PI low	%95 PI high
Damlacık büyüklüğü (nm)	15,16	15,16	0,91	1	12,74	17,57
PDİ	0,140	0,140	0,038	1	0,040	0,240

SS: Standart sapma

Şekil 4.64'te seçilen formülasyon matematik model sonucu 2 yönlü %95 güven aralığı analizi sonucunda damlacık boyutu 15,16 nm ve PDİ'i 0,140 olan sonuç verirken, damlacık boyutu değeri deneysel ortamda 12,74 nm < DB < 17,57 nm arasında, PDİ sonucu da 0,040 < PDİ < 0,240 arasında olmalıdır.

Hedeflenen karakterizasyon ölçütlerine göre bileşimi Şekil 4.64'te belirtilen ve seçilen hedef formülasyonun deneysel çalışmalar sonucunda damlacık boyutu ve PDİ sonuçları Çizelge 4.49'da verilmiştir. Aday hedef formülasyon bileşimi Çizelge 4.48'de %95 güven aralığıyla verilen aralıkta çıkmıştır ve 0,9: 7,2: 0,8 - Maisine®: Cremophor® RH 40: Labrasol® sistemi optimum formülasyon olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.49. Deneysel çalışmalar sonucunda Maisine® SNEDDS formülasyonu için elde edilen karakterizasyon özellikleri

Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044

X_{ort} ± SS, n=3

Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD verilerinin değerlendirilmesi

Deney tasarımında cevap olan ortalama damlacık büyüklüğü ve PDİ'lerin sonuçları Çizelge 4.50'de, programın verdiği BBD tasarımı model ve yanıtları Çizelge 4.51'de, damlacık büyüklüğü ve PDİ için programın tanımladığı modellere ait parametreler ise Çizelge 4.52'de verilmiştir. Formülasyondaki bağımsız değişkenlerden hangilerinin cevapları istatistiksel olarak etkilediği ANOVA testi sonucunda belirlenmiştir. BBD damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları Çizelge 4.53'te, PDİ cevabı için ANOVA sonuçları ise Çizelge 4.54'te verilmiştir.

Çizelge 4.50. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD parametreleri ve cevapları

Formülasyon	Bağımsız değişkenler			Bağımlı değişkenler	
	X_1	X_2	X_3	Damlacık boyutu (nm) (Y_1)	PDİ (Y_2)
1	-1	-1	0	39,8 ± 2,7	0,711 ± 0,085
2	0	0	0	84,2 ± 3,7	1,000 ± 0,000
3	-1	1	0	15,9 ± 6,0	0,121 ± 0,029
4	0	1	1	49,9 ± 4,8	0,818 ± 0,050
5	1	1	0	81,3 ± 6,9	0,993 ± 0,014
6	0	-1	-1	117,3 ± 12,4	0,919 ± 0,102
7	0	-1	1	142,1 ± 39,0	0,914 ± 0,065
8	-1	0	-1	23,2 ± 0,5	0,187 ± 0,026
9	1	0	-1	133,8 ± 46,2	0,771 ± 0,098
10	1	0	1	171,0 ± 21,4	0,834 ± 0,135
11	0	1	-1	38,8 ± 0,6	0,638 ± 0,017
12	-1	0	1	24,0 ± 1,8	0,201 ± 0,058
13	0	0	0	85,7 ± 1,6	0,973 ± 0,024
14	1	-1	0	215,0 ± 21,0	0,884 ± 0,147
15	0	0	0	86,9 ± 26,4	0,870 ± 0,101

-1: Her bir faktör için en az değeri, **0:** Her bir faktör için orta değeri, **1:** Her bir faktör için en fazla değeri ifade etmektedir, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.51. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD model ve yanıtları

Faktör	İsim	Birim	Min	Ort	Maks	SS
A	Peceol®	g	0,9	1,45	2,0	0,42
B	Cremophor® RH 40	g	4,5	5,85	7,2	1,02
C	Labrasol®	g	0,5	0,65	0,8	0,11

Yanıtlar	İsim	Birim	Min	Ort	Maks	SS	Model
Y_1	Damlacık büyüklüğü	nm	15,91	87,26	215,00	58,95	2FI
Y_2	PDİ	-	0,121	0,722	1,000	0,303	Kuadratik

SS: Standart sapma

Çizelge 4.52. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü ve PDİ için modellere ait parametreler

Model	Damlacık büyüklüğü		PDİ	
	Ayarlanmış R^2	Beklenen R^2	Ayarlanmış R^2	Beklenen R^2
Lineer	0,9092	0,8475	0,4582	0,2132
2FI	**0,9973**	**0,9928**	0,4334	-0,1991
Kuadratik	0,9964	0,9806	**0,9659**	**0,9059**
Kübik	**0,9995**	-	**0,9488**	-

Çizelge 4.53. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD damlacık büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kareler	F Değeri	Prob>F
Model	48578,07	6	8096,34	864,37	<0,0001*
A-Peceol®	31030,39	1	31030,39	3312,81	<0,0001*
B-Cremophor® RH 40	13471,79	1	13471,79	1438,25	<0,0001*
C-Labrasol®	680,99	1	680,99	72,70	<0,0001*
AB	3017,30	1	3017,30	322,13	<0,0001*
AC	330,88	1	330,88	35,32	0,0003
BC	46,72	1	46,72	4,99	0,0560
Residual (Kalıntı)	74,93	8	9,37		
Lack of Fit (Uyum Eksikliği)	71,19	6	11,87	6,34	0,1424
Pure Error (Hata)	3,74	2	1,87		
Total (Genel Toplam)	48653,00	14			
R^2			0,9985		

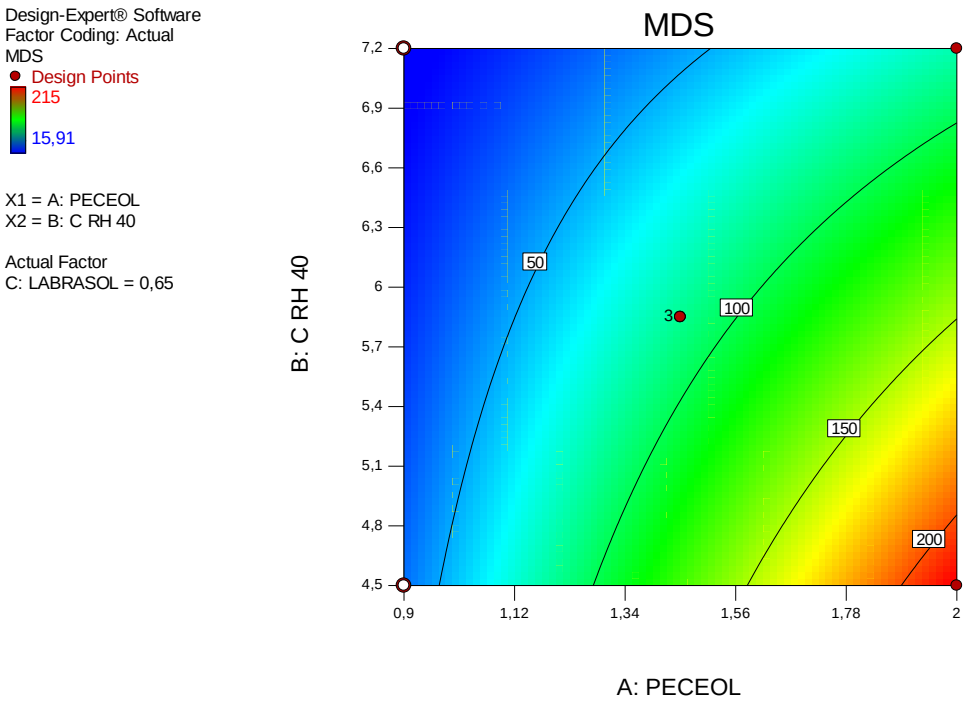
***"Prob>F"** değerleri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

Damlacık büyüklüğü cevabı incelendiğinde 2 FI model Design Expert® 10 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Çizelge 4.52'de görüldüğü gibi R^2 değeri programın tasarım için önerdiği model için en büyük bulunmuştur. Modelde A, B, C, AB ve AC terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

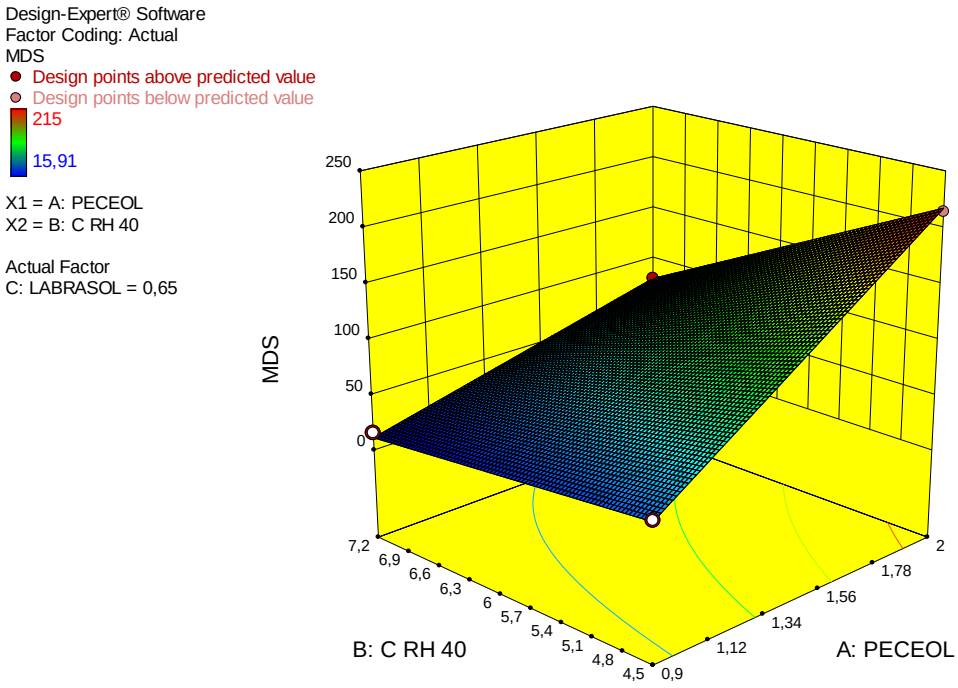
Y_1 = 87,26+62,28*A-41,04*B+9,23*C-27,46*AB+9,10*AC

Y_1: Damlacık büyüklüğü (nm)
A: Peceol®
B: Cremophor® RH 40
C: Labrasol®
AB: Peceol® miktarı-Cremophor® RH 40 miktarı etkileşimi
AC: Peceol® miktarı-Labrasol® miktarı etkileşimi

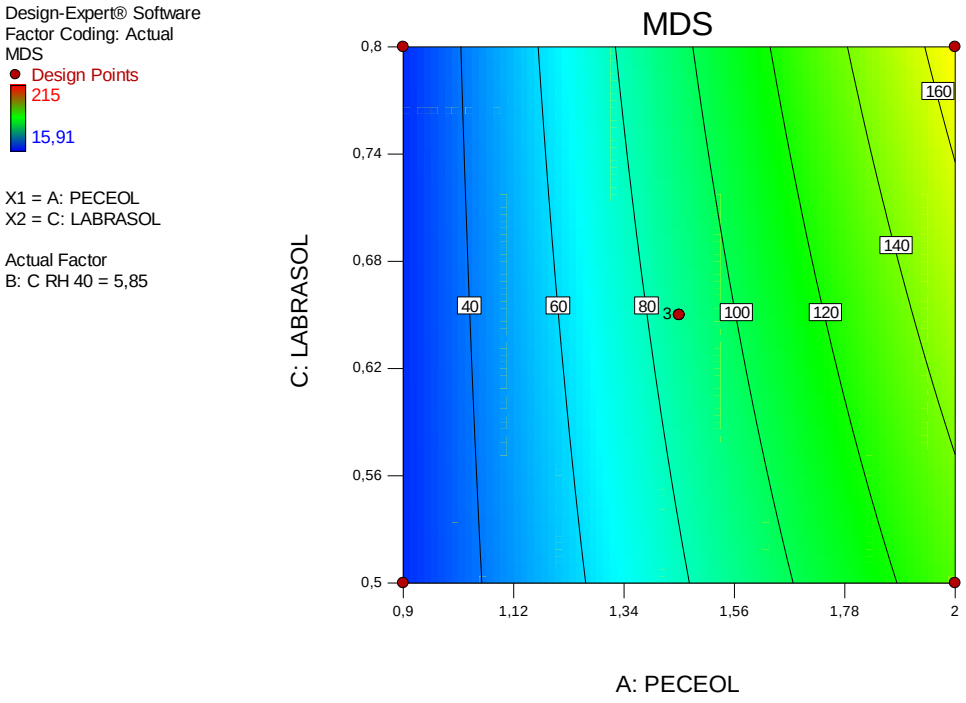
Tasarım sonucunda programın önerdiği model denkleminde damlacık büyüklüğü cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey ve kontur grafikleri A, B ve AB için Şekil 4.65 ve 4.66'da ve A, C ve AC için Şekil 4.67 ve 4.68'de gösterilmiştir.



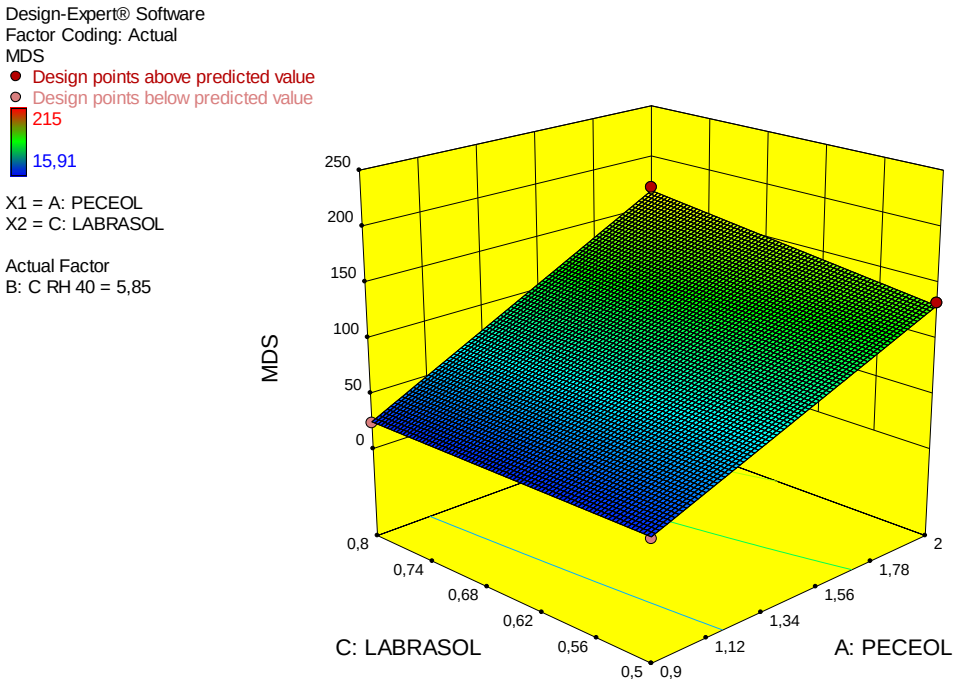
Şekil 4.65. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği



Şekil 4.66. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği



Şekil 4.67. Peceol®, Labrasol® miktarının ve Peceol® - Labrasol® miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği



Şekil 4.68. Peceol®, Labrasol® miktarının ve Peceol® - Labrasol® miktarları etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

Çizelge 4.54. Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD PDİ cevabı için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kareler	F değeri	Prob>F
Model	1,27	9	0,14	45,12	<0,0003*
A-Peceol®	0,64	1	0,64	204,17	<0,0001*
B-Cremophor® RH 40	0,092	1	0,092	29,37	0,0029
C-Labrasol®	7,938E-003	1	7,938E-003	2,53	0,1723
AB	0,12	1	0,12	38,99	0,0015
AC	6,002E-004	1	6,002E-004	0,19	0,6798
BC	8,556E-003	1	8,556E-003	2,73	0,1593
A^2	0,33	1	0,33	104,11	0,0002
B^2	2,650E-003	1	2,650E-003	0,85	0,3999
C^2	0,086	1	0,086	27,31	0,0034
Residual (Kalıntı)	0,016	5	3,133E-003		
Lack of Fit (Uyum Eksikliği)	6,251E-003	3	2,084E-003	0,44	0,7479
Pure Error (Hata)	9,413E-003	2	4,706E-003		
Total (Genel Toplam)	1,29	14			
R^2			0,9878		

***"Prob>F"** değerleri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı değer olarak kabul edilmiştir.

PDİ cevabı incelendiğinde Kuadratik model Design Expert® 10 programı tarafından uygun model olarak seçilmiştir. Çizelge 4.52'de görüldüğü gibi R^2 değeri programın tasarım için önerdiği model için en büyük bulunmuştur. Modelde A, B ve AB terimlerinin anlamlı etkili olduğu bulunmuştur.

Y_2 =0,95+0,28*A-0,11*B+0,17*A*B

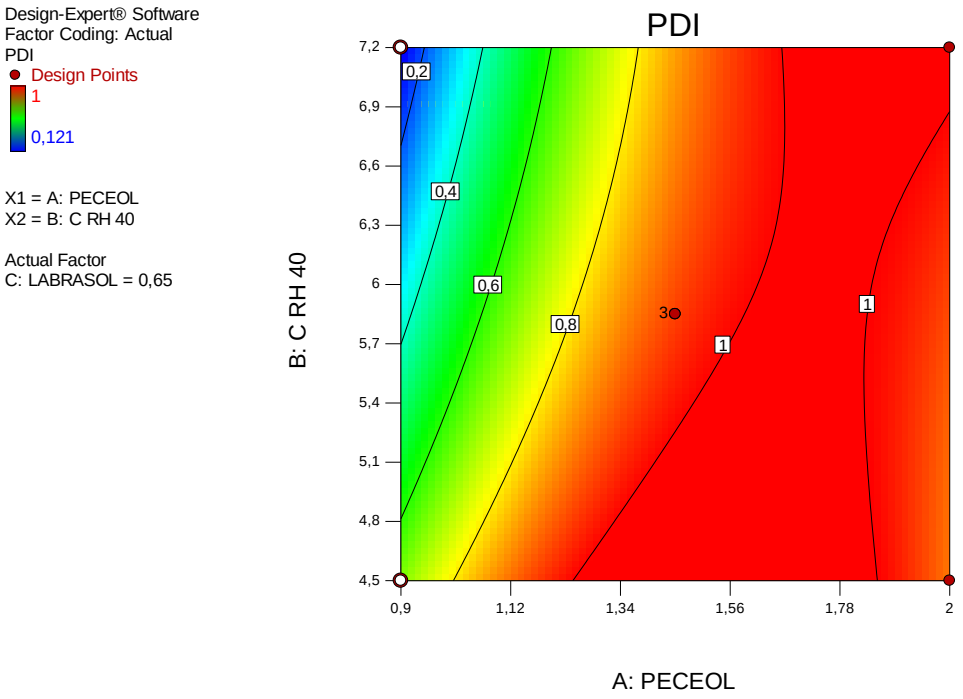
Y_2: PDİ

A: Peceol®

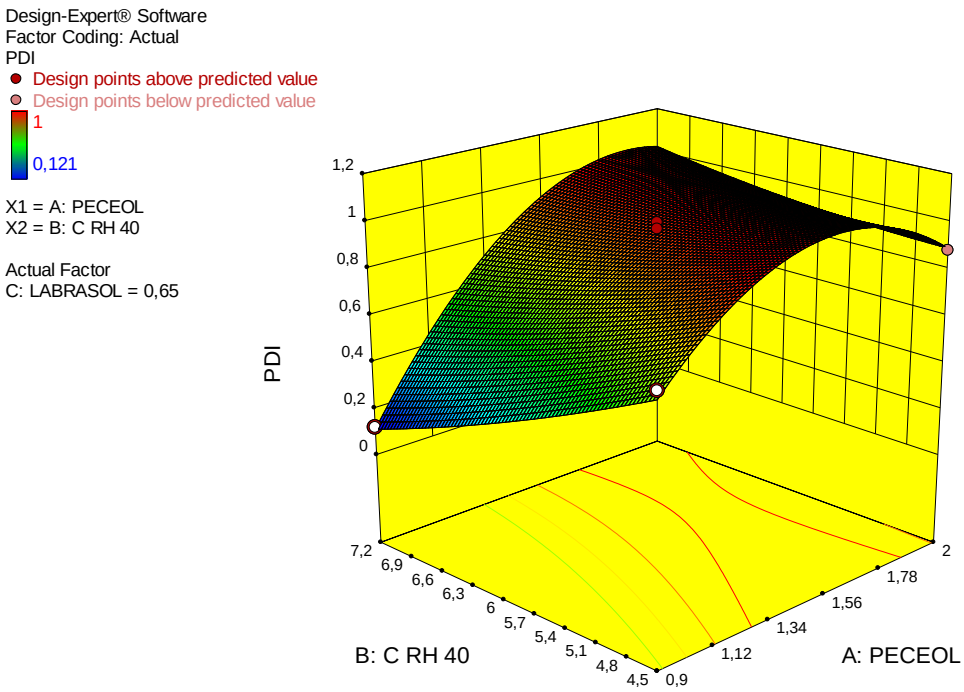
B: Cremophor® RH 40

AB: Peceol® miktarı-Cremophor® RH 40 miktarı etkileşimi

Tasarım sonucunda programın önerdiği model denkleminde PDİ cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bağımsız değişkenlere ait yüzey ve kontur grafikleri A, B ve AB için Şekil 4.69 ve 4.70'te gösterilmiştir.

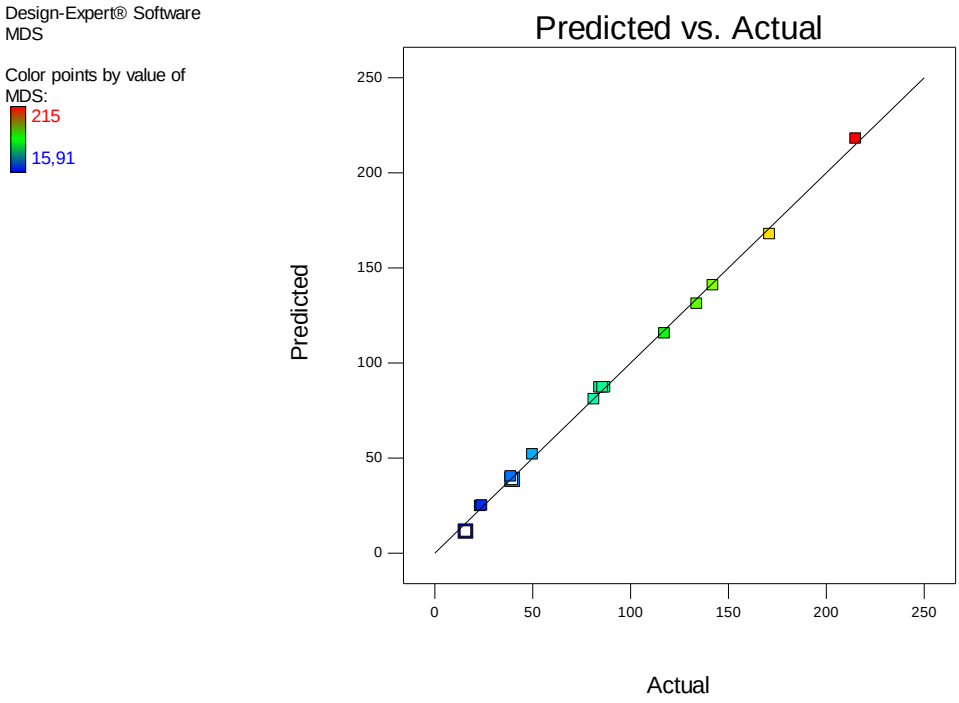


Şekil 4.69. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin PDİ üzerine etkisini gösteren yüzey grafiği

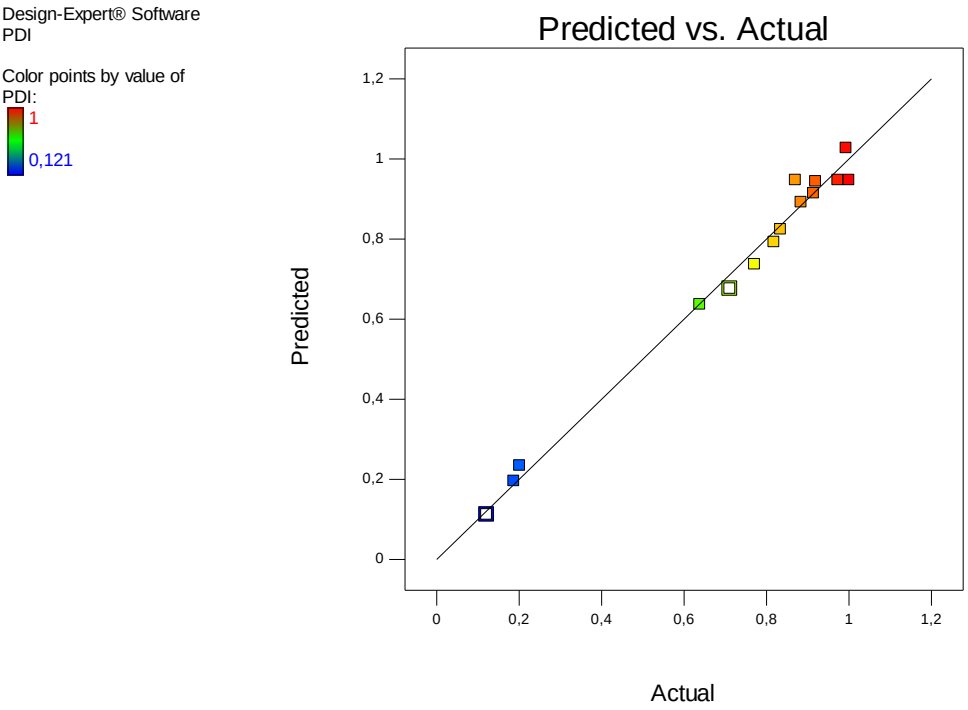


Şekil 4.70. Peceol®, Cremophor® RH 40 miktarının ve Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarları etkileşiminin PDİ üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

Damlacık büyüklüğü ve PDİ deney verileri ile matematiksel model sonucunda elde edilen tahmini veriler arasındaki ilişkinin korelasyon grafiği Şekil 4.71 ve 4.72'de görülmektedir.

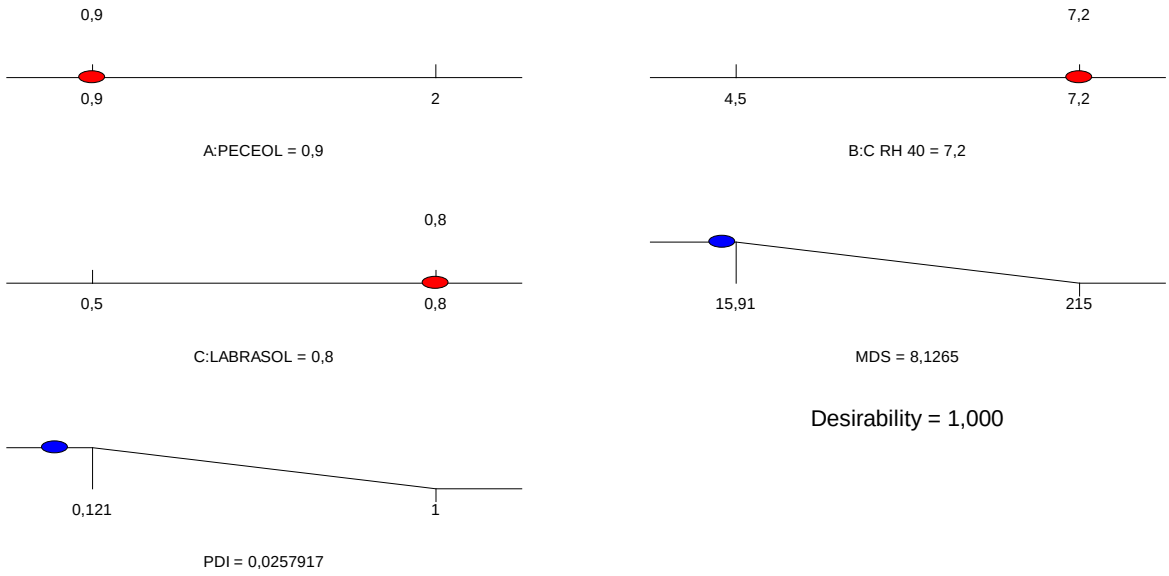


Şekil 4.71. Peceol® SNEDDS formülasyonunda damlacık büyüklüğüne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği



Şekil 4.72. Peceol® SNEDDS formülasyonunda PDİ'ne ait deneysel veriler ile model sonucu oluşan tahmini verilerin korelasyon grafiği

Geliştirilecek SNEDDS formülasyonun hedeflenen karakterizasyon özelliklerinin damlacık boyutu <100 nm ve PDİ'nin <0,2 olması amaçlanmaktadır. Şekil 4.73'te deney tasarımı ile model sonucu belirlenen yağ, sürfaktan ve kosürfaktan miktarları ve formülasyonun karakterizasyon özellikleri ve Çizelge 4.55'te formülasyonun deney şartlarında 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.73. Peceol® SNEDDS hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri

Çizelge 4.55. Peceol® SNEDDS hedef formülasyonun 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri

Yanıtlar	Ortalama	Medyan	SS	n	%95 PI low	%95 PI high
Damlacık büyüklüğü (nm)	8,127	8,127	3,06	1	-2,32	18,57
PDİ	0,026	0,026	0,056	1	-0,200	0,250

SS: Standart sapma

Şekil 4.73'te seçilen formülasyon matematik model sonucu 2 yönlü %95 güven aralığı analizi sonucunda damlacık boyutu 8,13 nm ve PDİ'si 0,026 olan sonuç verirken, damlacık boyutu değeri deneysel ortamda 2,32 nm < DB < 18,57 nm arasında, PDİ sonucu da 0,200 < PDİ < 0,250 arasında olmalıdır.

Hedeflenen karakterizasyon ölçütlerine göre bileşimi Şekil 4.73'te belirtilen ve seçilen hedef formülasyonun deneysel çalışmalar sonucunda damlacık boyutu ve PDİ sonuçları Çizelge 4.56'da verilmiştir. Aday hedef formülasyon bileşimi Çizelge 4.55'te %95 güven aralığıyla verilen aralıkta çıkmıştır ve 0,9: 7,2: 0,8 - Peceol®: Cremophor® RH 40: Labrasol® sistemi optimum formülasyon olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.56. Deneysel çalışmalar sonucunda Peceol® SNEDDS formülasyonu için elde edilen karakterizasyon özellikleri

Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008

X_{ort} ± SS, n=3

4.4.4. Etkin madde yükleme çalışmaları

Etkin madde yükleme çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. BBD ile elde edilen ve bileşenlerin oranları belirlenmiş optimum Maisine® SNEDDS formülasyonun 1 g'ına 30 mg, Peceol® SNEDDS formülasyonun 1 g'ına 28 mg BOS yüklenmiştir.

4.4.5. Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmaları

Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi

Disperse olabilme çalışmaları

İki formülasyonda bir dakika içinde disperse olarak şeffaf görünümde sistemler oluşmuştur. Deney sonunda belirlenen süre ve görünümleri neticesinde her iki formülasyon derecelendirme sisteminde A'da yer almıştır ve sonuçlar Çizelge 4.57'de verilmiştir. Elde edilen sonuç doğrultusunda her iki formülasyonunda GI sıvı ile seyreldiğinde kendiliğinden nanoemülsiyon oluşturduğundan emin olunmuştur.

Çizelge 4.57. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait disperse olabilme sonuçları

		Görünüm	Derece
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	Şeffaf	A
	P–SNEDDS formülasyon	Şeffaf	A
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	Şeffaf	A
	P–SNEDDS formülasyon	Şeffaf	A

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS

Kendiliğinden emülsifiye olma zamanı

Formülasyonlar bir dakikanın altında kendiliğinden emülsifiye olarak şeffaf bir sistem oluşmuştur. Kendiliğinden emülsifiye olabildiği zaman, oluşan sisteme ait görünüm ve sonuçlar Çizelge 4.58'de verilmiştir.

Çizelge 4.58. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait kendiliğinden emülsifiye olma zamanı sonuçları

		Süre (sn)	Görünüm
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	58 ± 3	Şeffaf
	P–SNEDDS formülasyon	60 ± 0	Şeffaf
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	47 ± 4	Şeffaf
	P–SNEDDS formülasyon	54 ± 6	Şeffaf

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

% Transmittans

Her bir formülasyonu ve formülasyonu oluşturan bileşenlere ait % transmittans değerleri Çizelge 4.59'da verilmiştir.

Çizelge 4.59. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar ve bileşenlerine ait % transmittans sonuçları

		% Transmittans
Labrasol®		95 ± 0
Maisine®		98 ± 0
Peceol®		100 ± 1
Cremophor® RH 40		100 ± 0
Boş Maisine® SNEDDS formülasyon		99 ± 0
Boş Peceol® SNEDDS formülasyon		100 ± 0
BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyon		99 ± 0
	1:250 distile su	100 ± 0
BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyon		100 ± 0
	1:250 distile su	100 ± 0

X_{ort} ± SS, n=3

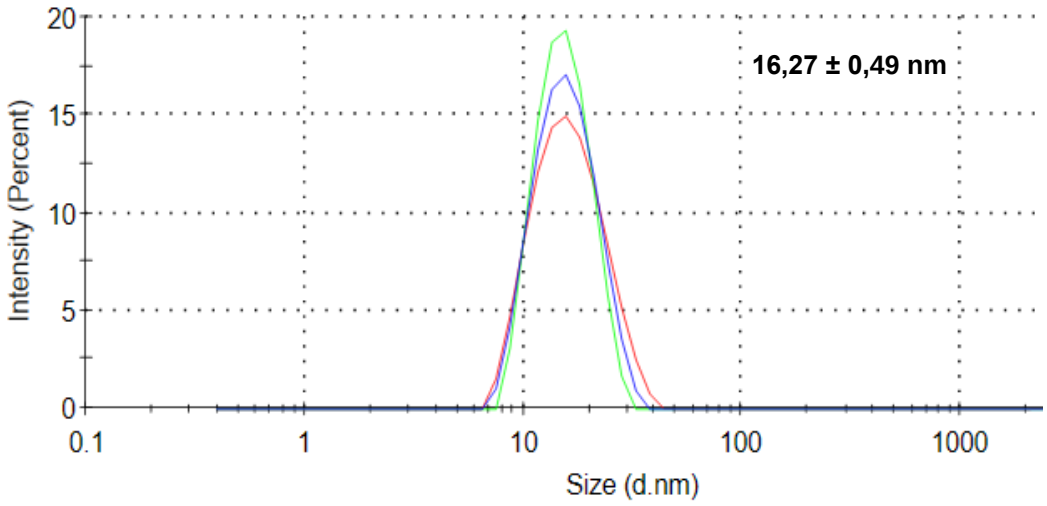
Damlacık büyüklüğü ve PDİ

Etkin madde yüklenecek boş sistem için Design Expert® 10 ile elde edilen kabul edilebilir optimum Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait sonuçlar ile bu formülasyonlara etkin madde yüklendikten sonraki damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları Çizelge 4.60'ta, damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları Şekil 4.74 - 4.77'de verilmiştir.

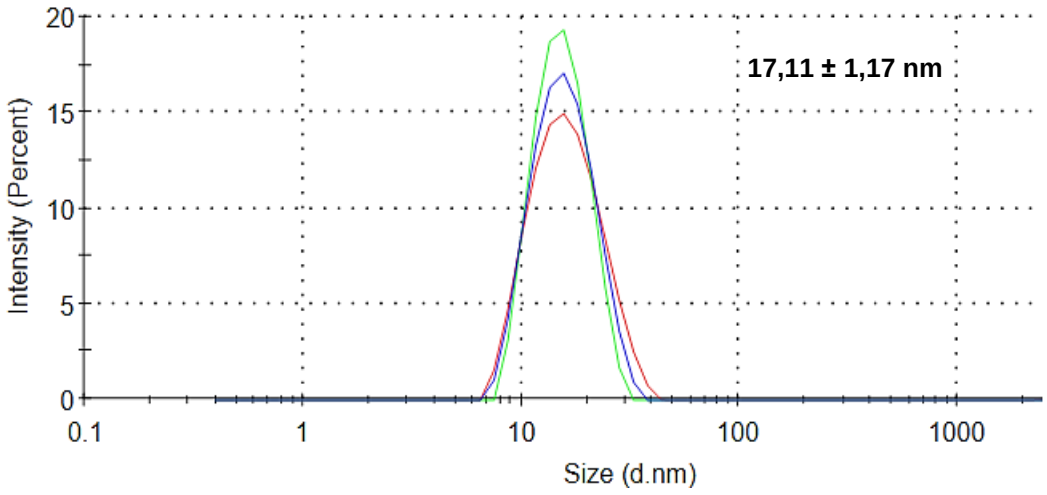
Çizelge 4.60. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları

		Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044
	P–SNEDDS formülasyon	14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	17,11 ± 1,17	0,180 ± 0,063
	P–SNEDDS formülasyon	16,76 ± 1,78	0,200 ± 0,025

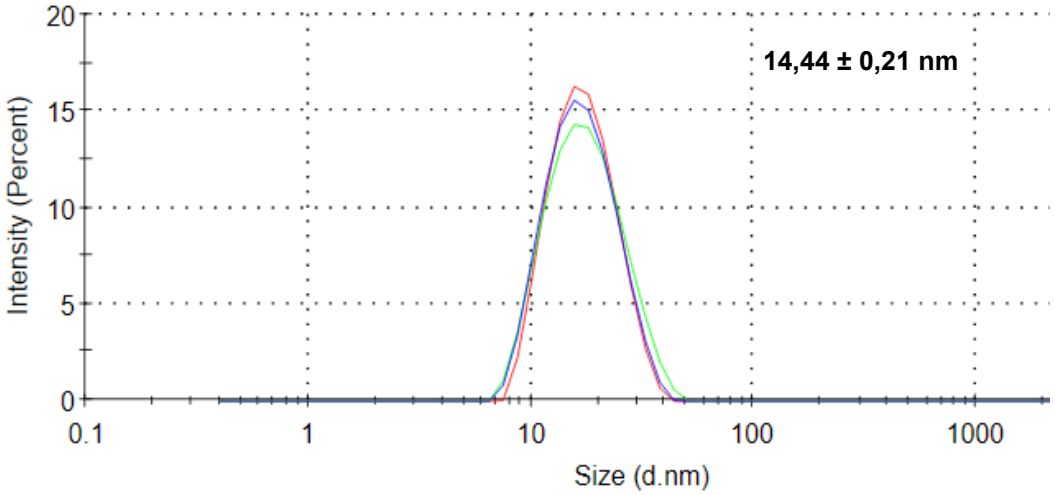
M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3



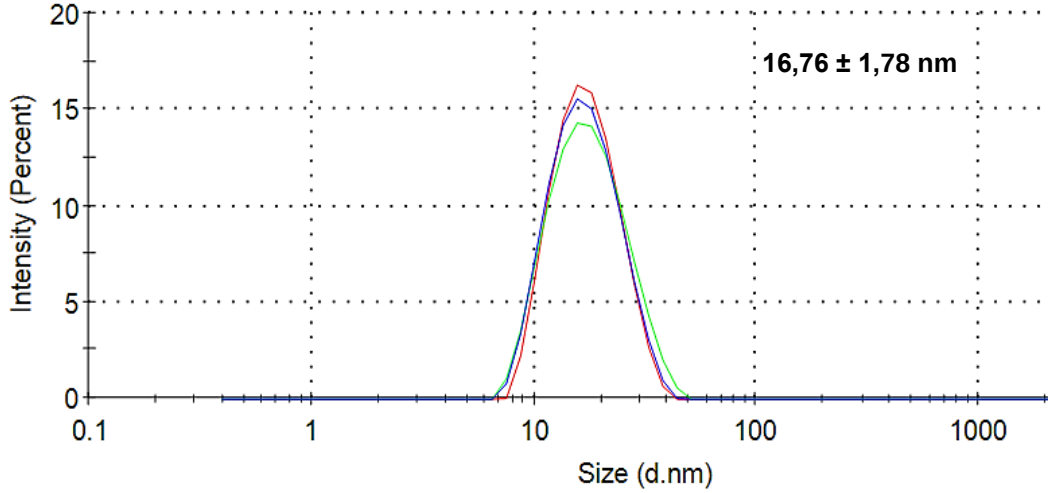
Şekil 4.74. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları



Şekil 4.75. BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları



Şekil 4.76. Etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları



Şekil 4.77. BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyon nanoemülsiyonlarının damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımları

Damlacık büyüklüğü ve PDİ'ye pH ve sıvı hacminin etkisi

Damlacık büyüklüğü ve PDİ üzerine pH ve sıvı hacminin etkisi için her iki formülasyondan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.61 ve 4.62'de verilmiştir.

Çizelge 4.61. Maisine® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü ve PDİ'sine pH ve sıvı hacmi etkisinin sonuçları

		Seyreltme oranı	Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
Etkin madde içermeyen	Distile su	1:100	17,50 ± 1,66	0,163 ± 0,050
		1:250	16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044
		1:500	18,44 ± 1,27	0,212 ± 0,019
	pH 1,2	1:100	16,92 ± 0,70	0,124 ± 0,032
		1:250	17,48 ± 0,33	0,144 ± 0,034
		1:500	17,56 ± 1,18	0,161 ± 0,045
	pH 6,8	1:100	16,70 ± 0,49	0,109 ± 0,026
		1:250	17,26 ± 0,92	0,143 ± 0,054
		1:500	24,98 ± 1,58	0,210 ± 0,017
BOS yüklü	Distile su	1:100	19,46 ± 7,79	0,082 ± 0,021
		1:250	17,11 ± 1,17	0,180 ± 0,063
		1:500	19,10 ± 2,85	0,206 ± 0,024
	pH 1,2	1:100	23,08 ± 12,79	0,150 ± 0,061
		1:250	16,26 ± 0,69	0,163 ± 0,052
		1:500	21,76 ± 2,18	0,210 ± 0,043
	pH 6,8	1:100	15,92 ± 0,72	0,131 ± 0,047
		1:250	17,57 ± 2,42	0,187 ± 0,060
		1:500	21,16 ± 3,59	0,206 ± 0,038

X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.62. Peceol® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü ve PDİ'sine pH ve sıvı hacminin etkisinin sonuçları

		Seyreltme oranı	Damlacık büyüklüğü	PDİ
Etkin madde içermeyen	Distile su	1:100	15,75 ± 0,35	0,082 ± 0,021
		1:250	14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008
		1:500	24,57 ± 0,47	0,220 ± 0,018
	pH 1,2	1:100	16,31 ± 1,02	0,131 ± 0,080
		1:250	17,97 ± 2,45	0,153 ± 0,064
		1:500	17,57 ± 2,00	0,161 ± 0,065
	pH 6,8	1:100	16,50 ± 0,52	0,131 ± 0,047
		1:250	17,62 ± 0,35	0,233 ± 0,014
		1:500	19,39 ± 0,88	0,231 ± 0,022
BOS yüklü	Distile su	1:100	15,38 ± 1,18	0,160 ± 0,046
		1:250	16,76 ± 1,78	0,200 ± 0,025
		1:500	25,17 ± 10,91	0,178 ± 0,051
	pH 1,2	1:100	18,03 ± 1,40	0,205 ± 0,026
		1:250	27,00 ± 15,39	0,201 ± 0,057
		1:500	34,49 ± 20,88	0,225 ± 0,035
	pH 6,8	1:100	16,04 ± 0,78	0,128 ± 0,045
		1:250	16,96 ± 1,28	0,165 ± 0,032
		1:500	21,05 ± 1,21	0,230 ± 0,017

X_{ort} ± SS, n=3

Türbidite

Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait türbidite sonuçları Çizelge 4.63'te verilmiştir.

Çizelge 4.63. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait türbidite sonuçları

			Türbidite (NTU)
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**		5,8 ± 0,1
	P–SNEDDS formülasyon		5,6 ± 0,1
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**		12,3 ± 0,2
		1:250	9,9 ± 0,1
	P–SNEDDS formülasyon		12,4 ± 0,2
		1:250	10,9 ± 0,3

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Viskozite

Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait viskozite sonuçları Çizelge 4.64'te verilmiştir.

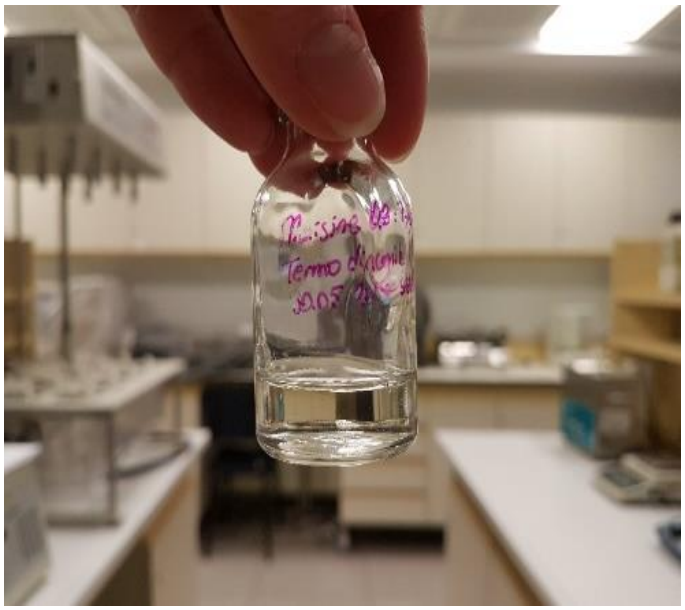
Çizelge 4.64. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait viskozite sonuçları

		Viskozite (cp)
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	684
	P–SNEDDS formülasyon	652
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	571
	P–SNEDDS formülasyon	474

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, n=3

Termodinamik stabilite çalışmaları

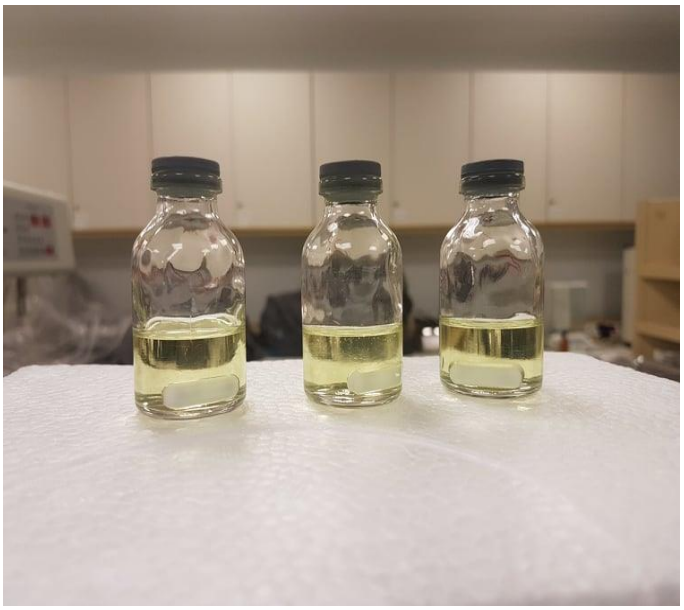
Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları termodinamik stabilite çalışmaları ile damlacık büyüklüğü ve PDİ açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.65 - 4.67). Termodinamik stabilite çalışmaları sonucunda herhangi bir fiziksel değişiklik gözlenmemiştir (Resim 4.1 - 4.4).



Resim 4.1. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonuna ait görsel



Resim 4.2. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonuna ait görsel



Resim 4.3. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonuna ait görsel



Resim 4.4. Termodinamik stabilite çalışmaları sonrası BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonuna ait görsel

Isıtma – soğutma

Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için ısıtma-soğutma döngüsünden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.65'te verilmiştir.

Çizelge 4.65. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait ısıtma-soğutma döngüsü sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları

			Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044
		Isıtma-soğutma sonrası	18,18 ± 2,42	0,172 ± 0,045
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008
		Isıtma-soğutma sonrası	16,15 ± 0,90	0,158 ± 0,066
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	17,11 ± 1,17	0,180 ± 0,063
		Isıtma-soğutma sonrası	20,35 ± 3,31	0,168 ± 0,040
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	16,76 ± 1,78	0,200 ± 0,025
		Isıtma-soğutma sonrası	16,67 ± 1,92	0,175 ± 0,080

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Santrifüj

Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için santrifüj çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.66'da verilmiştir.

Çizelge 4.66. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait santrifüj sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları

			Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044
		Santrifüj sonrası	17,36 ± 1,19	0,222 ± 0,031
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008
		Santrifüj sonrası	16,62 ± 0,05	0,262 ± 0,001
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	17,11 ± 1,17	0,180 ± 0,063
		Santrifüj sonrası	17,35 ± 2,16	0,170 ± 0,066
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	16,76 ± 1,78	0,200 ± 0,025
		Santrifüj sonrası	15,36 ± 0,67	0,136 ± 0,027

M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Dondurma-çözme (Freeze thaw)

Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için dondurma-çözme döngüsünden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.67'de verilmiştir.

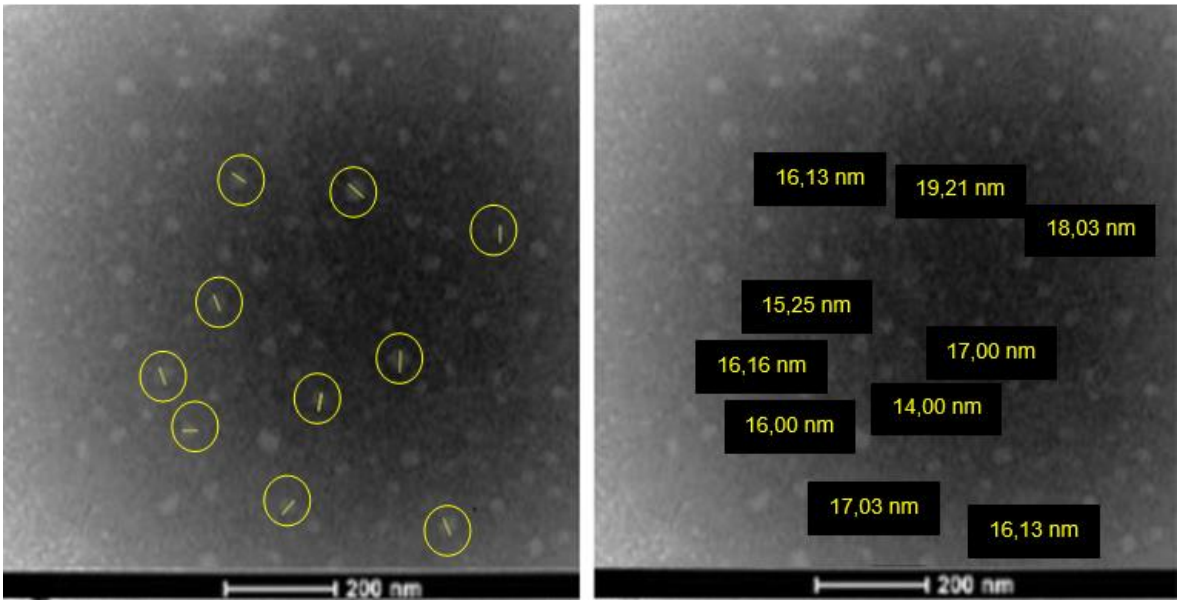
Çizelge 4.67. Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait dondurma-çözme sonrası damlacık büyüklüğü ve PDİ sonuçları

			Damlacık büyüklüğü (nm)	PDİ
Etkin madde içermeyen	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	16,27 ± 0,49	0,140 ± 0,044
		Dondurma-çözme sonrası	17,83 ± 2,81	0,178 ± 0,083
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	14,44 ± 0,21	0,149 ± 0,008
		Dondurma-çözme sonrası	16,95 ± 1,03	0,252 ± 0,047
BOS yüklü	**M–SNEDDS formülasyon**	Başlangıç	17,11 ± 1,17	0,180 ± 0,063
		Dondurma-çözme sonrası	20,13 ± 3,23	0,198 ± 0,023
	P–SNEDDS formülasyon	Başlangıç	16,76 ± 1,78	0,200 ± 0,025
		Dondurma-çözme sonrası	16,58 ± 1,79	0,229 ± 0,038

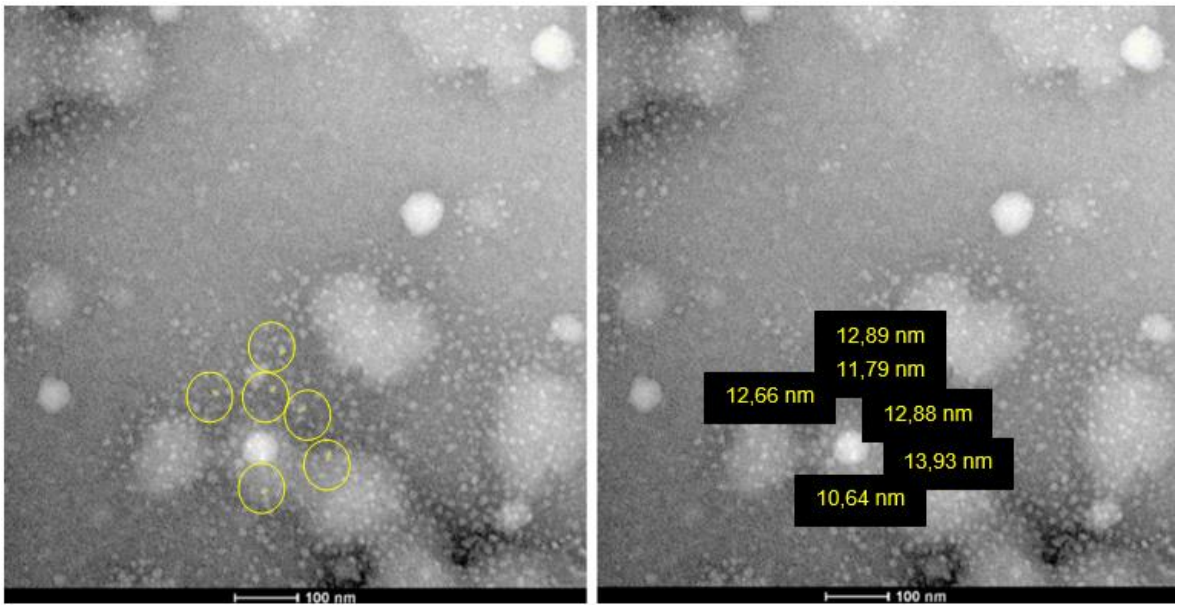
M-SNEDDS: Maisine® SNEDDS, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Morfolojik çalışmalar

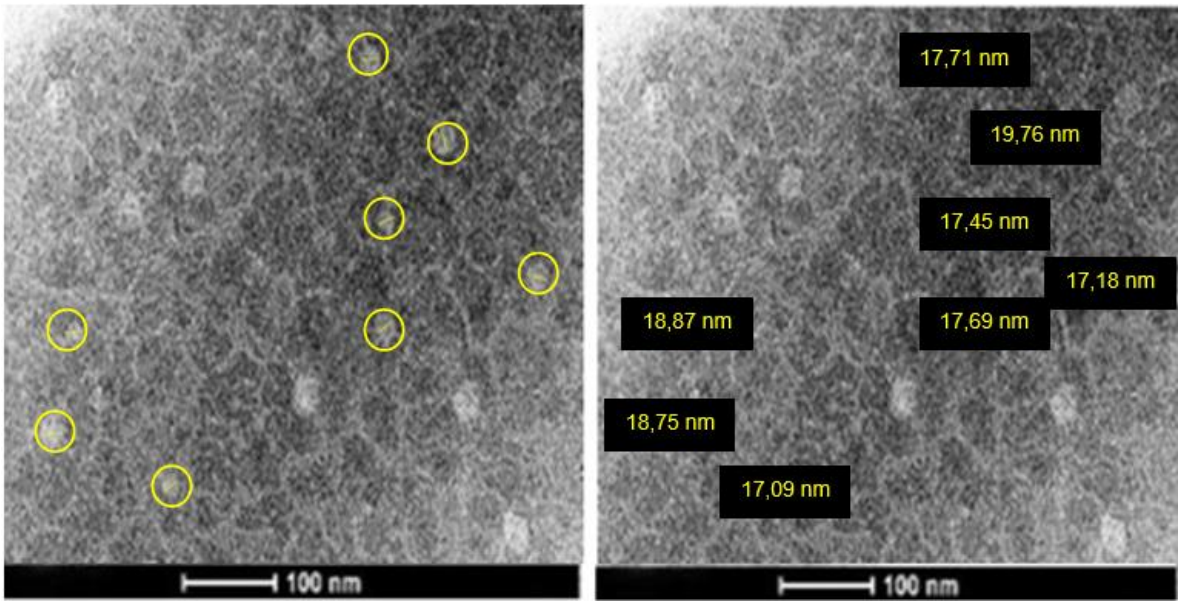
Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait morfolojik TEM çalışma sonuçları Resim 4.5 - 4.8'de verilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma ile nanoemülsiyonların oluştuğu ve etkin madde yüklemesi ile yapısal bütünlüklerinin bozulmadığı gözlenmiştir. TEM görüntüleri üzerinde ImageJ 1.53o programı ile değerlendirilen damlacık boyutlarının Malvern Zeta Sizer ile elde edilen damlacık boyutlarına ait sonuçlar ile benzer olduğu bulunmuştur.



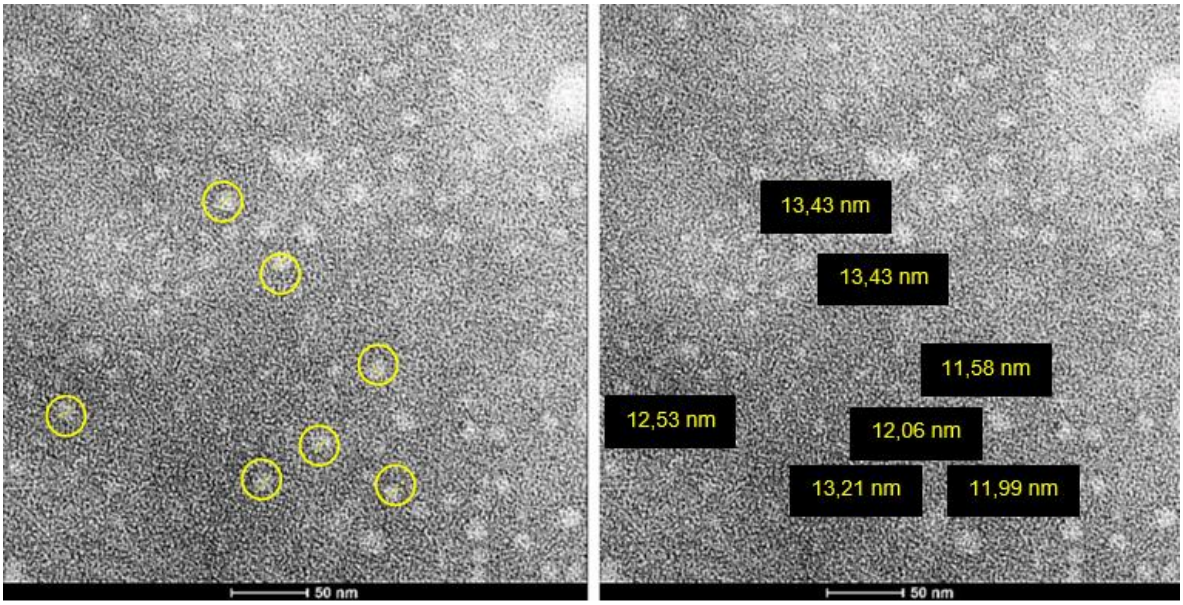
Resim 4.5. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü



Resim 4.6. Etkin madde içermeyen Peceol® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü



Resim 4.7. BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü



Resim 4.8. BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu için TEM görüntüsü

Uzun dönem stabilite çalışmaları

Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar 6 ay boyunca 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN fiziksel ve kimyasal olarak stabil bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 4.68'de gösterilmiştir. Stabilite çalışmaları sırasında BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonların fiziksel görünüşünde bulanıklık veya çökme gibi herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar damlacık boyutu ve PDİ açısından incelendiğinde uzun süreli (25±2°C/%60±5 BN) ve hızlandırılmış stabilite koşullarında (4°C ve 40±2°C/%75) bir değişiklik göstermemiş ve 6 ay için stabil bulunmuştur (40±2°C/%75±5 BN).

Çizelge 4.68. BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarına ait uzun dönem stabilite sonuçları

	Zaman (Ay)	Damlacık büyüklüğü (nm) M-SNEDDS	Damlacık büyüklüğü (nm) P-SNEDDS	PDİ M-SNEDDS	PDİ P-SNEDDS
		Etkin madde içermeyen			
4°C	0	16,27 ± 0,49	14,44 ± 0,21	0,140 ± 0,044	0,149 ± 0,008
	1	20,86 ± 1,50	17,13 ± 1,70	0,208 ± 0,006	0,178 ± 0,078
	3	16,46 ± 1,30	16,12 ± 1,26	0,138 ± 0,052	0,183 ± 0,050
	6	22,81 ± 2,82	17,84 ± 3,46	0,198 ± 0,015	0,135 ± 0,061
25±2°C %60±5 BN	0	16,27 ± 0,49	14,44 ± 0,21	0,140 ± 0,044	0,149 ± 0,008
	1	18,76 ± 3,09	17,74 ± 3,38	0,160 ± 0,081	0,201 ± 0,080
	3	17,11 ± 0,96	20,51 ± 1,92	0,175 ± 0,040	0,230 ± 0,016
	6	21,05 ± 2,54	15,71 ± 0,34	0,199 ± 0,014	0,108 ± 0,029
40±2°C %75±5 BN	0	16,27 ± 0,49	14,44 ± 0,21	0,140 ± 0,044	0,149 ± 0,008
	1	16,68 ± 0,67	16,85 ± 0,73	0,185 ± 0,027	0,193 ± 0,016
	3	19,39 ± 1,70	16,58 ± 2,22	0,193 ± 0,028	0,191 ± 0,044
	6	17,32 ± 2,59	19,66 ± 5,30	0,121 ± 0,069	0,165 ± 0,029
		BOS yüklü			
4°C	0	17,11 ± 1,17	14,44 ± 0,21	0,180 ± 0,063	0,149 ± 0,008
	1	19,09 ± 2,61	23,22 ± 6,93	0,207 ± 0,046	0,186 ± 0,043
	3	15,35 ± 0,49	17,20 ± 2,76	0,136 ± 0,038	0,202 ± 0,044
	6	17,60 ± 0,50	16,97 ± 1,18	0,178 ± 0,029	0,176 ± 0,063
25±2°C %60±5 BN	0	17,11 ± 1,17	14,44 ± 0,21	0,180 ± 0,063	0,149 ± 0,008
	1	16,47 ± 1,19	24,30 ± 2,29	0,159 ± 0,050	0,190 ± 0,072
	3	16,80 ± 0,28	15,40 ± 0,17	0,183 ± 0,002	0,154 ± 0,043
	6	18,58 ± 1,15	18,29 ± 1,86	0,156 ± 0,047	0,208 ± 0,058
40±2°C %75±5 BN	0	17,11 ± 1,17	14,44 ± 0,21	0,180 ± 0,063	0,149 ± 0,008
	1	19,84 ± 3,01	18,04 ± 3,32	0,207 ± 0,035	0,201 ± 0,031
	3	16,44 ± 1,70	15,21 ± 0,57	0,176 ± 0,023	0,128 ± 0,039
	6	20,21 ± 3,32	16,03 ± 1,13	0,166 ± 0,077	0,141 ± 0,065

X_{ort} ± SS, n=3

4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları - I

İn vitro çözünme hızı çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sıvı sistemlerden hangisinin katı forma dönüştürüleceğinin karar verilmesi açısından referans tablet, BOS yüklü Maisine® SNEDDS ve BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonları değerlendirilmiştir. Çalışmalar çözünme hız ortamı olarak FDA tarafından önerilen %1 SLS içeren distile su ve biyouyumlu ortamlar olan FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2'de Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme hızı test sonuçları sırasıyla Çizelge 4.69 - 4.73'te, çözünme hızı profilleri ise Şekil 4.78 - 4.82'de verilmiştir.

%1 SLS içeren distile su ortamına ait bağıl sink koşul değerleri referans tablet için 10,3, Maisine® SNEDDS formülasyon için 44,4 ve Peceol® SNEDDS formülasyon için 47,6 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.69. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	90,2 ± 2,6	96,9 ± 5,4	100,26 ± 2,3	101 ± 2	102 ± 1
P-SNEDDS	90,2 ± 13,4	101 ± 3	102 ± 1,4	103 ± 1	103 ± 1
M-SNEDDS	80,2 ± 20,0	103 ± 0	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 1

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.70. FaSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	21,9 ± 0,3	27,3 ± 0,8	30,1 ± 0,3	31,8 ± 0,1	32,4 ± 2,9
P-SNEDDS	68,8 ± 1,24	88,5 ± 3,01	95,4 ± 1,4	95,4 ± 1,1	96,4 ± 1,6
M-SNEDDS	82,5 ± 4,6	94,7 ± 1,0	97,4 ± 0,3	97,1 ± 0,7	97,2 ± 1,2

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.71. FeSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	8,72 ± 0,93	10,1 ± 0,1	10,7 ± 0,9	10,7 ± 0,5	11,0 ± 0,1
P-SNEDDS	80,7 ± 3,5	85,6 ± 0,4	86,2 ± 1,1	86,5 ± 0,7	86,8 ± 0,4
M-SNEDDS	70,6 ± 6,1	84,6 ± 1,3	86,7 ± 1,4	87,3 ± 2,1	87,8 ± 1,0

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.72. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

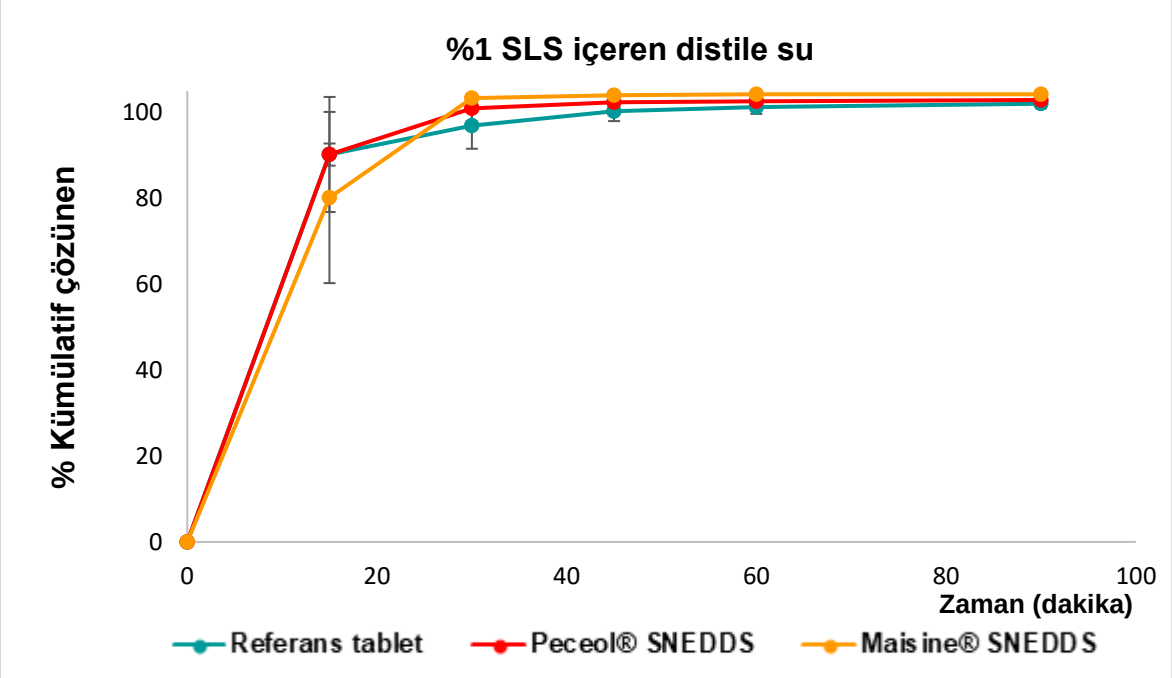
% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	14,9 ± 0,35	17,9 ± 0,5	19,7 ± 0,8	20,5 ± 0,2	22,3 ± 0,8
P-SNEDDS	57,7 ± 3,54	76,6 ± 1,6	81,6 ± 0,4	82,2 ± 0,3	85,3 ± 0,6
M-SNEDDS	81,5 ± 11,3	89,0 ± 2,4	93,1 ± 0,5	94,1 ± 0,4	94,1 ± 0,8

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

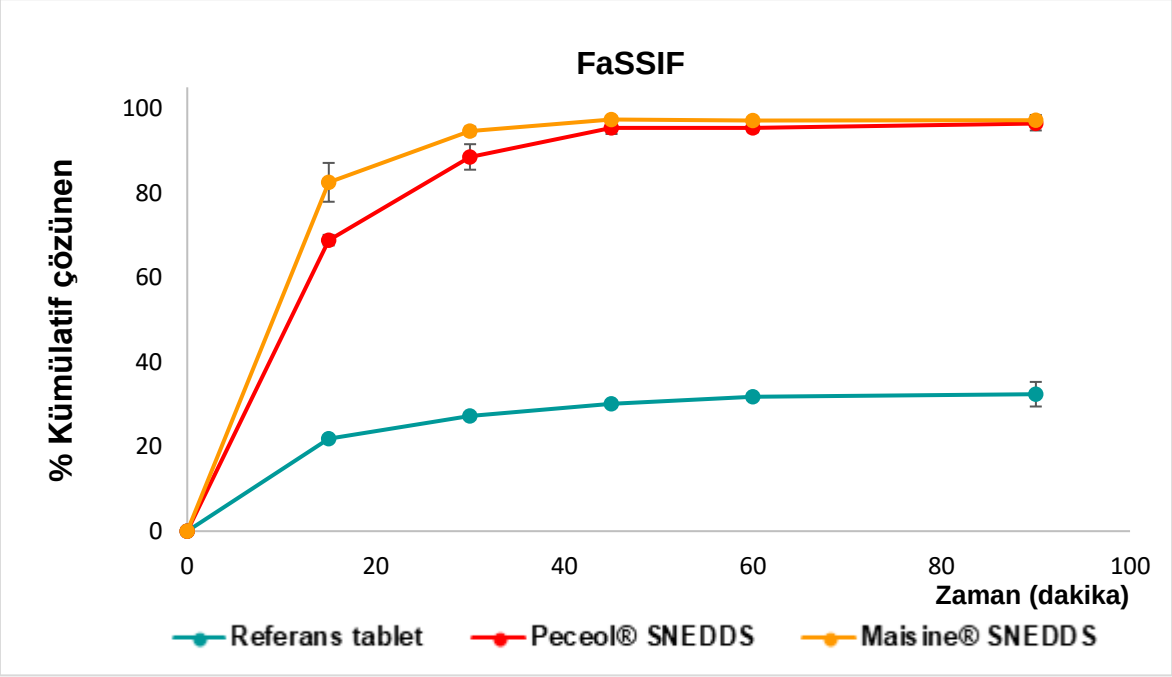
Çizelge 4.73. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	16,7 ± 0,2	18,6 ± 0,5	19,3 ± 1,7	19,3 ± 0,3	20,1 ± 2,6
P-SNEDDS	68,1 ± 5,9	83,5 ± 2,9	91,2 ± 0,6	87,2 ± 0,3	87,7 ± 0,3
M-SNEDDS	91,5 ± 10,2	93,6 ± 3,3	98,7 ± 2,9	99,5 ± 1,9	99,1 ± 1,7

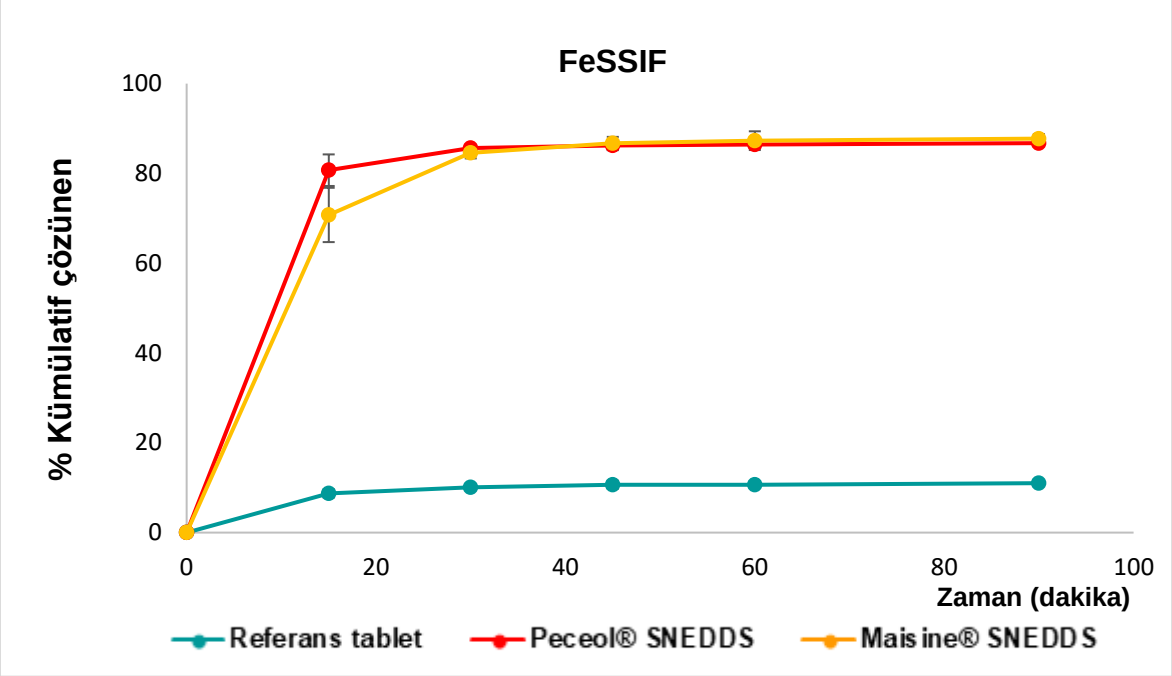
Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3



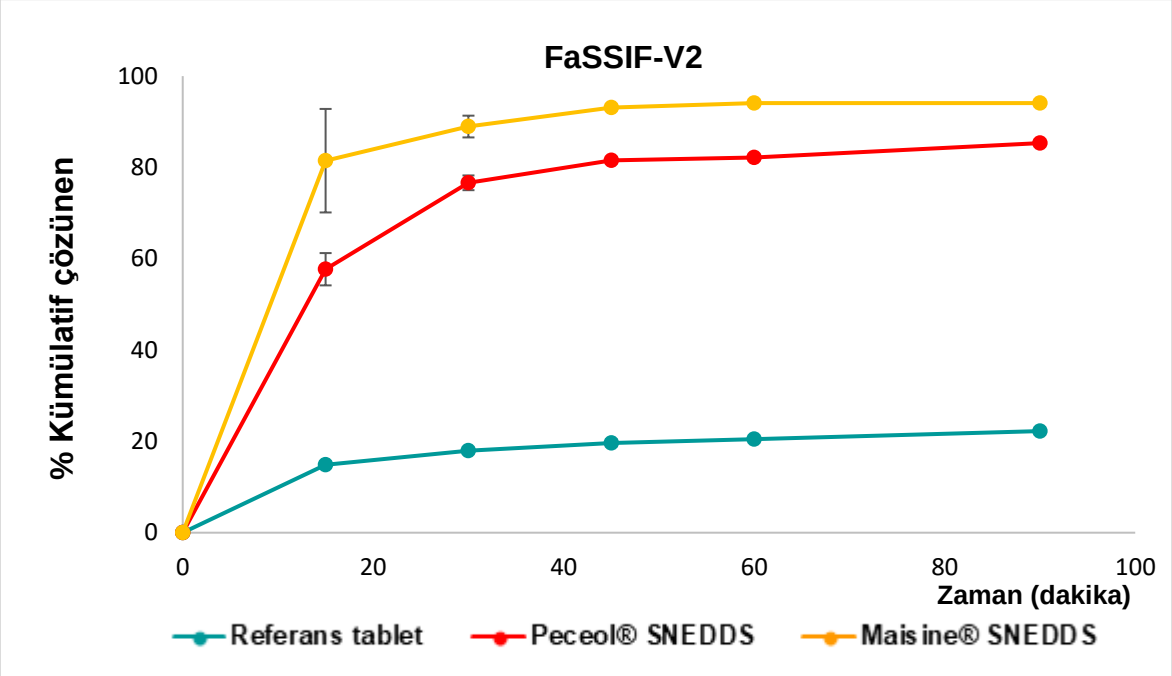
Şekil 4.78. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



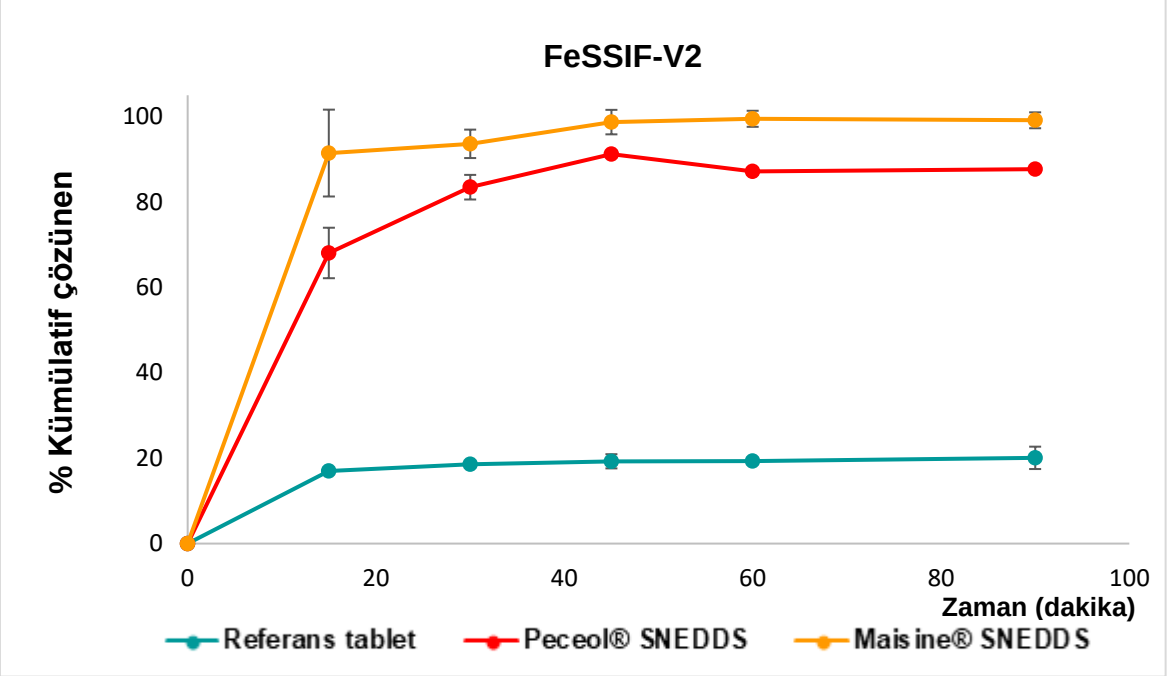
Şekil 4.79. FaSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.80. FeSSIF ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.81. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.82. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet ve SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri

BOS %1 SLS içeren distile su ortamında BOS yüklü Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlardan ve referans tabletten 15 dakika içinde ve %80'den fazla, 45 dakika içinde ise etkin maddenin tamamını salmıştır.

Biyouyumlu ortamları taklit eden FaSSIF ortamında referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %32'sini salarken, BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu 15 dakika içinde yaklaşık %69'unu, BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu yaklaşık %83'ünü salmıştır. 90 dakika sonunda ise BOS yüklü Peceol® ve Maisine® SNEDDS formülasyonları sırasıyla içeriğindeki etkin maddenin %96 ve %97'sini salmıştır. FeSSIF ortamında ise referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %11'ini salarken, BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu %87'sini, BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu %88'ini salmıştır.

Biyouyumlu ortamların geliştirilen ikinci versiyonları olan FaSSIF-V2 ortamında referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %22'sini salarken, BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu 15 dakika içinde yaklaşık %58'sini, BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu yaklaşık %82'sini salmıştır. 90 dakika sonunda ise BOS yüklü Peceol® ve Maisine® SNEDDS formülasyonları sırasıyla

içeriğindeki etkin maddenin %85 ve %94'ünü salmıştır. FeSSIF-V2 ortamında ise referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %20'sini salarken, BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonu %88'sini, BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu %99'unu salmıştır.

Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS formülasyonların farklı ortamlardaki in vitro çözünme hızı çalışmalarından 90 dakika sonunda elde edilen % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel anlamlılıkları Çizelge 4.74'te verilmiştir. Biyouyumlu ortamlar FaSSIF ve FeSSIF ile ikinci versiyonları olan FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için referans ve SNEDDS formülasyonların 90 dakika sonunda elde edilen % kümülatif çözünen etkin madde miktarı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.74. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS formülasyonların % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi

	%1 SLS içeren distile su	**FaSSIF**	**FeSSIF**	**FaSSIF-V2**	**FeSSIF-V2**
Referans-T / M-SNEDDS	p>0,05	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*
Referans-T / P-SNEDDS	p>0,05	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, * istatistiksel olarak anlamlıdır

Geliştirilen SNEDDS formülasyonlardan BOS'un artan çözünme hızı kendiliğinden oluşan nanoemülsiyon sonucunda damlacık boyutunun küçük olması ve yüzey alanının genişlemesi sonucunda gerçekleşmektedir. Geliştirilen formülasyonlarla etkin maddenin artan çözünürlüğü ve çözünme hızı nedeniyle in vivo ortamda referans tablete göre daha yüksek emilim ve oral biyoyararlanım sağlayabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen tüm karakterizasyon verilerinden hareketle geliştirilen iki formülasyondan BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonu bundan sonraki çalışmalar için seçilmiştir.

4.6. S-SNEDDS Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

4.6.1. S-SNEDDS için toz özelliklerinin incelenmesi

Toz özelliklerinin incelenmesi çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi yapılmış BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2 ile katı forma getirilmesi için 1:1, 1,25:1, 1,5:1 (sırasıyla her biri sıvı BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2) olmak üzere 3 farklı oran denenmiştir. Başlangıç ve 12. ay sonundaki toz özelliklerine ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Küme dansitesi

1:1, 1,25:1, 1,5:1 BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için başlangıç ve 12. ay sonundaki küme dansitesi sonuçları Çizelge 4.75'te verilmiştir.

Çizelge 4.75. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için küme dansitesi sonuçları

		1:1	1,25:1	1,5:1
Küme dansitesi (g/mL)	**Başlangıç**	0,33	0,36	0,36
	12. ay	0,32	0,34	0,37

Sıkıştırılmış dansite

1:1, 1,25:1, 1,5:1 BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için başlangıç ve 12. ay sonundaki sıkıştırılmış dansite sonuçları Çizelge 4.76'da verilmiştir.

Çizelge 4.76. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için sıkıştırılmış dansite sonuçları

		1:1	1,25:1	1,5:1
Sıkıştırılmış dansite (g/mL)	**Başlangıç**	0,39	0,44	0,47
	12. ay	0,40	0,41	0,43

Yığın açısı

1:1, 1,25:1, 1,5:1 BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için başlangıç ve 12. ay sonundaki yığın açısı sonuçları Çizelge 4.77'de verilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.9'a göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.77. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için yığın açısı sonuçları

		1:1	1,25:1	1,5:1
Yığın açısı (°)	**Başlangıç**	20,5	22,6	23,9
	12. ay	13,1	14,4	12,5

Carr indeksi

1:1, 1,25:1, 1,5:1 BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için başlangıç ve 12. ay sonundaki Carr indeksi sonuçları Çizelge 4.78'de verilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.10'a göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.78. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için Carr indeksi sonuçları

		1:1	1,25:1	1,5:1
Carr indeksi (%)	**Başlangıç**	15	18	23
	12. ay	20	18	14

Hausner oranı

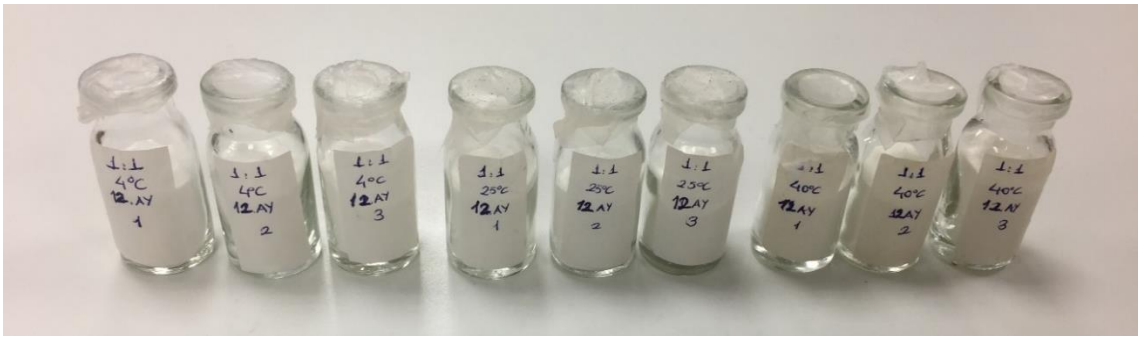
1:1, 1,25:1, 1,5:1 BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için başlangıç ve 12. ay sonundaki Hausner oranı sonuçları Çizelge 4.79'da verilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.11'e göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.79. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 oranları için Hausner oranı sonuçları

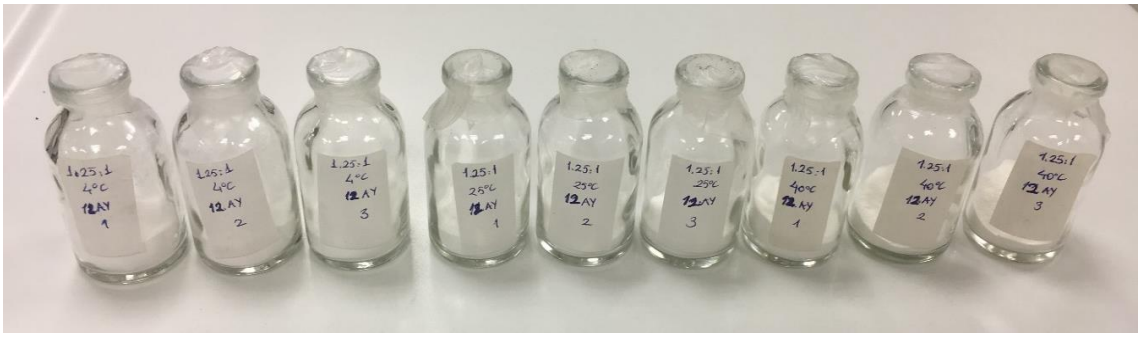
		1:1	1,25:1	1,5:1
Hausner oranı	**Başlangıç**	1,18	1,22	1,31
	12. ay	1,24	1,22	1,16

Uzun dönem stabilite çalışmaları

S-SNEDDS toz kütlelerinin stabilitesi 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulları altında 1, 3, 6 ve 12. ay için değerlendirilmiştir. Çalışmada 12. ay sonunda toz özellikleri açısından da incelenen 3 oran tekrar değerlendirilmiştir ve sonuçlar başlangıç için elde edilen veriler ile Çizelge 4.75 - 4.79'da verilmiştir. 1:1, 1,25:1 ve 1,5:1 oranlarına ait görseller sırasıyla Resim 4.9 - 4.11'de verilmiştir.



Resim 4.9. 1:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri



Resim 4.10. 1,25:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri

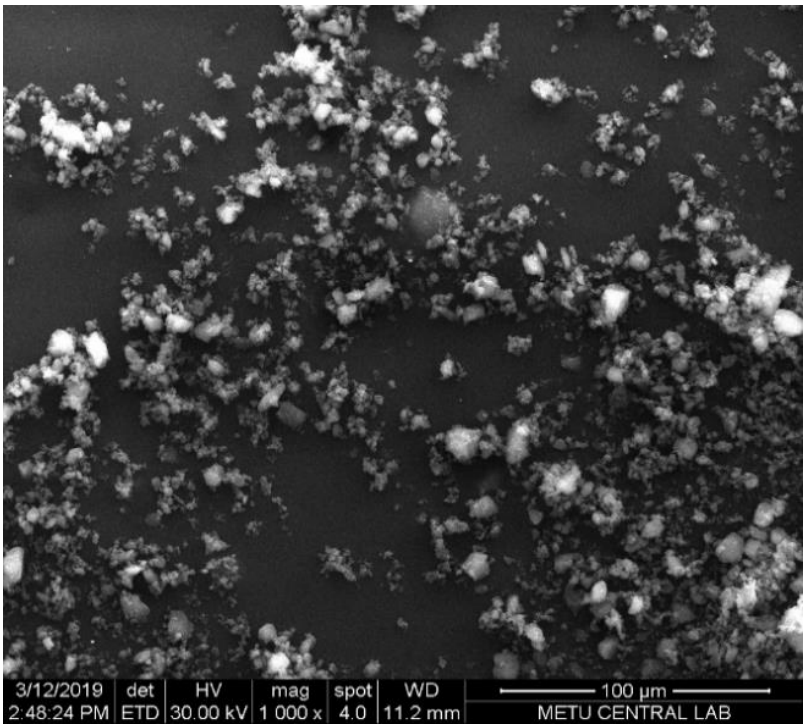


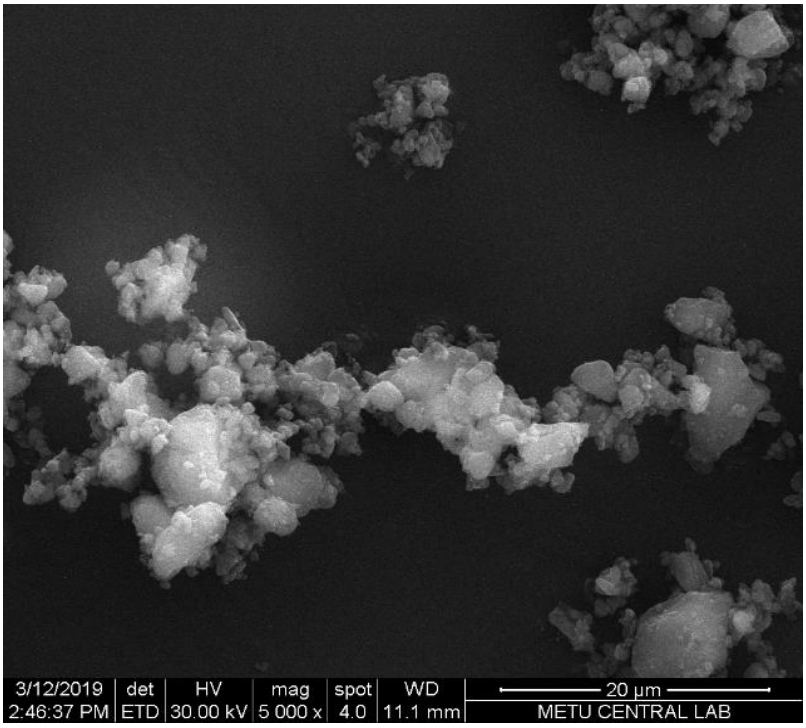
Resim 4.11. 1,5:1 oranında hazırlanan toz kütlelerine ait 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN stabilite örnekleri

4.6.2. S-SNEDDS tozun katı hal karakterizasyonu

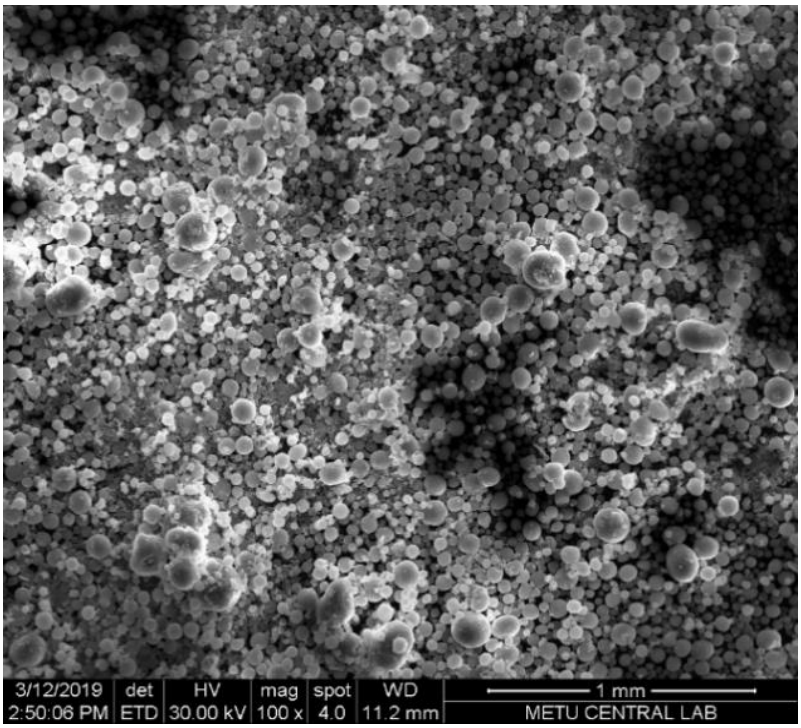
SEM görüntüleme

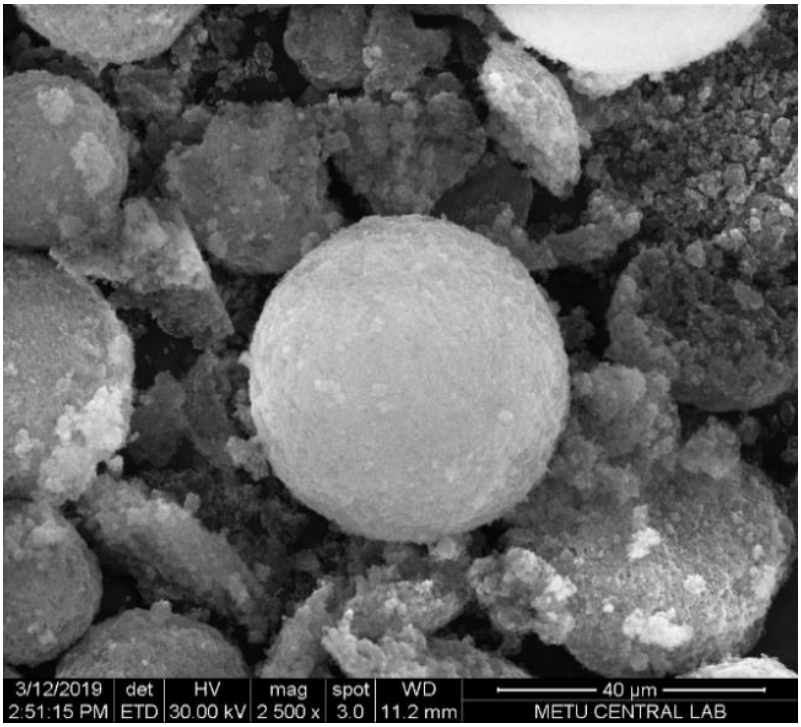
BOS, Neusilin® US2, tablet formülasyonu için kullanılacak olan toz kütlelerinin SEM görüntülemesi Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve görüntüleme sonuçları Resim 4.12 - 4.19'da verilmiştir.



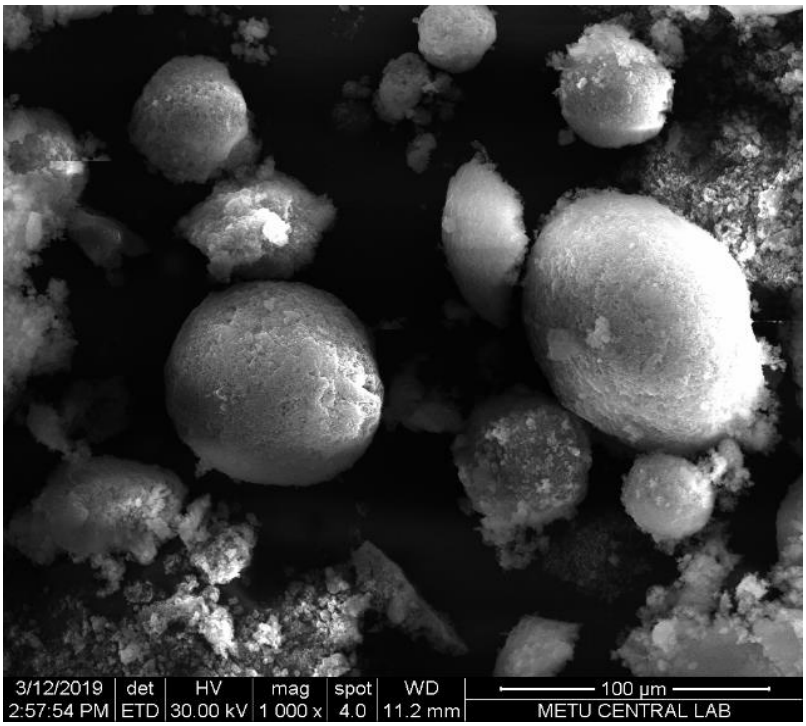


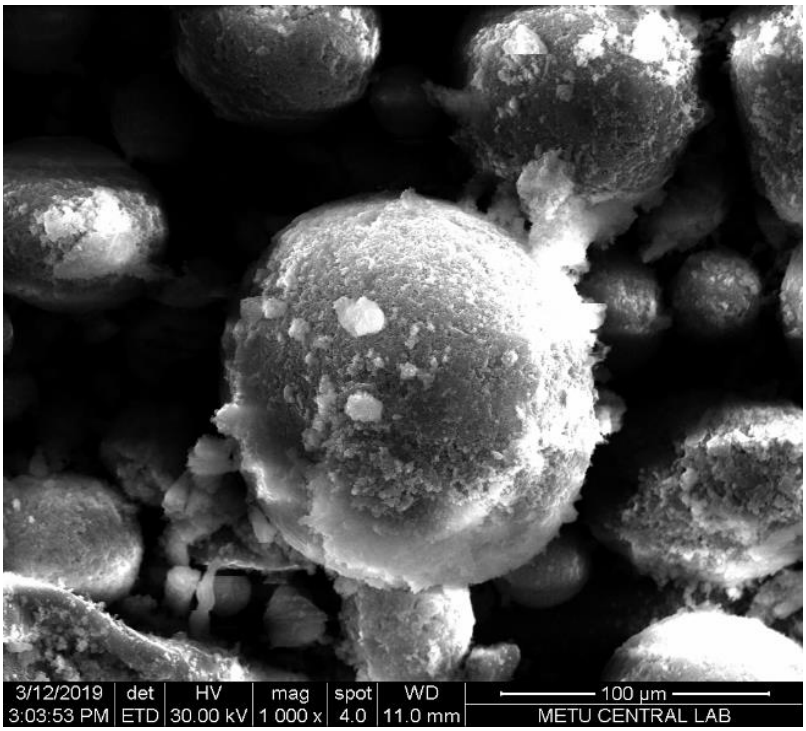
Resim 4.12. BOS'a ait 1000 X ve 5000 X ölçekli SEM görüntüleri



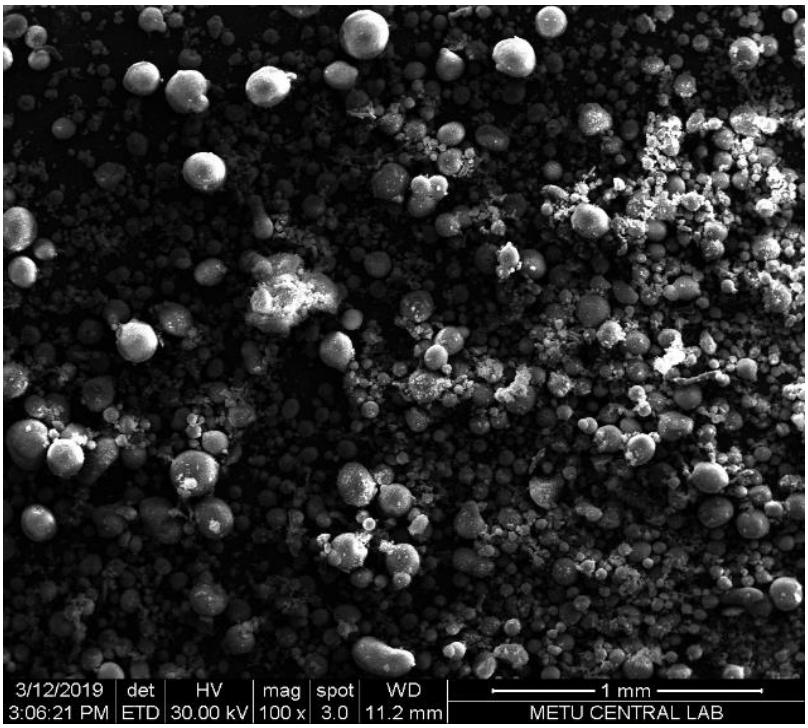


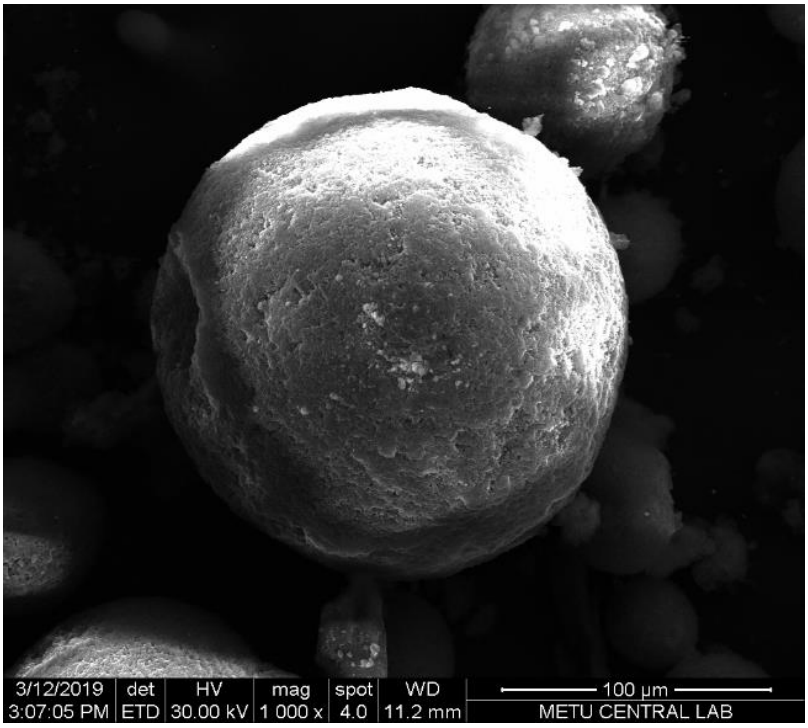
Resim 4.13. Neusilin® US2'ye ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri



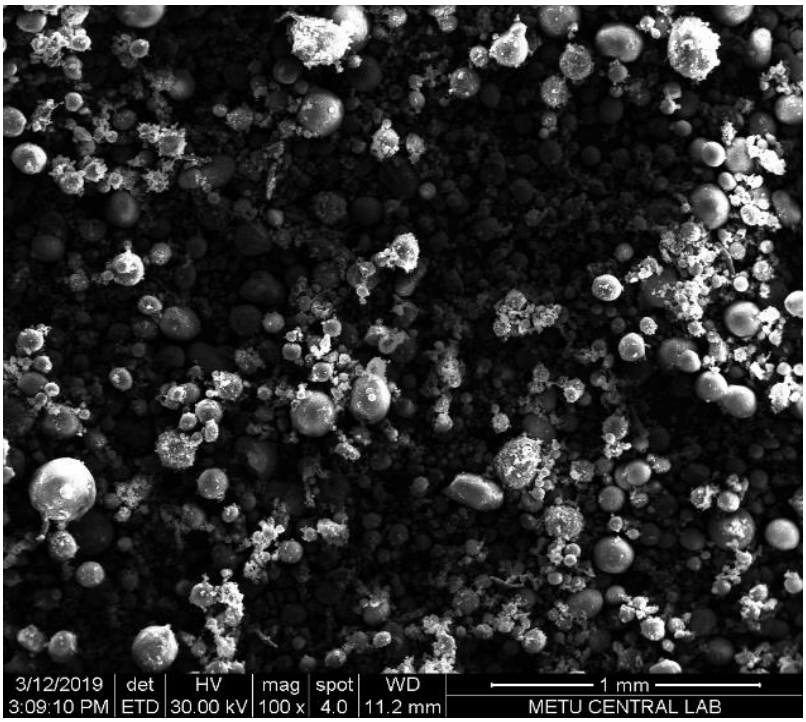


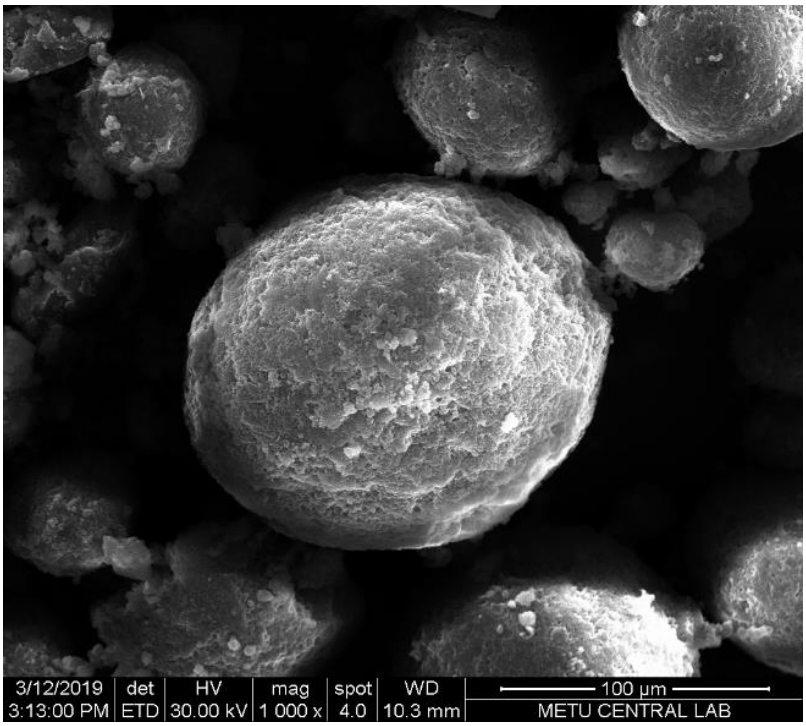
Resim 4.14. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait 1000 X ölçekli SEM görüntüleri



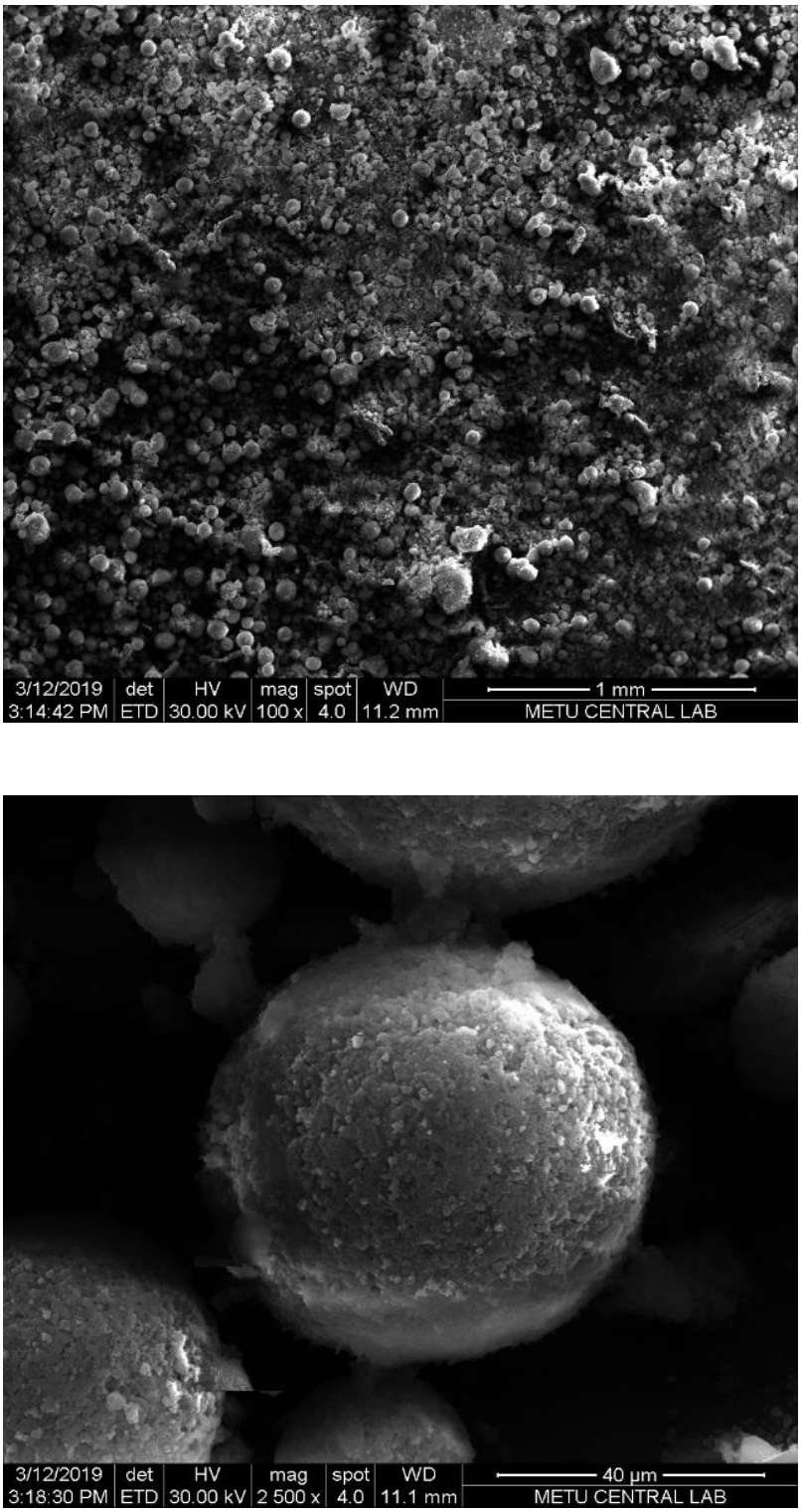


Resim 4.15. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait 100 X ve 1000 X ölçekli SEM görüntüleri

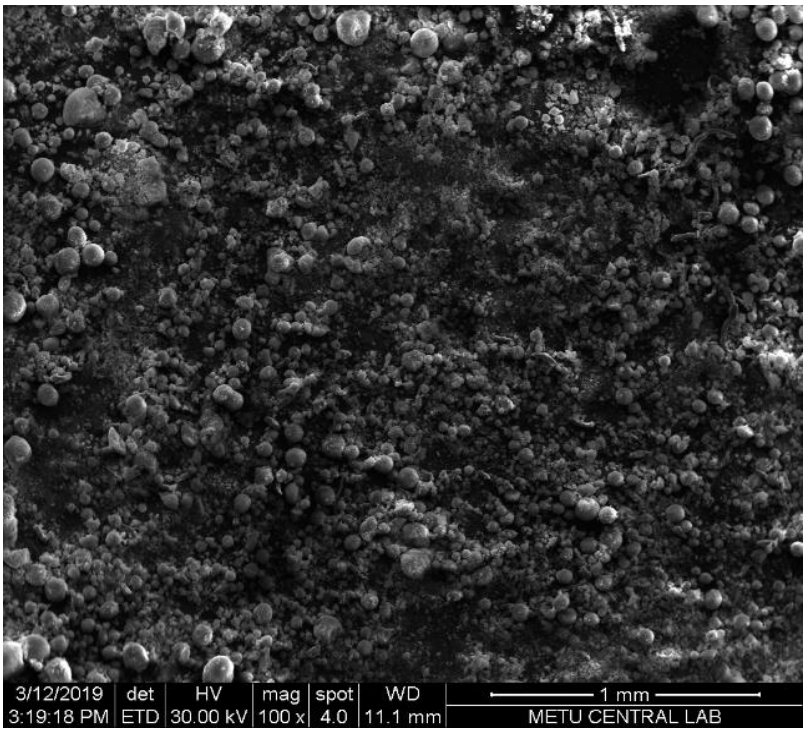


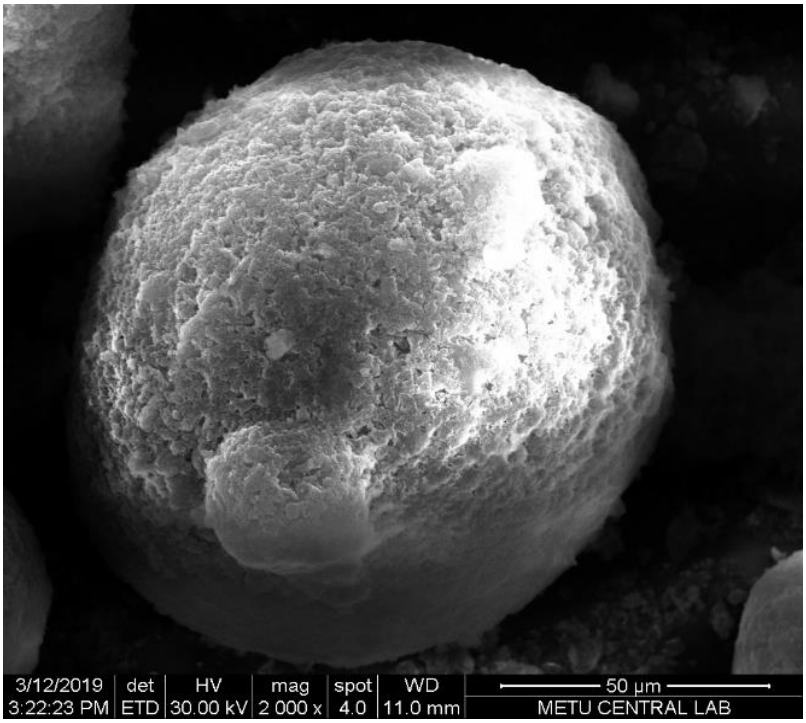


Resim 4.16. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait 100 X ve 1000 X ölçekli SEM görüntüleri

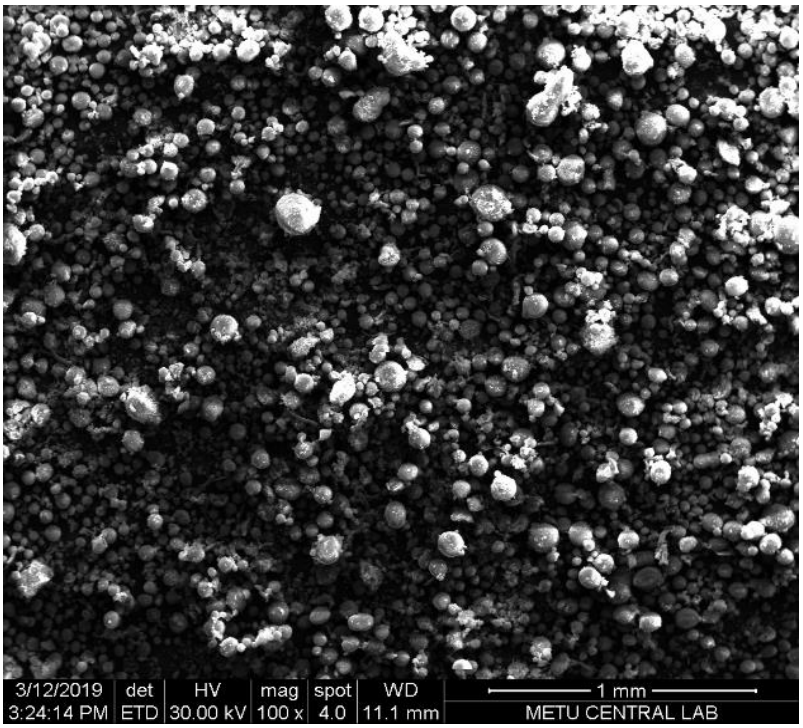


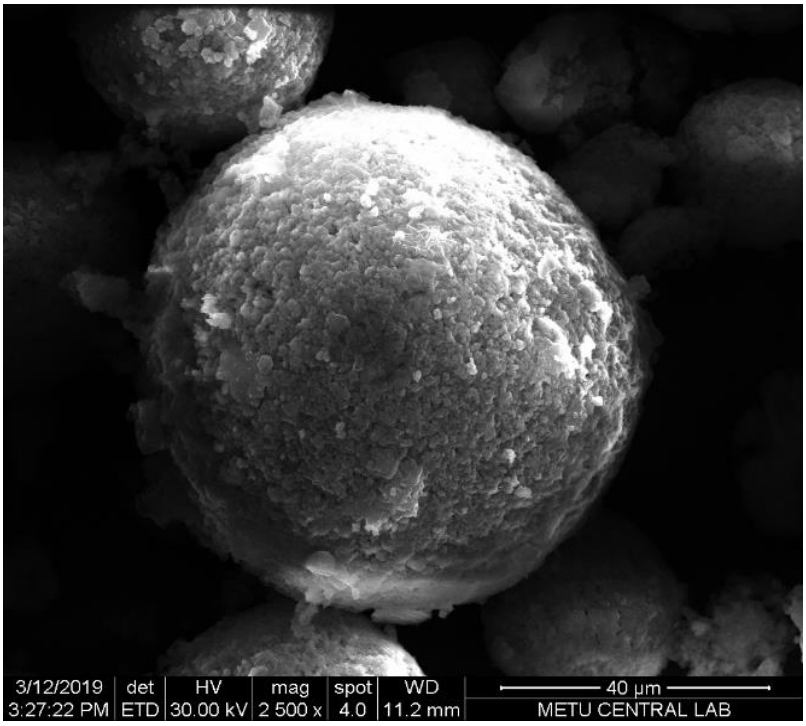
Resim 4.17. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri





Resim 4.18. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait 100 X ve 2000 X ölçekli SEM görüntüleri

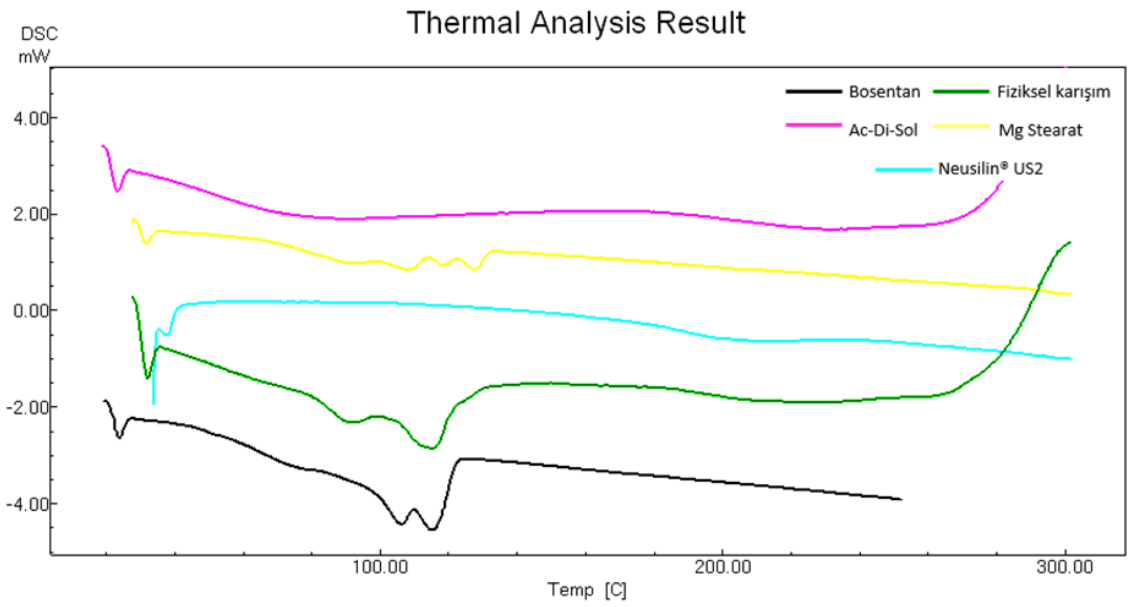




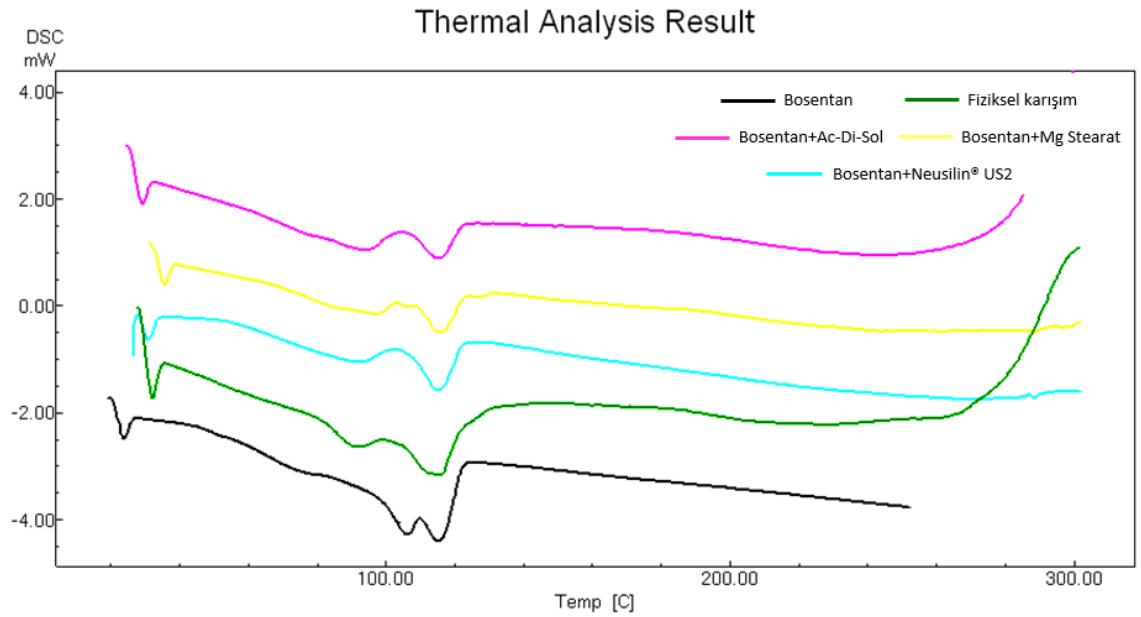
Resim 4.19. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait 100 X ve 2500 X ölçekli SEM görüntüleri

DSC analizi

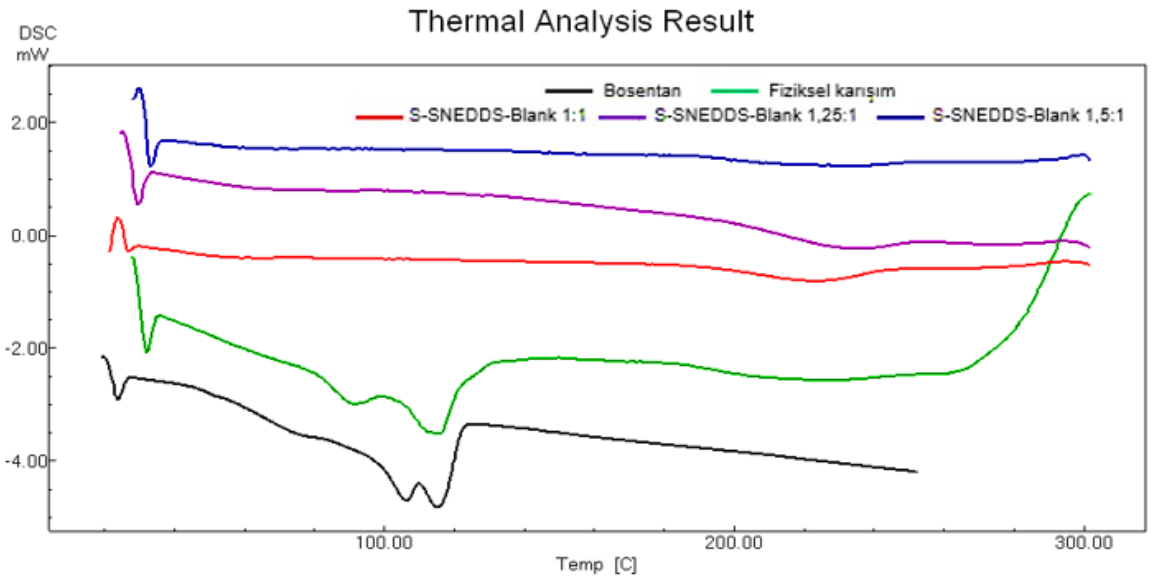
Tablet formülasyonunda kullanılacak olan yardımcı maddelerin, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarının DSC termogramları Şekil 4.83 - 4.86'da verilmiştir.



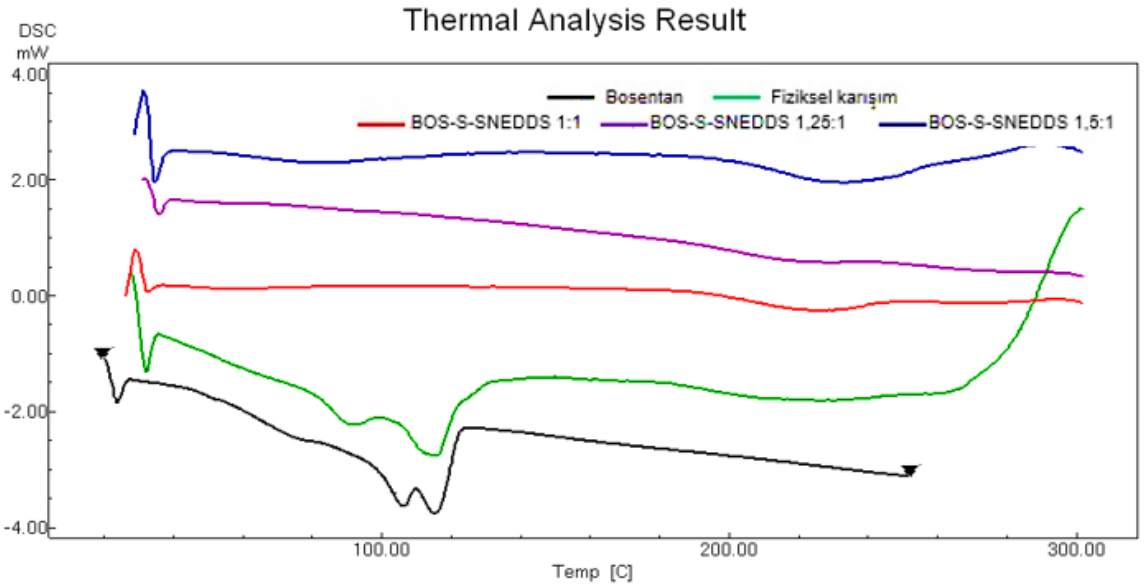
Şekil 4.83. BOS ve S-SNEDDS hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelere ait DSC termogramı



Şekil 4.84. BOS ve S-SNEDDS hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerin karışımları ve fiziksel karışıma ait DSC termogramı



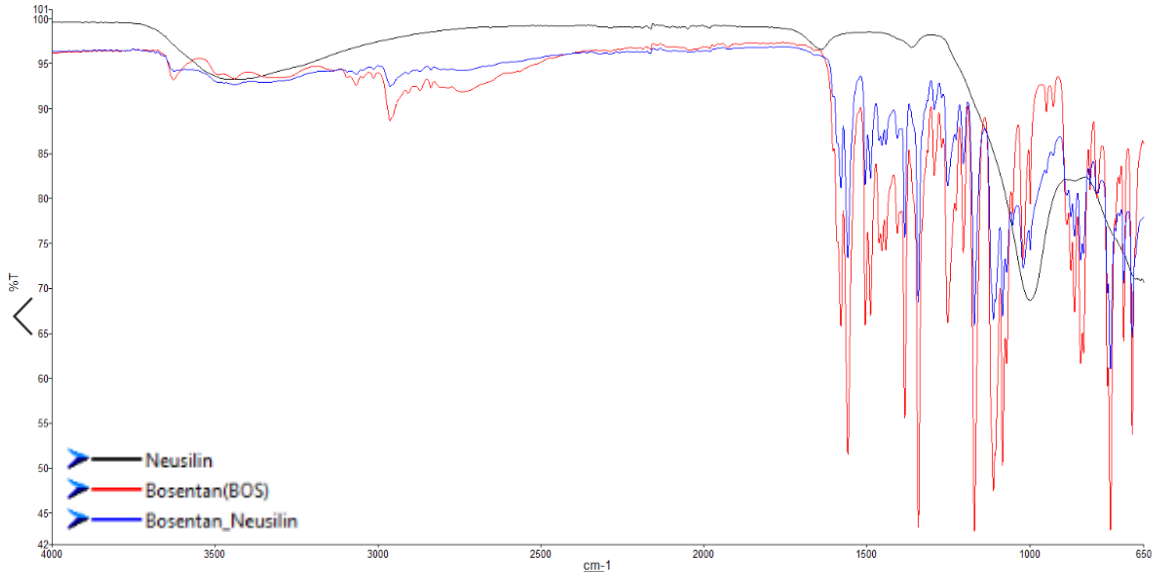
Şekil 4.85. BOS, fiziksel karışım ve etkin madde içermeyen S-SNEDDS formülasyonlarına ait DSC termogramı



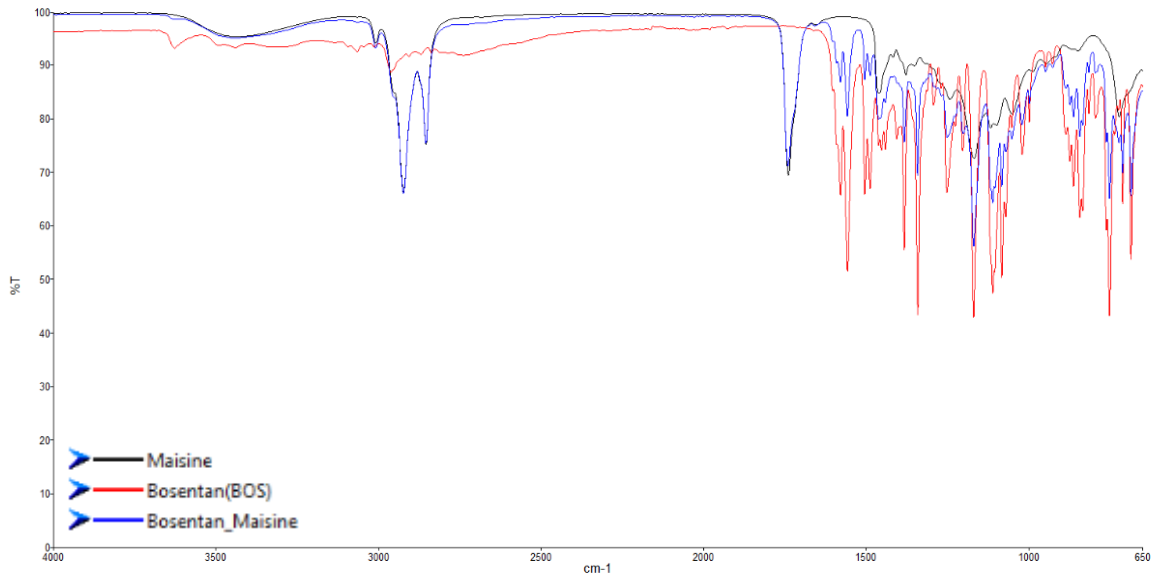
Şekil 4.86. BOS, fiziksel karışım ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarına ait DSC termogramı

FT-IR analizi

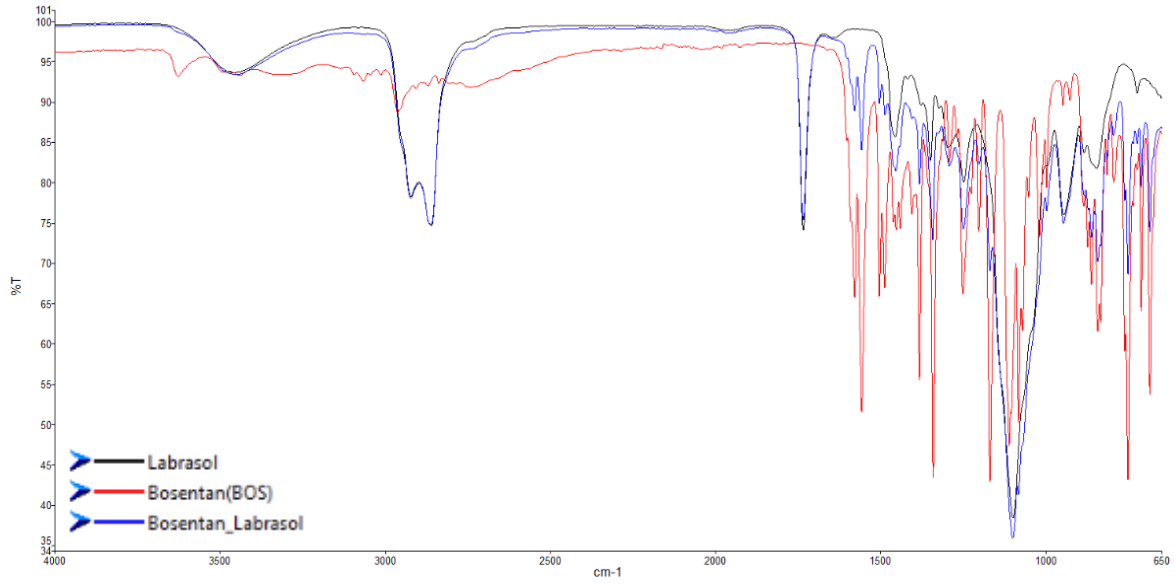
Neusilin® US2, Maisine® SNEDDS ve tablet formülasyonunda kullanılacak olan yardımcı maddelerin etkin madde ile olan etkileşimleri FT-IR analizi ile incelenmiş spektrumları Şekil 4.87 - 4.94'te verilmiştir.



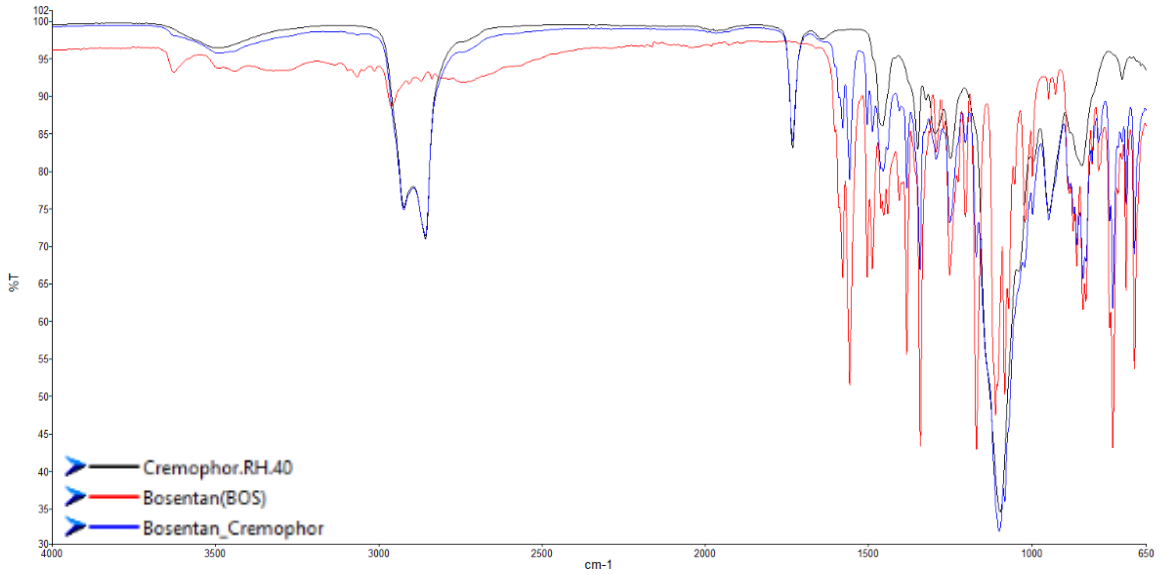
Şekil 4.87. BOS, Neusilin® US2, BOS-Neusilin® US2 FT-IR spektrumu



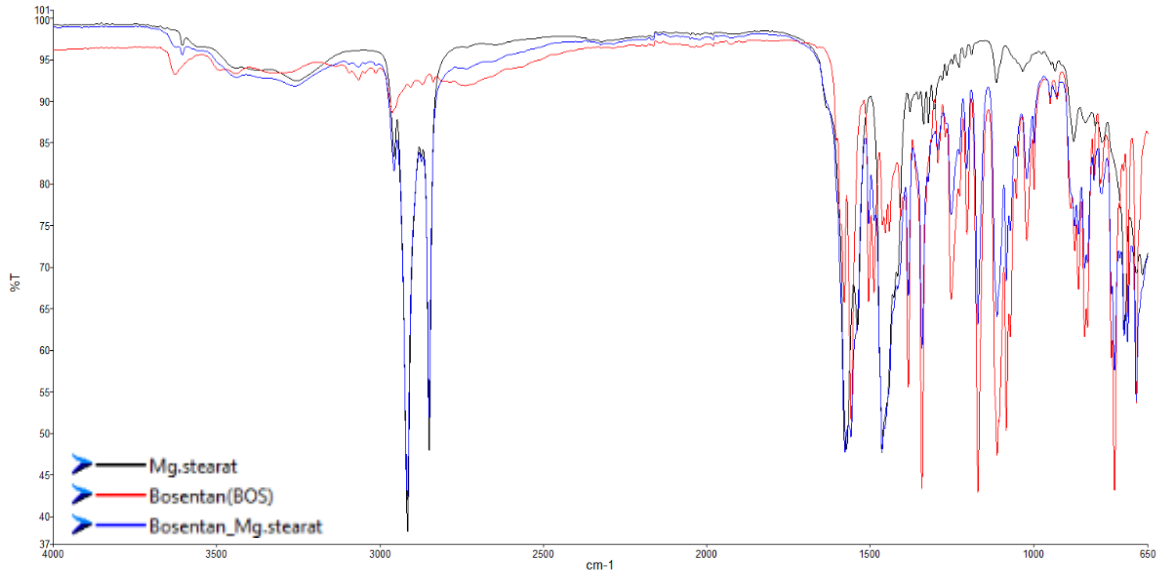
Şekil 4.88. BOS, Maisine®, BOS-Maisine® FT-IR spektrumu



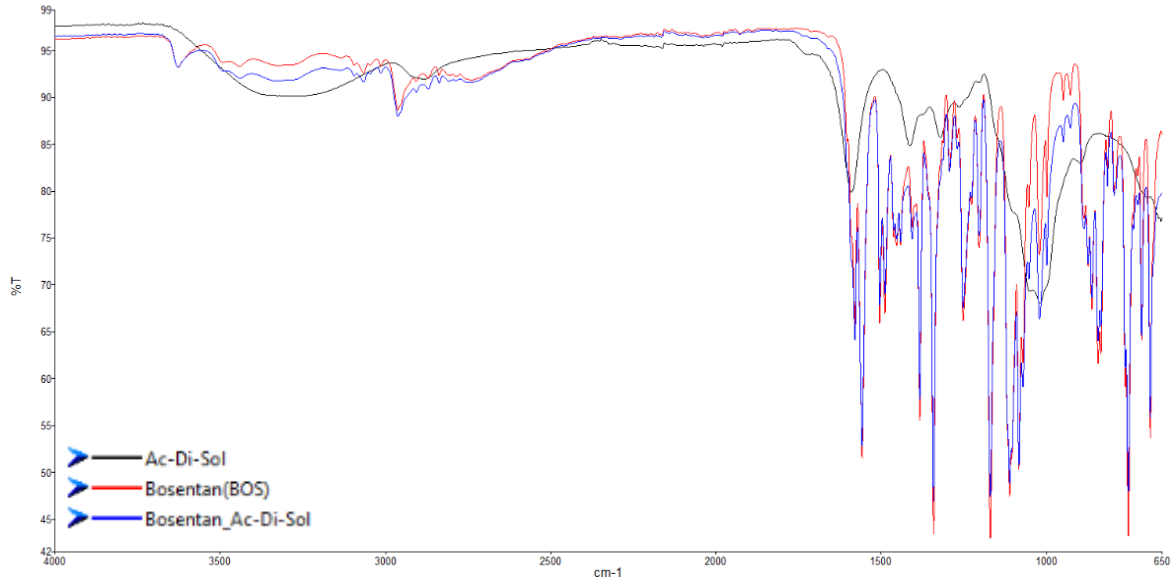
Şekil 4.89. BOS, Labrasol®, BOS-Labrasol® FT-IR spektrumu



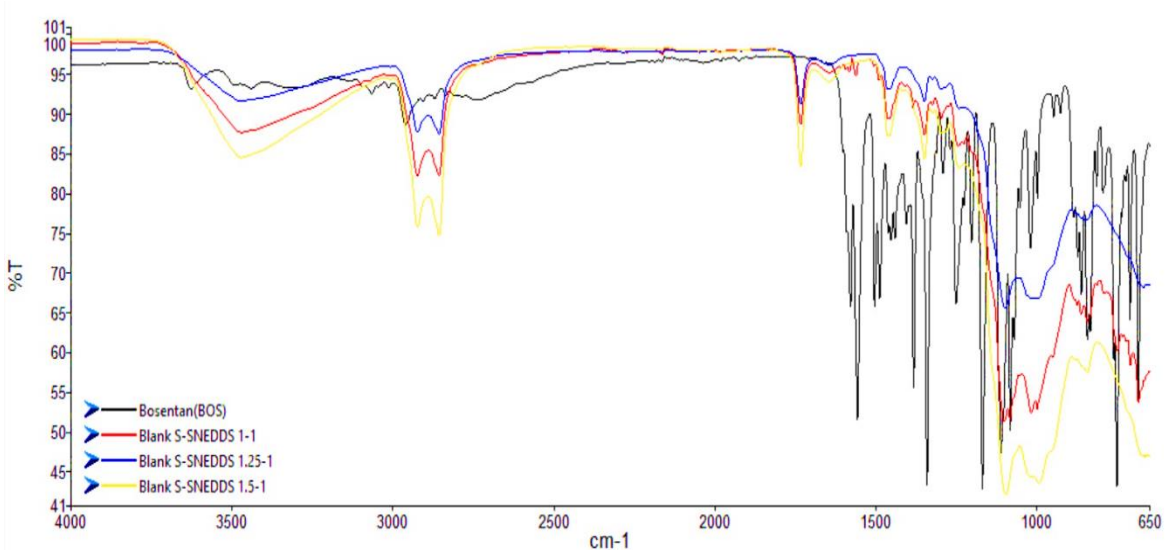
Şekil 4.90. BOS, Cremophor® RH 40, BOS-Cremophor® RH 40 FT-IR spektrumu



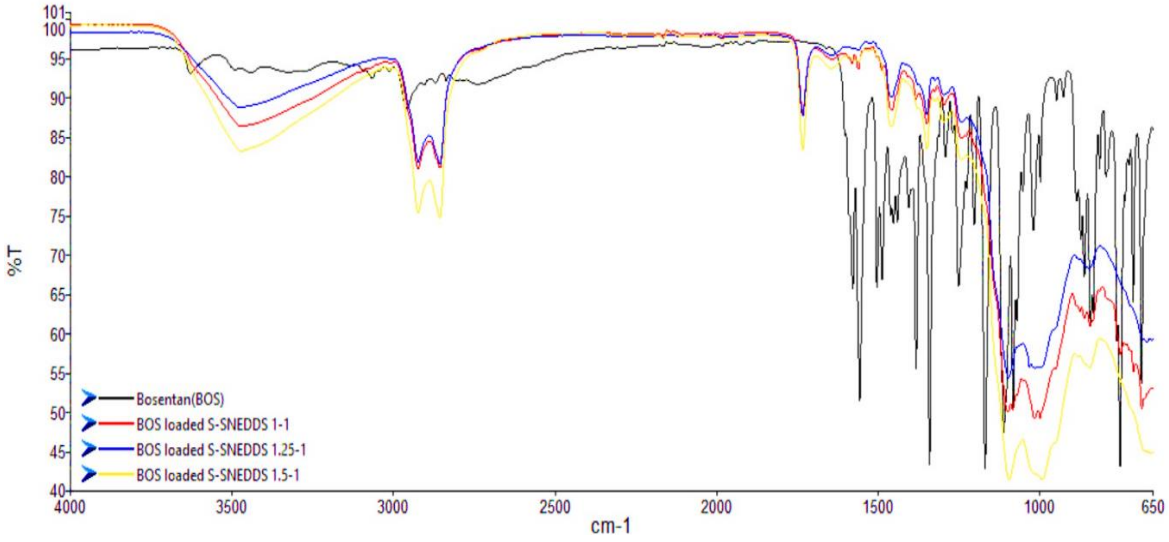
Şekil 4.91. BOS, Magnezyum stearat, BOS-Magnezyum stearat FT-IR spektrumu



Şekil 4.92. BOS, Ac-Di-Sol®, BOS-Ac-Di-Sol® FT-IR spektrumu



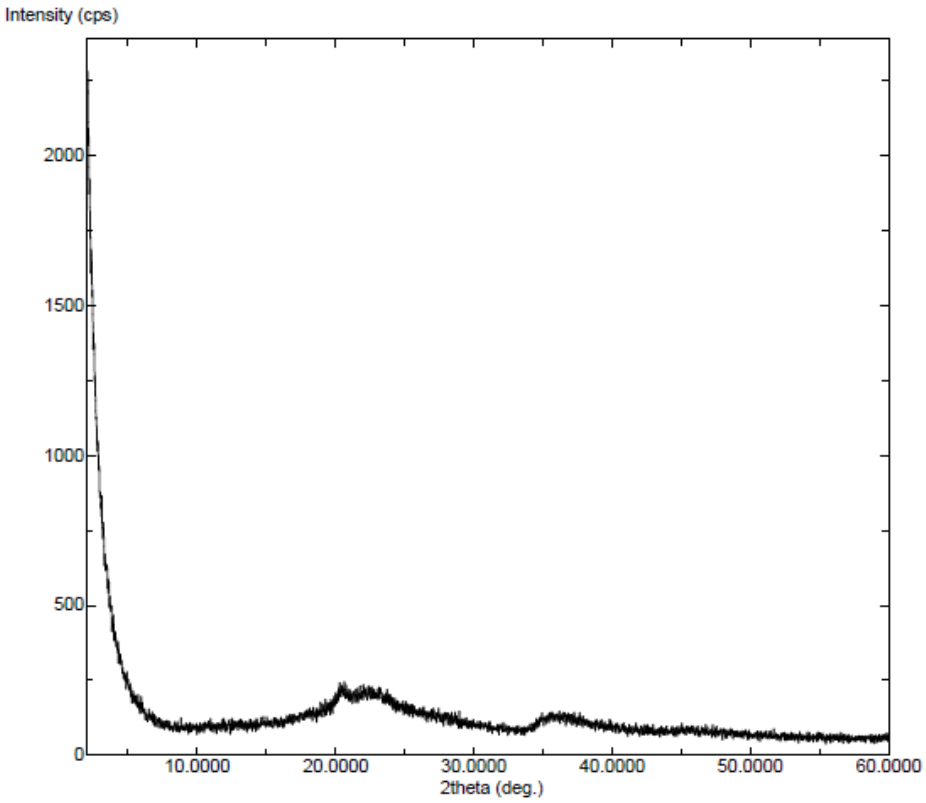
Şekil 4.93. BOS, etkin madde içermeyen S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyon FT-IR spektrumu



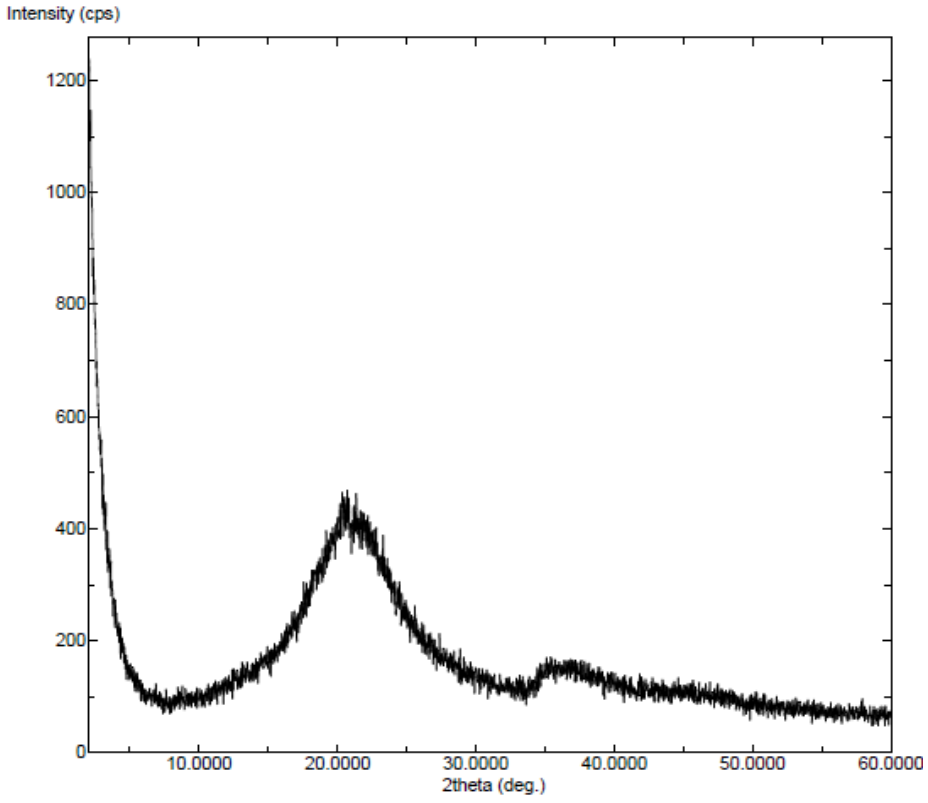
Şekil 4.94. BOS, BOS yüklü S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyon FT-IR spektrumu

X-RPD analizi

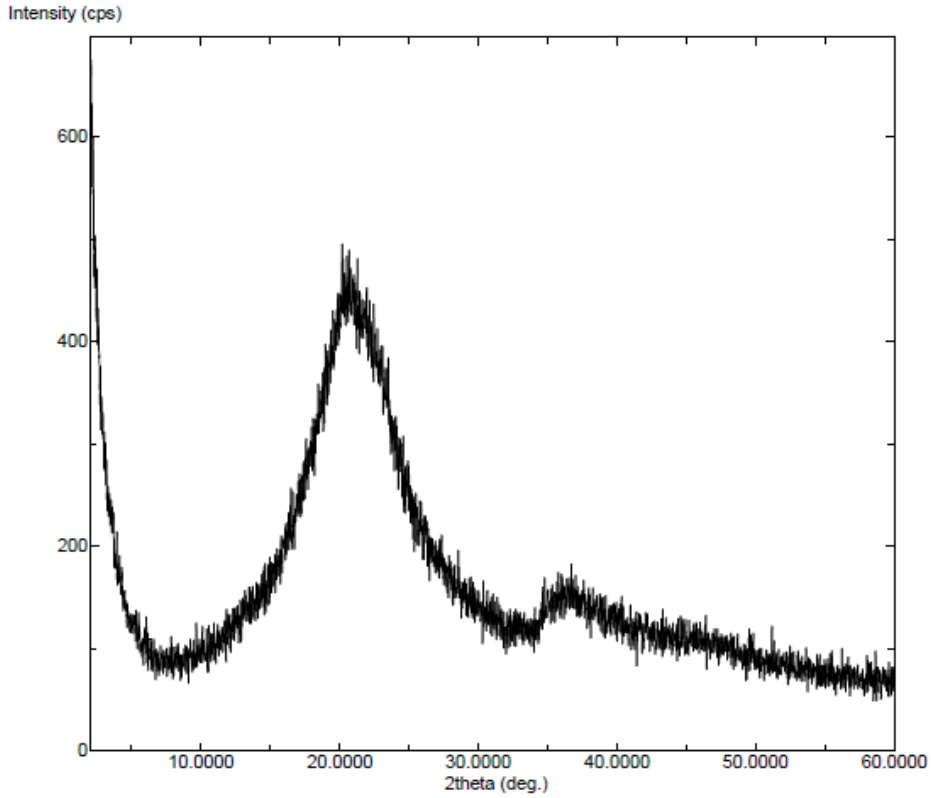
Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda BOS'un X-RPD diyagramı Bölüm 4.1.4'te verilmiştir. Adsorban olarak kullanılan Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarının X-RPD sonuçlarına ait diyagramlar ise Şekil 4.95 - 4.102'de verilmiştir.



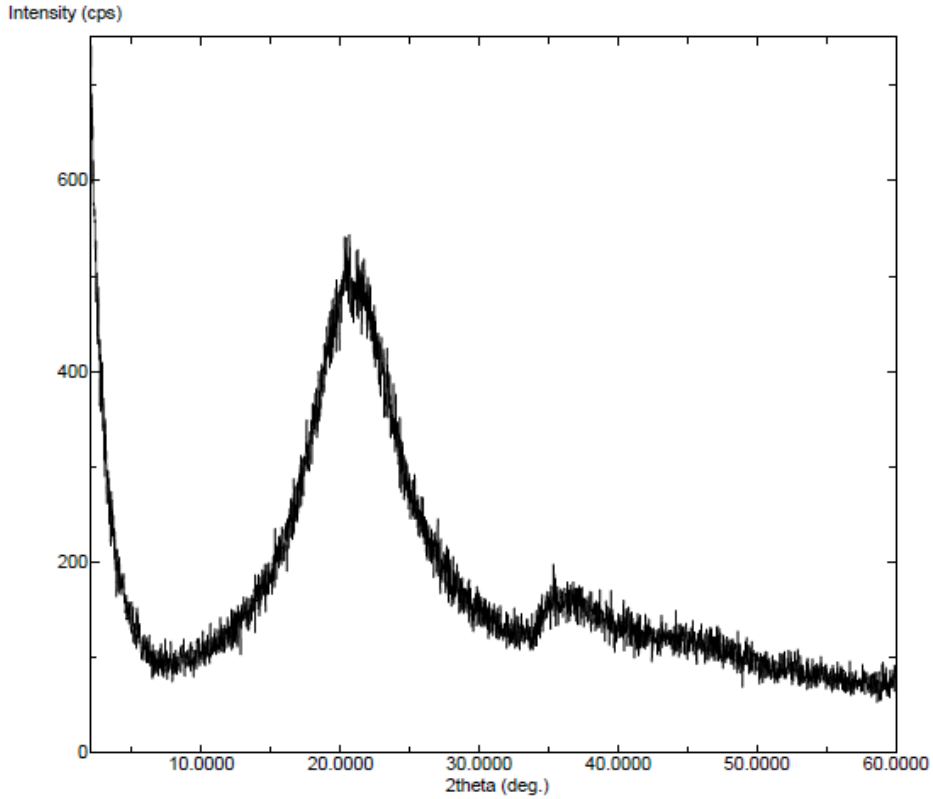
Şekil 4.95. Neusilin® US2'ye ait X-RPD diyagramı



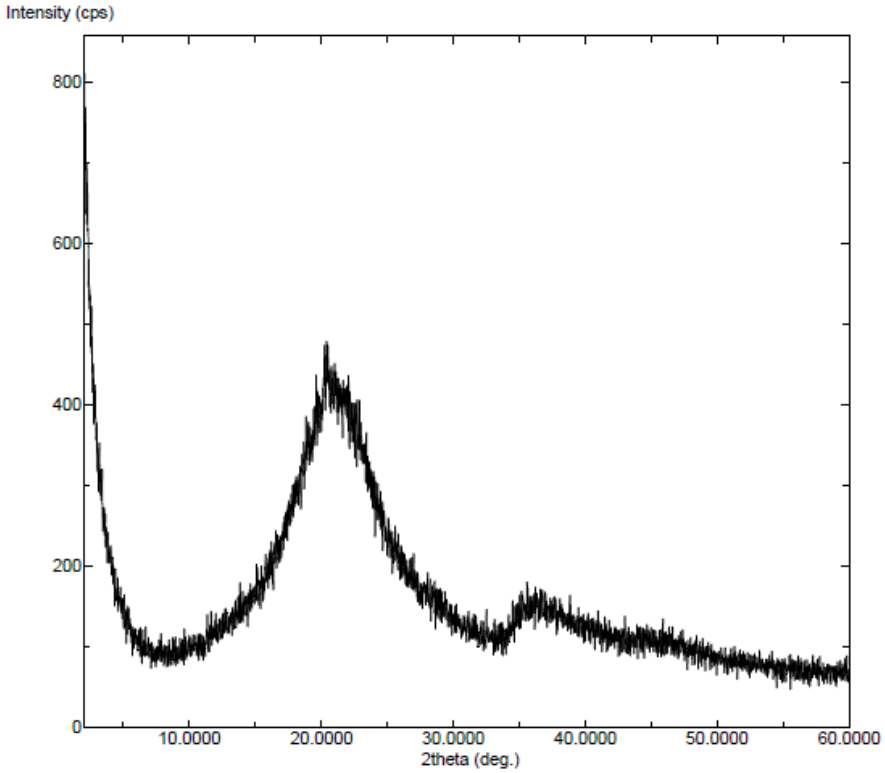
Şekil 4.96. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 formülasyonuna ait X-RPD diyagramı



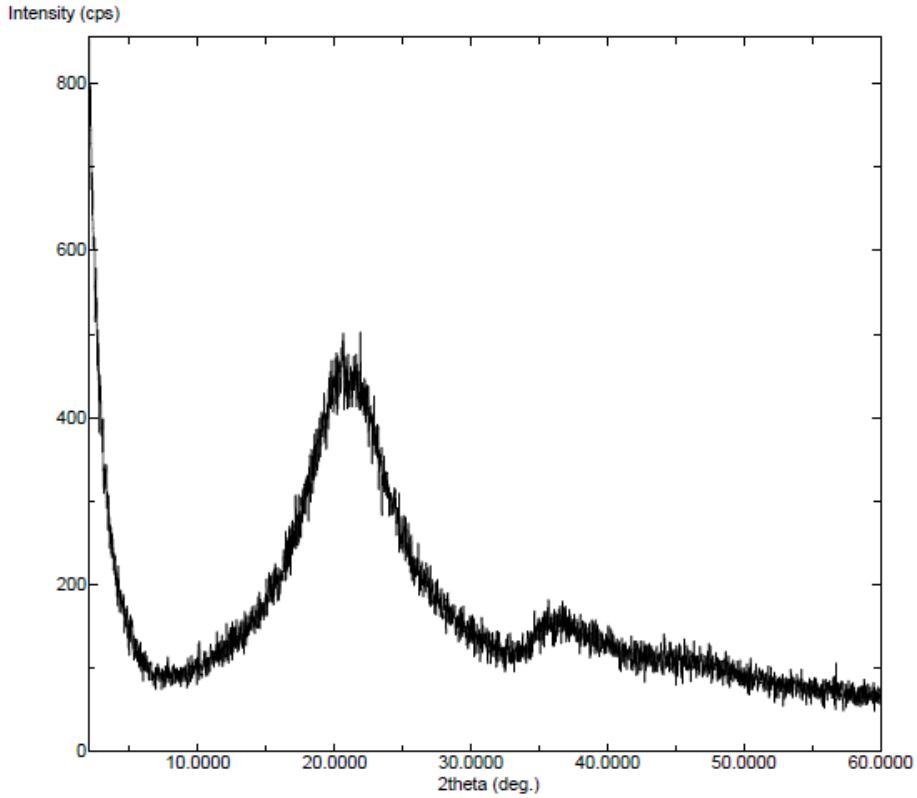
Şekil 4.97. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 formülasyonuna ait X-RPD diyagramı



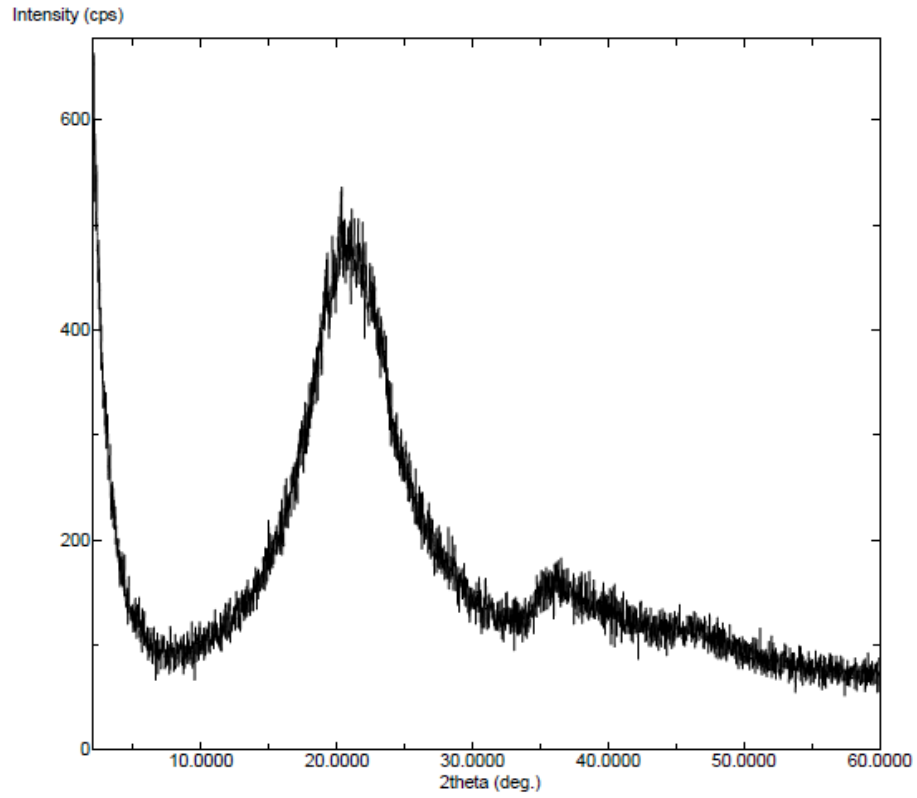
Şekil 4.98. Etkin madde içermeyen Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait X-RPD diyagramı



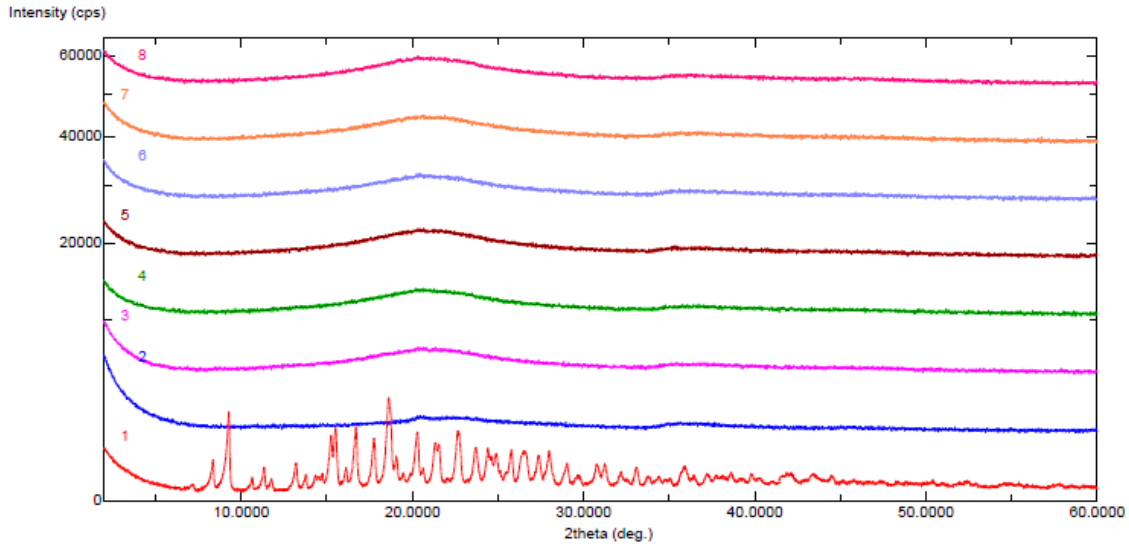
Şekil 4.99. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1:1 oranına ait X-RPD diyagramı



Şekil 4.100. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranına ait X-RPD diyagramı



Şekil 4.101. BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,5:1 oranına ait X-RPD diyagramı



Şekil 4.102. BOS, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyonlarına ait X-RPD diyagramı

BET analizi

Neusilin® US2, etkin madde içermeyen S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1), BOS yüklü S-SNEDDS (1:1, 1,25:1, 1,5:1) formülasyonları için BET analizi yapılmış sonuçlar aşağıdaki Çizelge 4.80'de verildiği gibi bulunmuştur. Neusilin® US2'nin por çapı yaklaşık yaklaşık 12,27 nm (1,227E+02 Å) bulunmuştur.

Çizelge 4.80. Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarına ait BET sonuçları

	Por çapı (BHJ), Å	**Yüzey alanı (S_{BET}), m^2/g**	**Yüzey alanı (S_{BHJ}), m^2/g**	**Mikro gözenek hacmi, cc/g**
Neusilin® US2	1,227E+02	3,422E+02	3,903E+02	1,710E-01
B-S-SNEDDS 1:1	1,460E+01	1,957E+02	2,877E+02	9,639E-02
B-S-SNEDDS 1,25:1	1,467E+01	1,902E+02	2,800E+02	9,423E-02
B-S-SNEDDS 1,5:1	1,455E+01	1,453E+02	2,145E+02	7,162E-02
BOS-S-SNEDDS 1:1	1,468E+01	1,825E+02	2,601E+02	9,020E-02
BOS-S-SNEDDS 1,25:1	1,442E+01	1,649E+02	2,450E+02	8,234E-02
BOS-S-SNEDDS 1,5:1	1,447E+01	1,560E+02	2,281E+02	7,721E-02

B-S-SNEDDS: BOS içermeyen S-SNEDDS, **BOS-S-SNEDDS**: BOS yüklü S-SNEDDS

4.6.3. S-SNEDDS tablet basımı

Mikromeritik özellikler ve katı hal karakterizasyon çalışmaları sonucunda BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2'nin 1,25:1 oranı seçilmiştir. Her tablet 30 mg BOS, yardımcı madde olarak ana kütlenin %5'i Ac-Di-Sol® (dağıtıcı), %1'i magnezyum stearat (lubrikan) olacak şekilde belirlenmiş ve karıştırılmıştır. Karışım sabit bir sıkıştırma kuvveti altında 22x11 mm'lik zımba kullanılarak tek zımbalı tablet makinesinde doğrudan basım yöntemi ile basılmış ve kompakt tabletler üretilmiştir.

4.6.4. S-SNEDDS ile geliştirilen tablet formülasyonunda yapılan kontroller

Sertlik

Sertlik çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, 10 tablette yapılan tablet sertlik ölçümüne ait sonuçlar Çizelge 4.81'de verilmiştir.

Çizelge 4.81. S-SNEDDS tablete ait sertlik sonuçları

Tablet numarası	**Sertlik (N)**
1	140,3
2	150,7
3	142,6
4	141,3
5	148,8
6	147,8
7	161,3
8	164,5
9	165,6
10	155,3
X_{ort}	152
SS	10
% VK	6,30

Çap-kalınlık

Çap-kalınlık çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, 10 tabletin çap ve kalınlık ölçüm sonuçları Çizelge 4.82'de verilmiştir.

Çizelge 4.82. S-SNEDDS tablete ait çap-kalınlık sonuçları

Tablet numarası	Çap (mm)	Kalınlık (mm)
1	11,12	8,90
2	11,12	8,90
3	11,11	8,95
4	11,09	8,95
5	11,13	8,88
6	11,09	8,92
7	11,11	8,92
8	11,11	8,94
9	11,12	8,89
10	11,10	8,85
X_{ort}	11,11	8,91
SS	0,01	0,03
% VK	0,12	0,360

Ağırlık sapması

Ağırlık sapması çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, rastgele olarak seçilen 20 tabletin ortalama ve tek ağırlıkları Çizelge 4.83'te verilmiştir. Tabletlerden en fazla iki tablet ortalama tablet ağırlığının %7,5'inden ve hiçbir tablet ortalamanın %15'inden fazla sapma göstermemiş, sonuçlar limitler içerisinde bulunmuştur.

Çizelge 4.83. S-SNEDDS tablete ait ağırlık sapması sonuçları

Tablet numarası	Tablet ağırlığı (g)	Tablet numarası	Tablet ağırlığı (g)
1	1,92	11	1,93
2	2,04	12	1,93
3	1,93	13	1,92
4	1,91	14	1,93
5	1,92	15	1,93
6	1,92	16	1,93
7	1,93	17	1,93
8	1,92	18	1,92
9	1,93	19	1,93
10	1,93	20	1,92
X_{ort}			1,93
SS			0,03
% VK			1,38

Ufalanma-aşınma

Ufalanma-aşınma çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş yapılan çalışma sonucunda ufalanan, aşınan, çatlayan veya kırılan herhangi bir tablet olmamıştır.

İlk tartım: 38,50171 g
Son tartım: 38,50135 g
Ağırlık kaybı: 0,00036 g
% ağırlık kaybı: %0,00093

Dağılma süresi

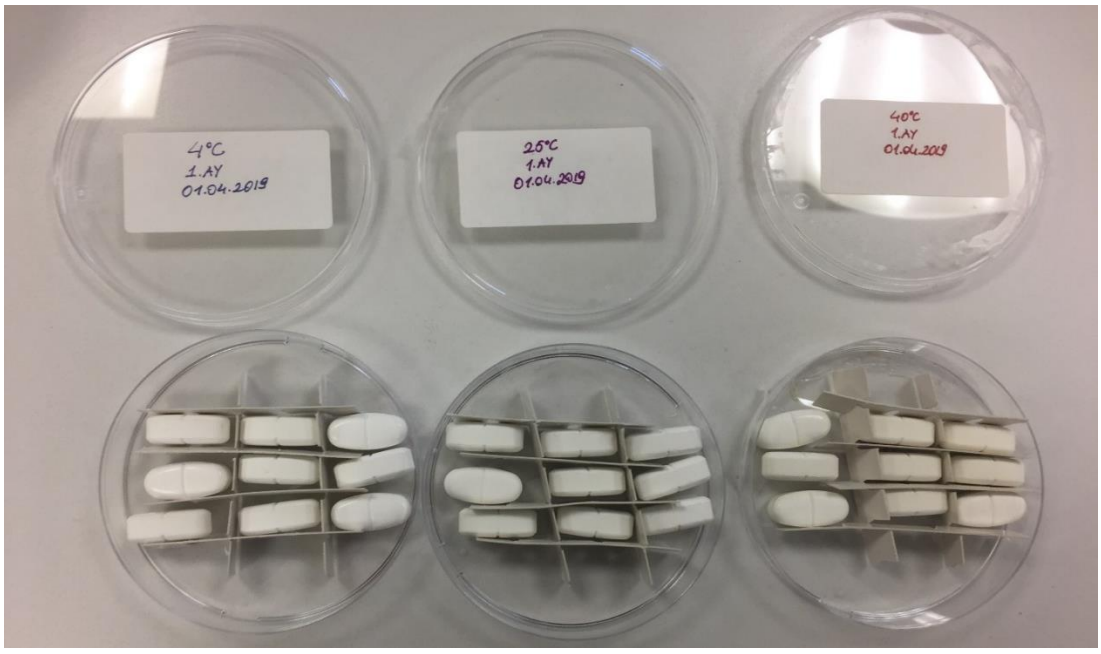
Dağılma süresi çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, tabletlerin tam dağılması için geçen süre 23,7 ± 0,5 dakika olarak belirlenmiştir.

İçerik tek düzeliği

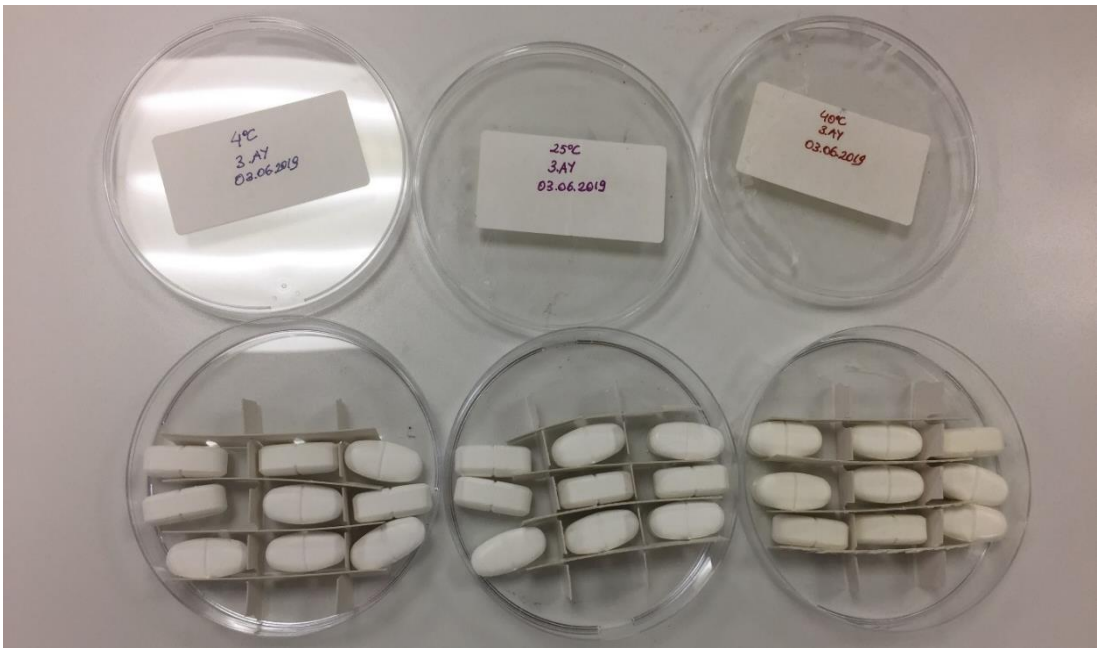
İçerik tek düzeliği çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, BOS yüklü S-SNEDDS tablette yer alan BOS miktarı 30 mg olup deney sonucunda hesaplanan etkin madde içeriği 30,8 mg'dır ve %102,6'ya karşılık gelmektedir.

Uzun dönem stabilite çalışmaları

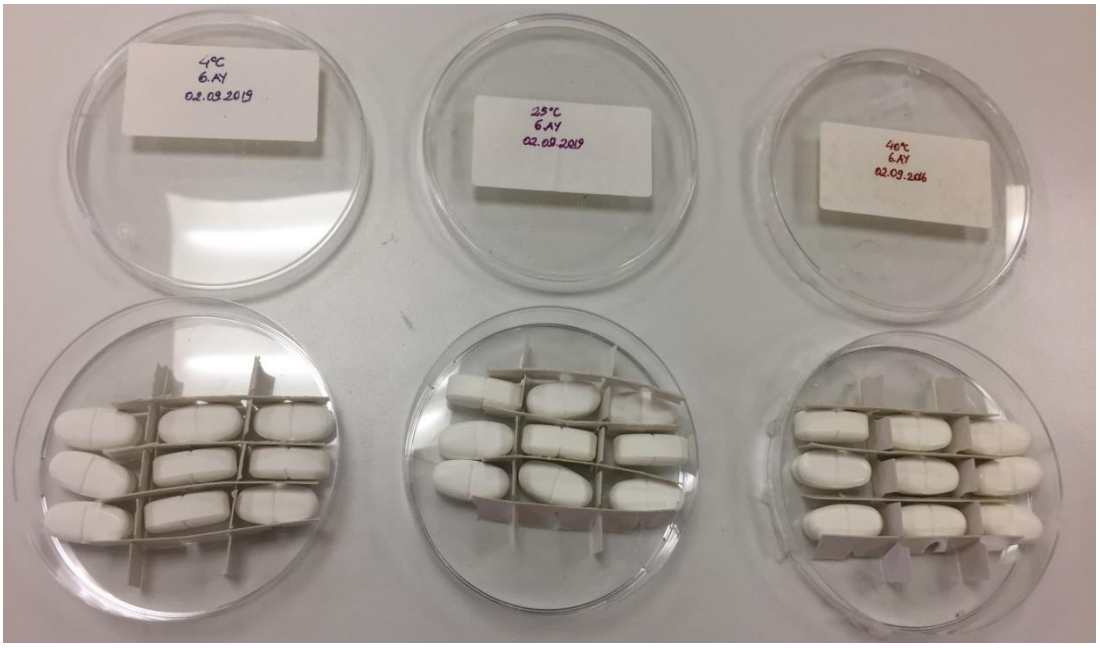
S-SNEDDS tablet formülasyonun stabilitesi 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulları altında 0, 1, 3, 6 ve 12. ayda fiziksel ve etkin madde içeriği açısından değerlendirilmiştir. Fiziksel değerlendirmeye ait görseller Resim 4.20 - 4.23'te verilirken tabletlere ait etkin madde içerikleri Çizelge 4.84'te verilmiştir.



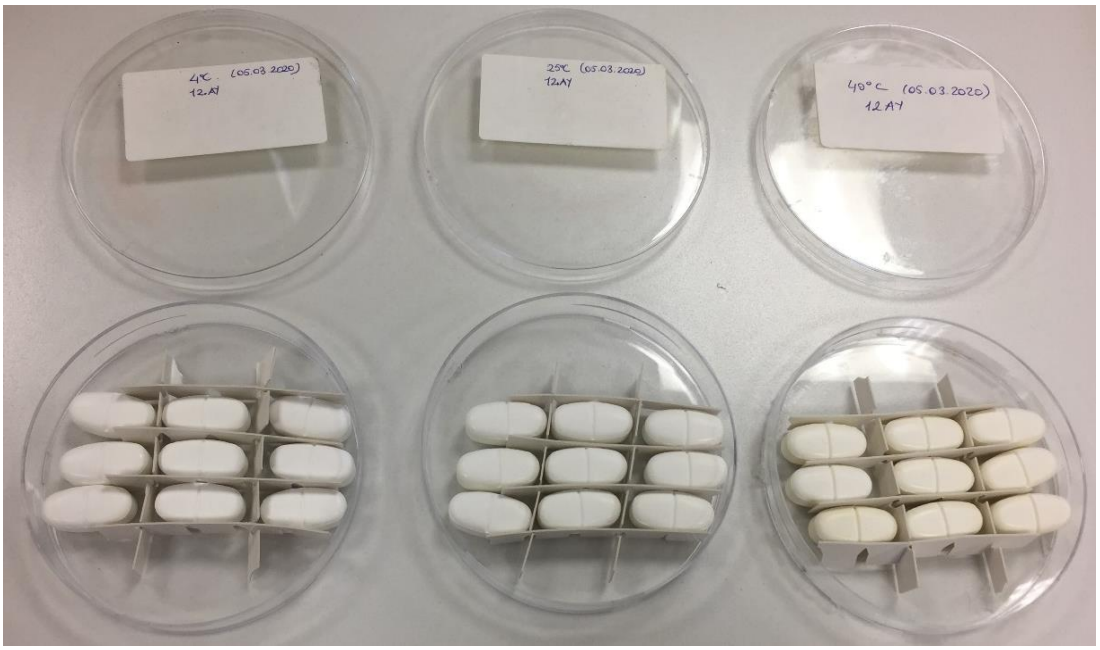
Resim 4.20. Stabilite 1. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli



Resim 4.21. Stabilite 3.ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli



Resim 4.22. Stabilite 6. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli



Resim 4.23. Stabilite 12. ay 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN şartları için S-SNEDDS tabletlerin görseli

Çizelge 4.84. S-SNEDDS tabletlerin uzun dönem stabilitesine ait % BOS içeriği analiz sonuçları

	4°C	**25±2°C/%60±5 BN**	**40±2°C/%75±5 BN**
1. ay*	%103	%99,7	%91,9
3. ay*	%102	%98,8	%90,9
6. ay*	%100	%97,1	%90,9
12. ay*	%102	%98,8	%81,4

***** n=3

Rekonstitüsyon çalışması

BOS yüklü S-SNEDDS tabletlerin (başlangıç ve 12 aylık 25±2°C/%60±5 RH stabilitesi için) su ile temasıyla oluşan kendiliğinden nanoemülsiyonların damlacık boyutu ve PDI değerleri sırasıyla 18,36 ± 024 nm ve 16,32 ± 0,05 nm, 0,466 ± 0,050 ve 0,372 ± 0,025 olarak bulunmuştur.

4.7. Referans Tablette Yapılan Kontroller

4.7.1. Sertlik

Sertlik çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş. 10 tablette yapılan tablet sertlik ölçümüne ait sonuçlar Çizelge 4.85'te verilmiştir.

Çizelge 4.85. Referans tablete ait sertlik sonuçları

Tablet numarası	Sertlik (N)
1	31,6
2	31,7
3	33,8
4	32,5
5	33,0
6	31,8
7	33,1
8	31,5
9	32,5
10	32,5
X_{ort}	32,4
SS	0,8
% VK	2,30

4.7.2. Çap-kalınlık

Çap-kalınlık çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, 10 tabletin çap ve kalınlık ölçüm sonuçları Çizelge 4.86'da verilmiştir.

Çizelge 4.86. Referans tablete ait çap-kalınlık sonuçları

Tablet numarası	Çap (mm)	Kalınlık (mm)
1	5,16	4,15
2	5,16	4,13
3	5,17	4,14
4	5,14	4,12
5	5,16	4,13
6	5,17	4,15
7	5,17	4,10
8	5,16	4,12
9	5,17	4,11
10	5,17	4,14
X_{ort}	5,16	4,13
SS	0,01	0,02
% VK	0,180	0,400

4.7.3. Ağırlık sapması

Ağırlık sapması çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, rastgele olarak seçilen 20 tabletin ortalama ve tek ağırlıkları Çizelge 4.87'de verilmiştir. Tabletlerden en fazla iki tablet ortalama tablet ağırlığının %7,5'inden ve hiçbir tablet ortalamanın %15'inden fazla sapma göstermemiş, sonuçlar limitler içerisinde bulunmuştur.

Çizelge 4.87. Referans tablete ait ağırlık sapması sonuçları

Tablet numarası	Tablet ağırlığı (mg)	Tablet numarası	Tablet ağırlığı (mg)
1	171,8	11	174,0
2	171,0	12	174,0
3	171,0	13	171,0
4	170,0	14	170,0
5	171,0	15	169,2
6	171,4	16	170,6
7	171,4	17	172,9
8	168,1	18	172,0
9	171,8	19	173,9
10	170,6	20	171,5
X_{ort}			172
SS			2
% VK			1,02

4.7.4. Ufalanma-aşınma

Ufalanma-aşınma çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş yapılan çalışma sonucunda ufalanan, aşınan, çatlayan veya kırılan herhangi bir tablet olmamıştır.

İlk tartım: 3,42746 g
Son tartım: 3,42603 g
Ağırlık kaybı: 0,00143 g
% ağırlık kaybı: %0,04172

4.7.5. Dağılma süresi

Dağılma süresi çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş tabletlerin tam dağılması için geçen süre 72,5 ± 2,26 sn olarak belirlenmiştir.

4.7.6. İçerik tek düzeliği

İçerik tek düzeliği çalışmaları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş referans tablette belirtilen bosentan monohidrat içeriği 129,082 mg'dır. İçerik tek düzeliği çalışması ile analiz sonucunda BOS içeriği %92,6'dır (120 mg).

4.8. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları – II

İn vitro çözünme hızı çalışmalarının ikinci aşamasında ilk aşamada katı forma dönüştürülüp tablet haline getirilmesine karar verilen BOS yüklü Maisine® SNEDDS, S-SNEDDS tablet ve referans tablet tarafından çözünme hızı ortamı olarak önerilen %1 SLS içeren distile suda ve biyouyumlu ortamlar olan FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme hızı sonuçları sırasıyla Çizelge 4.88 - 4.92'de, çözünme hızı profilleri ise Şekil 4.103 - 4.107'de verilmiştir.

Çizelge 4.88. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	90,2 ± 2,6	96,9 ± 5,4	100 ± 2	101 ± 2	102 ± 1
M-SNEDDS	80,2 ± 19,9	103 ± 0	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 1
S-SNEDDS-T	58,8 ± 4,8	74,7 ± 5,0	81,8 ± 4,6	85,3 ± 4,7	88,3 ± 3,2

Referans-T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.89. FaSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	21,9 ± 0,3	27,3 ± 0,8	30,1 ± 0,3	31,8 ± 0,1	32,4 ± 2,9
M-SNEDDS	82,5 ± 4,6	94,7 ± 1,0	97,4 ± 0,3	97,1 ± 0,7	97,2 ± 1,2
S-SNEDDS-T	44,9 ± 0,9	59,8 ± 0,5	67,1 ± 4,1	72,4 ± 3,1	80,0 ± 4,1

Referans-T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.90. FeSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	8,72 ± 0,93	10,1 ± 0,1	10,7 ± 0,9	10,7 ± 0,5	11,0 ± 0,1
M-SNEDDS	70,8 ± 6,1	84,6 ± 1,3	86,7 ± 1,4	87,3 ± 2,1	87,8 ± 1,0
S-SNEDDS-T	51,3 ± 12,9	61,4 ± 7,4	70,1 ± 8,0	74,0 ± 5,5	82,4 ± 2,3

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

Çizelge 4.91. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

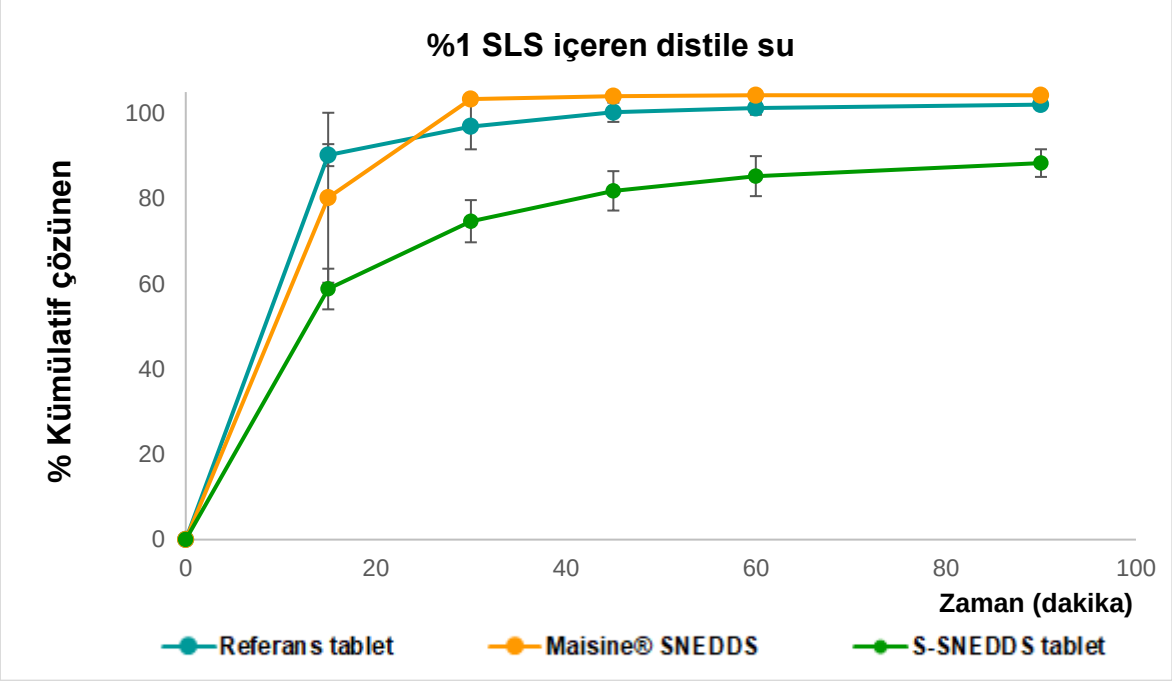
% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	14,9 ± 0,4	17,9 ± 0,5	19,7 ± 0,8	20,5 ± 0,2	22,3 ± 0,8
M-SNEDDS	81,5 ± 11,3	89,0 ± 2,4	93,1 ± 0,5	94,1 ± 0,4	94,1 ± 0,8
S-SNEDDS-T	55,9 ± 11,3	69,8 ± 9,9	72,8 ± 1,9	80,3 ± 9,2	82,4 ± 7,8

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3

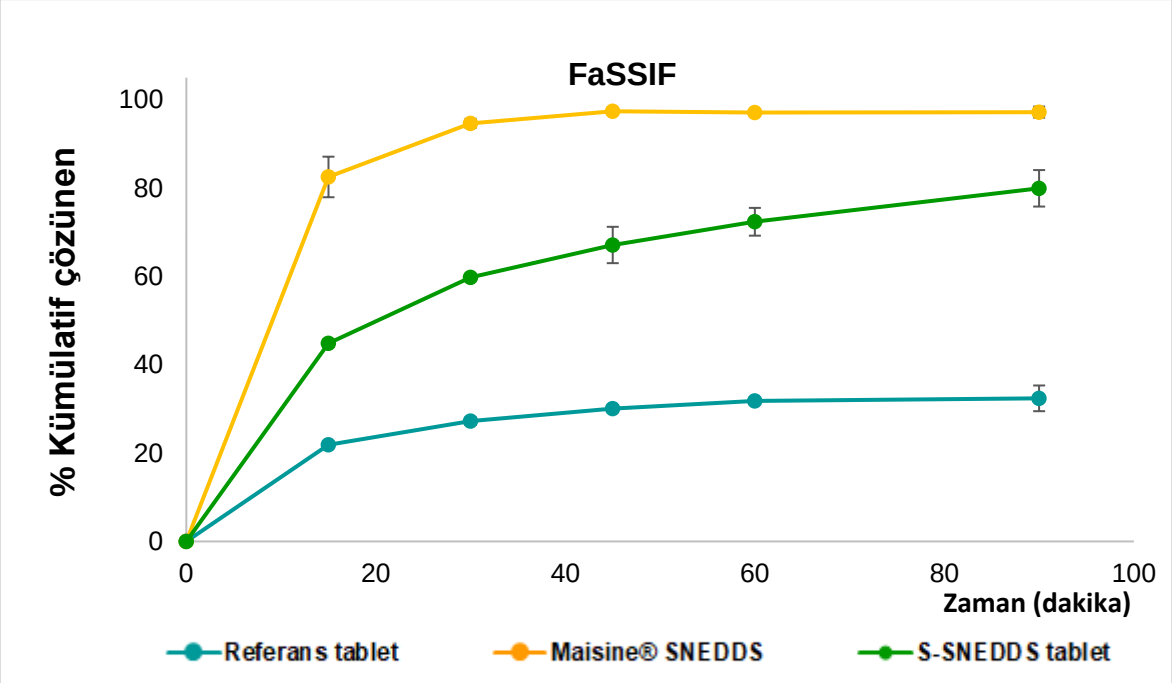
Çizelge 4.92. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı sonuçları

% Kümülatif çözünen BOS	15 (dk)	30 (dk)	45 (dk)	60 (dk)	90 (dk)
Referans-T	16,7 ± 0,2	18,6 ± 0,5	19,3 ± 1,7	19,3 ± 0,3	20,1 ± 2,6
M-SNEDDS	91,5 ± 10,2	93,6 ± 3,3	98,7 ± 2,9	99,5 ± 1,9	99,1 ± 1,9
S-SNEDDS-T	68,1 ± 5,9	83,5 ± 2,9	91,2 ± 0,6	87,2 ± 0,3	87,7 ± 0,3

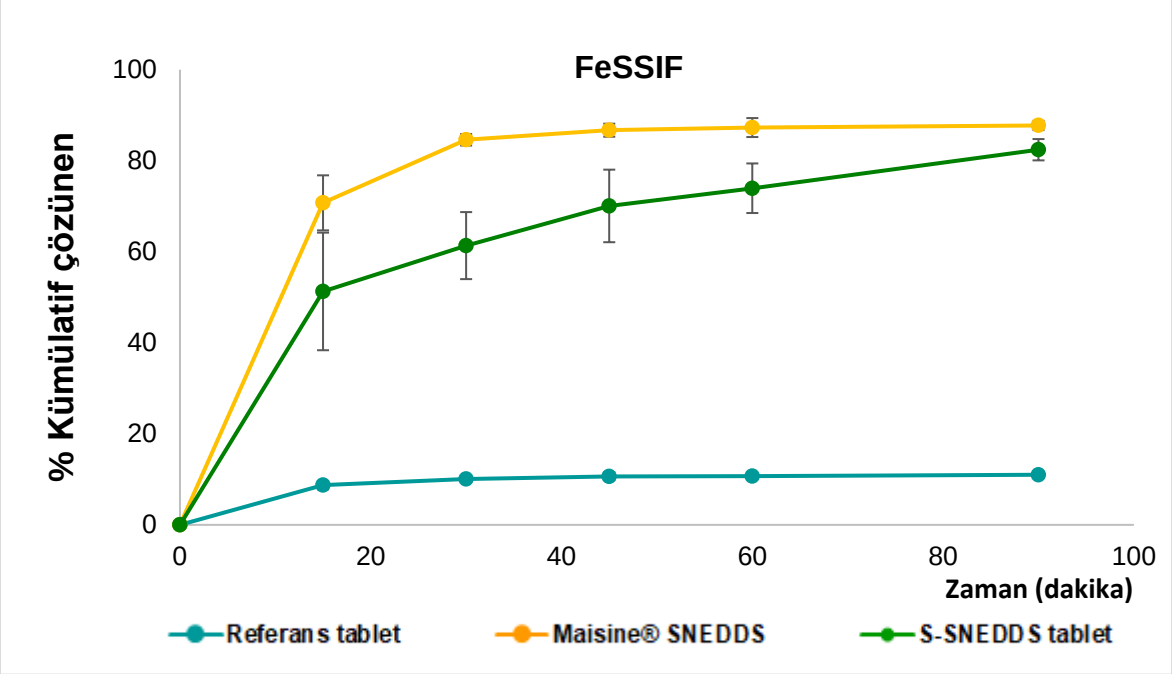
Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, X_{ort} ± SS, n=3



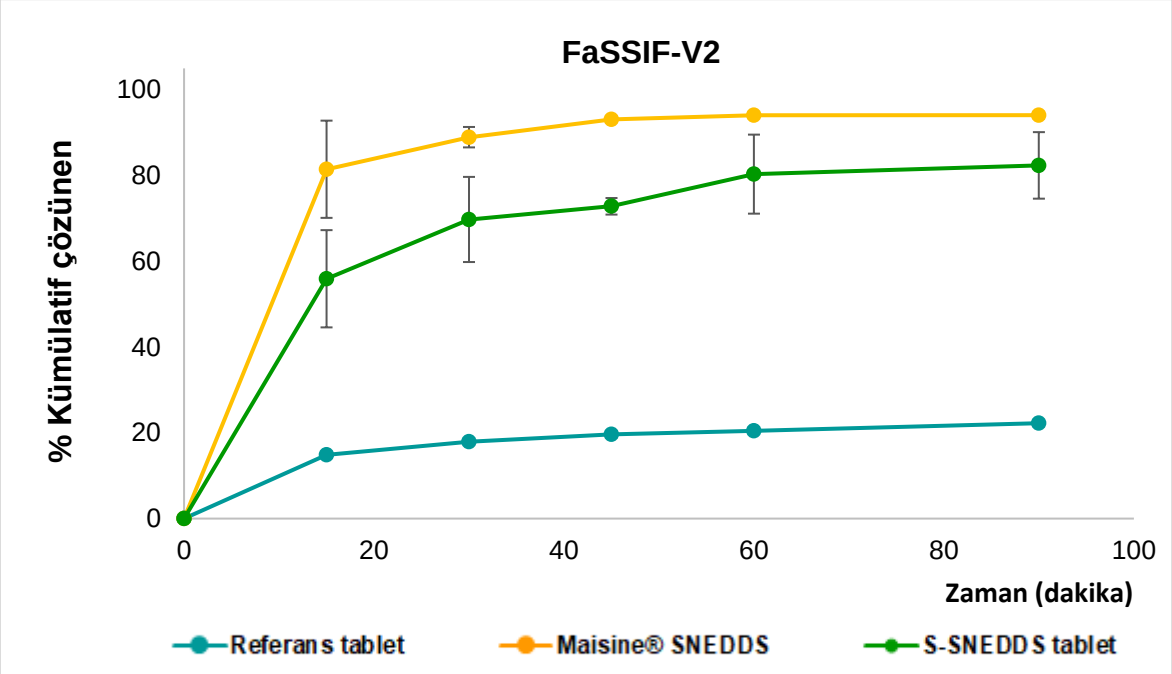
Şekil 4.103. %1 SLS içeren distile su ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



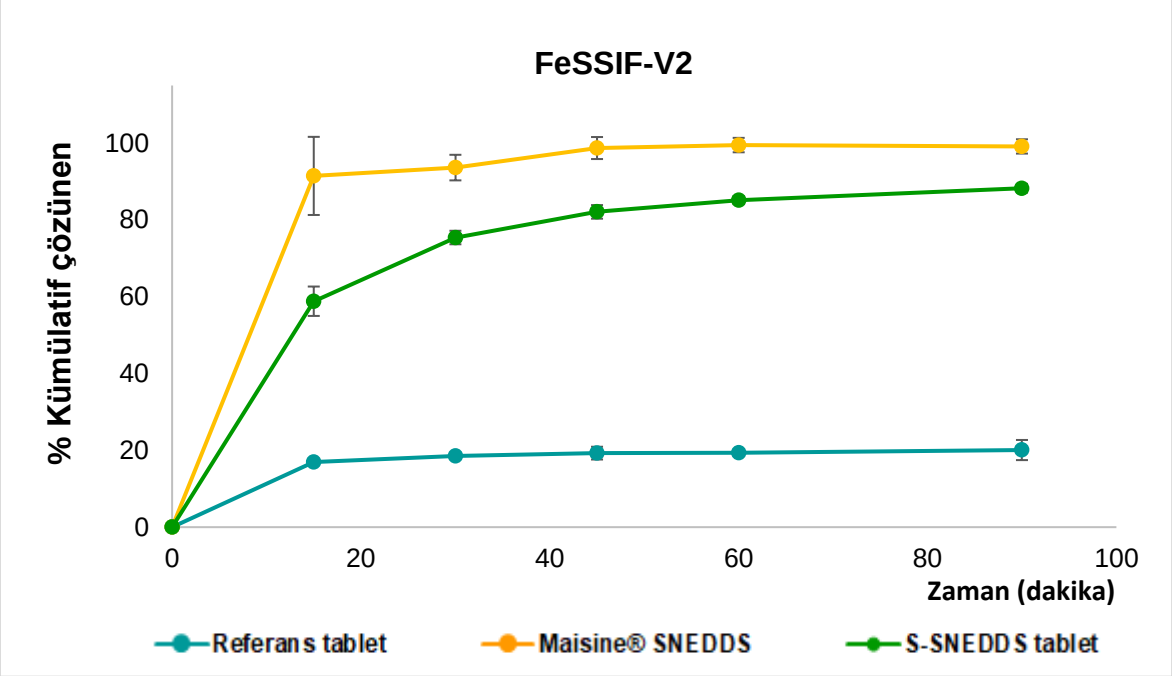
Şekil 4.104. FaSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.105. FeSSIF ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.106. FaSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri



Şekil 4.107. FeSSIF-V2 ortamı için referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların in vitro çözünme hızı profilleri

BOS %1 SLS içeren distile su ortamında referans tabletten ve Maisine® SNEDDS formülasyondan 15 dakika içinde ve %80'den fazla, S-SNEDDS tabletten %58; 90 dakika sonunda ise referans tabletten ve Maisine® SNEDDS formülasyondan BOS'un tamamı, S-SNEDDS tabletten %88'i salınmıştır.

FaSSIF ortamında referans tablet 90 dakika sonunda BOS'un yaklaşık %32'sini salarken, Maisine® SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu sırasıyla içeriğindeki etkin maddenin %97 ve %80'ini salmıştır. FaSSIF-V2 ortamında ise referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %22'si salınırken, Maisine® SNEDDS formülasyonu yaklaşık %94'ünü, S-SNEDDS tablet %82'ini salmıştır. S-SNEDDS tabletten referans tablete göre % kümülatif çözünen BOS miktarı FaSSIF için 2,5 kat, FaSSIF-V2 için 3,7 kat fazla çözünme göstermiştir.

FeSSIF ortamında referans tablet 90 dakika sonunda BOS'un yaklaşık %11'ini salarken, Maisine® SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu sırasıyla içeriğindeki etkin maddenin %88 ve %82'sini salmıştır. FeSSIF-V2 ortamında ise referans tablet 90 dakika sonunda etkin maddenin yaklaşık %20'si salınırken, Maisine® SNEDDS formülasyonu yaklaşık %99'unu, S-SNEDDS tablet %88'ini

salmıştır. S-SNEDDS tabletten referans tablete göre % kümülatif çözünen BOS miktarı FeSSIF için 7,5 kat, FeSSIF-V2 için 4,4 kat fazla çözünme göstermiştir.

Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların farklı ortamlardaki in vitro çözünme hızı çalışmalarından 90 dakika sonunda elde edilen % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel anlamlılıkları Çizelge 4.93'te verilmiştir. Biyouyumlu ortamlar FaSSIF ve FeSSIF ile ikinci versiyonları olan FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için ticari ürün ve SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların 90 dakika sonunda elde edilen % kümülatif çözünen etkin madde miktarı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.93. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların % kümülatif çözünen BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi

	%1 SLS içeren distile su	**FaSSIF**	**FeSSIF**	**FaSSIF-V2**	**FeSSIF-V2**
Referans-T / M-SNEDDS	p>0,05	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*
Referans-T / S-SNEDDS-T	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*

Referans -T: Tracleer® tablet, **P-SNEDDS:** Peceol® SNEDDS, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, * istatistiksel olarak anlamlıdır

Referans, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların çözünme hızı profillerinin model bağımsız f_2 benzerlik faktörü sonuçları Çizelge 4.94'te verilmiştir.

Çizelge 4.94. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların kullanılan ortamlara göre çözünme hızı profillerinin f_2 benzerlik faktörü sonuçları

	f_2				
	%1 SLS	**FaSSIF**	**FeSSIF**	**FaSSIF-V2**	**FeSSIF-V2**
Referans tablet-Maisine® SNEDDS	63	11	9	9	7
Referans tablet-S-SNEDDS tablet	31	24	14	15	13
Maisine® SNEDDS- S-SNEDDS tablet	35	28	41	38	37

Referans tablet ve S-SNEDDS tabletlerin çözünme hızı profillerinin DDSolver® ile model bağımlı yöntemler kullanılarak değerlendirilmesine ait sonuçlar Çizelge 4.95'te verilmiştir. Hangi modele uyduğu düzeltilmiş determinasyon katsayısı (R^2adj), Akaike bilgi ölçütü (AIC) ve model seçim kriteri (MSC) ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.95. Referans tablet ve S-SNEDDS tablet formülasyonunun kullanılan ortamlara göre çözünme hızı profillerinin model bağımlı yöntem sonuçları

		Referans tablet	S-SNEDDS tablet
%1 SLS içeren distile su	**Model parametereleri**	**Gompertz 2**	**Probit 2**
		α= 1,20	α= -1,77
		β= 1,69	β= 1,80
		F_{max}= 107	F_{max}= 92,4
	R^2_{adj}	0,999	0,999
	AIC	7,41	-3,53
	MSC	6,03	7,83
FaSSIF	**Model parametereleri**	**Peppas-Sahlin 2**	**Probit 1**
		k_1= 7,14	α= -1,58
		k_2= -0,39	β= 1,23
	R^2_{adj}	0,999	0,999
	AIC	-15,51	1,97
	MSC	7,82	6,84
FeSSIF	**Model parametereleri**	**Gompertz 2**	**Korsmeyer-Peppas**
		α= 3,65	K_{KP}= 25,0
		β= 2,22	n= 0,27
		F_{max}= 11,6	
	R^2_{adj}	0,999	0,999
	AIC	-13,5	8,15
	MSC	5,13	5,74
FaSSIF-V2	**Model parametereleri**	**Weibull 1**	**Gompertz 1**
		α= 9,59	α= 3,14
		β= 0,20	β= 1,44
		Ti= 6,00	
	R^2_{adj}	0,999	0,998
	AIC	-9,68	16,9
	MSC	6,02	4,24
FeSSIF-V2	**Model parametereleri**	**Probit 2**	**Logistic 2**
		α= -0,310	α= -3,15
		β= 0,995	β= 3,14
		F_{max}= 21,1	F_{max}= 92,7
	R^2_{adj}	0,999	0,999
	AIC	-9,99	-9,17
	MSC	5,67	8,77

α: çözünme ve zaman faktörü; **β:** şekil faktörü

k_1: ilaç salınımına $t^{0,5}$'e bağlı ilaç difüzyonunun bağıl katkısını gösteren sabit

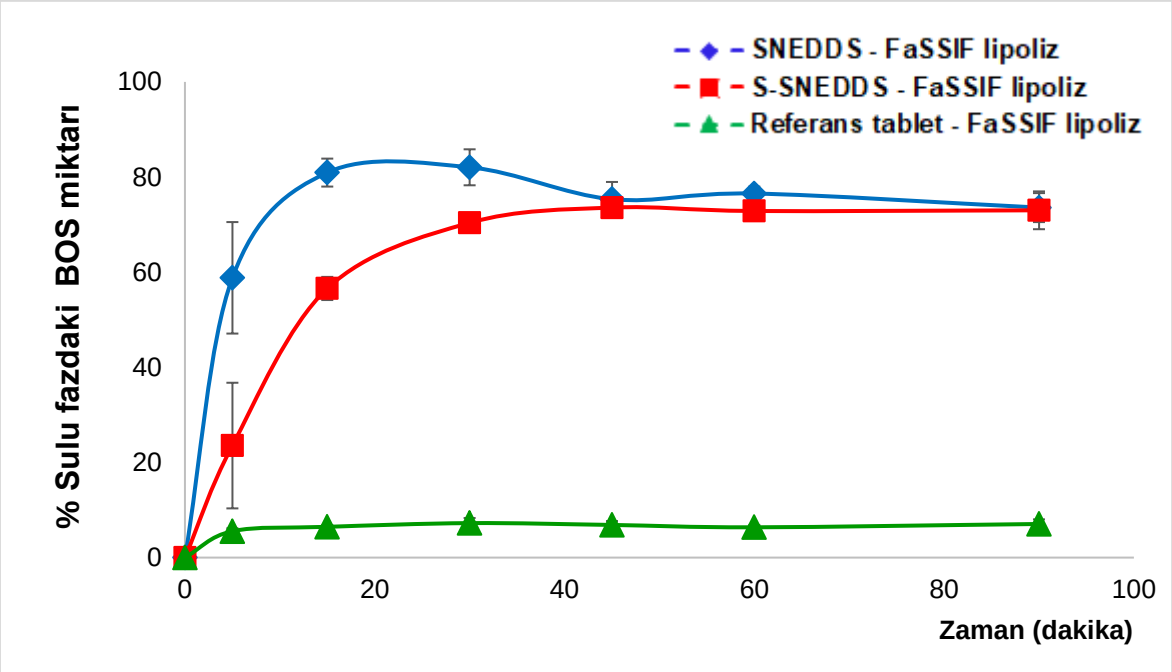
k_2: t'ye bağlı polimerin ilaç salımına bağıl katkısını gösteren sabit

F_{max}: sonsuza kadar salınan ilacın maksimum fraksiyonu

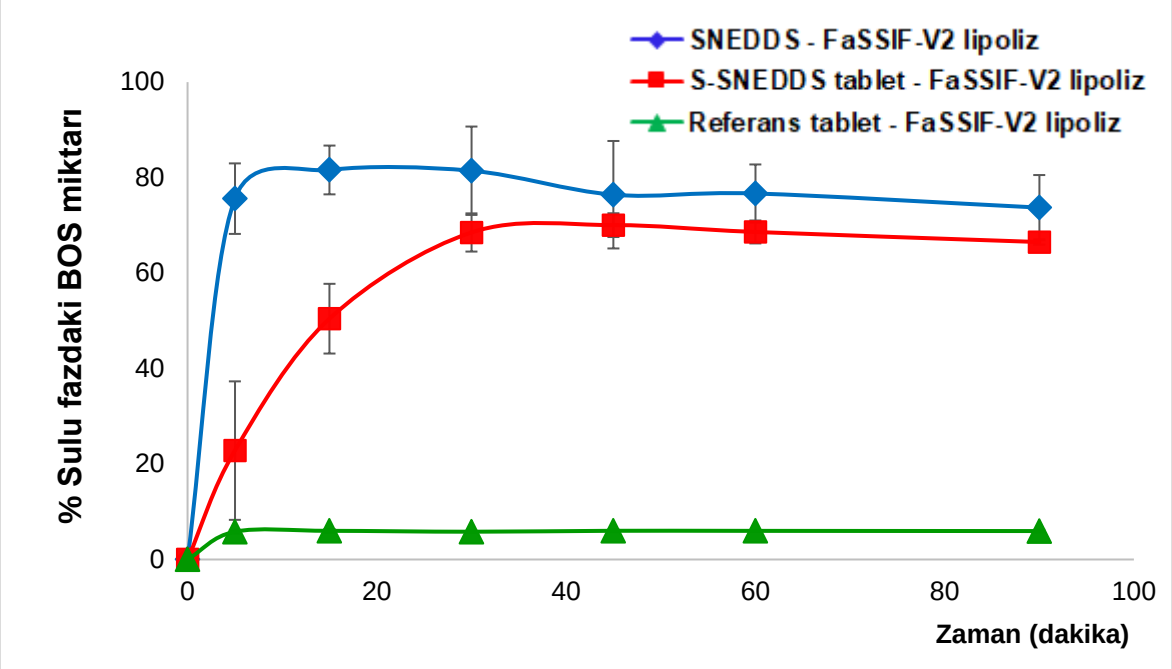
Özellikle açlık ve tokluk ortamlarında elde edilen sonuçlar geliştirilen S-SNEDDS tablet açısından referans tablete kıyasla umut vericidir. Bundan sonraki aşamalarda gerçekleştirilecek olan in vivo çalışmalarla da in vitro verilerin desteklenmesi hedeflenmektedir.

4.9. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

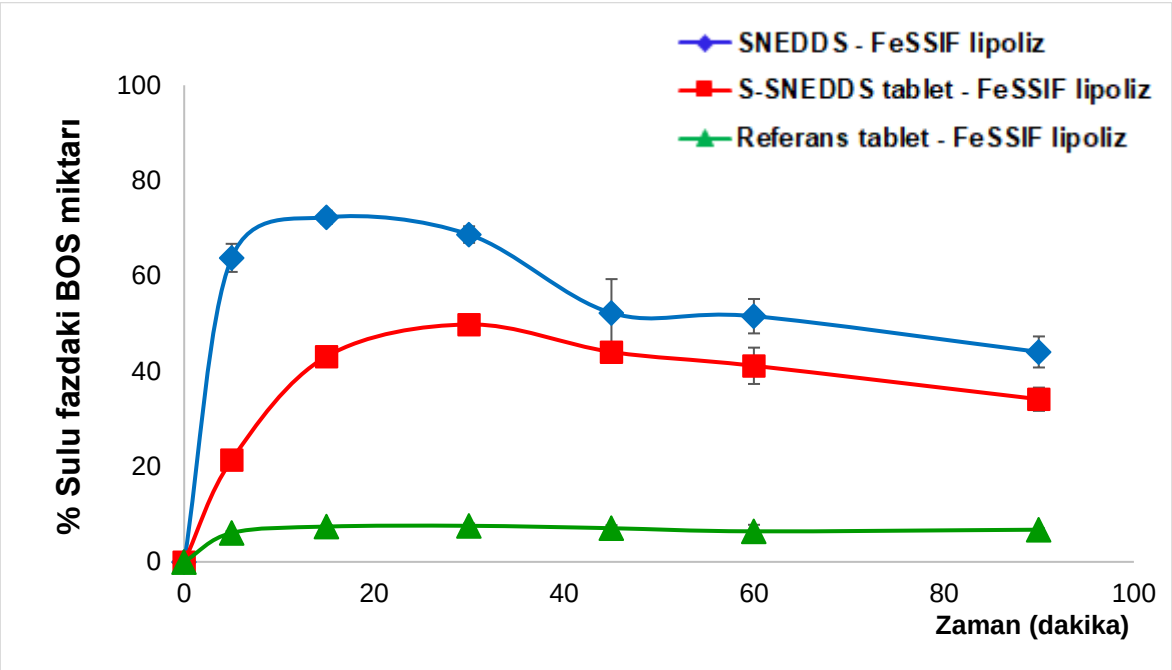
Referans tablet, BOS yüklü SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlar için FaSSIF ve FaSSIF-V2 ortamlarında yürütülen lipoliz çalışmalarına ait % sulu faz BOS miktarı profilleri Şekil 4.108 ve 4.109'da, FeSSIF ve FeSSIF-V2 ortamlarında yürütülen lipoliz çalışmalarında sulu faz BOS miktarı profilleri Şekil 4.110 ve 4.111'de, 90 dakika sonunda % sulu faz BOS miktarları Şekil 4.112'de gösterilmiştir.



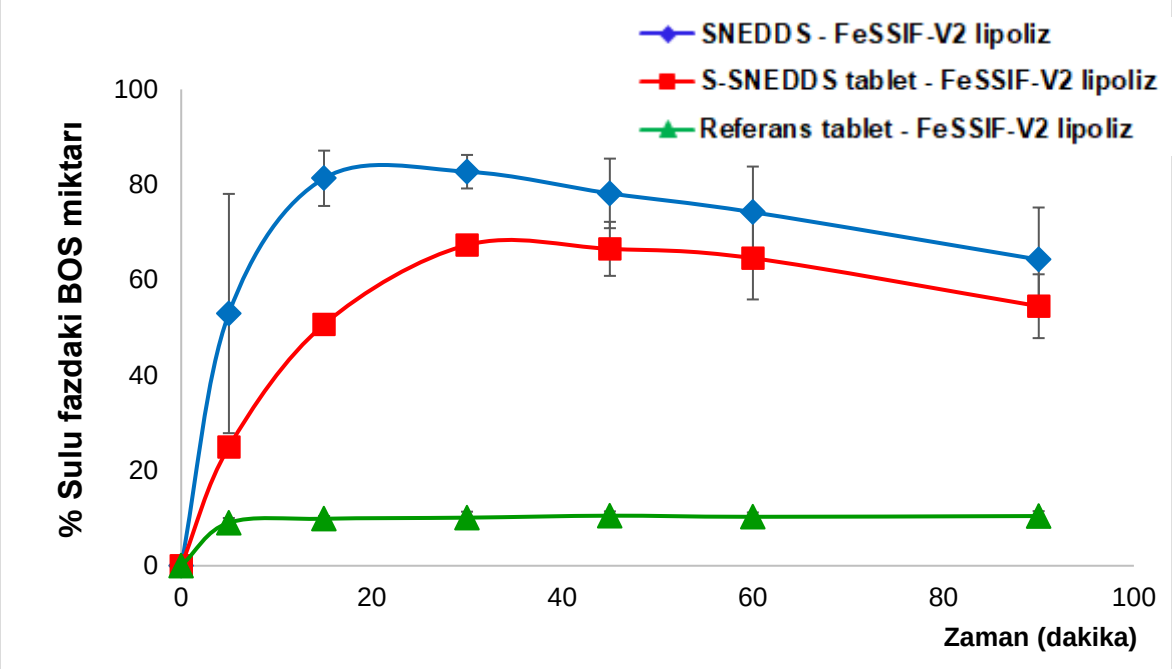
Şekil 4.108. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FaSSIF lipoliz ortamına ait profilleri



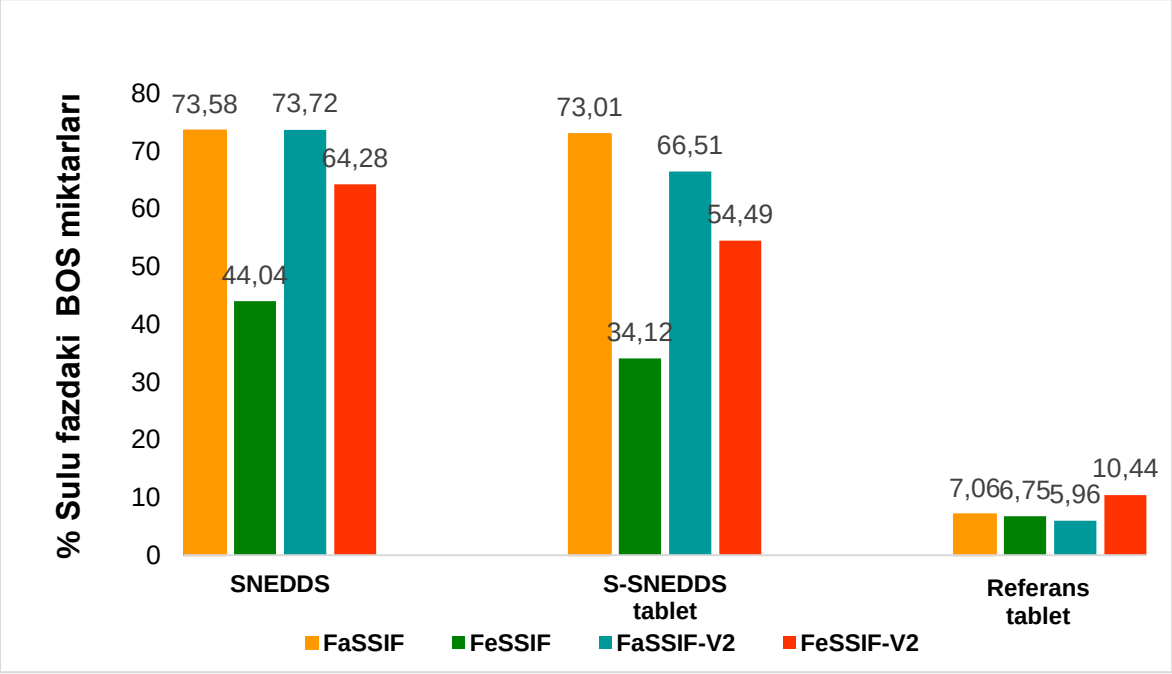
Şekil 4.109. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FaSSIF-V2 lipoliz ortamına ait profilleri



Şekil 4.110. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FeSSIF lipoliz ortamına ait profilleri



Şekil 4.111. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların FeSSIF-V2 lipoliz ortamına ait profilleri



Şekil 4.112. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların 90 dakika lipolizi sonunda % sulu faz BOS miktarları

FaSSIF ve FaSSIF-V2 lipoliz ortamlarında SNEDDS ve S-SNEDDS tablet 90 dakika boyunca formülasyonlardaki BOS miktarının %66'dan fazlasını çözünmüş halde tutmuştur (Şekil 4.108, 4.109 ve 4.112). 90 dakika sonunda FaSSIF

ortamında SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu için sulu faz BOS miktarı sırasıyla %73,6 ve %73,0'tür. Çalışma sonunda (90. dakika) FaSSIF-V2 ortamında SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu için sulu faz BOS miktarı ise sırasıyla %73,7 ve %66,5'tur. Tablet formülasyonu dağılma ve adsorban olarak kullanılan Neusilin® US2'dan SNEDDS'in desorpsiyon süreci nedeniyle yaklaşık 30 dakika boyunca SNEDDS formülasyonuna kıyasla sulu fazda daha az BOS bulunmuştur. Ancak iki ortam ve iki formülasyon arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Referans tabletin lipolizi sırasında ise BOS'un büyük miktarı çökmüş, BOS'ın %7,1'i FaSSIF lipoliz ortamında, %6,0'si FaSSIF-V2 lipoliz ortamında çözünür halde bulunmuştur (Şekil 4.108, 4.109 ve 4.112).

FeSSIF ortamında 90 dakika sonunda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu için sulu faz BOS miktarı sırasıyla %44,0 ve %34,1'dir (Şekil 4.110). FeSSIF-V2 ortamında 90 dakika sonunda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu için sulu faz BOS miktarı ise sırasıyla %64,3 ve %54,5'tur (Şekil 4.111). Açlık lipoliz ortamlarıyla karşılaştırıldığında tokluk lipoliz ortamlarındaki % sulu faz BOS miktarı daha azdır ($p<0,05$). FeSSIF-V2 lipoliz ortamı ile karşılaştırıldığında 90 dakika sonunda FeSSIF lipoliz ortamında % sulu faz BOS miktarı SNEDDS ve S-SNEDDS için daha azdır (Şekil 4.112).

Referans tabletin lipolizi sırasında ise ilacın büyük bir miktarı çökmüş, BOS'un %6,8'i FeSSIF lipoliz ortamında, %10,4'ü FeSSIF-V2 lipoliz ortamında çözünür halde bulunmuştur. Referans tablet için açlık ve tokluk ortamları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonların biyouyumlu ortamlardaki in vitro lipoliz çalışmalarından 90 dakika sonunda elde edilen % sulu faz BOS miktarı için istatistiksel anlamlılıkları Çizelge 4.96'da verilmiştir.

Çizelge 4.96. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların biyouyumlu ortamlarda % sulu faz BOS miktarı için istatistiksel değerlendirmesi

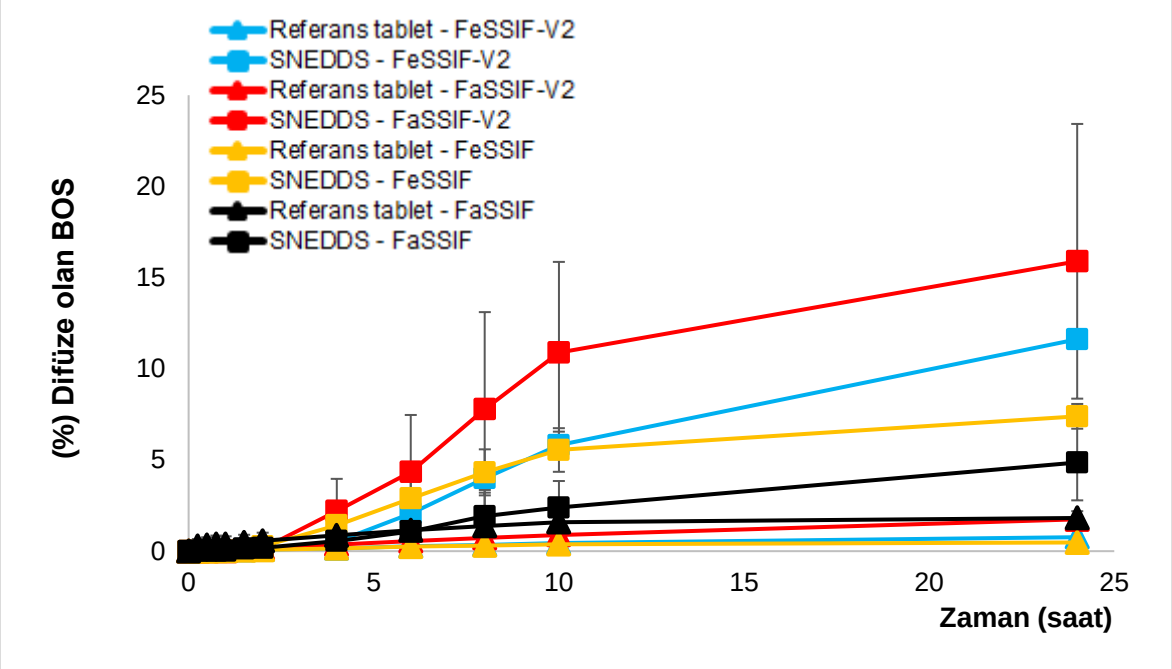
	FaSSIF	FeSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
Referans-T / **M-SNEDDS**	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*
Referans-T / **S-SNEDDS-T**	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*

Referans-T: Tracleer® tablet, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, **S-SNEDDS-T:** S-SNEDDS tablet, * istatistiksel olarak anlamlıdır

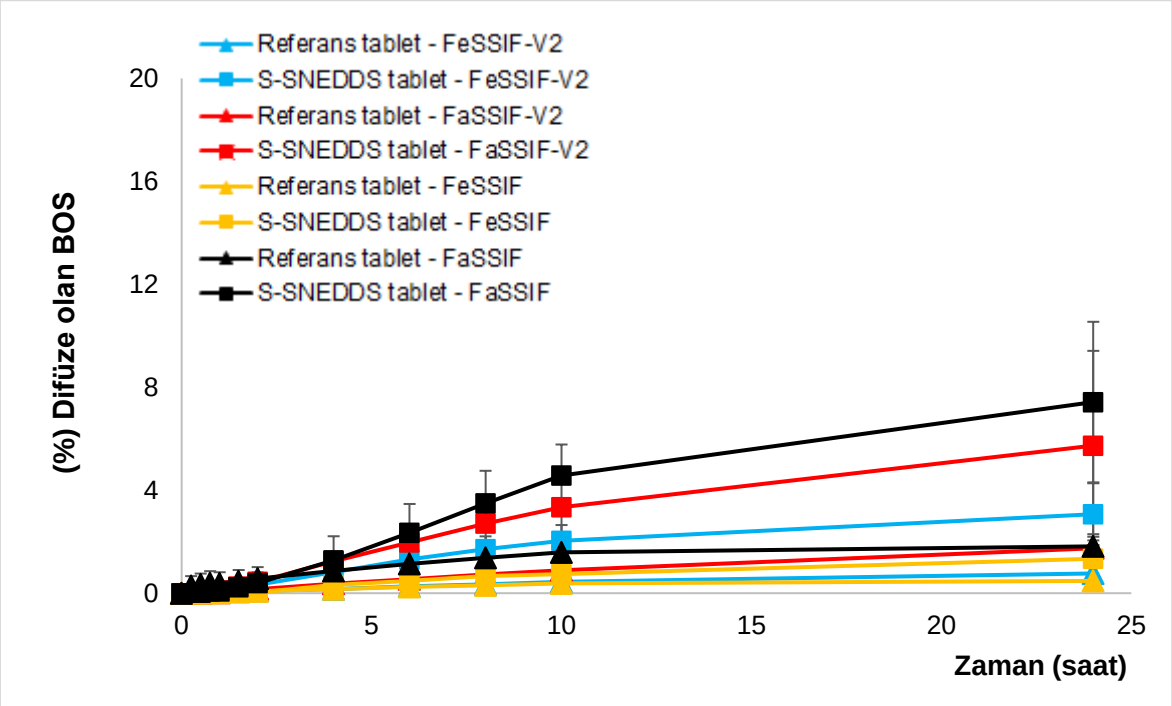
4.10. Ex Vivo Permeabilite Çalışmaları

Permeabilite çalışmalarında in vivo koşulları daha iyi simüle etmek ve in vitro çözünme ve in vivo çalışmalar ile ilişkilendirmek için ortam olarak FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 kullanılmıştır. BOS için FDA tarafından önerilen çözünme ortamı olan %1 SLS içeren distile su ortamı yüksek miktarda yüzey aktif madde içerdiğinden ve in vivo koşulları yansıtmadığından ex vivo permeabilite çalışmasına dahil edilmemiştir.

Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların ex vivo permeabilite çalışmasına ait % difüze olan BOS miktarı-zaman profilleri Şekil 4.113 ve 4.114'te verilmiştir. Akı ve permeabilite katsayısı Bölüm 3.2.8'de yer alan eşitliklere göre hesaplanmış ve Çizelge 4.97'de gösterilmiştir.



Şekil 4.113. Referans tablet ve SNEDDS formülasyonuna ait % difüze olan BOS-zaman profili



Şekil 4.114. Referans tablet ve S-SNEDDS tablet formülasyonuna ait % difüze olan BOS-zaman profili

Çizelge 4.97. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının akı ve permeabilite katsayısı sonuçları

		SNEDDS	S-SNEDDS tablet	Referans tablet
A	**Akı (μg cm^{-2} min^{-1})**	54,4±20,2	44,8±28,0	8,85±1,83
	Permeabilite katsayısı (x 10^{-2} cm min^{-1})	0,181±0,067	0,597±0,374	0,118±0,024
E	**Akı (μg cm^{-2} min^{-1})**	208±26,6	3,2±2,89	2,69±0,317
	Permeabilite katsayısı (x 10^{-2} cm min^{-1})	0,692±0,089	0,042±0,038	0,036±0,004
A-V2	**Akı (μg cm^{-2} min^{-1})**	417±262	24,2±19,2	6,36±0,816
	Permeabilite katsayısı (x 10^{-2} cm min^{-1})	1,390±0,874	0,322±0,255	0,085±0,011
E-V2	**Akı (μg cm^{-2} min^{-1})**	229±85,0	6,06±3,48	3,36±0,802
	Permeabilite katsayısı (x 10^{-2} cm min^{-1})	0,763±0,283	0,081±0,046	0,045±0,011

A: FaSSIF, **E:** FeSSIF, **A-V2:** FaSSIF-V2, **E-V2:** FeSSIF-V2, X_{ort} ± SS, n=3

Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların farklı ortamlardaki permeabilite çalışmalarından elde edilen permeabilite katsayısı için istatistiksel anlamlılıkları Çizelge 4.98'de verilmiştir.

Çizelge 4.98. Referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların permeabilite katsayısı için istatistiksel değerlendirmesi

	FaSSIF	FeSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
Referans-T / M-SNEDDS	p>0,05	p<0,05*	p<0,05*	p<0,05*
Referans-T / S-SNEDDS-T	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Referans-T: Tracleer® tablet, **M-SNEDDS:** Maisine® SNEDDS, **S-SNEDDS-T:** S-SNEDDS tablet, * istatistiksel olarak anlamlıdır

İn vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite çalışmaları sonucunda referans tablet ile karşılaştırılan SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarından elde edilen artışlar ve bu artışların istatistiksel anlamlılıkları Çizelge 4.99 ve 4.100'de verilmiştir.

Çizelge 4.99. Referans tablete kıyasla SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite artışları

	İn vitro çözünme hızı **(%) Kümülatif çözünen**	**Ex vivo permeabilite** **Permeabilite katsayısı**	**İn vitro lipoliz** **(%) Sulu faz BOS**
FaSSIF	3,0-kat*	1,53-kat	10,4-kat*
FeSSIF	8,0-kat*	19,2-kat *	6,5-kat*
FaSSIF-V2	4,2-kat*	16,4-kat*****	12,4-kat*
FeSSIF-V2	4,9-kat*	17,0-kat*****	6,2-kat*

* p<0,05, istatistiksel olarak anlamlıdır

Çizelge 4.100. Referans tablete kıyasla S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite artışları

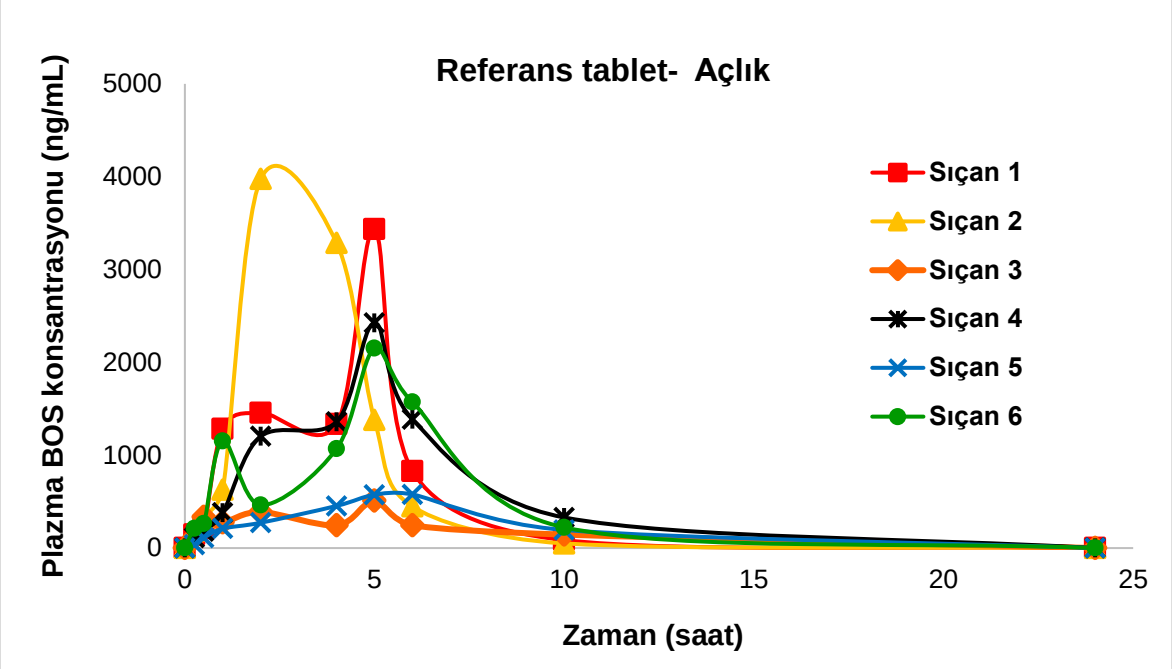
	İn vitro çözünme hızı **(%) Kümülatif çözünen**	**Ex vivo permeabilite** **Permeabilite katsayısı**	**İn vitro lipoliz** **(%) Sulu faz BOS**
FaSSIF	2,47-kat*	5,06-kat	10,3-kat*
FeSSIF	7,49-kat*	1,17-kat	5,05-kat*
FaSSIF-V2	3,70-kat*	3,79-kat	11,2-kat*****
FeSSIF-V2	4,39-kat*	1,80-kat	5,22-kat*****

* p<0,05, istatistiksel olarak anlamlıdır

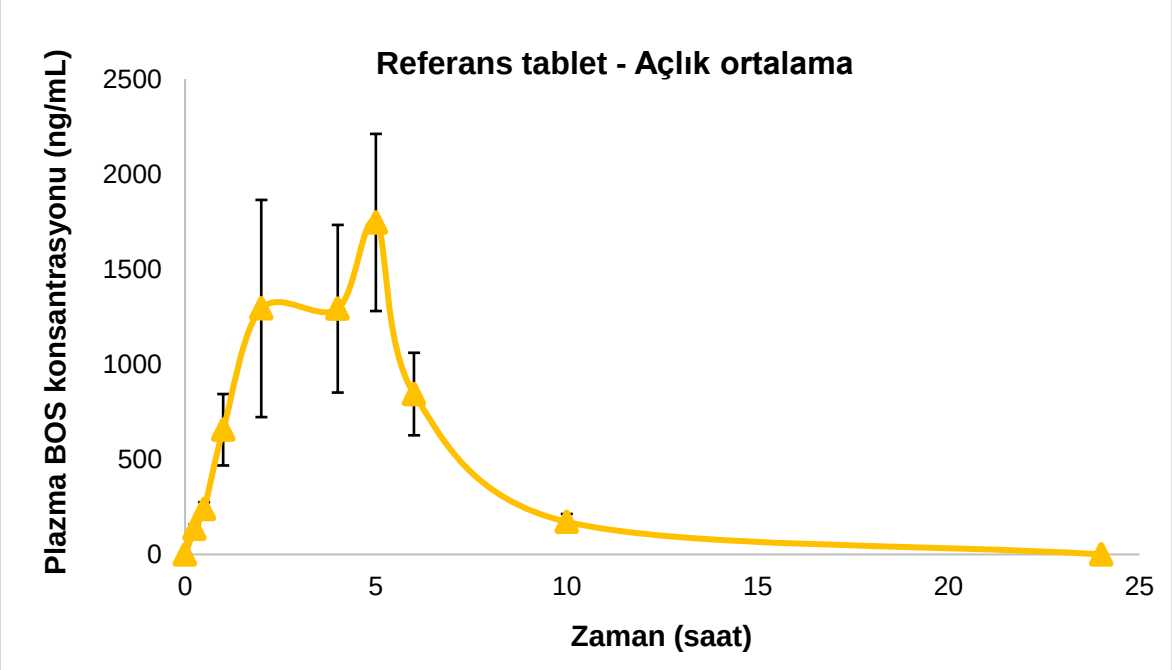
4.11. İn Vivo Çalışmalar

4.11.1. Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları

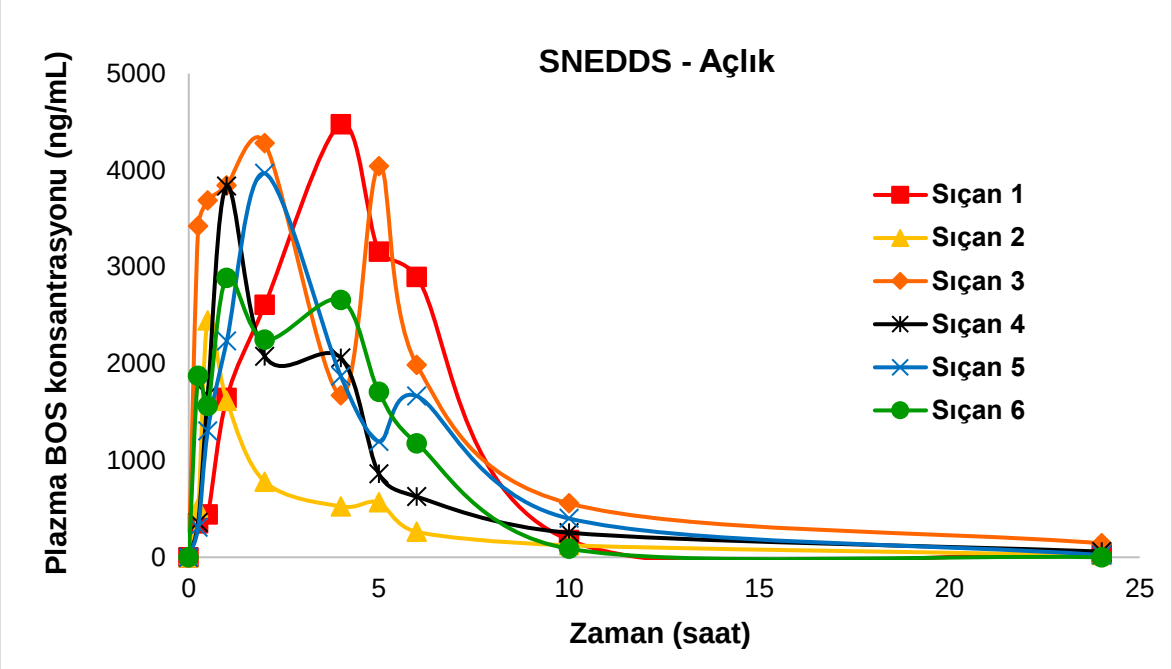
Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlar için açlık ve tokluk sıçan gruplarından elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri Şekil 4.115 - 4.128'de, verilerden hareketle WinNonlin™ 8.3 programı kullanılarak NCA ile hesaplanan farmakokinetik parametreler ise Çizelge 4.101 ve 4.102'de verilmiştir.



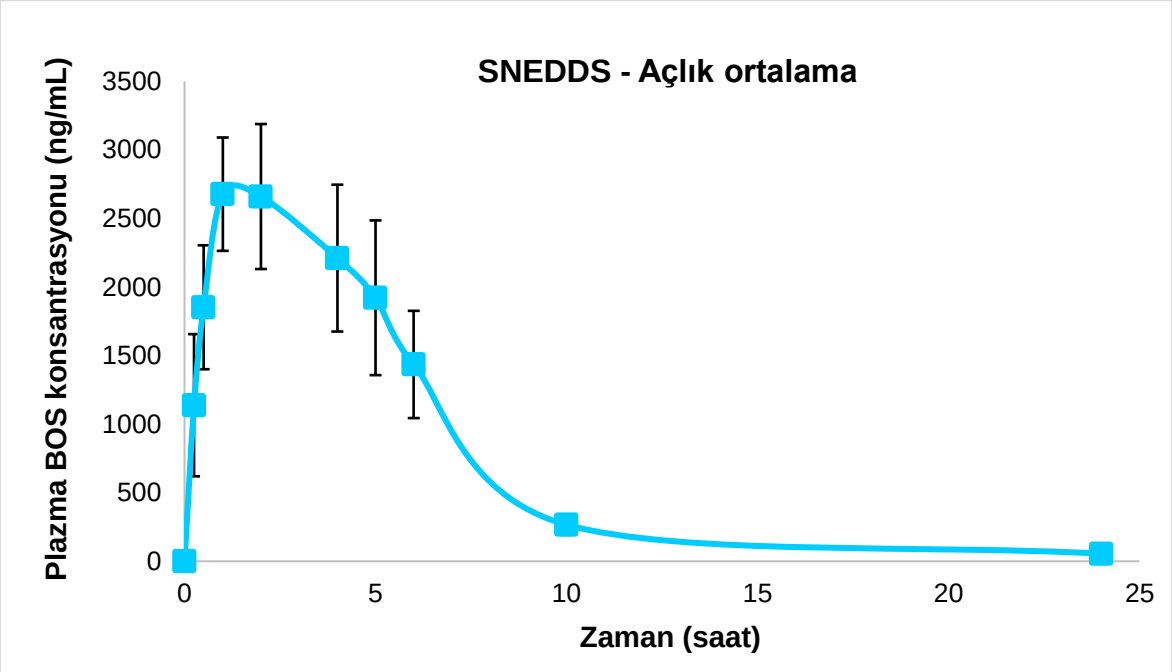
Şekil 4.115. Referans tablet açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



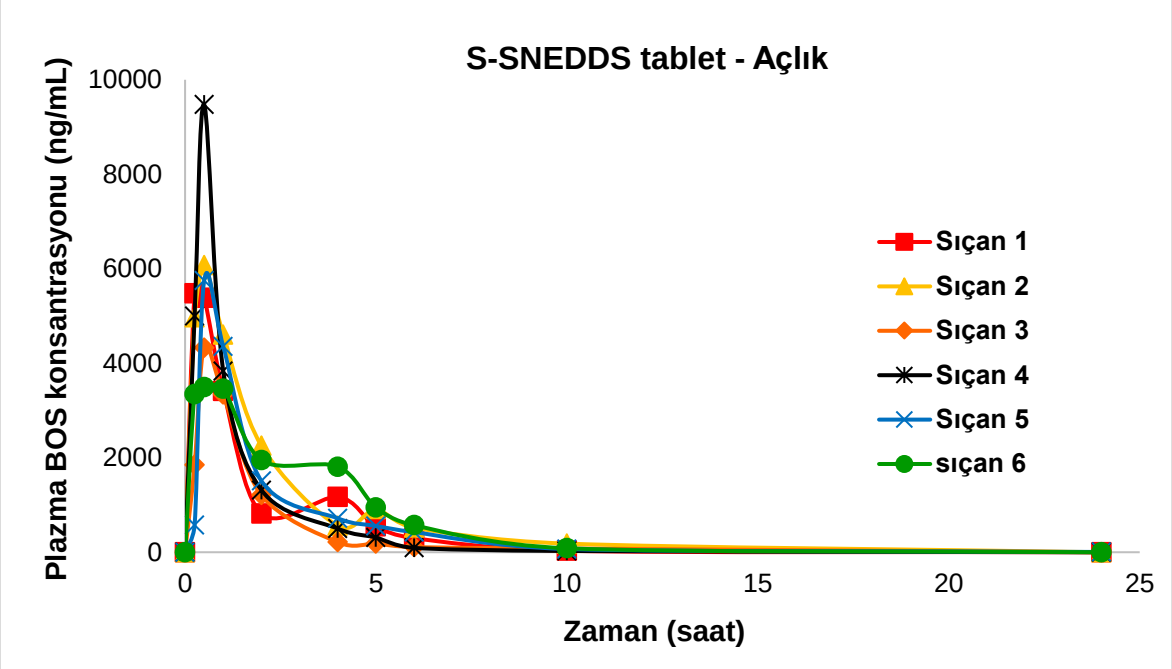
Şekil 4.116. Referans tablet açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



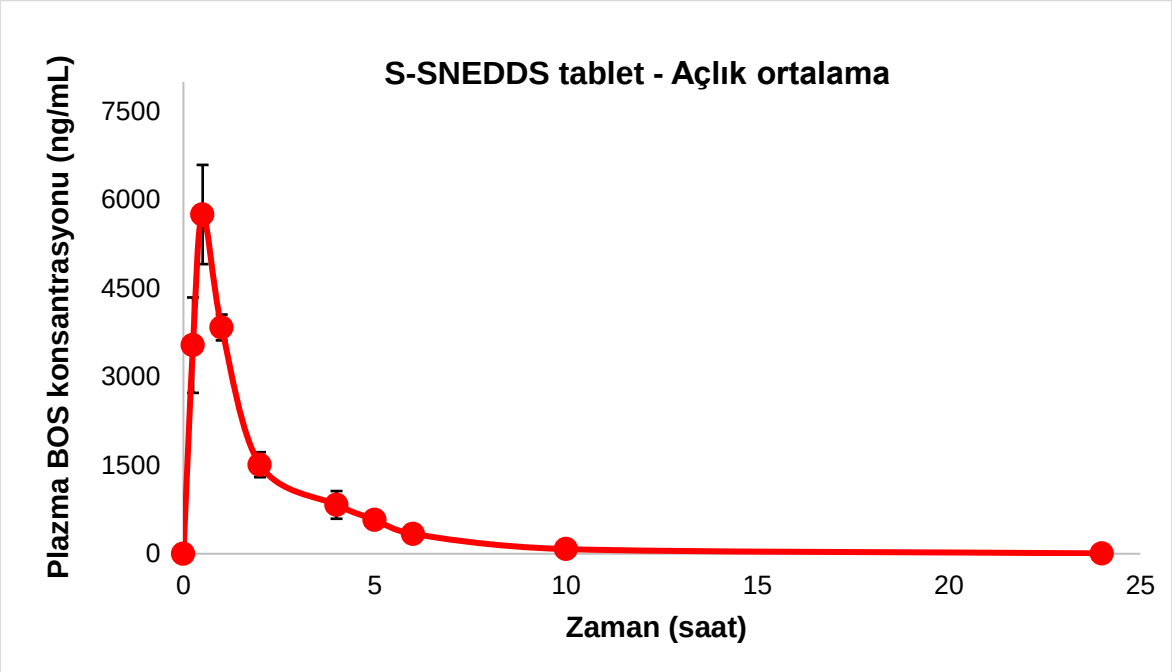
Şekil 4.117. SNEDDS formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



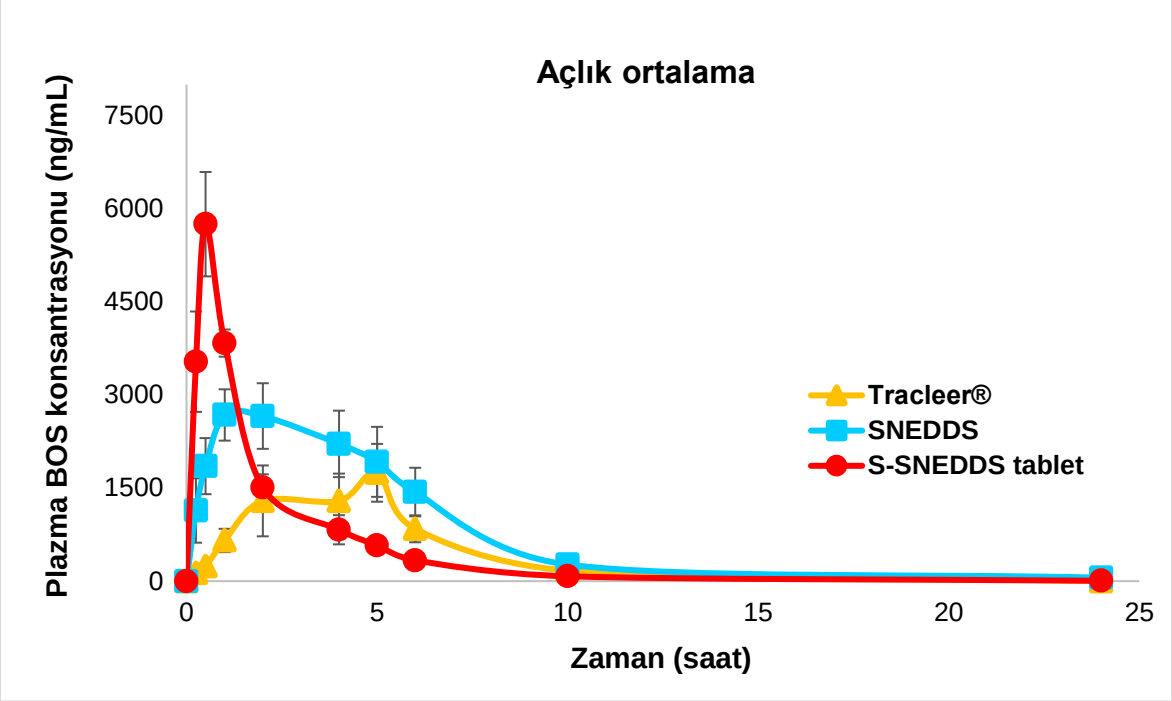
Şekil 4.118. SNEDDS formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



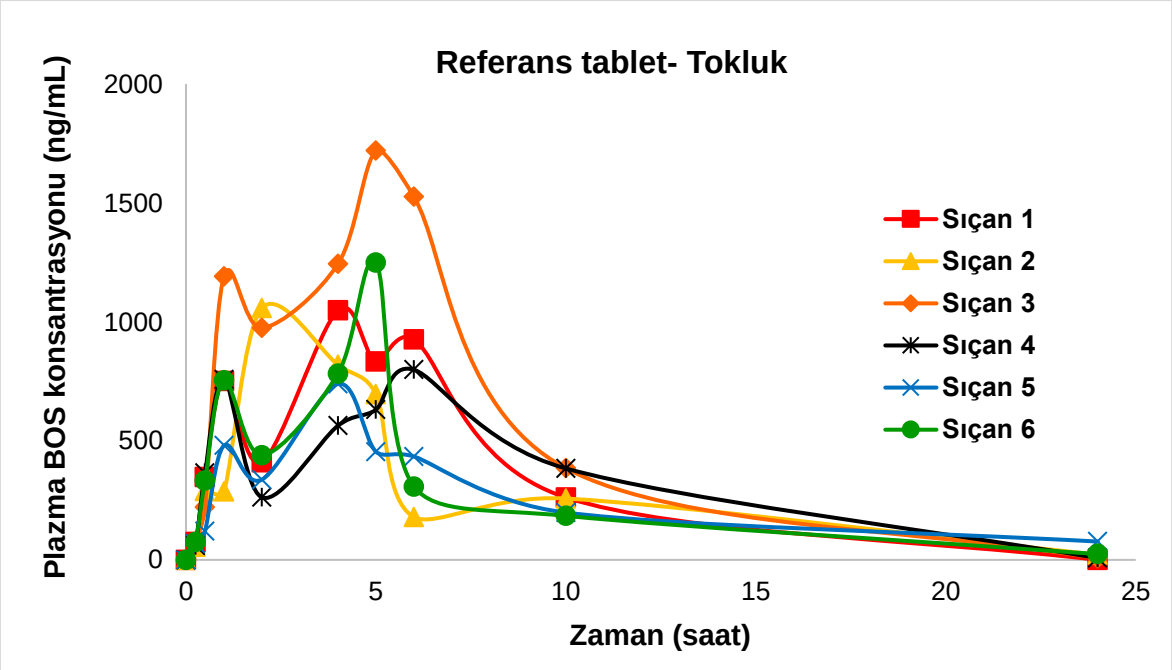
Şekil 4.119. S-SNEDDS tablet formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



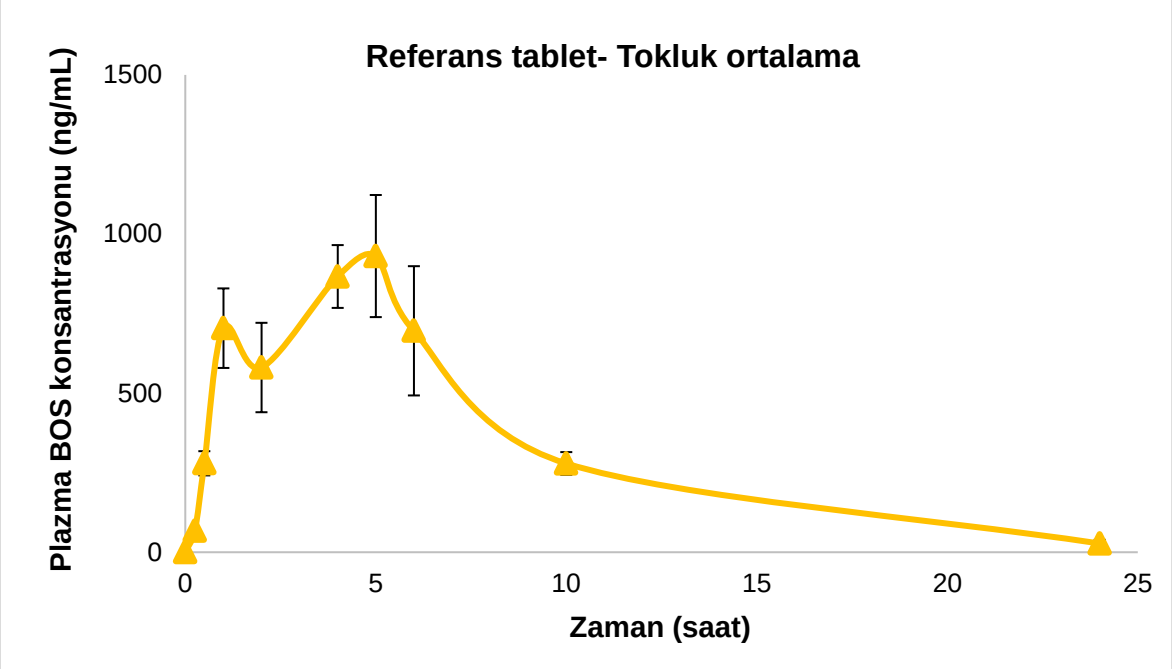
Şekil 4.120. S-SNEDDS tablet formülasyonu açlık grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



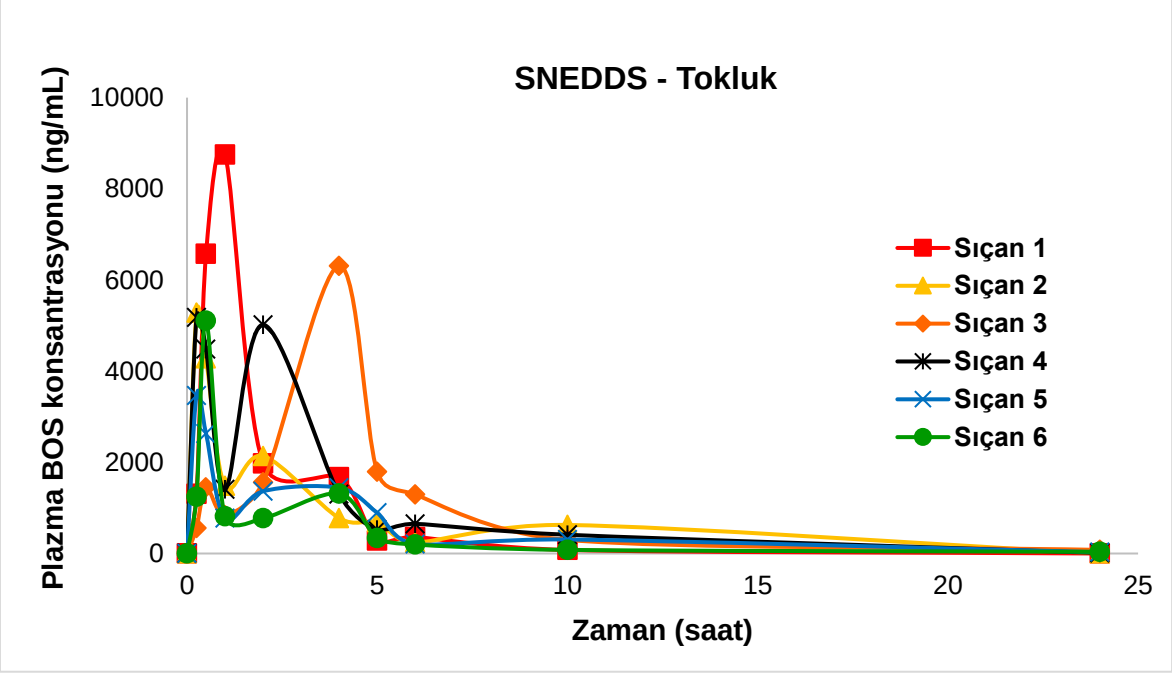
Şekil 4.121. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarına ait açlık sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



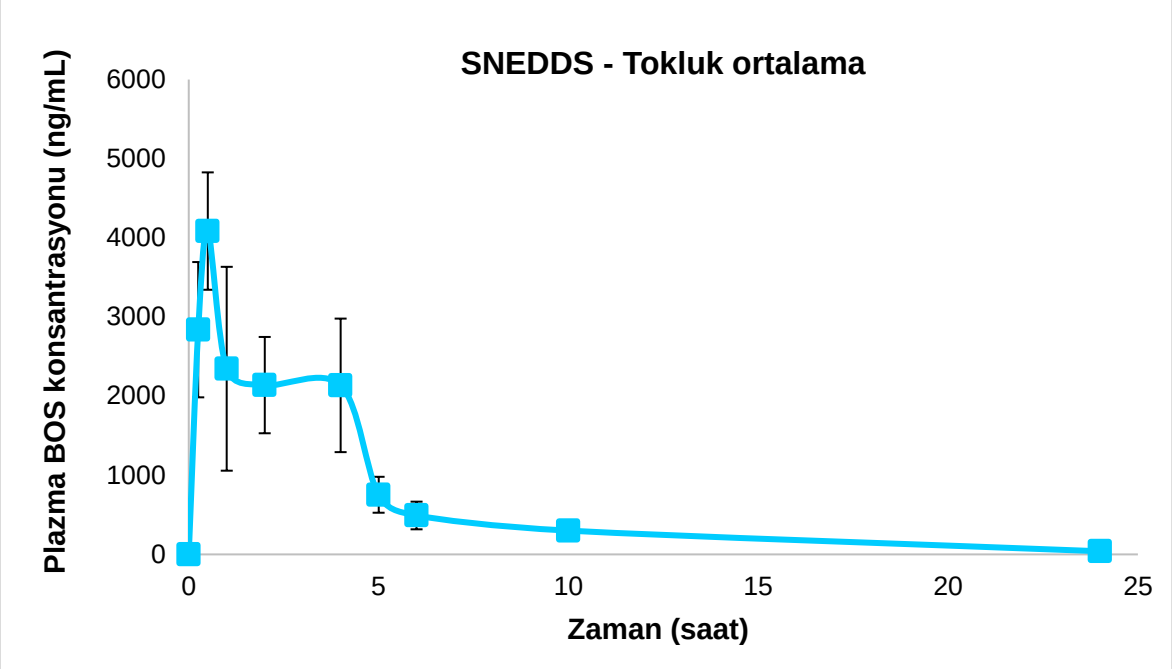
Şekil 4.122. Referans tablet tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



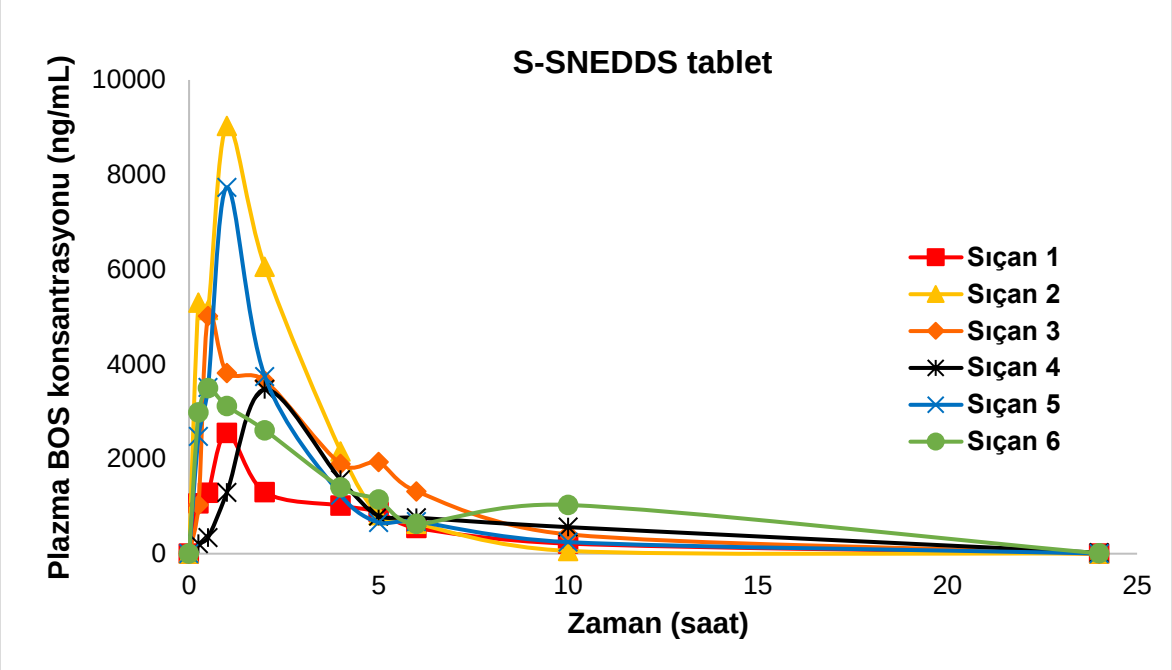
Şekil 4.123. Referans tablet tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



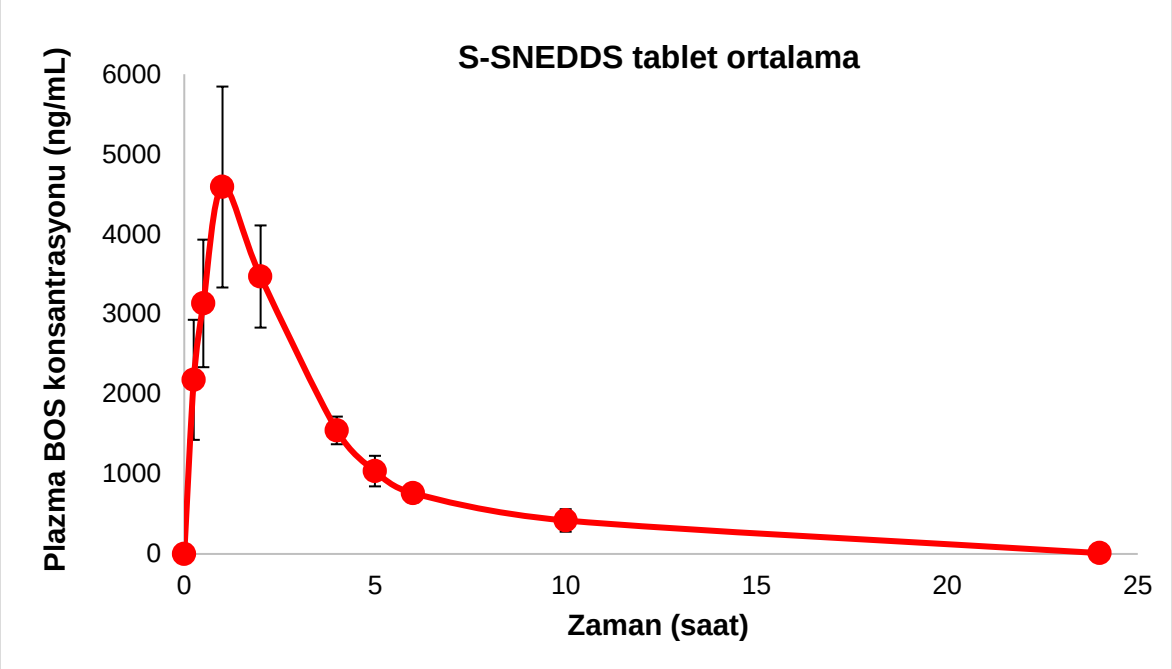
Şekil 4.124. SNEDDS formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



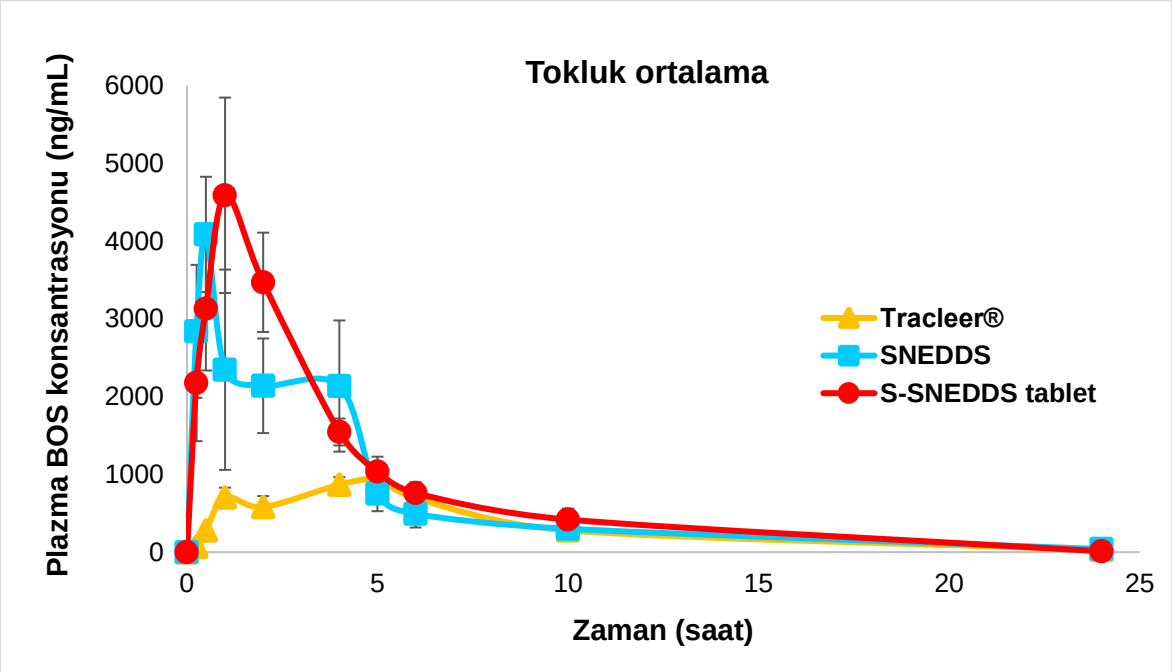
Şekil 4.125. SNEDDS formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



Şekil 4.126. S-SNEDDS tablet formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



Şekil 4.127. S-SNEDDS tablet formülasyonu tokluk grubu sıçanlarına ait ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)



Şekil 4.128. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarına ait tokluk sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6, X_{ort} ± SH)

Çizelge 4.101. Açlık grubuna ait farmakokinetik parametreleri

	K_e (1/saat)	$t_{1/2}$ (saat)	t_{maks} (saat)	C_{maks} (ng/mL)	AUC_{0-t} (saat.ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (saat.ng/mL)	MRT (saat)	V_d (L)	Cl_F (L/saat)
Referans tablet	0,41 ± 0,20	2,26 ± 1,50	4,67 ± 1,37	2178 ± 1429	8689 ± 4489	9263 ± 4170	4,43 ± 0,66	8,27 ± 9,91	1,94 ± 1,12
SNEDDS	0,25 ± 0,18	3,76 ± 1,64	1,75 ± 1,26	3649 ± 805	18426 ± 7879	18768 ± 8111	4,51 ± 0,60	6,81 ± 6,50	1,19 ± 0,77
S-SNEDDS tablet	0,39 ± 0,17	2,21 ± 1,20	0,46 ± 0,10	5766 ± 2057	11081 ± 2252	11313 ± 2271	2,13 ± 0,52	4,34 ± 3,21	1,30 ± 0,25

	SNEDDS		**S-SNEDDS tablet**	
	C_{max}	**AUC_{0-24}**	**C_{max}**	**AUC_{0-24}**
	1,67-kat	2,12-kat*	2,65-kat*	1,28-kat
% BBY	212		128	

Ort ± SS, **K_e**: eliminasyon hız sabiti, **$t_{1/2}$**: yarı ömür; **t_{max}**: C_{max}'a ulaşma süresi; **C_{maks}**: plazmadaki maksimum ilaç konsantrasyonu; **AUC**: eğrinin altındaki alan, **MRT:** vücuttaki ortalama kalış süresi**,** **V_d**: dağılım hacmi, **Cl**: klirens, **% BBY**: AUC'ye göre hesaplanan bağıl biyoyararlanım yüzdesi, *: p<0,05, istatistiksel olarak anlamlıdır

Çizelge 4.102. Tokluk grubuna ait farmakokinetik parametreler

	K_e (1/saat)	$t_{1/2}$ (saat)	t_{maks} (saat)	C_{maks} (ng/mL)	AUC_{0-t} (saat.ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (saat.ng/mL)	MRT (saat)	V_d (L)	Cl_F (L/saat)
Referans tablet	0,20 ± 0,08	4,03 ± 1,98	4,33 ± 1,37	1102 ± 355	7855 ± 2797	8223 ± 2595	6,22 ± 0,99	14,27 ± 8,54	2,34 ± 0,49
SNEDDS	0,21 ± 0,11	3,88 ± 1,75	1,04 ± 1,48	5682 ± 1761	14458 ± 5374	15172 ± 5136	3,82 ± 1,20	8,11 ± 6,92	1,31 ± 0,50
S-SNEDDS tablet	0,32 ± 0,13	2,44 ± 0,72	1,00 ± 0,55	5215 ± 2609	18632 ± 5588	19028 ± 5384	3,84 ± 1,41	3,32 ± 1,90	0,91 ± 0,41

	SNEDDS		**S-SNEDDS tablet**	
	C_{max}	**AUC_{0-24}**	**C_{max}**	**AUC_{0-24}**
	5,15-kat*****	1,84-kat*****	4,73-kat*****	2,37-kat*****
% BBY	184		237	

Ort ± SS, **K_e**: eliminasyon hız sabiti, **$t_{1/2}$**: yarı ömür; **t_{max}**: C_{max}'a ulaşma süresi; **C_{maks}**: plazmadaki maksimum ilaç konsantrasyonu; **AUC**: eğrinin altındaki alan, **MRT:** vücuttaki ortalama kalış süresi**,** **V_d**: dağılım hacmi, **Cl**: klirens, **% BBY**: AUC'ye göre hesaplanan bağıl biyoyararlanım yüzdesi, *: p<0,05, istatistiksel olarak anlamlıdır

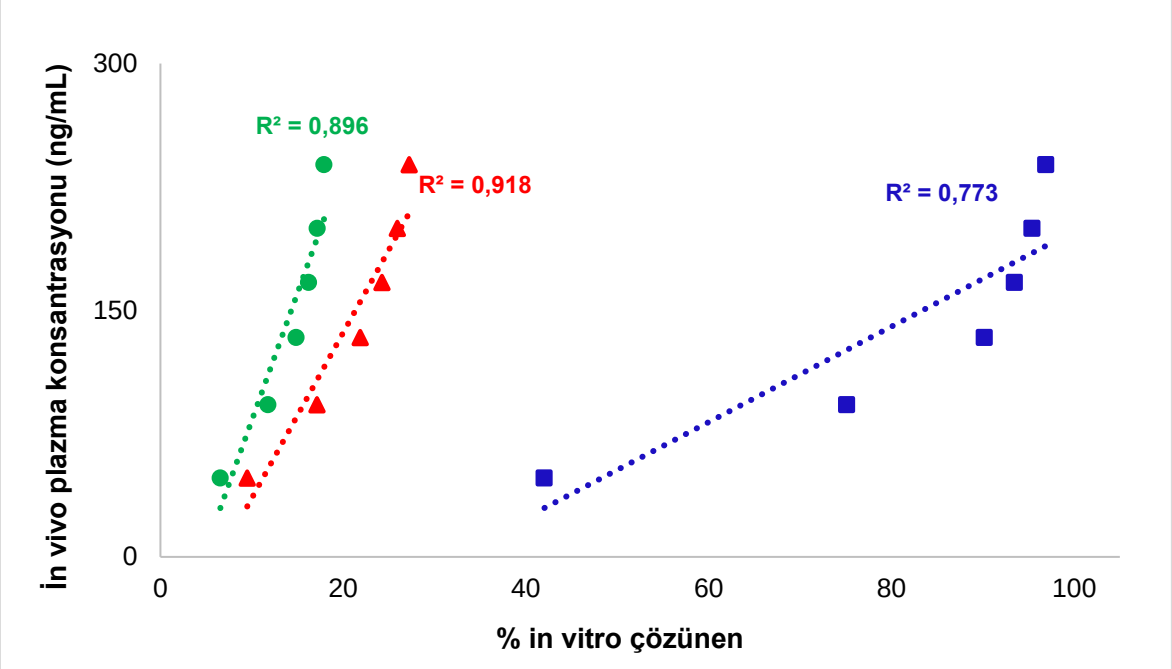
Yapılan farmakokinetik çalışmalarda SNEDDS formülasyonu referans tablet ile karşılaştırıldığında açlık durumu için C_{maks} ve AUC değerleri sırasıyla 3649 ± 805 ng/mL ve 18426 ± 7879 saat.ng/mL, tokluk durumu için ise sırasıyla 5682 ± 1761 ng/mL ve 14458 ± 5374 saat.ng/mL'dir. SNEDDS formülasyonu referans tablet ile karşılaştırıldığında açlık durumunda C_{max} ve AUC'yi 1,67 ve 2,12 kat, tokluk durumunda C_{max} ve AUC'yi 5,15 ve 1,84 kat artmıştır (Çizelge 4.101 ve 4.102).

S-SNEDDS tablet formülasyonu referans tablet ile karşılaştırıldığında açlık durumu için C_{maks} ve AUC değerleri sırasıyla 5766 ± 2057 ng/mL ve 11081 ± 2252 saat.ng/mL, tokluk durumu için ise sırasıyla 5215 ± 2609 ng/mL ve 18632 ± 5588 saat.ng/mL'dir. S-SNEDDS tablet formülasyonu referans tablet ile karşılaştırıldığında açlık durumunda C_{max} ve AUC 2,65 ve 1,28 kat, tokluk durumunda C_{max} ve AUC'yi 4,73 ve 2,37 kat artmıştır (Çizelge 4.101 ve 4.102). Tokluk durumunda hem SNEDDS hem de S-SNEDDS için C_{maks} ve AUC'deki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

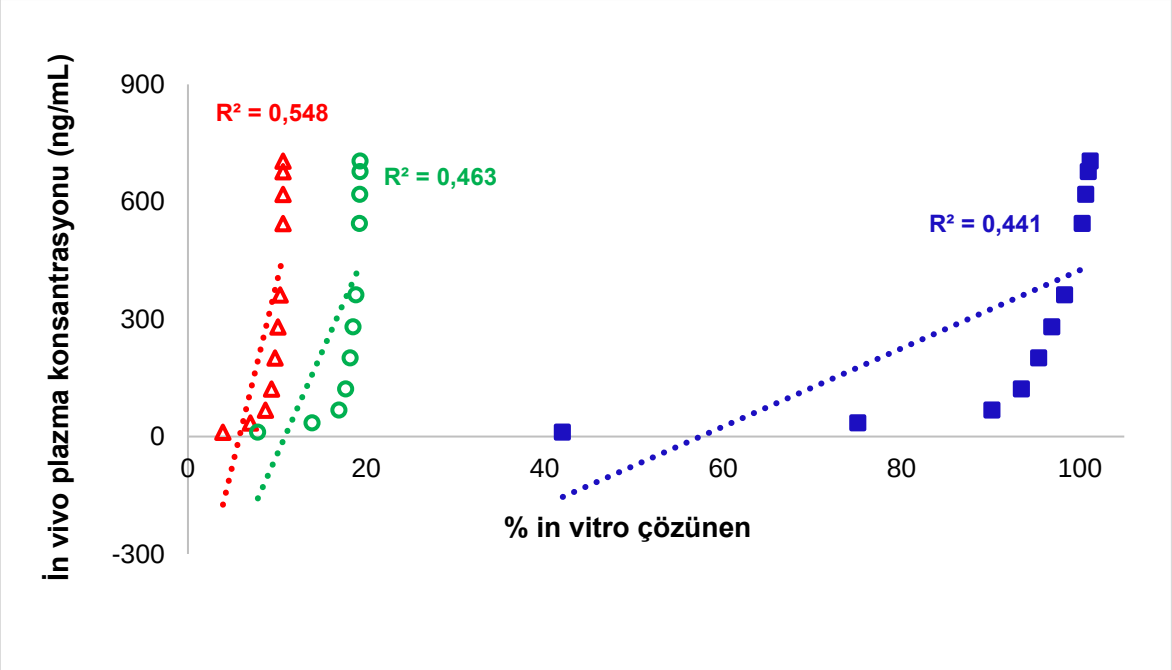
<u>İn vitro - in vivo ilişki (IVIVR) kurulması</u>

PCHIP yöntemi kullanılarak BOS yüklü SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonları ve referans tablet için %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında çalışmalar MathLab® 9.10 ile gerçekleştirilmiştir.

Referans tablet için in vivo açlık plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FaSSIF ve FaSSIF-V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,773, 0,918 ve 0,896 olarak hesaplanırken (Şekil 4.129), in vivo tokluk plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FeSSIF ve FeSSIF-V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,442, 0,548 ve 0,463 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.130).

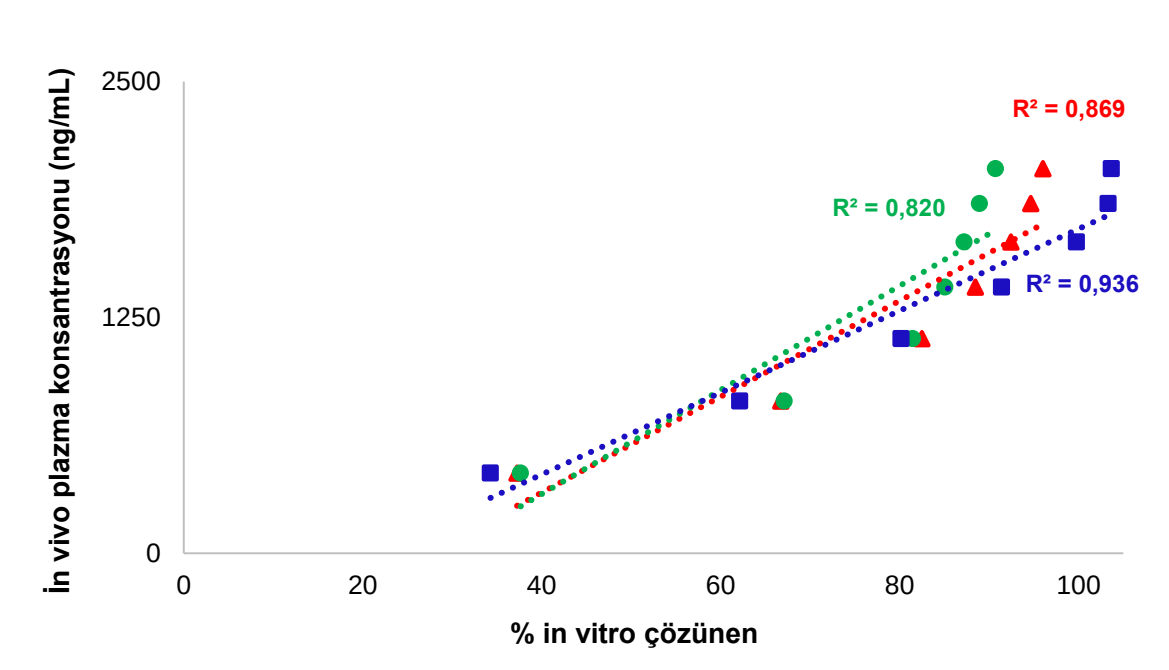


Şekil 4.129. Referans tablet için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

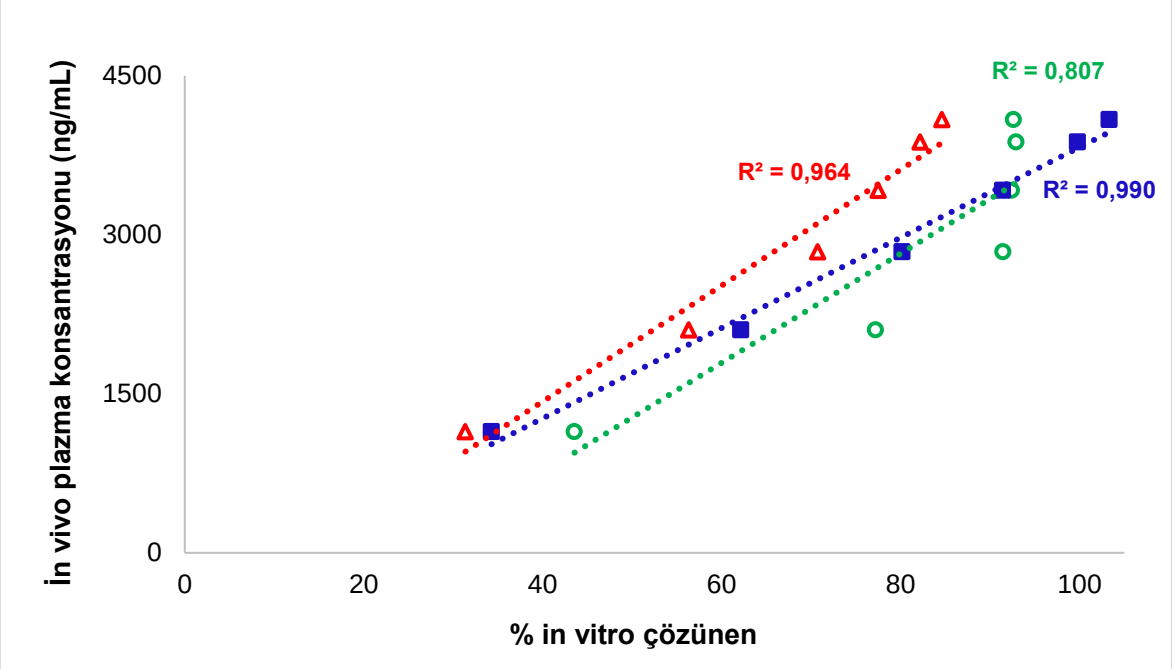


Şekil 4.130. Referans tablet için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

BOS yüklü SNEDDS formülasyonu için in vivo açlık plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FaSSIF ve FaSSIF V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,936, 0,869 ve 0,820 olarak hesaplanırken (Şekil 4.131), in vivo tokluk plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FeSSIF ve FeSSIF-V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,990, 0,965 ve 0,807 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.132).

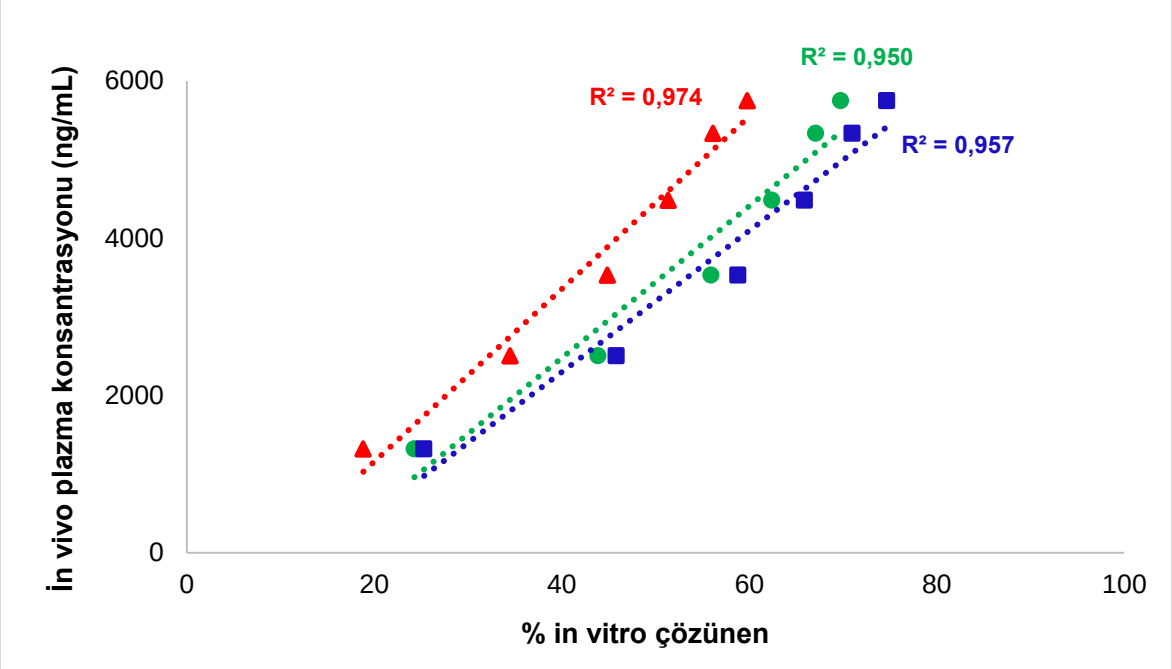


Şekil 4.131. SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

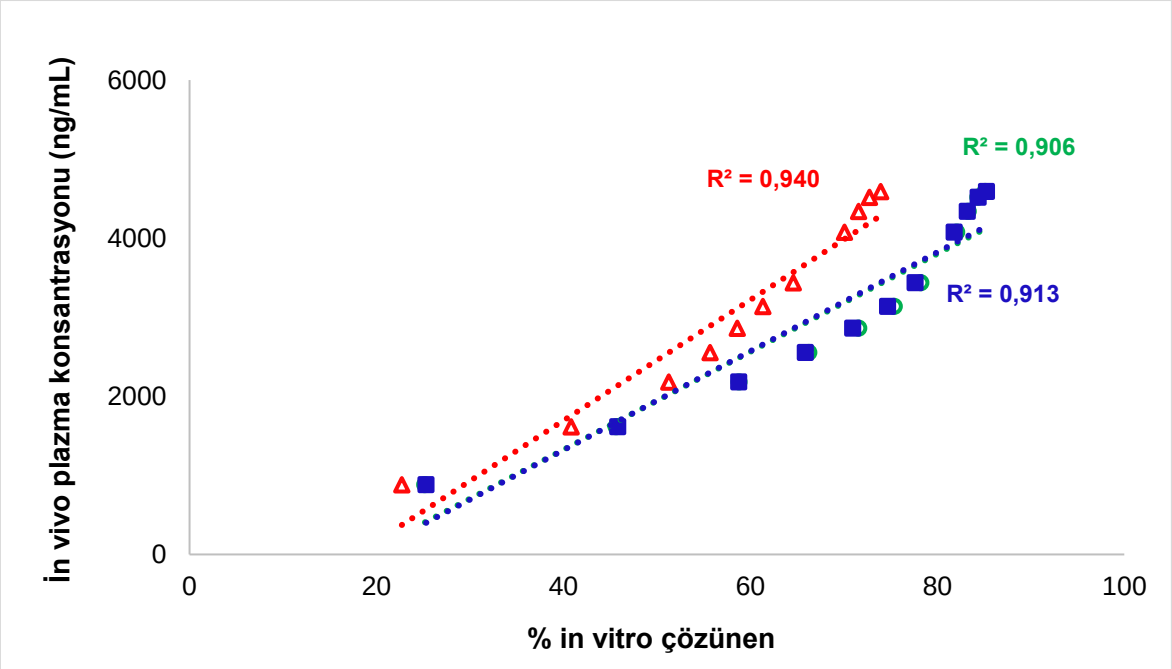


Şekil 4.132. SNEDDS formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

BOS yüklü S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vivo açlık plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FaSSIF ve FaSSIF-V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,957, 0,974 ve 0,950 olarak hesaplanırken (Şekil 4.133), in vivo tokluk plazma konsantrasyonu ile %1 SLS içeren distile su, FeSSIF ve FeSSIF-V2 ortamları arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) sırasıyla 0,914, 0,940 ve 0,906 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.134).



Şekil 4.133. S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FaSSIF (▲), FaSSIF-V2 (●), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

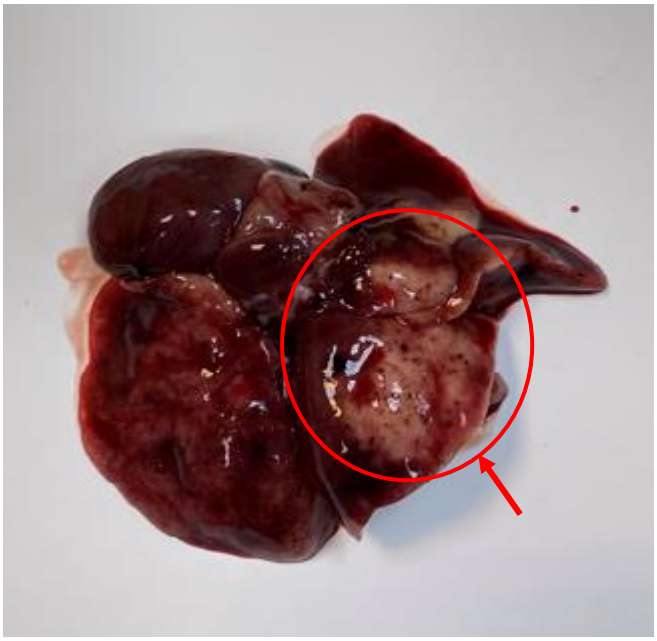


Şekil 4.134. S-SNEDDS tablet formülasyonu için in vitro çözünme hızı (FeSSIF (△), FeSSIF-V2 (○), %1 SLS içeren distile su ortamı (■)) ile in vivo tokluk plazma konsantrasyonu arasındaki ilişki

4.11.2. Farmakodinamik ve histolojik çalışmalar

Ekokardiyografik çalışmalar

Ekokardiyografik çalışmalar Bölüm 3.2.9'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Yapılan ekokardiyografik inceleme sonrasında triküspit yetmezlik akımı, sağ ventrikül sonu diastolik çap, TAPSE, pulmoner yetmezlik akımı, PAAcT, sağ ventrikül ön duvar arter anülüs çapa ait parametrelerin başlangıç (sağlıklı hayvanların), tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün için ve 14. gün tedavi için sonuçları Çizelge 4.103 - 4.105'te verilmiştir. 28. gün hastalığın oluştuğuna dair makroskopik olarak gözlemlenebilen akciğerde çilek görünümü, ölen hayvanların nekropsisi ile de doğrulanmıştır (Resim 4.24) (Liu ve diğerleri, 2020).



Resim 4.24. PAH oluşumu sonrası akciğerde çilek görünümüne ait görsel

Bu parametrelerin başlangıç (sağlıklı hayvanların) ve tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün için sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Çizelge 4.106'da, tedavi başlangıç-referans tablet tedavi grubu 14. gün tedavi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Çizelge 4.107'de, tedavi başlangıç-SNEDDS formülasyon tedavi grubu 14. gün tedavi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Çizelge 4.108'de, tedavi başlangıç-S-SNEDDS tablet formülasyon tedavi grubu ile 14. gün tedavi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ise Çizelge 4.109'da ve

referans tablet - SNEDDS - S-SNEDDS tablet gruplarının 14. gün tedavi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ise Çizelge 4.110’da verilmiştir.

Çizelge 4.103. Başlangıca (sağlıklı hayvanlara) ait ekokardiyografik parametre sonuçları

Denek no	TY (m/sn)	RV end dia (mm)	RV end dia A (cm^2)	RV end sis A (cm^2)	TAPSE (cm)	PAAcT (msn)	RV öd sis (mm)	RV öd dia (mm)	AO (mm)	PA (mm)	TE (m/sn)	TA (m/sn)
T1	1,02	4,09	0,38	0,23	0,30	26,00	1,51	0,96	2,55	2,58	0,91	0,62
T2	1,05	3,67	0,35	0,23	0,28	27,00	1,45	0,86	2,63	2,66	0,82	0,56
T3	0,78	2,95	0,23	0,10	0,30	30,00	1,36	0,85	2,46	2,35	0,81	0,52
T4	0,71	4,14	0,38	0,20	0,28	21,00	1,34	0,79	2,22	2,70	1,00	0,73
T5	0,80	3,53	0,30	0,15	0,30	27,00	1,26	0,82	2,71	2,67	0,93	0,67
T6	0,62	3,76	0,38	0,20	0,30	20,00	1,37	0,92	2,16	2,16	1,04	0,76
S1	1,04	3,69	0,33	0,20	0,30	27,00	1,50	0,79	2,33	2,70	0,73	0,58
S2	0,83	3,68	0,30	0,15	0,30	25,00	1,49	0,79	2,36	2,50	0,88	0,68
S3	0,75	3,84	0,38	0,23	0,30	23,00	1,45	0,79	2,98	3,28	0,88	0,58
S4	0,89	3,33	0,30	0,13	0,30	25,00	1,32	0,68	3,05	3,17	0,80	0,64
S5	0,88	3,50	0,30	0,18	0,33	27,00	1,28	0,85	3,08	3,18	0,89	0,62
S6	0,89	3,61	0,33	0,20	0,25	26,75	1,36	0,79	2,80	2,80	0,83	0,55
S7	0,87	3,25	0,23	0,10	0,25	22,00	1,25	0,80	2,54	2,71	0,85	0,59
S8	1,08	3,84	0,35	0,18	0,30	26,75	1,39	0,72	3,21	3,14	0,82	0,59
S9	0,56	4,21	0,35	0,20	0,28	38,00	1,44	0,87	2,50	2,38	0,85	0,67
S-S1	0,58	3,40	0,40	0,20	0,30	23,00	1,41	0,74	3,05	3,02	0,84	0,62
S-S2	0,51	4,06	0,33	0,20	0,30	22,00	1,32	0,84	3,13	2,63	0,86	0,59
S-S3	0,70	3,13	0,30	0,20	0,30	27,00	1,42	0,73	2,73	2,71	0,86	0,55
S-S4	1,26	3,45	0,30	0,20	0,25	26,00	1,25	0,76	2,84	2,77	0,85	0,60
S-S5	0,88	3,40	0,33	0,20	0,30	26,75	1,41	0,78	3,15	2,94	0,91	0,60
S-S6	0,86	3,48	0,30	0,18	0,30	22,00	1,47	0,78	3,14	3,45	0,83	0,60
S-S7	0,56	3,46	0,33	0,20	0,25	24,00	1,44	0,76	2,86	2,75	0,95	0,71
S-S8	0,37	4,02	0,38	0,30	0,20	33,50	1,13	0,71	2,51	2,50	0,82	0,54

TY: Triküspit yetmezliği, **RV end dia:** Sağ ventrikül sonu diastolik çap, **RV end dia A:** Sağ ventrikül sonu diastolik alan, **RV end sis A:** Sağ ventrikül sonu sistolik alan, **TAPSE:** Triküspit kapak anuler plane sistolik ekskursiyonu, **PAAcT:** Pulmoner arter akselerasyon zamanı, **RV öd sis**: RV ön duvar sistolik kalınlığı, **RV öd dia**: RV ön duvar diastolik kalınlığı, **AO:** Aorta anülüs çap, **PA:** Pulmoner arter anülüs çap, **TE:** Triküspit E, **TA:** Triküspit

Çizelge 4.104. Tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün ekokardiyografik parametre sonuçları

Denek no	TY (m/sn)	RV end dia (mm)	RV end dia A (cm^2)	RV end sis A (cm^2)	TAPSE (cm)	PAAcT (msn)	RV öd sis (mm)	RV öd dia (mm)	AO (mm)	PA (mm)	TE (m/sn)	TA (m/sn)
T1	2,97	5,73	0,45	0,25	0,10	30,50	2,92	1,58	1,84	2,71	0,72	0,32
T2	2,41	4,52	0,28	0,10	0,28	40,50	2,87	1,72	2,74	2,68	0,63	0,34
T3	2,38	5,30	0,45	0,18	0,20	30,50	2,31	1,10	2,54	3,07	0,77	0,43
T4	0,56	2,48	0,20	0,10	0,25	18,00	1,48	1,12	2,93	2,91	0,64	0,38
T5	0,52	3,53	0,23	0,10	0,28	23,00	1,67	1,02	2,87	2,89	0,78	0,44
T6	0,61	4,05	0,35	0,15	0,20	18,00	1,77	0,88	2,83	2,84	0,65	0,45
S1	2,13	4,82	0,30	0,13	0,20	15,00	2,24	1,06	2,75	2,90	0,76	0,41
S2	2,68	3,36	0,20	0,10	0,18	24,00	1,81	1,04	2,30	2,26	0,59	0,47
S3	2,10	5,06	0,40	0,20	0,23	18,00	2,05	1,35	3,17	3,14	0,76	0,41
S4	2,58	3,35	0,28	0,10	0,20	15,00	1,67	0,92	2,81	3,21	0,77	0,59
S5	2,09	4,07	0,28	0,10	0,20	15,75	2,15	1,10	3,05	3,26	0,68	0,53
S6	3,44	4,30	0,35	0,15	0,20	15,00	2,12	1,15	2,87	3,26	0,73	0,49
S7	3,21	5,00	0,45	0,30	0,10	16,50	2,23	1,48	2,70	2,93	0,46	0,36
S8	3,71	7,64	0,65	0,43	0,10	17,25	2,35	1,42	3,20	3,99	0,68	0,40
S9	1,69	4,19	0,28	0,13	0,30	28,75	1,33	0,62	2,57	2,82	0,53	0,33
S-S1	2,49	5,38	0,48	0,30	0,13	14,00	2,27	1,52	2,90	3,28	0,72	0,39
S-S2	3,43	7,03	0,60	0,40	0,20	12,00	2,14	1,30	3,14	3,18	0,60	0,29
S-S3	3,48	5,78	0,43	0,28	0,20	12,00	2,23	1,20	2,14	2,37	0,57	0,43
S-S4	1,76	3,54	0,23	0,13	0,20	16,25	1,99	1,26	2,59	2,96	0,58	0,46
S-S5	2,27	4,41	0,33	0,20	0,20	17,25	1,58	0,79	3,65	3,68	1,20	0,44
S-S6	2,64	4,53	0,38	0,23	0,20	12,00	2,46	1,43	3,03	3,10	0,76	0,51
S-S7	3,25	4,42	0,30	0,15	0,13	0,00	2,06	1,24	0,00	0,00	0,68	0,42
S-S8	1,78	3,97	0,33	0,15	0,30	14,00	1,37	0,93	2,61	2,75	0,66	0,44

TY: Triküspit yetmezliği, **RV end dia:** Sağ ventrikül sonu diastolik çap, **RV end dia A:** Sağ ventrikül sonu diastolik alan, **RV end sis A:** Sağ ventrikül sonu sistolik alan, **TAPSE:** Triküspit kapak anuler plane sistolik ekskursiyonu, **PAAcT:** Pulmoner arter akselerasyon zamanı, **RV öd sis**: RV ön duvar sistolik kalınlığı, **RV öd dia**: RV ön duvar diastolik kalınlığı, **AO:** Aorta anülüs çap, **PA:** Pulmoner arter anülüs çap, **TE:** Triküspit E, **TA:** Triküspit A

Çizelge 4.105. 14. gün tedavi ekokardiyografik parametre sonuçları

Denek no	TY (m/sn)	RV end dia (mm)	RV end dia A (cm^2)	RV end sis A (cm^2)	TAPSE (cm)	PAAcT (msn)	RV öd sis (mm)	RV öd dia (mm)	AO (mm)	PA (mm)	TE (m/sn)	TA (m/sn)
T3	3,39	3,78	0,35	0,20	0,20	0,00	14,75	2,19	1,17	2,75	3,06	0,63
T4	1,89	3,50	0,28	0,15	0,20	1,53	17,25	1,90	0,96	2,90	2,86	0,84
T5	2,14	4,08	0,30	0,10	0,28	0,00	11,00	2,02	1,23	2,66	3,25	1,14
S1	1,70	5,14	0,38	0,23	0,20	0,00	11,00	2,17	1,02	2,81	2,76	0,88
S6	5,19	5,33	0,45	0,28	0,28	0,00	14,00	2,50	1,18	2,50	2,97	0,58
S9	1,33	4,80	0,53	0,40	0,23	1,13	23,00	1,37	0,92	3,63	3,50	0,79
S-S2	4,15	7,10	0,50	0,33	0,10	2,60	12,00	1,64	0,99	2,58	3,11	0,66
S-S3	4,04	5,38	0,50	0,33	0,20	2,20	13,00	2,20	1,19	2,45	2,71	1,05
S-S5	2,18	4,19	0,30	0,15	0,20	-	11,00	1,99	1,14	3,12	3,36	0,59

T: Tracleer® tablet, **S:** SNEDDS, **S-S:** S-SNEDDS tablet, **TY:** Triküspit yetmezliği, **RV end dia:** Sağ ventrikül sonu diastolik çap, **RV end dia A:** Sağ ventrikül sonu diastolik alan, **RV end sis A:** Sağ ventrikül sonu sistolik alan, **TAPSE:** Triküspit kapak anuler plane sistolik ekskursiyonu, **PAAcT:** Pulmoner arter akselerasyon zamanı, **RV öd sis**: RV ön duvar sistolik kalınlığı, **RV öd dia**: RV ön duvar diastolik kalınlığı, **AO:** Aorta anülüs çap, **PA:** Pulmoner arter anülüs çap, **TE:** Triküspit E, **TA:** Triküspit A

Çizelge 4.106. Başlangıç (sağlıklı hayvanların) ve tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün için ekokardiyografik parametre sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Parametre	Sayı	Ort	Min	Maks	SS	p
Triküspit yetmezliği - başlangıç (m/sn)	23	0,80	0,37	1,26	0,21	0,000
Triküspit yetmezliği - hastalık (m/sn)	23	2,35	0,52	3,71	0,92	
RV end diastolik çap - başlangıç (mm)	23	3,63	2,95	4,21	0,33	0,001
RV end diastolik çap - hastalık (mm)	23	4,63	2,48	7,64	1,18	
TAPSE - başlangıç (cm)	23	0,28	0,20	0,33	0,03	0,000
TAPSE - hastalık (cm)	23	0,20	0,10	0,30	0,06	
Pulmoner yetmezlik - başlangıç (m/sn)	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,001
Pulmoner yetmezlik - hastalık (m/sn)	23	1,22	0,00	3,47	1,18	
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - başlangıç (msn)	23	25,90	20,00	38,00	4,02	0,001
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - hastalık (msn)	23	18,40	0,00	40,50	8,24	
RV ön duvar sistolik kalınlığı - başlangıç (mm)	23	1,37	1,13	1,51	0,10	0,000
RV ön duvar sistolik kalınlığı - hastalık (mm)	23	2,05	1,32	2,92	0,42	
RV ön duvar diastolik kalınlığı - başlangıç (mm)	23	0,80	0,68	0,96	0,07	0,000
RV ön duvar diastolik kalınlığı - hastalık (mm)	23	1,18	0,62	1,72	0,27	
Aorta anülüs çap - başlangıç (mm)	23	2,74	2,16	3,21	0,32	0,659
Aorta anülüs çap - hastalık (mm)	23	2,66	0,00	3,65	0,69	
Pulmoner arter anülüs çap – başlangıç (mm)	23	2,77	2,16	3,45	0,32	0,033
Pulmoner arter anülüs çap - hastalık (mm)	23	2,87	0,00	3,99	0,73	

Çizelge 4.107. Referans tablet grubunda tedavinin 14. gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi

Parametre	Sayı	Ort	Min	Maks	SS	p
Triküspit yetmezliği - başlangıç (m/sn)	3	0,56	0,52	2,38	1,06	0,109
Triküspit yetmezliği - hastalık (m/sn)	3	2,13	1,89	3,39	0,81	
RV end diastolik çap - başlangıç (mm)	3	3,53	2,48	5,30	1,43	1,000
RV end diastolik çap - hastalık (mm)	3	3,77	3,49	4,08	0,30	
TAPSE - başlangıç (cm)	3	0,25	0,20	0,28	0,04	0,180
TAPSE - hastalık (cm)	3	0,20	0,20	0,27	0,04	
Pulmoner yetmezlik - başlangıç (m/sn)	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,317
Pulmoner yetmezlik - hastalık (m/sn)	3	0,00	0,00	1,52	0,88	
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - başlangıç (msn)	3	23,00	18,00	30,50	6,29	0,109
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - hastalık (msn)	3	14,75	11,00	17,25	3,15	
RV ön duvar sistolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	1,67	1,48	2,31	0,43	0,285
RV ön duvar sistolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	2,01	1,89	2,18	0,15	
RV ön duvar diastolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	1,10	1,02	1,12	0,05	0,593
RV ön duvar diastolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	1,17	0,96	1,22	0,14	
Aorta anülüs çap - başlangıç (mm)	3	2,87	2,54	2,93	0,21	0,593
Aorta anülüs çap - hastalık (mm)	3	2,75	2,65	2,90	0,13	
Pulmoner arter anülüs çap – başlangıç (mm)	3	2,91	2,89	3,07	0,10	1,000
Pulmoner arter anülüs çap - hastalık (mm)	3	3,05	2,86	3,25	0,20	

Çizelge 4.108. SNEDDS grubunda tedavinin 14. gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi

Parametre	Sayı	Ort	Min	Maks	SS	p
Triküspit yetmezliği - başlangıç (m/sn)	3	2,13	1,68	3,44	0,92	1,000
Triküspit yetmezliği - hastalık (m/sn)	3	1,70	1,32	5,19	2,13	
RV end diastolik çap - başlangıç (mm)	3	4,30	4,19	4,82	0,34	0,109
RV end diastolik çap - hastalık (mm)	3	5,13	4,79	5,33	0,27	
TAPSE - başlangıç (cm)	3	0,20	0,20	0,30	0,06	0,655
TAPSE - hastalık (cm)	3	0,22	0,20	0,27	0,04	
Pulmoner yetmezlik - başlangıç (m/sn)	3	1,70	1,31	3,47	1,15	0,109
Pulmoner yetmezlik - hastalık (m/sn)	3	0,00	0,00	1,13	0,65	
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - başlangıç (msn)	3	15,00	15,00	28,75	7,94	0,109
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - hastalık (msn)	3	14,00	11,00	23,00	6,25	
RV ön duvar sistolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	2,12	1,32	2,24	0,50	0,593
RV ön duvar sistolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	2,17	1,36	2,50	0,59	
RV ön duvar diastolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	1,06	0,62	1,15	0,28	0,593
RV ön duvar diastolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	1,01	0,92	1,17	0,13	
Aorta anülüs çap - başlangıç (mm)	3	2,75	2,56	2,87	0,16	0,593
Aorta anülüs çap - hastalık (mm)	3	2,80	2,49	3,63	0,59	
Pulmoner arter anülüs çap – başlangıç (mm)	3	2,90	2,81	3,26	0,24	1,000
Pulmoner arter anülüs çap - hastalık (mm)	3	2,97	2,75	3,49	0,38	

Çizelge 4.109. S-SNEDDS tablet grubunda tedavinin 14.gün ekokardiyografik parametre sonuçlarının tedavi öncesine göre istatistiksel değerlendirilmesi

Parametre	Sayı	Ort	Min	Maks	SS	p
Triküspit yetmezliği - başlangıç (m/sn)	3	3,43	2,27	3,48	0,69	0,285
Triküspit yetmezliği - hastalık (m/sn)	3	4,04	2,17	4,15	1,11	
RV end diastolik çap - başlangıç (mm)	3	5,78	4,41	7,03	1,31	0,285
RV end diastolik çap - hastalık (mm)	3	5,38	4,18	7,10	1,47	
TAPSE - başlangıç (cm)	3	0,20	0,20	0,20	0,00	0,317
TAPSE - hastalık (cm)	3	0,20	0,10	0,20	0,06	
Pulmoner yetmezlik - başlangıç (m/sn)	3	2,08	0,00	3,18	1,61	0,655
Pulmoner yetmezlik - hastalık (m/sn)	3	2,19	0,00	2,59	1,39	
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - başlangıç (msn)	3	12,00	12,00	17,25	3,03	0,655
Pulmoner arter akselerasyon zamanı - hastalık (msn)	3	12,00	11,00	13,00	1,00	
RV ön duvar sistolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	2,14	1,58	2,23	0,36	0,593
RV ön duvar sistolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	1,98	1,64	2,19	0,28	
RV ön duvar diastolik kalınlığı - başlangıç (mm)	3	1,20	0,79	1,30	0,27	1,000
RV ön duvar diastolik kalınlığı - hastalık (mm)	3	1,13	0,98	1,18	0,10	
Aorta anülüs çap - başlangıç (mm)	3	3,14	2,14	3,65	0,76	0,285
Aorta anülüs çap - hastalık (mm)	3	2,57	2,45	3,12	0,36	
Pulmoner arter anülüs çap – başlangıç (mm)	3	3,18	2,37	3,68	0,66	1,000
Pulmoner arter anülüs çap - hastalık (mm)	3	3,10	2,71	3,35	0,32	

Çizelge 4.110. Referans tablet - SNEDDS - S-SNEDDS tablet tedavi gruplarının 14. gün tedavi için ekokardiyografik parametre sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

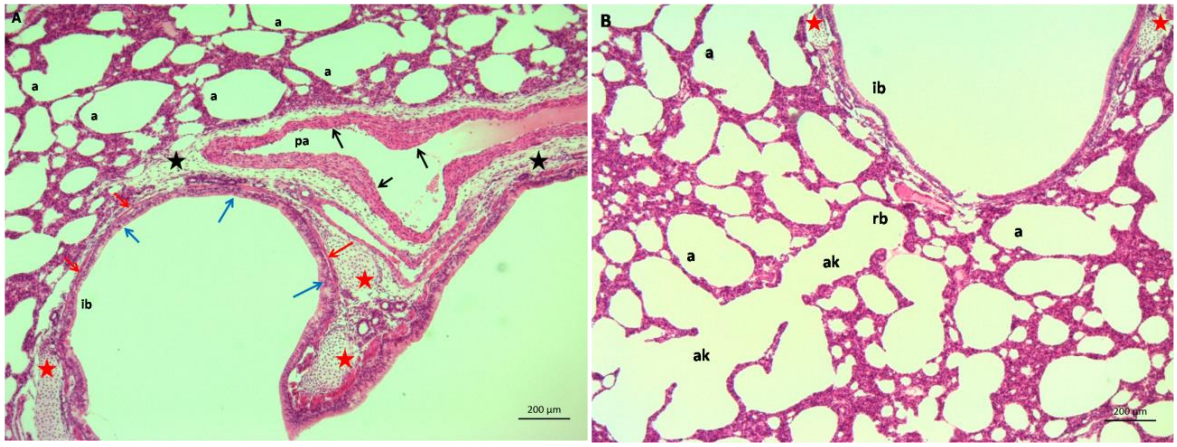
Parametre	Sayı	Ort	Min	Maks	SS	p
Triküspit yetmezliği (m/sn)	9	2,89	1,32	5,19	1,34	0,430
RV end diastolik çap (mm)	9	4,81	3,49	7,10	1,10	0,061
TAPSE (cm)	9	0,21	0,10	0,27	0,05	0,207
Pulmoner yetmezlik (m/sn)	9	0,83	0,00	2,59	1,06	0,363
Pulmoner arter akselerasyon zamanı (msn)	9	14,11	11,00	23,00	3,94	0,576
RV ön duvar sistolik kalınlığı (mm)	9	1,99	1,36	2,50	0,34	0,957
RV ön duvar diastolik kalınlığı (mm)	9	1,08	0,92	1,22	0,11	0,646
Aorta anülüs çap (mm)	9	2,82	2,45	3,63	0,37	0,733
Pulmoner arter anülüs çap (mm)	9	3,06	2,71	3,49	0,27	1,000

Histolojik çalışmalar

H&E boyama sonuçları

Akciğere ait sonuçlar

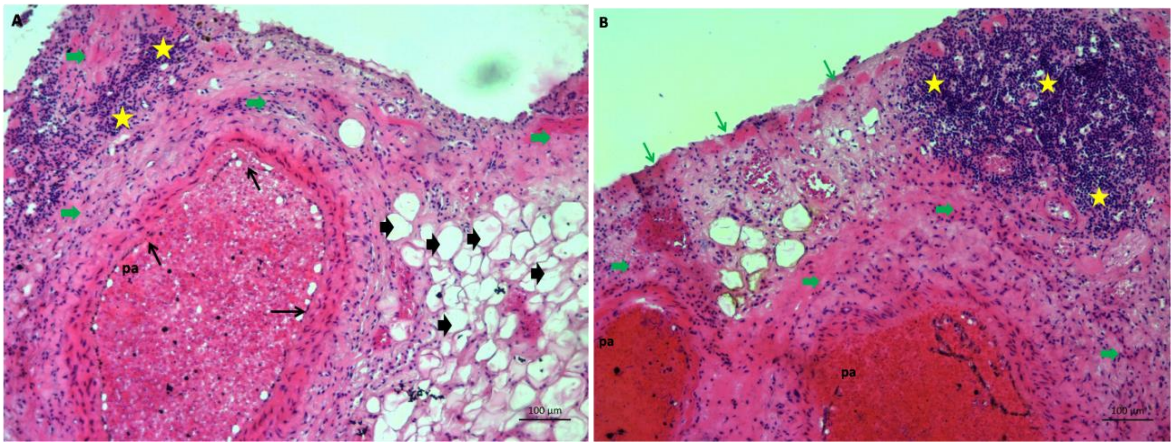
Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde akciğer parankimasını oluşturan bronş, bronşiyol, alveolar yapılar ve pulmoner damarlar izlenmiştir. Daha büyük büyütmelerde, duvarını çevreleyen hiyalin kıkırdak parçaları ile karakterize olan intrapulmoner bronş, iyi korunmuş yalancı çok katlı sili silindirik epiteli ile normal görünümde bulunmuştur. Alveolar kanallara açılan respiratuvar bronşiyollerin duvarlarını oluşturan kübik epitel hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde de herhangi bir yapısal bozukluğa ve ayrıca pulmoner arteri çevreleyen bağ dokusu elemalarında herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır (Resim 4.25).



Resim 4.25. Kontrol grubu (G1) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler
(A: İntrapulmoner bronş (ib), hiyalin kıkırdak (kırmızı yıldız), düz kas (kırmızı ok), solunum epiteli (mavi ok), pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), alveoller (a), B: Respiratuvar bronşiyol (rb), alveolar kanallar (ak), alveoller (a), (A, B: H&E, x5))

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruba (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerin doku genelinde alveolar yapılarda şiddetli dejenerasyon ile parankimada yoğun fibrozis ve konjesyon izlenmiştir. Pulmoner arter duvarı dikkatle incelendiğinde damar lümenini döşeyen endotel hücrelerinde dejenerasyon ve artmış duvar kalınlığı dikkat çekmiştir. Pulmoner arteri çevreleyen

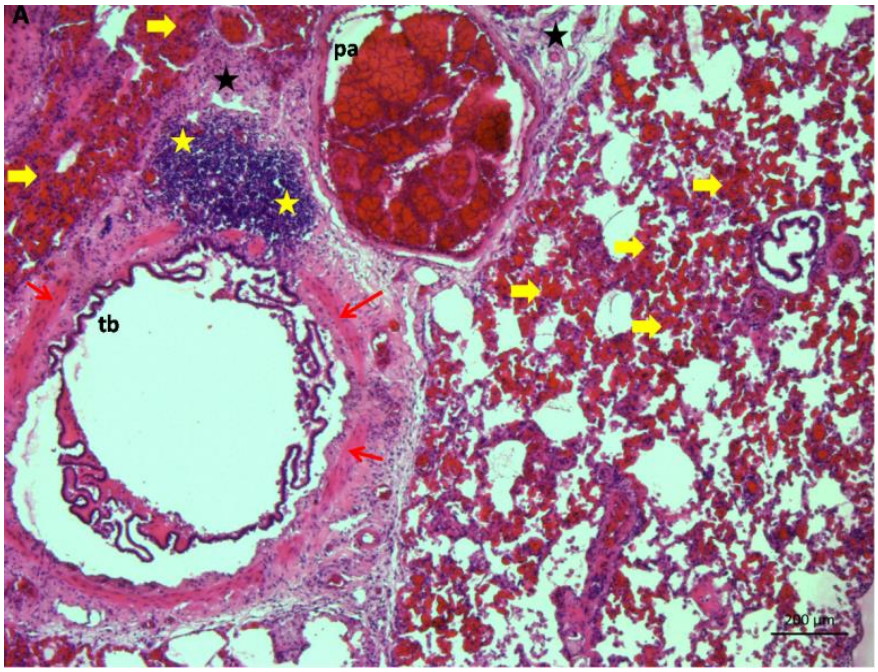
bağ dokusunda yoğun lenfatik hücre infiltrasyonu ve yağ hücreleri miktarında artış izlenmiştir. Bununla birlikte akciğeri en dıştan çevreleyen bağ doku (visseral plevra) da ve plevral mezotel hücrelerinde çekirdek parçalanmaları ve hücre membran sınırlarında düzensizleşme gibi dejenerasyonlar dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.26).



Resim 4.26. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grup (G2) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler
(A: Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), yağ hücreleri (siyah ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), B: Plevral mezotel (yeşil ok), (A, B: H&E, x10))

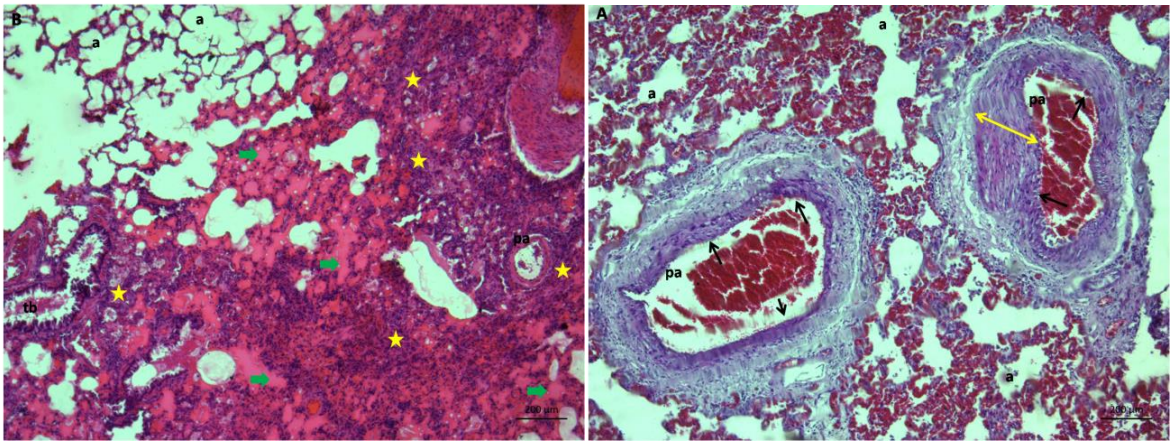
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS formülasyon uygulanan gruba (G3) ait örnekler incelendiğinde:

SNEDDS formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde alveolar yapılarda şiddetli dejenerasyon ve parankimada yoğun konjesyon izlenmiştir. Terminal bronşiyol duvarındaki mukozal katlantılar yakından incelendiğinde sili prizmatik epitelde düzensizlikler görülmüştür. Pulmoner arter duvarında ise lümenini döşeyen endotel hücrelerinde dejenerasyon dikkat çekmiş, ayrıca pulmoner arteri çevreleyen bağ dokusunda lenfatik hücre infiltrasyonun arttığı görülmüştür (Resim 4.27).



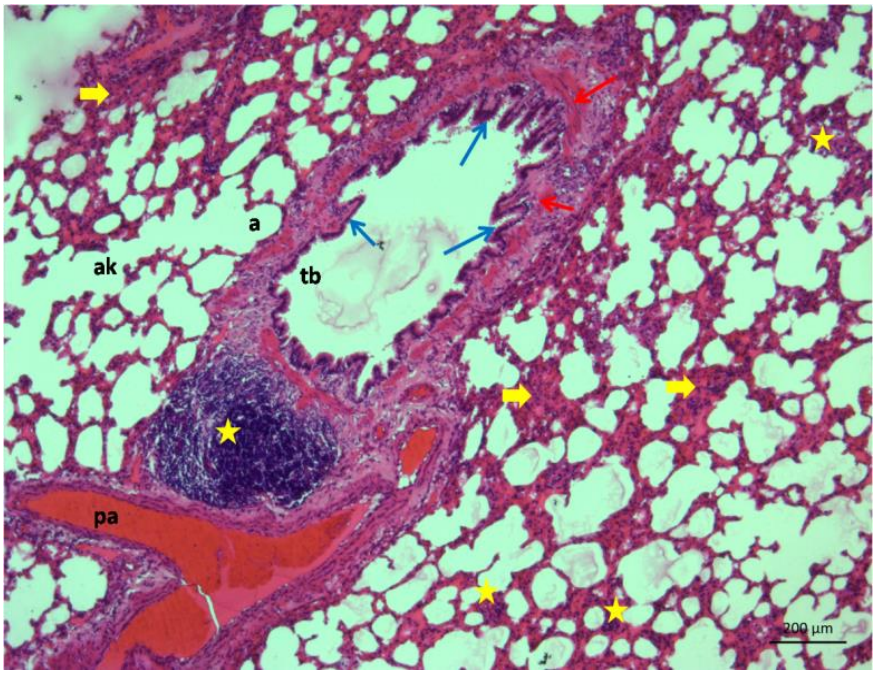
Resim 4.27. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Terminal bronşiyol (tb), düz kas (kırmızı ok), pulmoner arter (pa), bağ doku (siyah yıldız), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), (H&E, x10))

SNEDDS formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde 2 doz tedavi alan gruba benzer şekilde parankimada yoğun fibrozis ve konjesyon izlenmiştir. Bununla birlikte doku genelinde yoğun lenfatik hücre infiltrasyonu dikkat çekici bulunmuş, pulmoner arter duvarı dikkatle incelendiğinde ise artmış duvar kalınlığı görülmüştür (Resim 4.28).



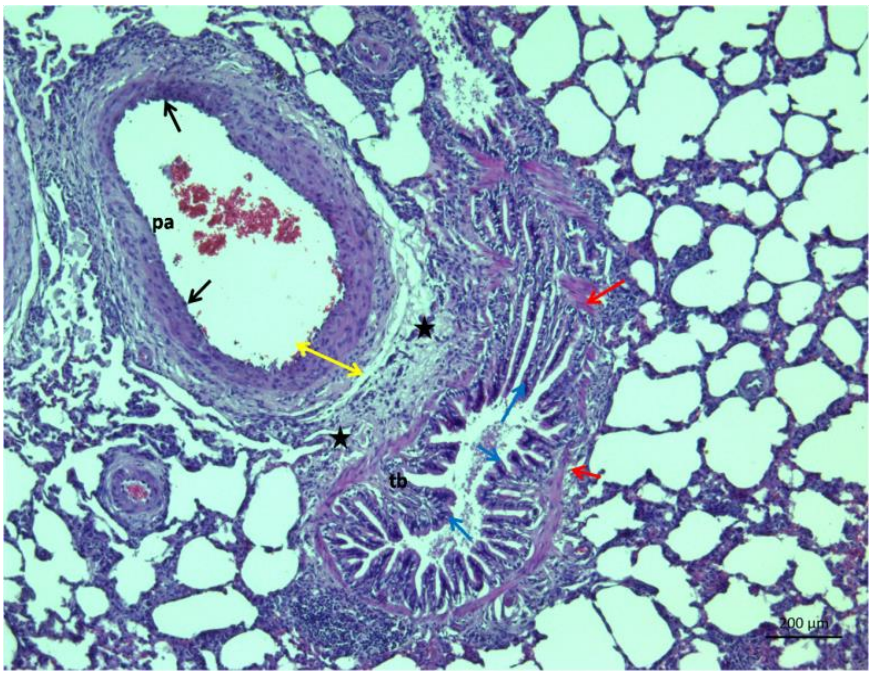
Resim 4.28. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Pulmoner arter (pa), fibrozis (yeşil ok başı), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), terminal bronşiyol (tb), B: Pulmoner arter (pa), (artmış duvar kalınlığı (sarı ok), (A, B: H&E, x5))

SNEDDS formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde terminal bronşiyol yapısının korunduğu, ancak mukozal katlantıları örten sili prizmatik epitelde dejenerasyon ve yer yer dökülmeler olduğu görülmüştür. Pulmoner arter duvarında artmış dilatasyon ve yoğun endotel hasarı tespit edilmiş, bununla birlikte pulmoner arteri çevreleyen bağ dokusunda lenfatik hücre infiltrasyonun arttığı görülmüştür. Ancak doku geneline yayılmış olan lenfatik hücre infiltrasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla nispeten daha az olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.29).



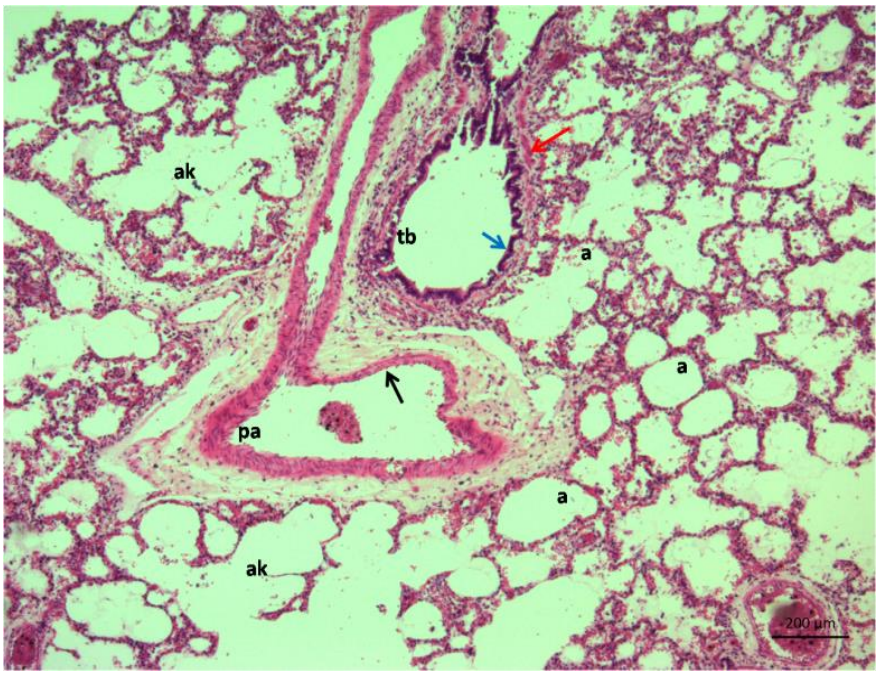
Resim 4.29. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), alveolar kese (ak), alveol (a), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), (A, B: H&E, x5))

SNEDDS formülasyonu ile 14 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde akciğer dokusunda histopatolojik parametrelerde düzelme saptanmıştır. Bu grupta perivasküler alanda ve doku genelinde izlenen fibrozis ve lenfatik hücre infiltrasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla daha ılımlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte terminal bronşiyol yapısının korunduğu, ancak mukozal katlantıları örten sili prizmatik epitelde dejenerasyon olduğu izlenmiştir (Resim 4.30).



Resim 4.30. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), artmış duvar kalınlığı (sarı ok), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), bağ doku (siyah ok), (H&E, x5))

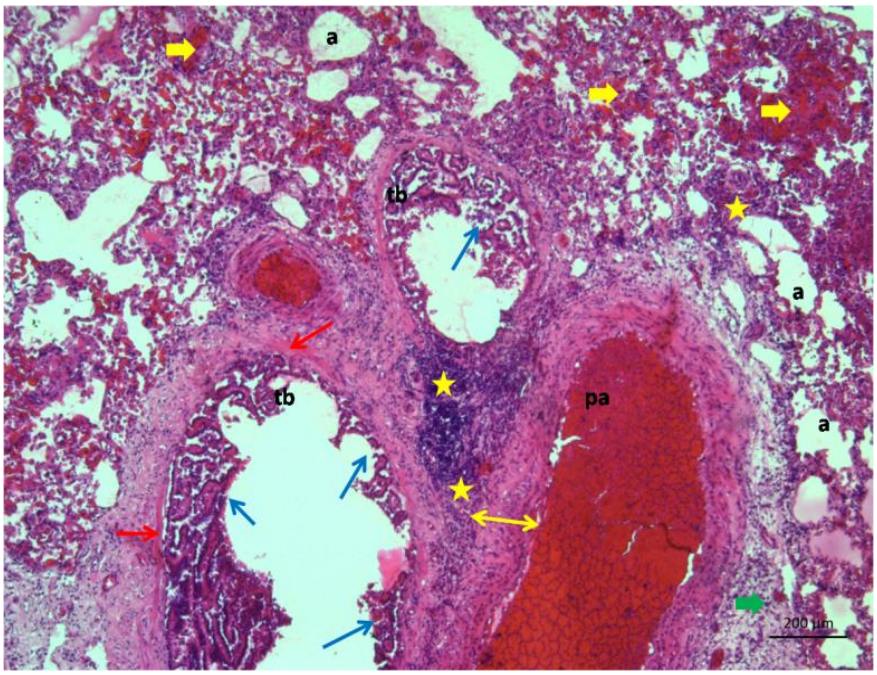
SNEDDS formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan akciğer kesitlerinde histopatolojik parametrelerdeki düzelme 14 doz tedavi alan sıçanlar ile benzer şekilde bulunmuştur. Respiratuvar bronşiyollerin duvarlarını oluşturan kübik epitel hücrelerindeki ve alveolar yapılardaki düzensizliklerin, daha düşük dozlarda tedavi alan gruplara kıyasla daha ılımlı olarak görülmüştür. Bununla birlikte doku genelindeki fibrozis, konjesyon ve lenfatik hücre infiltrasyonun da diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha hafif olduğu belirlenmiştir (Resim 4.31).



Resim 4.31. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), alveolar kese (ak), alveol (a), (H&E, x5))

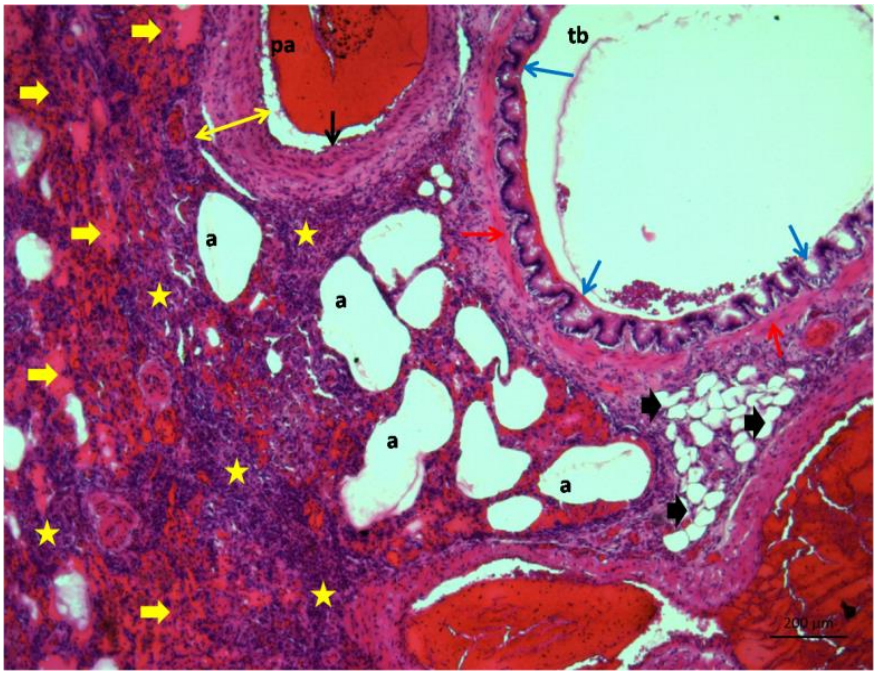
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan gruba (G4) ait örnekler incelendiğinde:

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde alveolar yapılarda izlenen şiddetli dejenerasyon ve parankimada yoğun konjesyon aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlara benzer şekilde bulunmuştur. Terminal bronşiyol duvarındaki mukozal katlantıları döşeyen epitelde düzensizlikler görülmüştür. Pulmoner arter duvarında ise lümenini döşeyen endotel hücrelerinde dejenerasyon dikkat çekmiş, ayrıca pulmoner arteri çevreleyen bağ dokusunda lenfatik hücre infiltrasyonun arttığı görülmüştür (Resim 4.32).



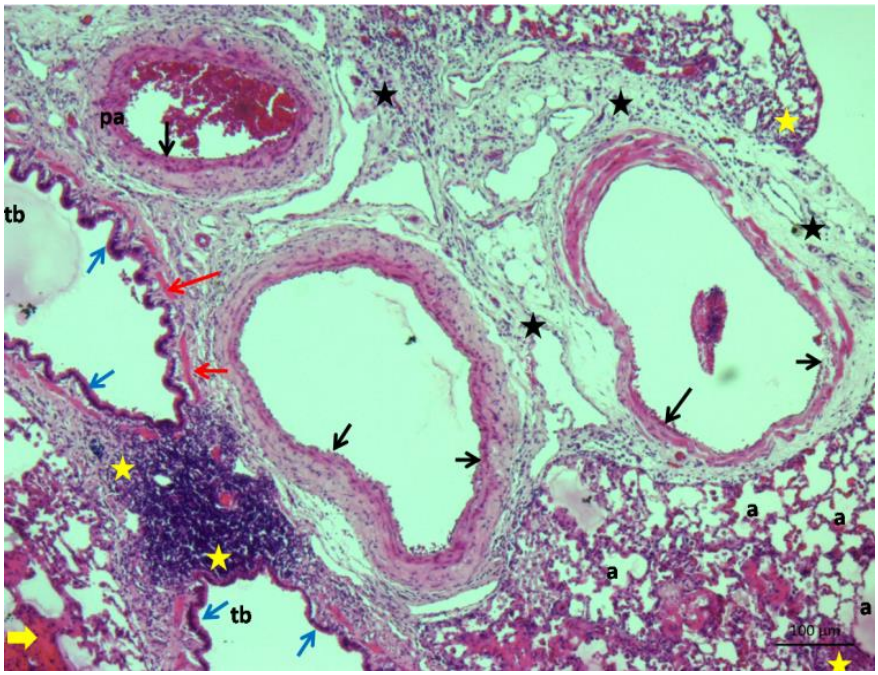
Resim 4.32. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), artmış duvar kalınlığı (sarı ok), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), alveol (a), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), (H&E, x5))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde parankimada yoğun fibrozis ve konjesyon görülmüş, bununla birlikte doku genelinde yoğun olarak izlenen lenfatik hücre infiltrasyonu 2 doz tedavi alan grupla benzer şekilde bulunmuş, pulmoner arter duvarında kalınlaşma izlenmiştir (Resim 4.33).



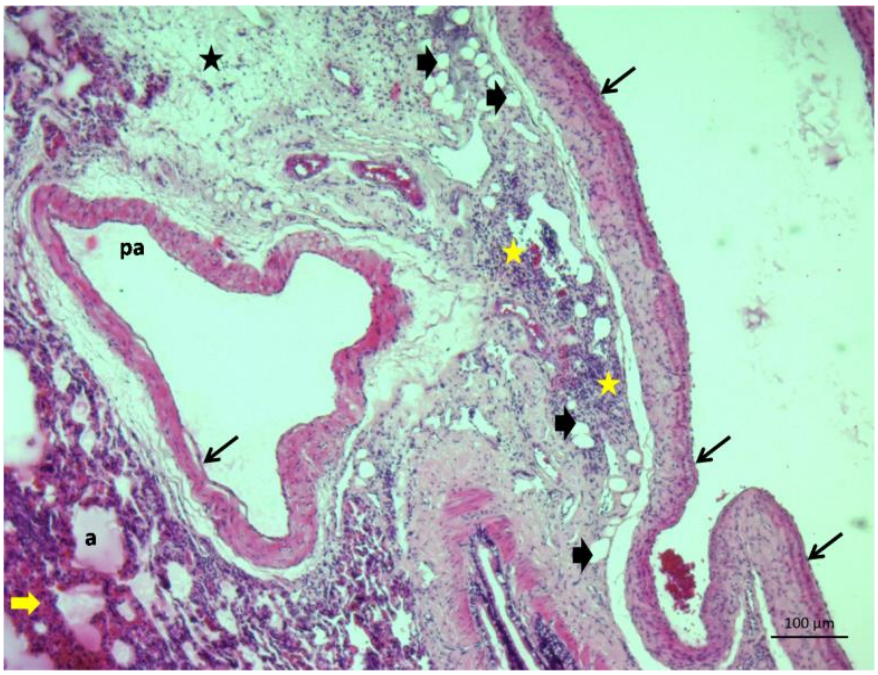
Resim 4.33. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), artmış duvar kalınlığı (sarı ok), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), alveol (a), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), (H&E, x5))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde pulmoner arter duvarında artmış dilatasyon ve yoğun endotel hasarı izlenmiş, pulmoner arteri çevreleyen bağ dokusunda lenfatik hücre infiltrasyonu görülmüştür. Söz konusu veriler aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan grup ile benzerlik gösterirken, 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla nispeten daha ılımlı olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.34).



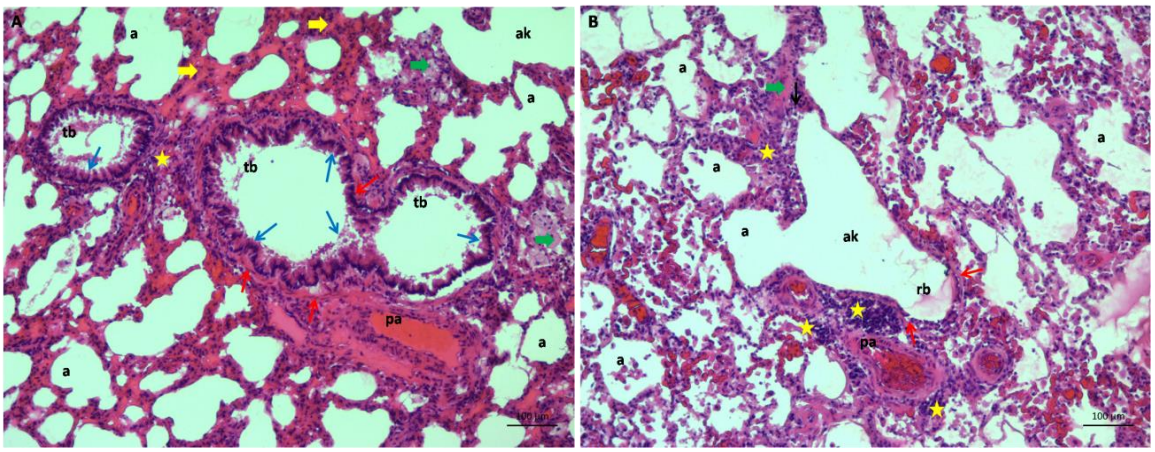
Resim 4.34. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), bağ doku (siyah yıldız), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), alveol (a), (H&E, x5))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 13 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer dokusunda saptanan histopatolojik parametrelerdeki düzelme aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlar ile paralel bulunmuştur. Doku genelinde izlenen fibrozis ve lenfatik hücre infiltrasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla daha ılımlı olduğu görülmüş, bununla birlikte perivasküler alanda yağ hücrelerinin varlığı izlenmiştir (Resim 4.35).



Resim 4.35. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), damar endotel hücreleri (siyah ok), bağ doku (siyah yıldız), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), alveol (a), (H&E, x10))

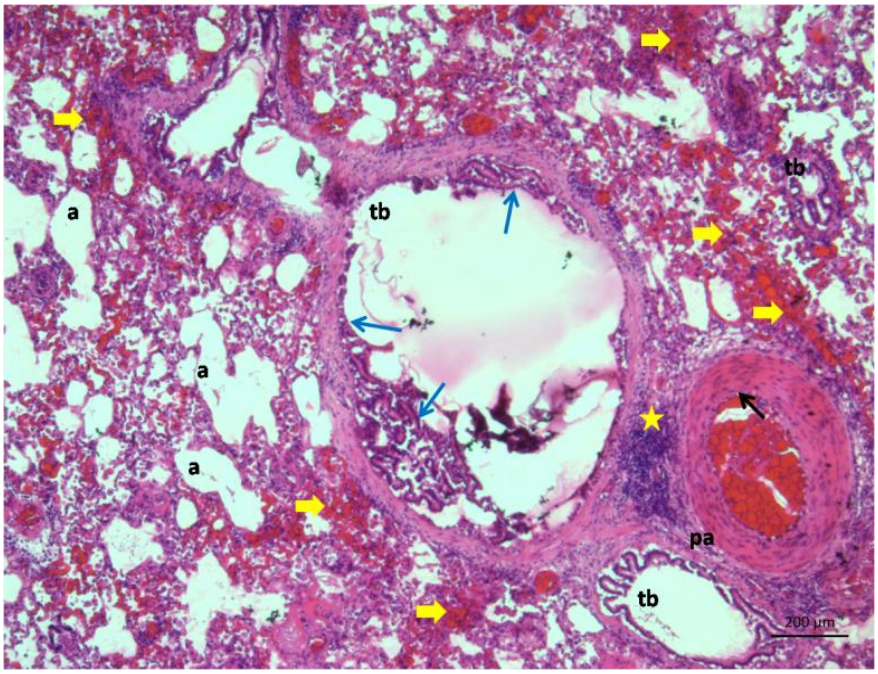
S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde terminal bronşiyollerin duvarlarını oluşturan kübik epiteldeki ve alveolar yapılardaki dejenerasyonların, daha düşük dozlarda tedavi alan gruplara kıyasla oldukça düzelmiş olduğu görülmüştür. Doku genelinde izlenen fibrozis, konjesyon ve lenfatik hücre infiltrasyonu gibi bulguların da aynı dozda SNEDDS formülasyon alan grup ile tutarlı şekilde, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu belirlenmiştir (Resim 4.36).



Resim 4.36. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntüler
(A: Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), alveolar kese (ak), alveol (a), B: Respiratuvar bronşiyol (rb), (A, B: H&E, x10))

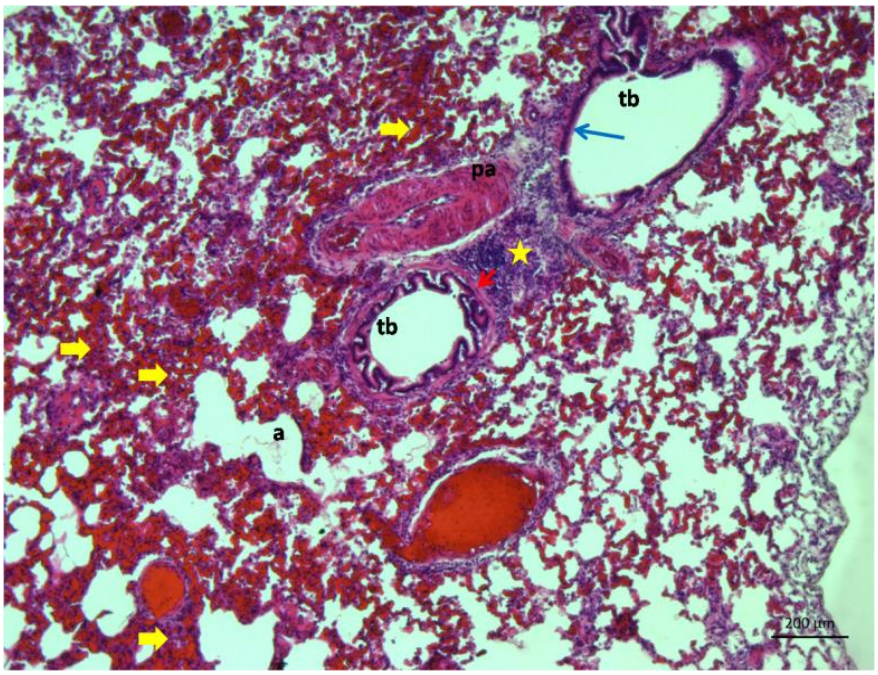
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda referans tablet uygulanan gruba (G5) ait örnekler incelendiğinde:

Referans tablet ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları uygulanan gruplardaki verilere benzer şekilde, alveolar yapılarda ve terminal bronşiyol duvarındaki mukozal katlantılarda şiddetli dejenerasyon izlenmiştir. Pulmoner arter duvarında kalınlaşma ve çevresindeki bağ dokusunda lenfatik hücre infiltrasyonun arttığı görülmüştür (Resim 4.37).



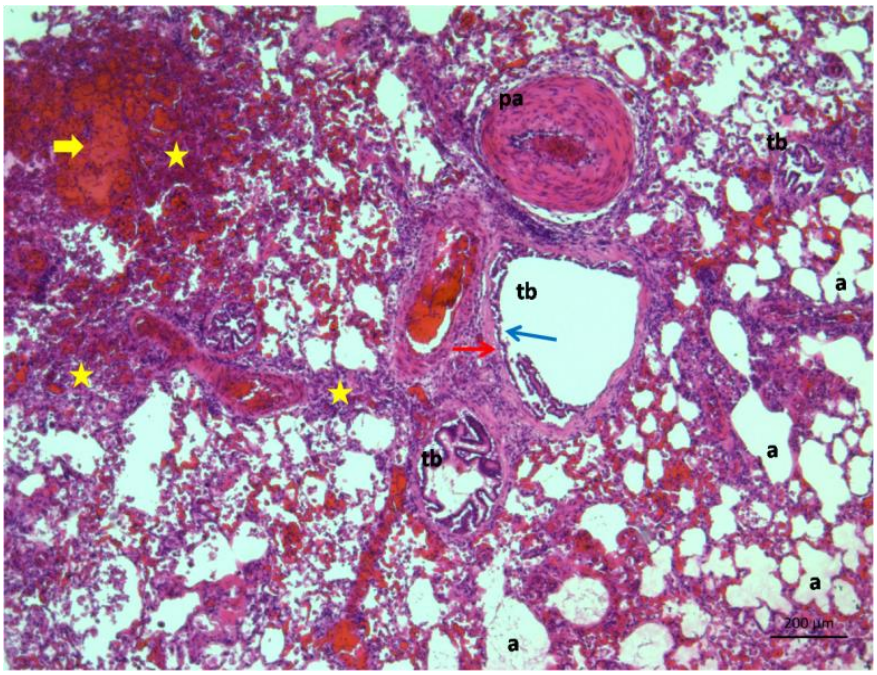
Resim 4.37. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), alveolar kese (ak), alveol (a), (H&E, x5))

Referans tablet ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde parankimada izlenen yoğun konjesyon ve doku genelindeki yoğun lenfatik hücre infiltrasyonun 2 doz tedavi alan gruba ve aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları uygulanan gruplara benzer olduğu görülmüştür (Resim 4.38).

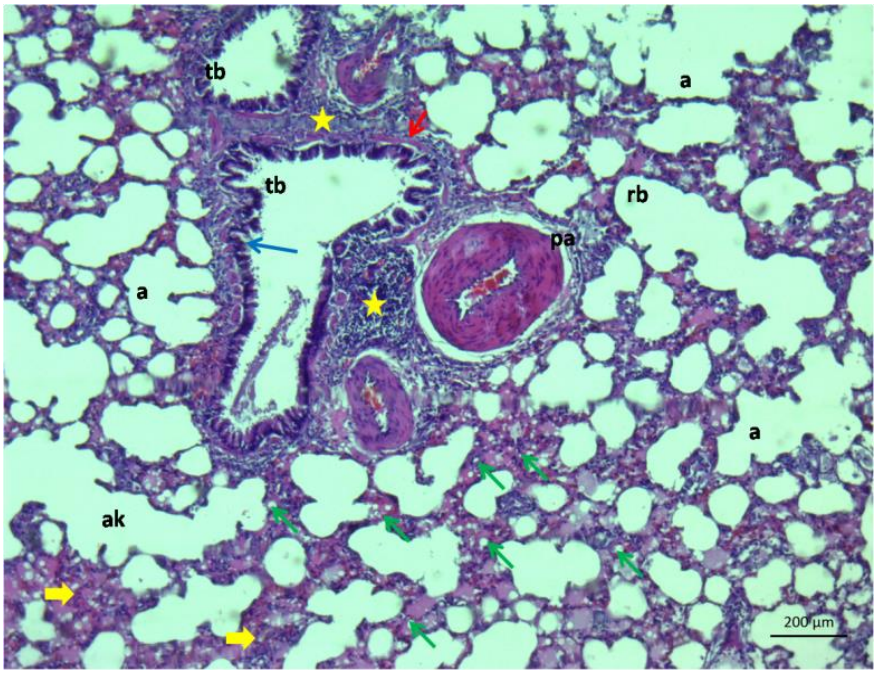


Resim 4.38. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), alveolar kese (ak), alveol (a), (H&E, x5))

Referans tablet ile 14 (Resim 4.39) ve 15 (Resim 4.40) doz tedavi uygulanan sıçanların akciğer kesitlerinde doku genelinde izlenen fibrozis, konjesyon ve lenfatik hücre infiltrasyonu gibi patolojik bulgular daha düşük (8 doz) SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları uygulanan sıçanlara benzer şekilde bulunmuştur.



Resim 4.39. 14 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), alveolar kese (ak), alveol (a), (H&E, x5))

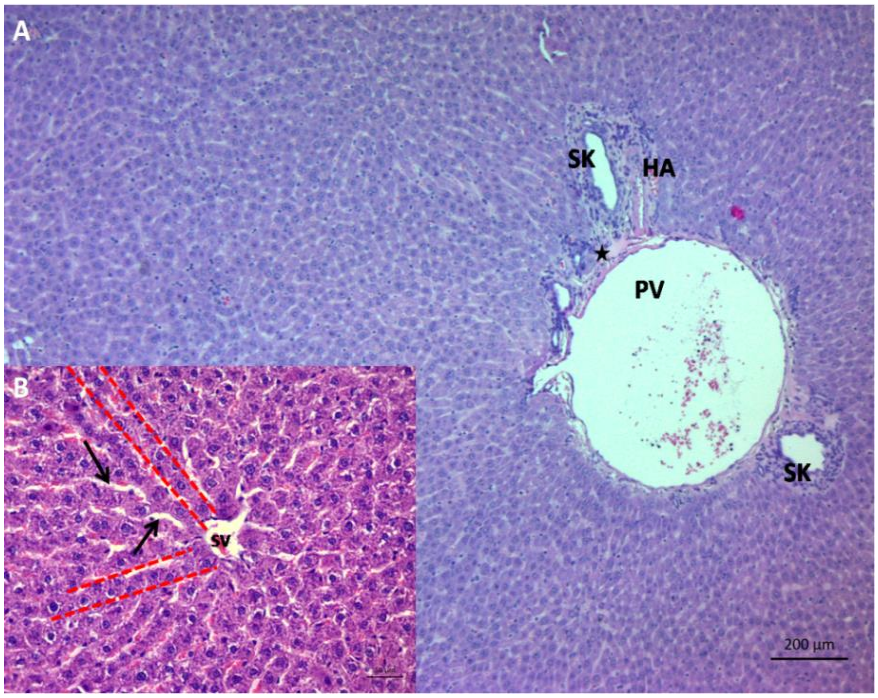


Resim 4.40. 15 doz referans tablet uygulanan grup (G5) akciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Pulmoner arter (pa), terminal bronşiyol (tb), mukozal katlantılar (mavi ok), düz kas (kırmızı ok), lenfatik hücre infiltrasyonu (sarı yıldız), konjesyon (sarı ok başı), fibrozis (yeşil ok başı), alveolar kese (ak), alveol (a), (H&E, x5))

Karaciğere ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

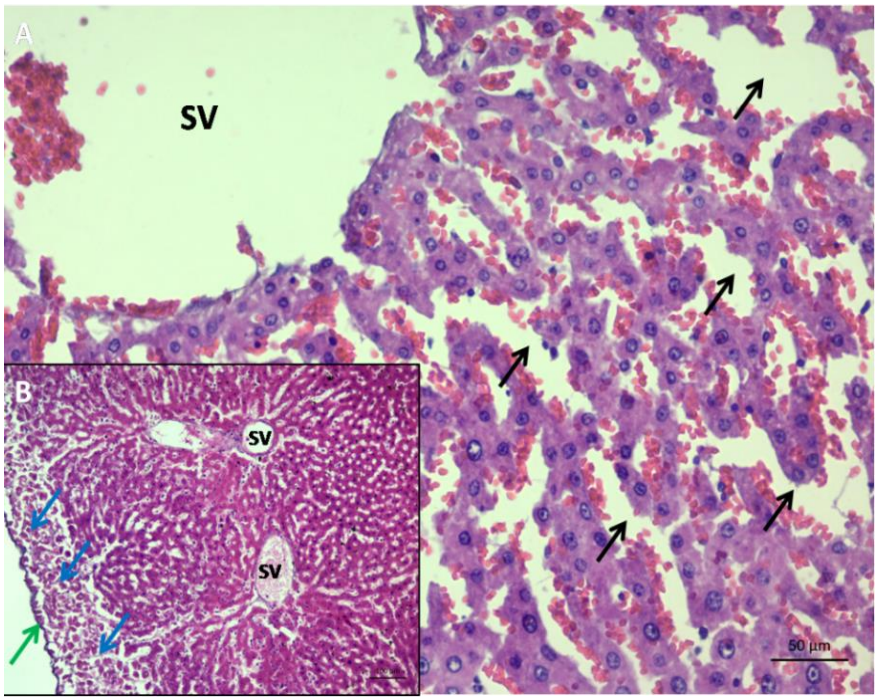
Karaciğer parankimasını oluşturan karaciğer hücre kordonları (Remark kordonları) belirgin çekirdekli hepatositleri ve iyi korunmuş sitoplazmaları ile normal görünümde gözlenmiştir. Klasik karaciğer lobülünün merkezinde yer alan santral ven (SV)'den lobülün periferine doğru uzanan bu hücre kordonları arasında yerleşik bulunan sinüzoidler ve bu yapıların duvarlarını oluşturan endotel hücrelerinde de herhangi bir yapısal bozukluğa rastlanmamıştır. Karaciğer lobüllerini oluşturan yapılara daha yakından bakıldığında klasik karaciğer lobülünün köşelerinde bulunan portal alan ve onunla ilişkili yapılardan; portal ven (PV), hepatik arter (HA) ve safra kanalı (SK) normal görünümde gözlenmiştir. Ayrıca portal alanda yerleşik bulunan bağ dokusu elemanlarında herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır (Resim 4.41).



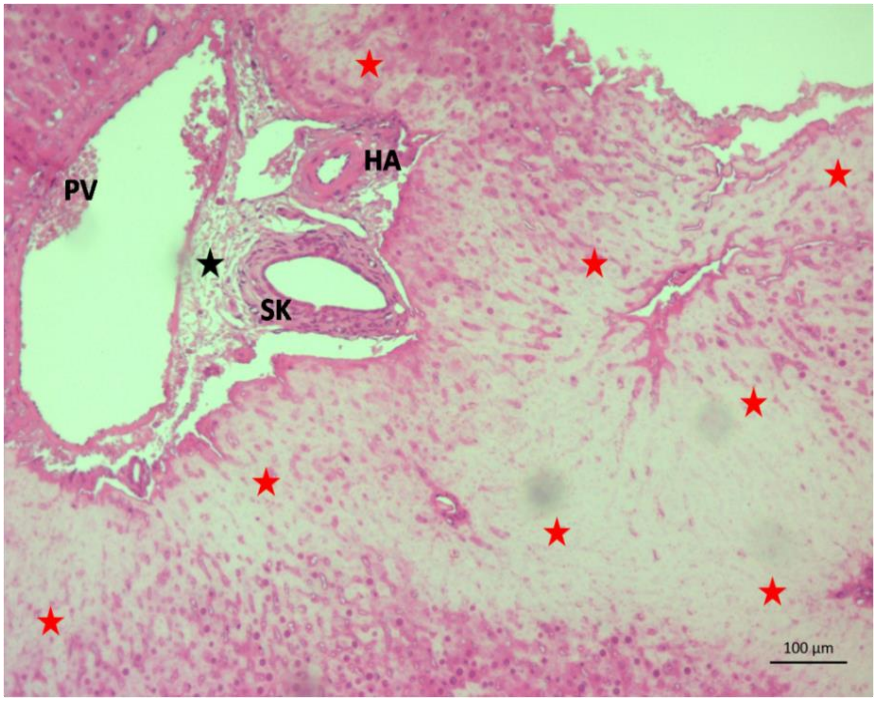
Resim 4.41. Kontrol grubu (G1) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Portal alana ait bağ doku (siyah yıldız), portal ven (PV), hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), B: Santral ven (SV), karaciğer hücre kordonları (kırmızı çizgiler), perisinüzoidal aralık (siyah ok) (A: H&E, x5) (B: H&E, x20))

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Karaciğer hücre kordonlarında düzensizleşme belirlenmiştir. Hepatositler dikkatle incelendiğinde hücre içinde vakuolizasyon ve membran tomurcuklanmaları görülmüştür. Özellikle karaciğeri en dıştan çevreleyen bağ dokusu kılıfın (Glisson kapsülü) hemen altında yerleşik olan hepatositlerde çekirdek parçalanmaları ve hücre membran sınırlarında düzensizleşme gibi dejenerasyonlar dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.42). Bununla birlikte karaciğer parankiminde bağ dokusu miktarının yoğun şekilde arttığı izlenmiştir (Resim 4.43).



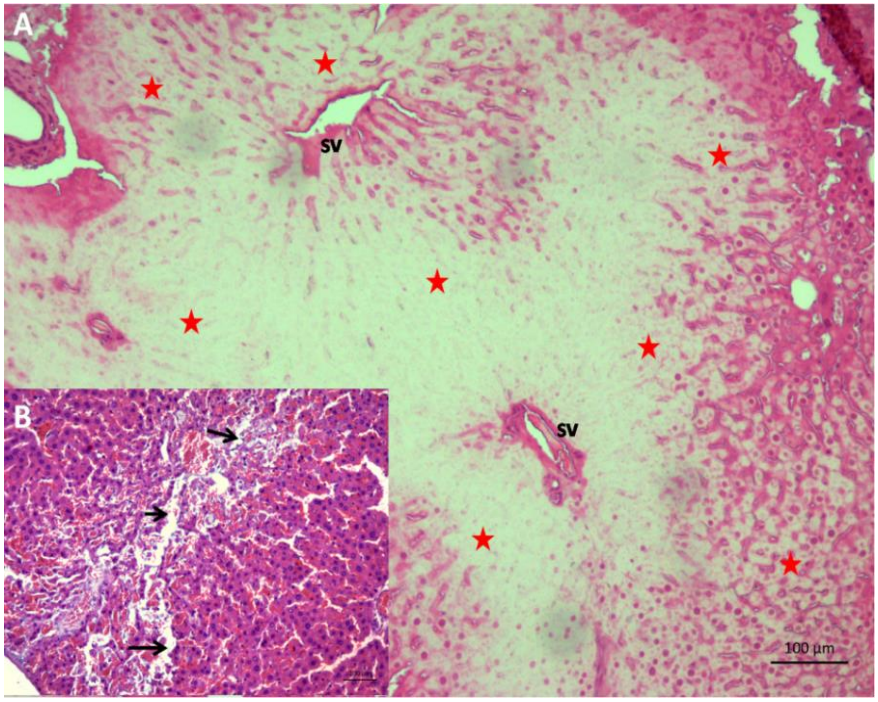
Resim 4.42. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-1
(A: Santral ven (SV), genişlemiş perisinüzoidal aralık (siyah ok), B: Glisson kapsülü (yeşil ok), dejeneratif hepatositler (mavi ok) (A: H&E, x20) (B: H&E, x10))



Resim 4.43. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-2
(Portal alana ait bağ doku (siyah yıldız), portal ven (PV), hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), fibrozis (kırmızı yıldız) (H&E, x10))

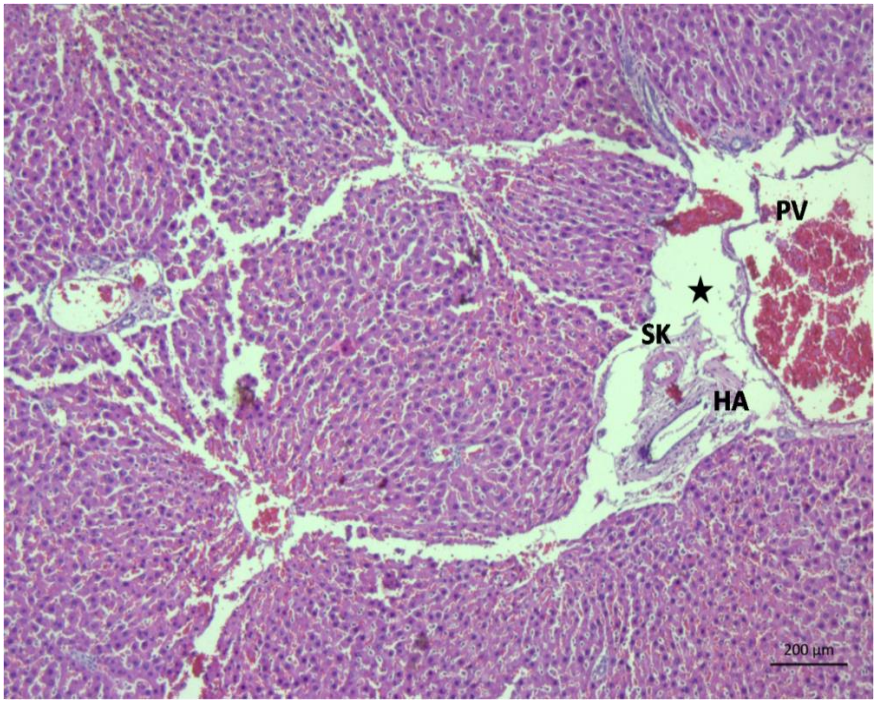
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS formülasyonu uygulanan gruba (G3) ait örnekler incelendiğinde:

SNEDDS formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde Remark kordonları arasında yerleşik bulunan sinüzoidlerde genişleme ve yoğun vasküler konjesyon görülmüş, ayrıca karaciğer parankiminde yoğun fibrozis izlenmiştir (Resim 4.44).



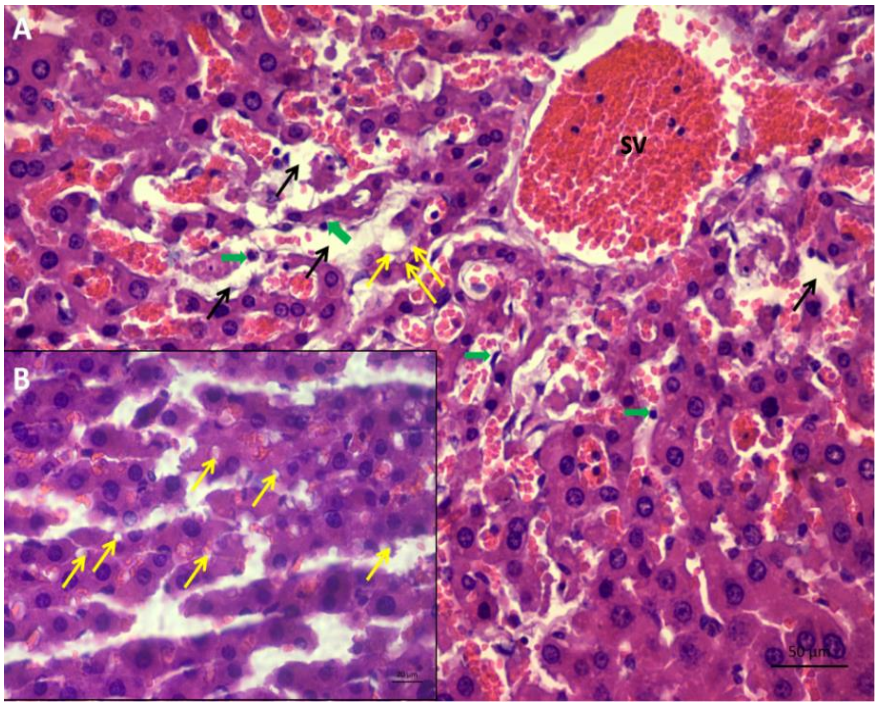
Resim 4.44. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), fibrozis (kırmızı yıldız), B: Genişlemiş perisinüzoidal aralık (siyah ok) (A, B: H&E, x10))

SNEDDS formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde portal alanda artmış bağ dokusu dejenerasyonu ve bu alanda yer alan portal ven ile hepatik arter duvarında artmış dilatasyon ve yoğun endotel hasarı tespit edilmiştir (Resim 4.45).



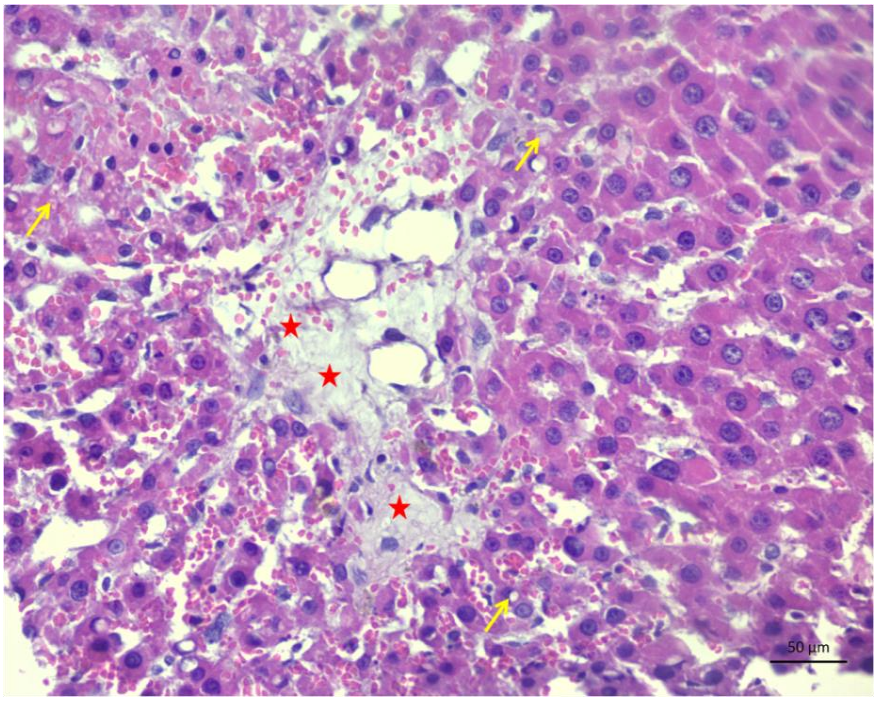
Resim 4.45. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Portal alana ait dejeneratif bağ doku (siyah yıldız), portal ven (PV) hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), fibrozis (kırmızı yıldız) (H&E, x5))

SNEDDS formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde klasik karaciğer lobül yapısının korunduğu ancak santral vene yakın konumlu sinüzoidal yapılarda genişleme ve çok sayıda Kupffer hücresinin varlığı dikkat çekmiştir. Bununla birlikte hücresel vakuolizasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla nispeten daha az olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.46).



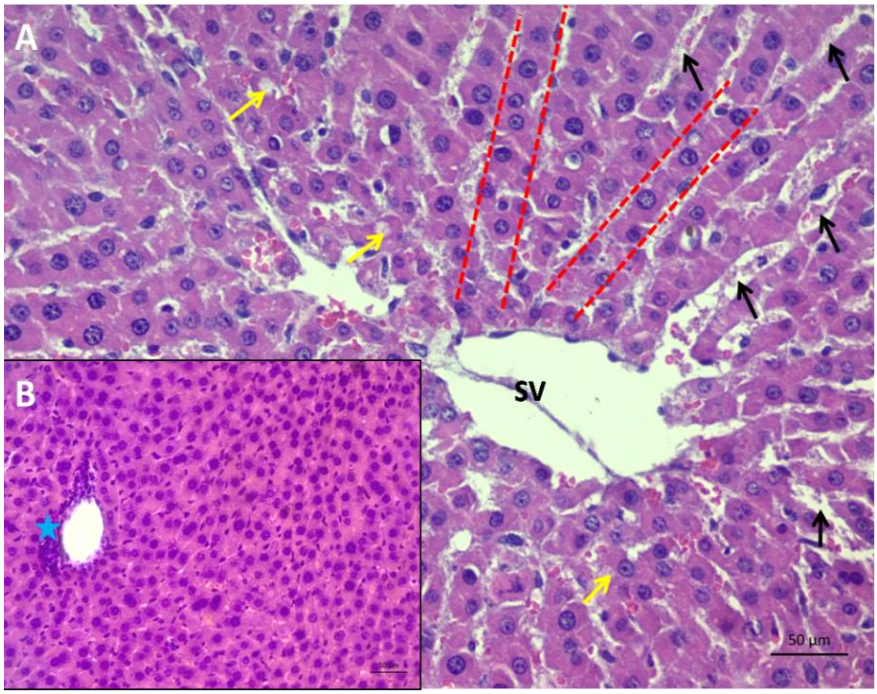
Resim 4.46. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), genişlemiş perisinüzoidal aralık (siyah ok), Kupffer hücresi (yeşil ok başı), B: Hücre içinde vakuolizasyon (sarı ok) (A: H&E, x20) (B: H&E, x40))

SNEDDS formülasyonu ile 14 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde karaciğer dokusunda histopatolojik parametrelerde düzelme saptanmıştır. Bu grupta perivasküler alanda izlenen fibrozis ve hücre içi vakuolizasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla daha ılımlı olduğu görülmüştür (Resim 4.47).



Resim 4.47. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Hücre içinde vakuolizasyon (sarı ok), fibrozis (kırmızı yıldız) (H&E, x20))

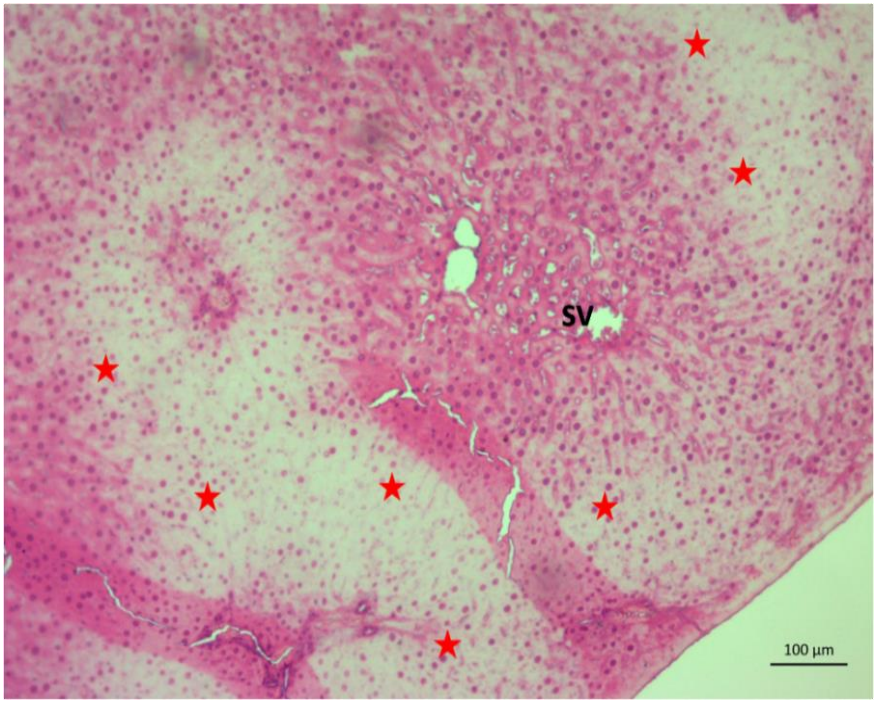
SNEDDS formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde histopatolojik parametrelerdeki düzelme 14 doz tedavi alan sıçanlar ile benzer şekilde bulunmuş, sinüzoidal aralıklardaki genişleme, karaciğer hücre kordonlarında düzensizleşme ve hücre içi vakuolizasyonun azalmış olduğu görülmüştür. Buna ek olarak bu grupta portal alandaki inflamatuar hücre infiltrasyonu da diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha hafif olarak izlenmiştir (Resim 4.48).



Resim 4.48. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), karaciğer hücre kordonları (kırmızı çizgiler), perisinüzoidal aralık (siyah ok), hücre içinde vakuolizasyon (sarı ok), B: İnflamatuar hücre infiltrasyonu (mavi yıldız) (A, B: H&E, x20))

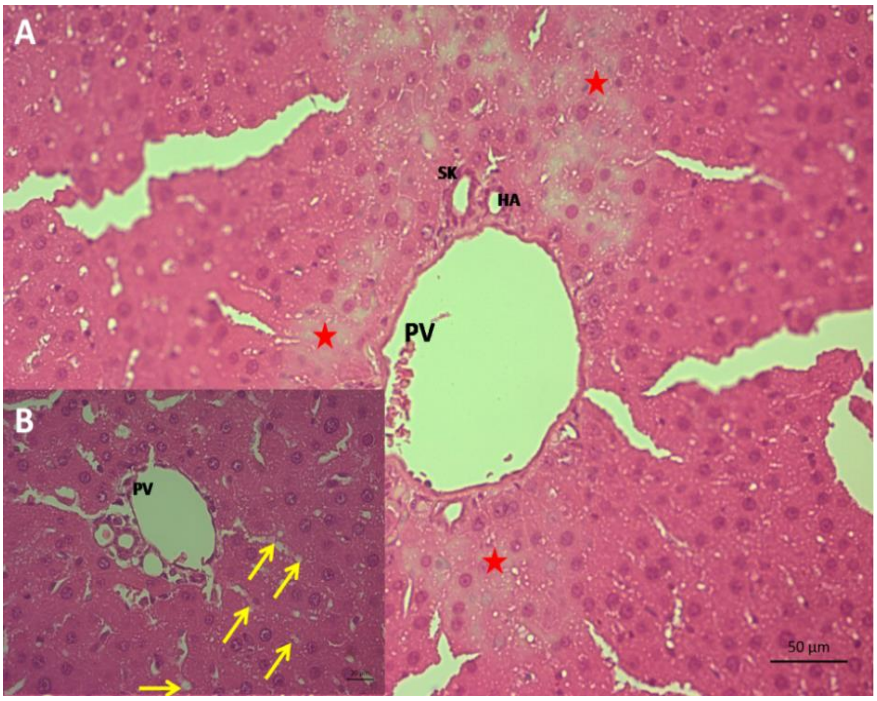
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda S-SNEDDS tablet preparatı uygulanan gruba (G4) ait örnekler incelendiğinde:

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlara benzer şekilde karaciğer parankiminde yoğun fibrozis izlenmiştir (Resim 4.49).



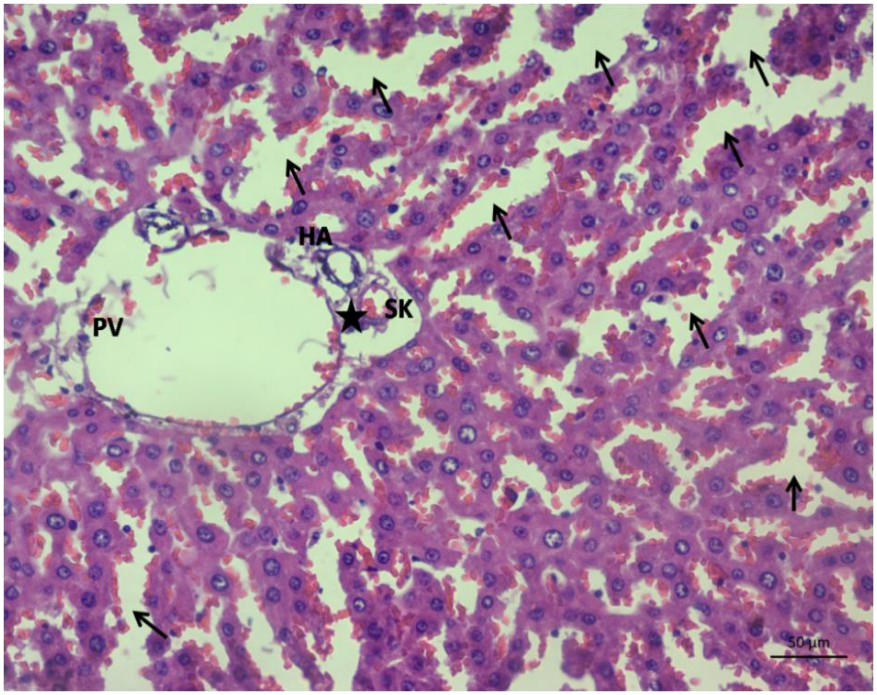
Resim 4.49. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), fibrozis (kırmızı yıldız) (A: H&E, x10))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde portal ven duvarında düzensizlik, sinüzoidal aralıklarda genişleme ve doku genelinde yoğun hücre içi vakuolisayon izlenmiş, bununla birlikte periportal alanda orta dereceli fibrotik alanlar dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.50).



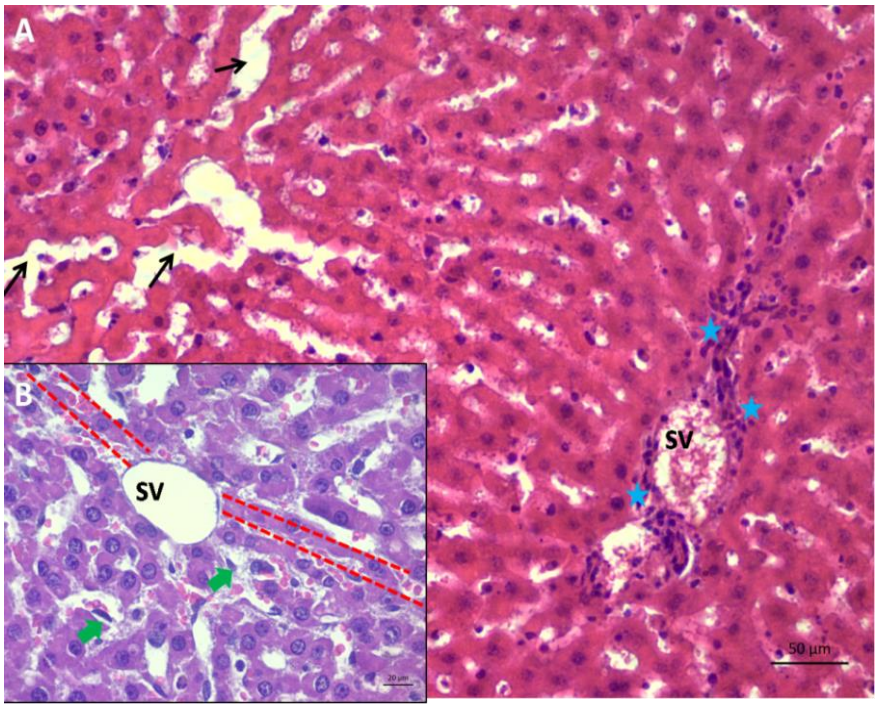
Resim 4.50. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Portal ven (PV), hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), fibrozis (kırmızı yıldız), B: Hücre içinde vakuolizasyon (sarı ok) (A: H&E, x20) (B: H&E, x40))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde karaciğer hücre kordonlarında düzensizleşme ve sinüzoidal aralıklarda genişleme görülmüş, hücre içi vakuolisayon 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla nispeten daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca portal ven ile hepatik arter duvarında dilatasyon ve yoğun endotel hasarı tespit edilmiştir. Söz konusu verilerin aynı dozda SNEDDS uygulanan sıçanlara kıyasla daha şiddetli olduğu görülmüştür (Resim 4.51).



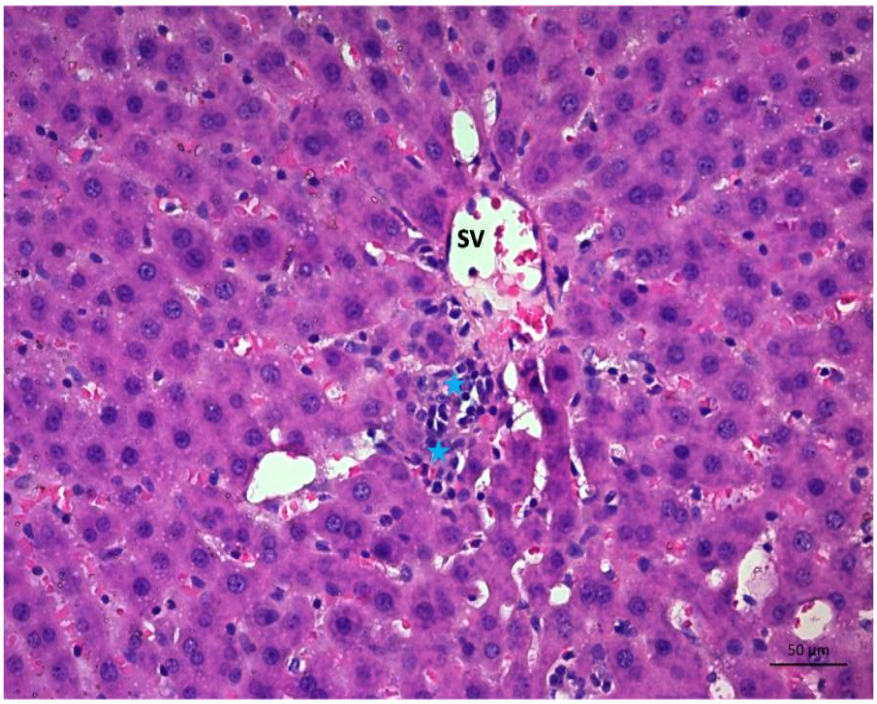
Resim 4.51. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Portal ven (PV), hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), portal alana ait bağ doku (siyah yıldız) (A: H&E, x20))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 13 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde karaciğer hücre kordonlarında düzensizleşme, hücre içi vakuolizasyon ve sinüzoidal genişleme gibi histopatolojik parametrelerin 2, 4 ve 8 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla oldukça düzelmiş olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu bulguların aynı dozda sıvı SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlara benzer şekilde olduğu, ancak daha yüksek dozda referans tablet tedavisi alan deneklere kıyasla daha ılımlı olduğu dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.52).



Resim 4.52. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), perisinüzoidal aralık (siyah ok), inflamatuar hücre infiltrasyonu (mavi yıldız), B: Santral ven (SV), karaciğer hücre kordonları (kırmızı çizgiler), Kuppfer hücresi (yeşil ok başı) (A: H&E, x20) (B: H&E, x40))

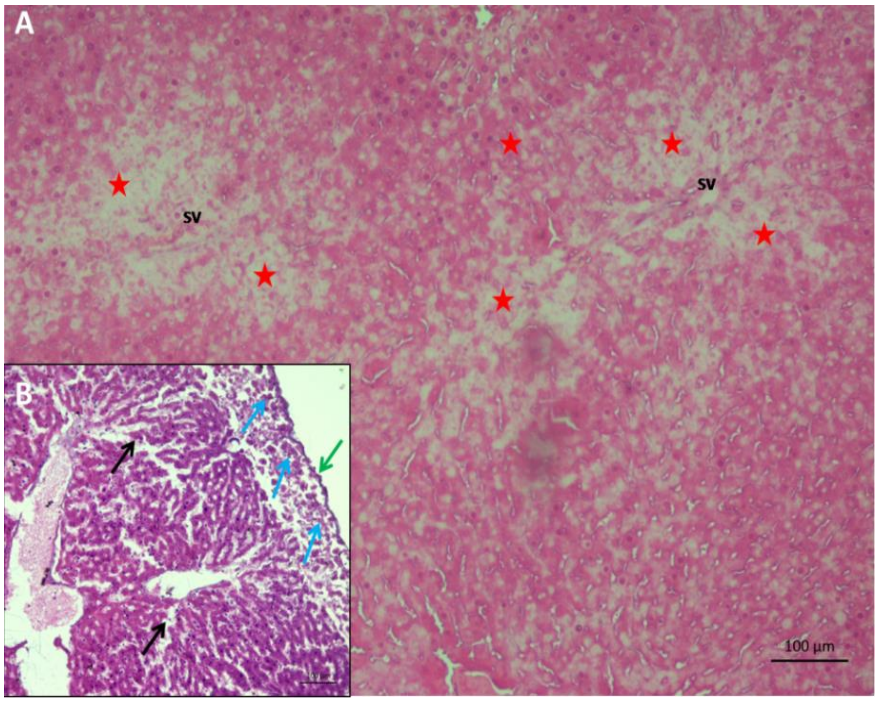
S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde elde edilen verilerin 13 doz tedavi alan sıçanlarla benzer eğilimde olduğu görülmüş, buna ek olarak bu grupta portal alandaki inflamatuar hücre infiltrasyonu da aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlara benzer şekilde bulunmuştur (Resim 4.53).



Resim 4.53. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Santral ven (SV), inflamatuar hücre infiltrasyonu (mavi yıldız) (A: H&E, x20))

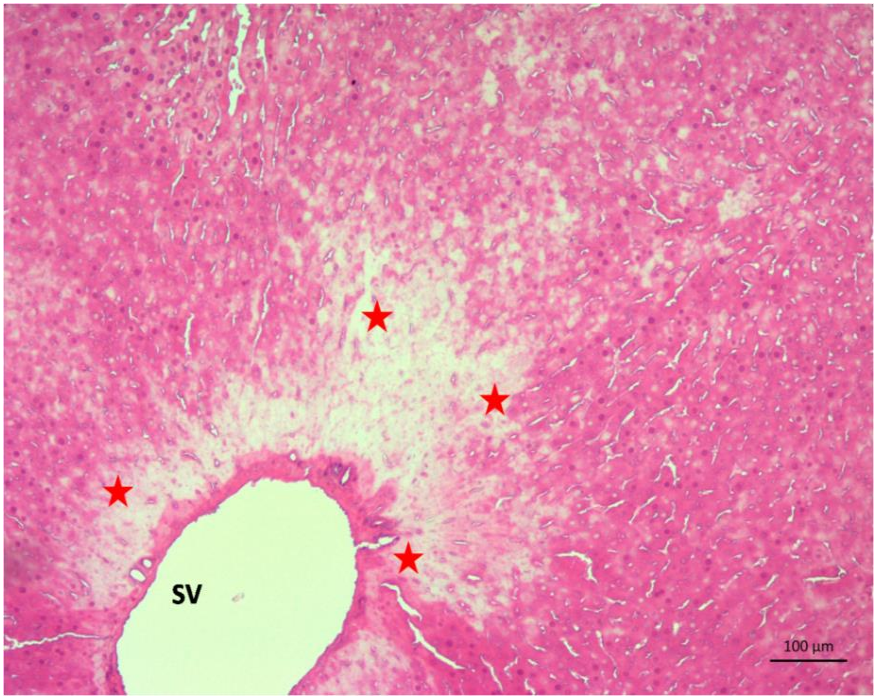
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda referans tablet uygulanan gruba (G5) ait örnekler incelendiğinde:

Referans tablet ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde G2 ile benzer şekilde subkapsüller bölgede yerleşik hepatositlerde çekirdek parçalanmaları ve hücre membran sınırlarında düzensizleşme ile karaciğer parankiminde yoğun fibrozis gibi dejenerasyonlar görülmüştür (Resim 4.54).



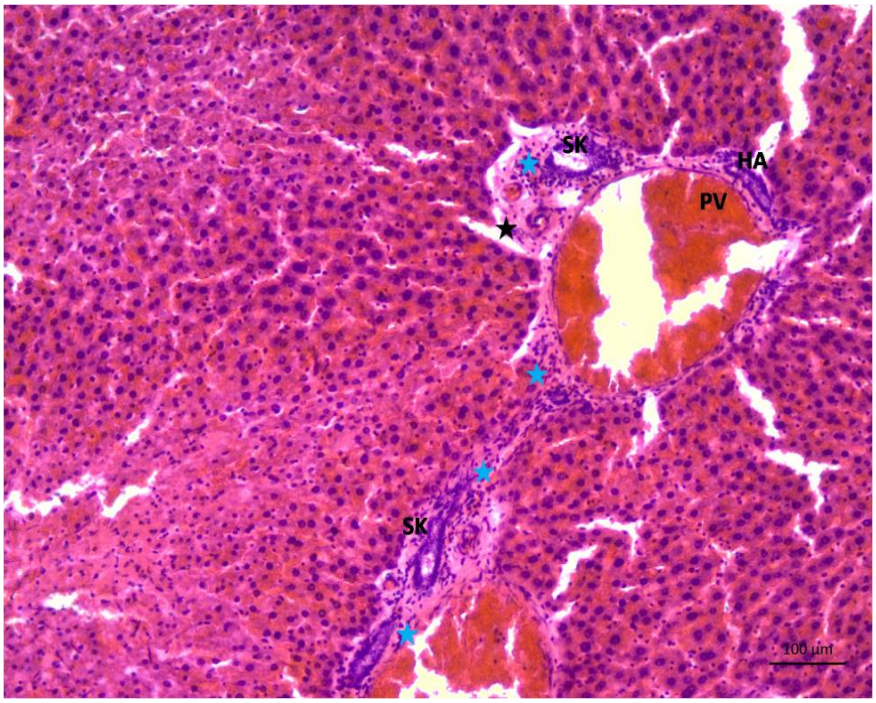
Resim 4.54. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), fibrozis (kırmızı yıldız), B: Genişlemiş perisinüzoidal aralık (siyah ok), Glisson kapsülü (yeşil ok), dejeneratif hepatositler (mavi ok) (A, B: H&E, x10))

Referans tablet ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde periportal alanda izlenen fibrotik alanlar aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon uygulanan sıçanlara kıyasla daha şiddetli ölçüde bulunmuştur (Resim 4.55).



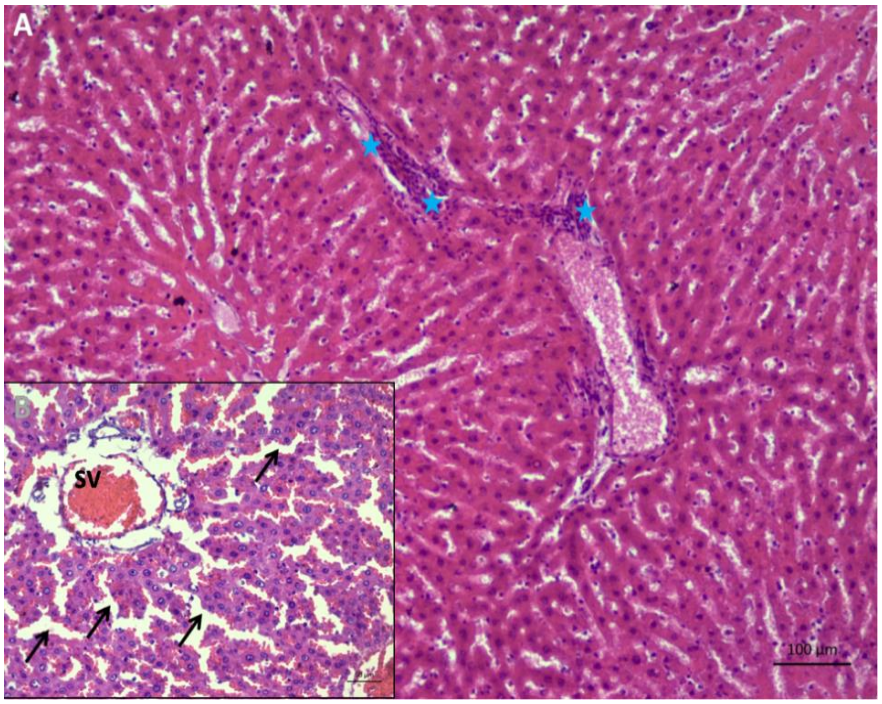
Resim 4.55. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Santral ven (SV), fibrozis (kırmızı yıldız) (H&E, 10))

Referans tablet ile 14 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde karaciğer hücre kordonlarında düzensizleşme ve hücre içi vakuolizasyon histopatolojik parametrelerin 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla oldukça düzelmiş olduğu tespit edilmiştir. Ancak periportal alandaki inflamatuar hücre infiltrasyonu aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlara kıyasla daha şiddetli izlenmiştir (Resim 4.56).



Resim 4.56. 14 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Portal ven (PV), hepatik arter (HA), safra kanalı (SK), portal alana ait bağ doku (siyah yıldız), inflamatuar hücre infiltrasyonu (mavi yıldız) (H&E, x10))

Referans tablet ile 15 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde elde edilen verilerin 14 doz tedavi alan sıçanlara benzer olduğu görülmüştür (Resim 4.57).

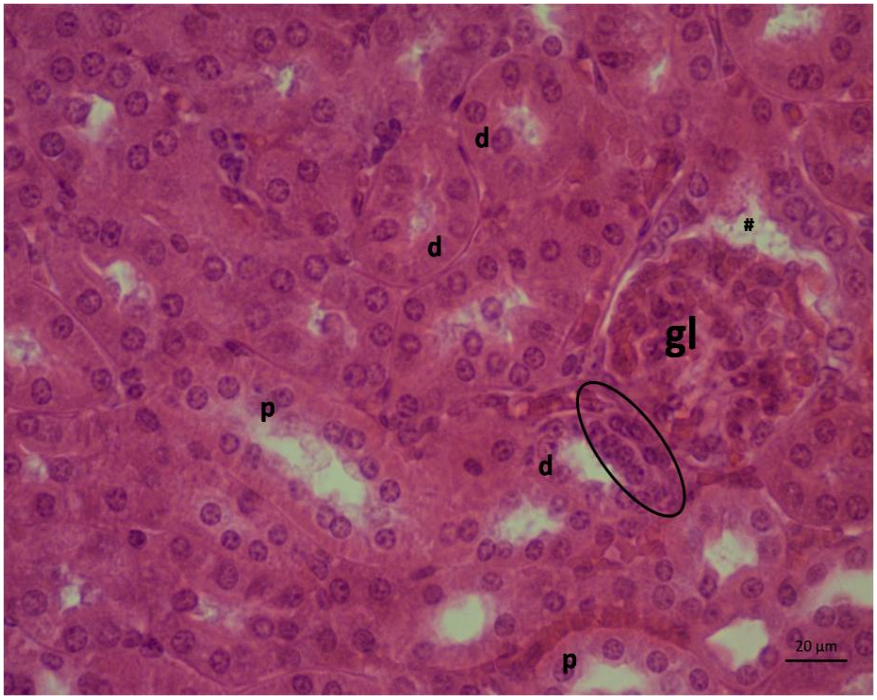


Resim 4.57. 15 doz referans tablet uygulanan grup (G5) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Santral ven (SV), inflamatuar hücre infiltrasyonu (mavi yıldız), B: Santral ven (SV), genişlemiş perisinüzoidal aralık (siyah ok) (A: H&E, x10) (B: H&E, x10))

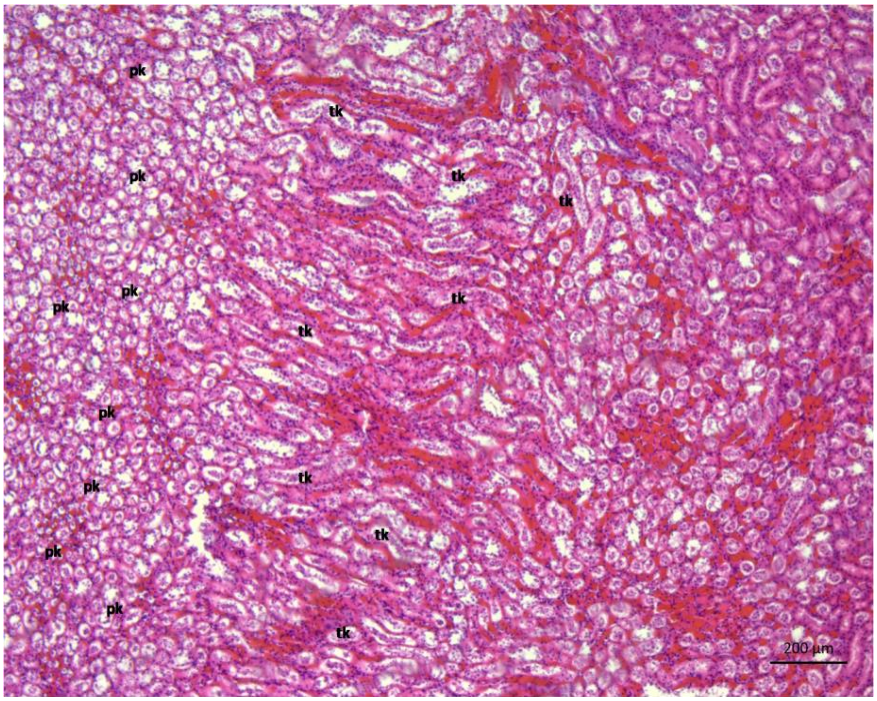
Böbreğe ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Renal korpüsküller ve kıvrıntılı tübüller ile karakterize olan korteks normal görünüşte bulunmuştur. Daha büyük büyütmelerde renal korpüskülü oluşturan glomeruluslar ve Bowman kapsülleri ile proksimal ve distal tübül yapılarının normal görünümde olduğu izlenmiştir. Renal korpüskülün damar kutbunda bulunan ve afferent arteriol duvarındaki modifiye kas hücrelerini, Lacis hücrelerini ve makula densayı içeren jukstaglomeruler aparatta herhangi bir yapısal bozukluğa rastlanmamıştır (Resim 4.58). Medullada bulunan nefronların düz tübüler segmentleri ve toplayıcı kanallar da normal görünüşte bulunmuştur (Resim 4.59).



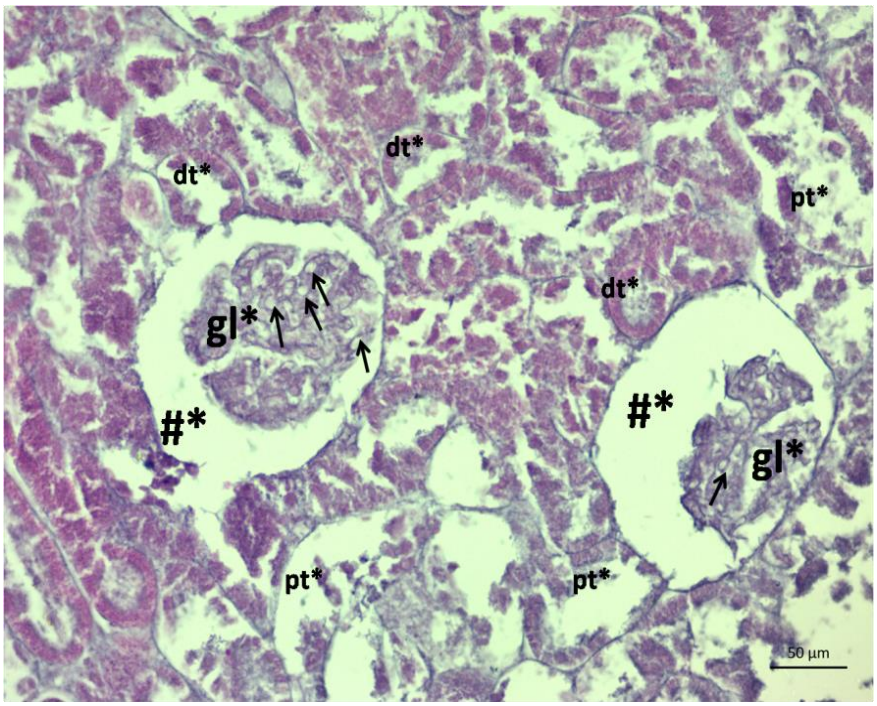
Resim 4.58. Kontrol grubu (G1) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-1
(Normal glomerül (gl), normal Bowman aralığı (#) normal proksimal tübül (p), normal distal tübül (d), (H&E, x5))



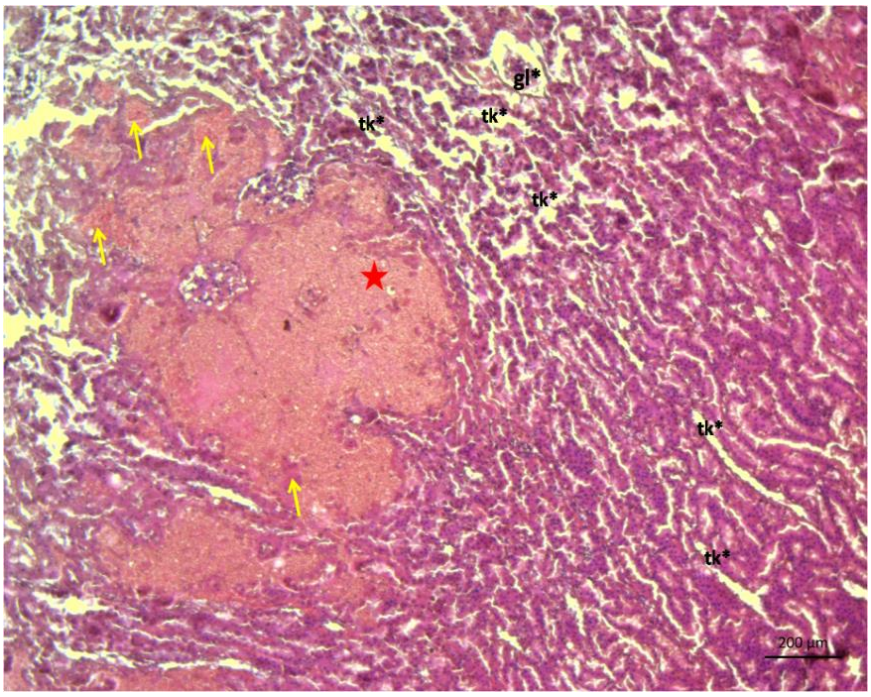
Resim 4.59. Kontrol grubu (G1) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-2
(Normal görünümde olan papillar kanallar (pk), normal görünümde olan toplayıcı kanallar (tk) (H&E, x10))

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Böbrek dokusunda şiddetli hasar tespit edilmiştir. Glomerulus kapiller endotelinde vakuolizasyon ve Bowman boşluğunda genişlemeler ve bazı glomeruler yapıların atrofik olduğu izlenmiştir. Tübüller yapılarda ise yaygın atrofi, belirgin lüminal genişlemeler ve deskuamasyon dikkati çekmiştir (Resim 4.60). Bununla birlikte kortikamedullar bölgede bağ dokusu miktarının yoğun şekilde arttığı ve kanama odaklarının olduğu görülmüştür. Henlenin ince parçasını döşeyen tek katlı yassı epitelde bazı alanlarda ciddi hasar oluştuğu ve duvar bütünlüğü bozulmuş olan dejenere toplayıcı kanallar saptanmıştır (Resim 4.61).



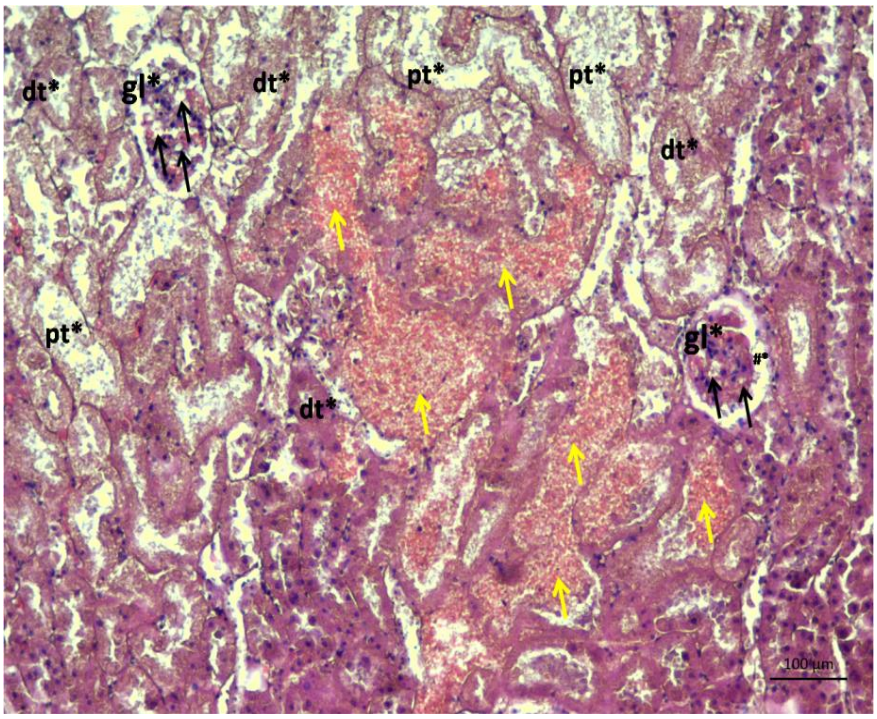
Resim 4.60. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grup (G2) karaciğer dokusuna ait histopatolojik görüntü-1
(Büzüşmüş glomerül (gl*), genişlemiş Bowman aralığı (#*), atrofik proksimal tübül (pt*), atrofik distal tübül (dt*), vakuolizasyon (siyah ok) (H&E, x20))



Resim 4.61. Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grubun (G2) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü-2
(Dejenere toplayıcı kanallar (tk*), fibrozis (kırmızı yıldız), konjesyon (sarı ok) (H&E, x5))

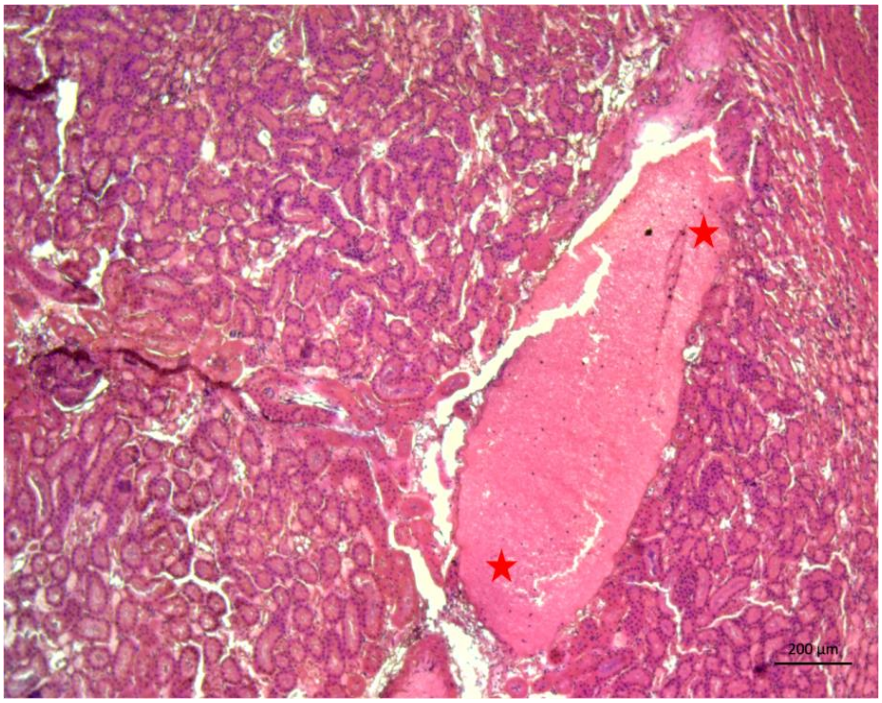
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS formülasyon uygulanan gruba (G3) ait örnekler incelendiğinde:

SNEDDS formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde glomerulus kapiller endotelinde vakuolizasyon, Bowman boşluğunda genişlemeler ve atrofik tübüler yapıların varlığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte kortikal bölgede şiddetli konjesyon varlığı dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.62).



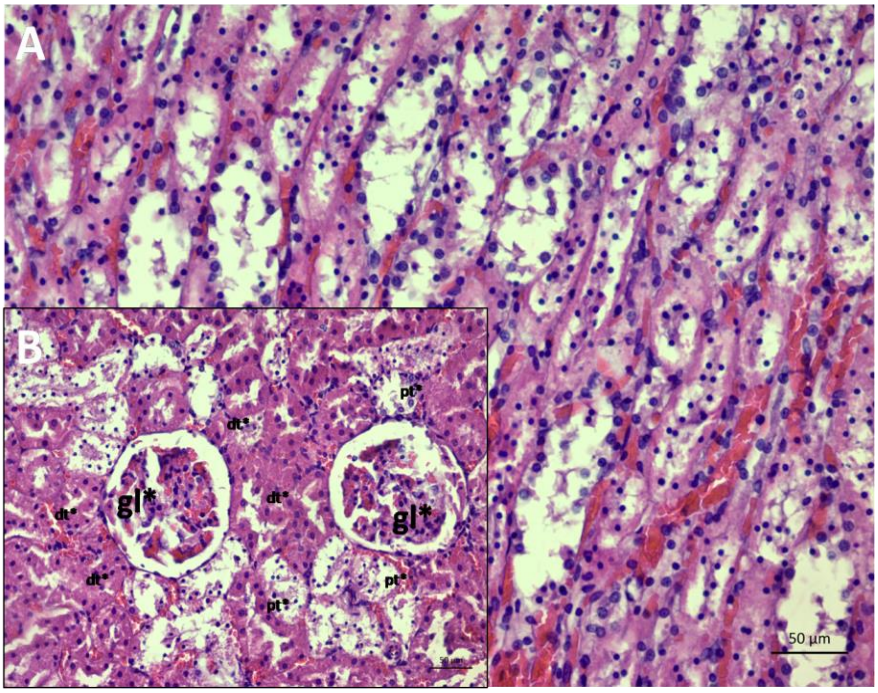
Resim 4.62. 2 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Büzüşmüş glomerül (gl*), genişlemiş Bowman aralığı (#*), atrofik proksimal tübül (pt*), atrofik distal tübül (dt*), vakuolizasyon (siyah ok), konjesyon (sarı ok) (H&E, x10))

SNEDDS formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde tübüller yapılarda yaygın atrofi ve belirgin lüminal genişlemeler izlenirken, hastalık oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan sıçanlara benzer şekilde kortikomedullar bölgede bağ dokusu miktarının yoğun şekilde arttığı ve kanama odaklarının olduğu görülmüştür (Resim 4.63).



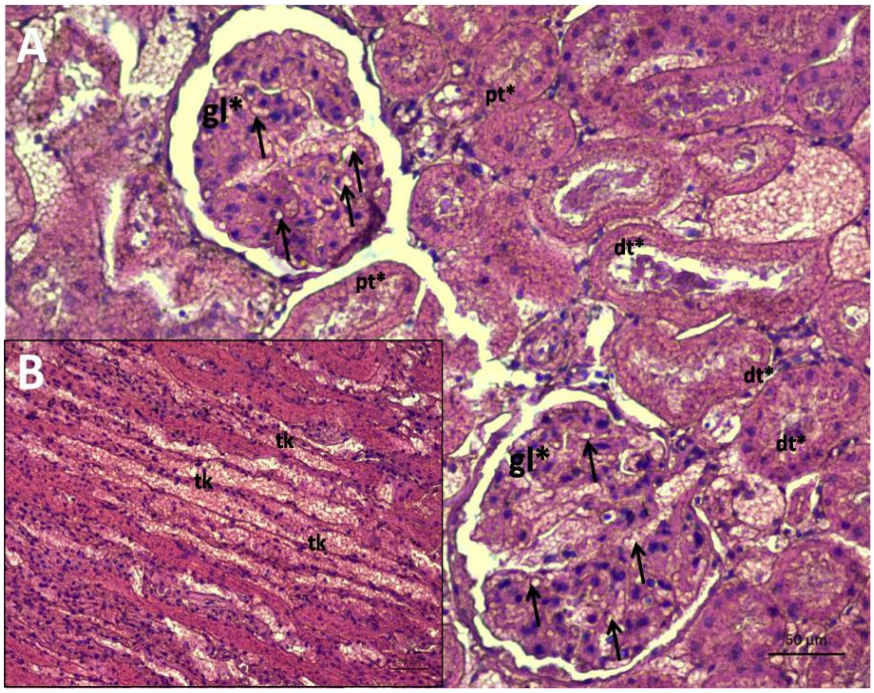
Resim 4.63. 4 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejenere toplayıcı kanallar (tk*), fibrozis (kırmızı yıldız), konjesyon (sarı ok) (H&E, x5))

SNEDDS formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde medullar bölgede, tübüller yapılardaki lüminal genişlemeler belirgin bulunmuştur. Ancak renal korpüsküller ve kıvrıntılı tübüllerde görülen dejenerasyonun 2 ve 4 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla daha ılımlı olduğu görülmüştür (Resim 4.64).



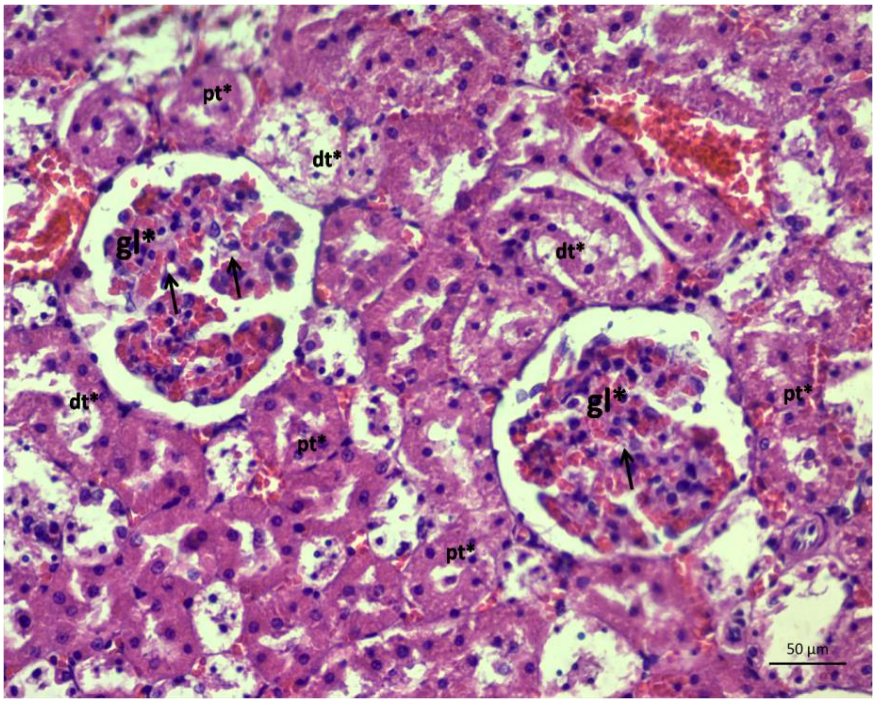
Resim 4.64. 8 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Dejeneratif toplama tübülleri, B: Dejeneratif glomerül (gl*), dejeneratif proksimal tübül (pt*), dejeneratif distal tübül (dt*) (A, B: H&E, x20))

SNEDDS formülasyonu ile 14 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme saptanmıştır. Renal korpüskülde görülen dejenerasyonların ve tübüller yapılardaki lüminal genişlemelerin 2, 4 ve 8 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla oldukça hafif olduğu görülmüştür (Resim 4.65).



Resim 4.65. 14 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Dejeneratif glomerül (gl*), dejeneratif proksimal tübül (pt*), dejeneratif distal tübül (dt*). B: Toplama kanalları (tk) (A, B: H&E, x20))

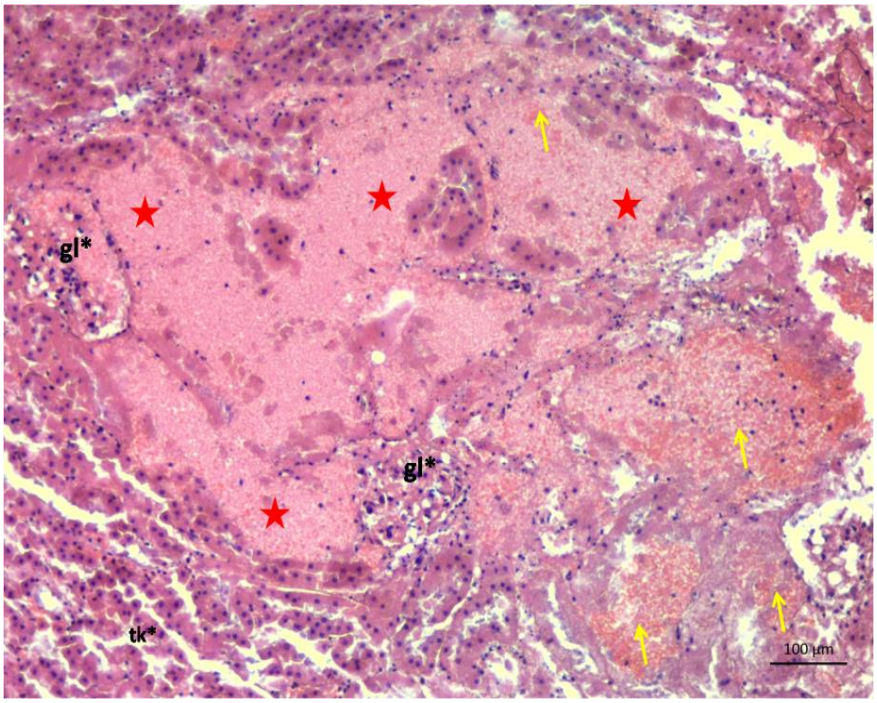
SNEDDS formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan sıçanların sıçanların böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerdeki düzelme 14 doz tedavi alan sıçanlar ile benzer şekilde bulunmuştur (Resim 4.66).



Resim 4.66. 20 doz SNEDDS formülasyonu uygulanan grup (G3) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), dejeneratif proksimal tübül (pt*), dejeneratif distal tübül (dt*) (A: H&E, x20))

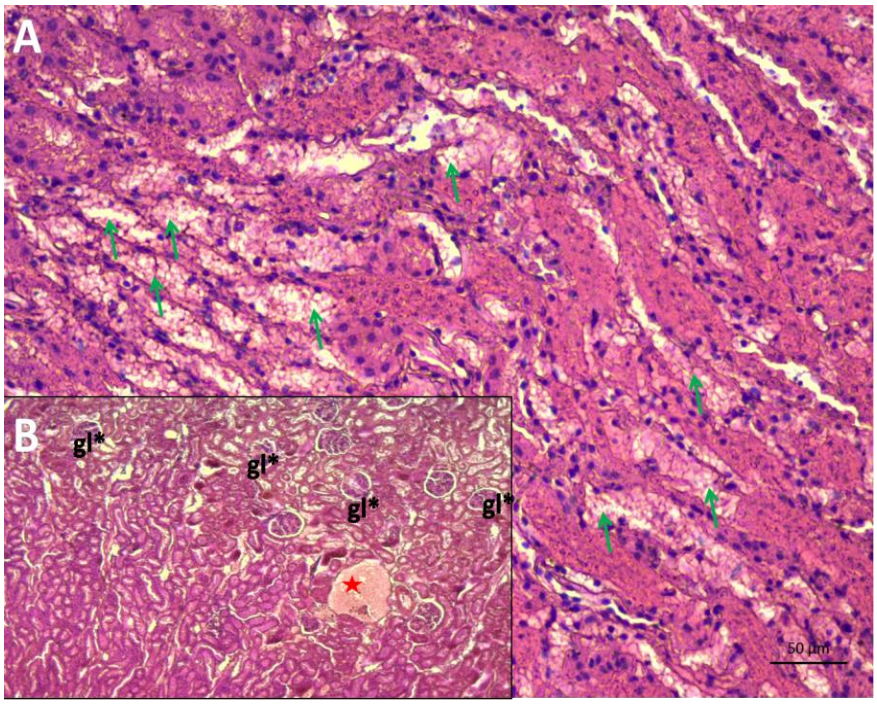
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan gruba (G4) ait örnekler incelendiğinde:

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde kortekste yaygın dejeneratif glomerüllere rastlanmıştır. Bu dejeneratif renal korpüsküllerin Bowman boşlukları kontrole kıyasla daha genişlemiş olarak görülmüş ve Glomerulus kapiller endotelinde vakuolizasyon izlenmiştir. Bununla birlikte kortikomedullar bölgede bağ dokusu miktarının yoğun şekilde artması ve kanama odaklarının olması dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.67).



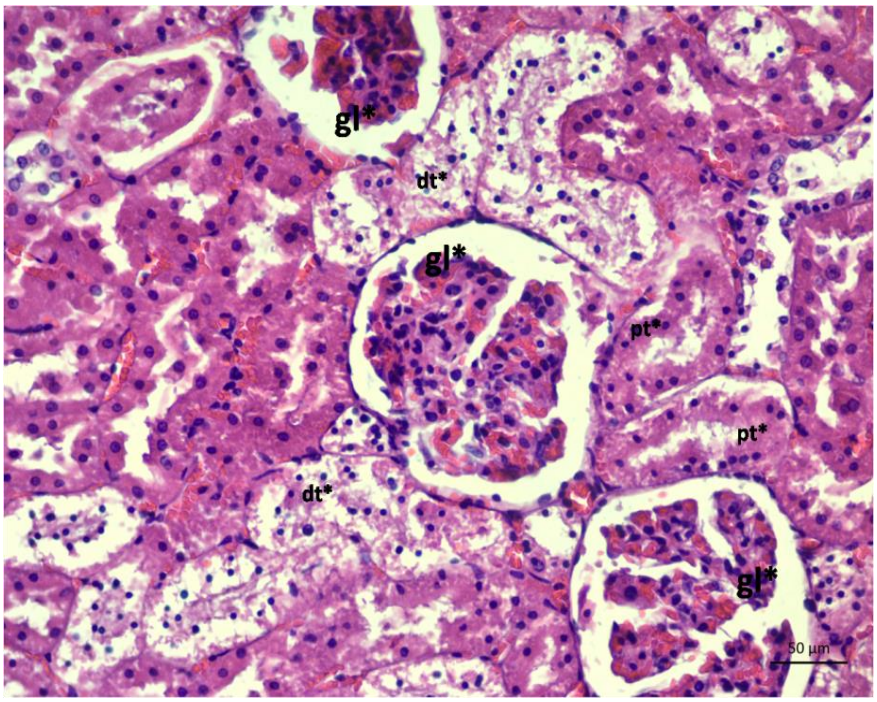
Resim 4.67. 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), dejenere toplayıcı kanallar (tk*), fibrozis (kırmızı yıldız), konjesyon (sarı ok) (H&E, x10))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde glomerüller yapılardaki büzülme ve kortikomedullar bölgede görülen fibrozis gibi dejeneratif bulgular 2 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan ve aynı dozda SNEDDS formülayon uygulanan sıçanlar ile benzerlik göstermiştir. Bunun yanı sıra toplayıcı tübüllerin hücre sitoplazmalarında görülen değişen şiddette vakuoller dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.68).



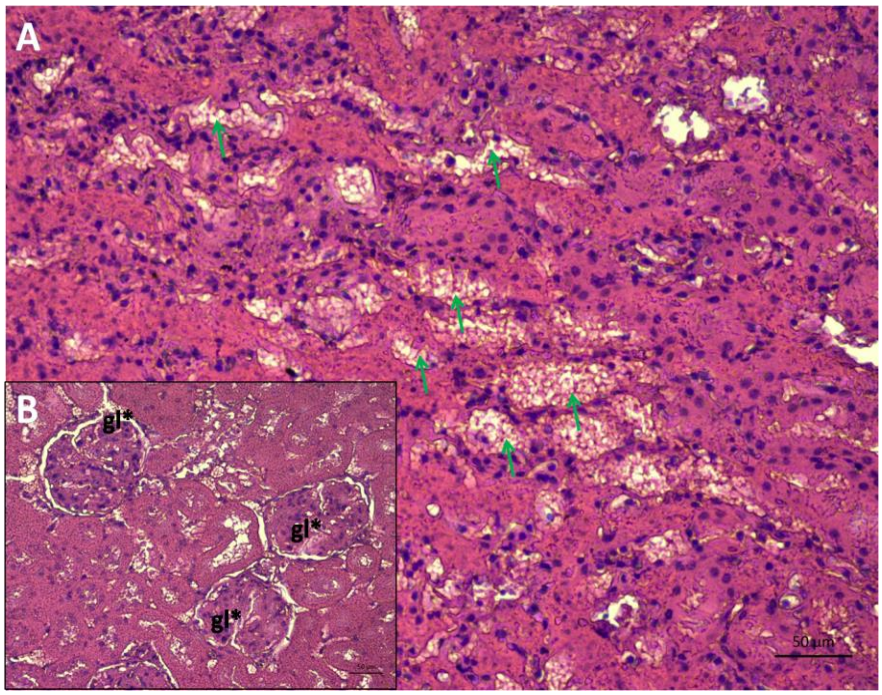
Resim 4.68. 4 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Sitoplazmik vakuoller (yeşil ok), B: Dejeneratif glomerül (gl*), fibrozis (kırmızı yıldız) (A: H&E, x5) (B: H&E, x20))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 8 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde her ne kadar klasik nefron yapısının korunduğu görülse de hem kortikal hem de medullar yapılarda dejeneratif değişikliklere rastlanmıştır. Renal korpüsküllerin Bowman boşluklarında genişleme ve glomerular yumakta büzülme izlenmiş, ayrıca medullanın düz tübülleri arasında az sayıda alanda tübüler dejenerasyon görülmüştür (Resim 4.69).



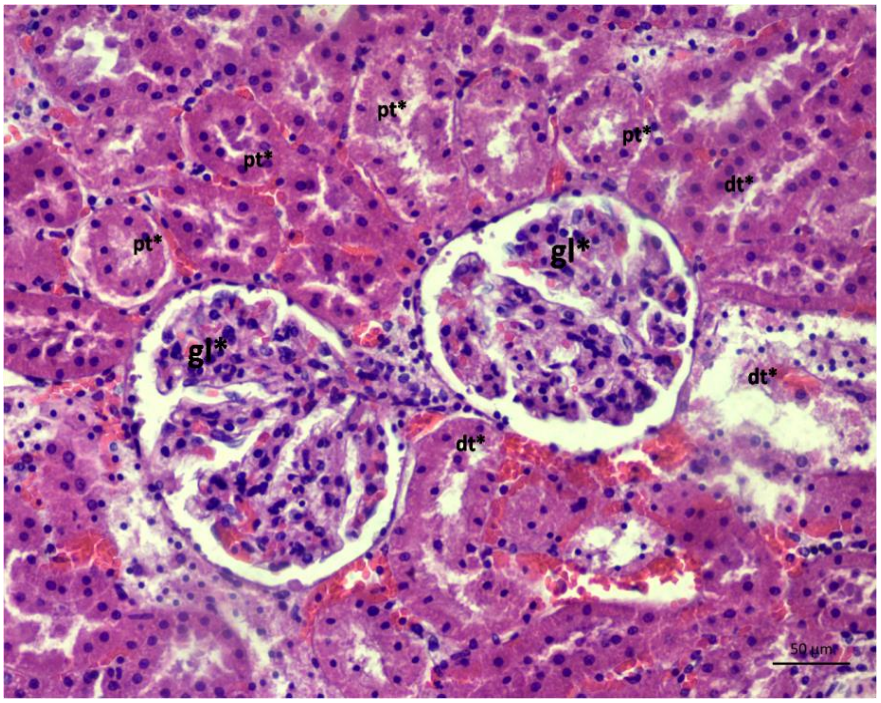
Resim 4.69. 8 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), dejeneratif proksimal tübül (pt*), dejeneratif distal tübül (dt*) (A: H&E, x20))

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 13 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde glomerular dejenerasyonların 2, 4 ve 8 doz tedavi alan sıçanlara kıyasla oldukça düzelmiş olduğu tespit edilmiştir. Ancak toplayıcı tübüllerin hücre sitoplazmalarında görülen değişen şiddette vakuoller oldukça belirgin bulunmuştur. Söz konusu bulguların aynı dozda SNEDDS formülasyon uygulanan deneklere benzer şekilde olduğu, ancak daha yüksek dozda referans tablet tedavisi alan deneklere kıyasla daha ılımlı olduğu dikkat çekici bulunmuştur (Resim 4.70).



Resim 4.70. 13 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(A: Sitoplazmik vakuoller (yeşil ok), B: Dejeneratif glomerül (gl*) (A, B: H&E, x20))

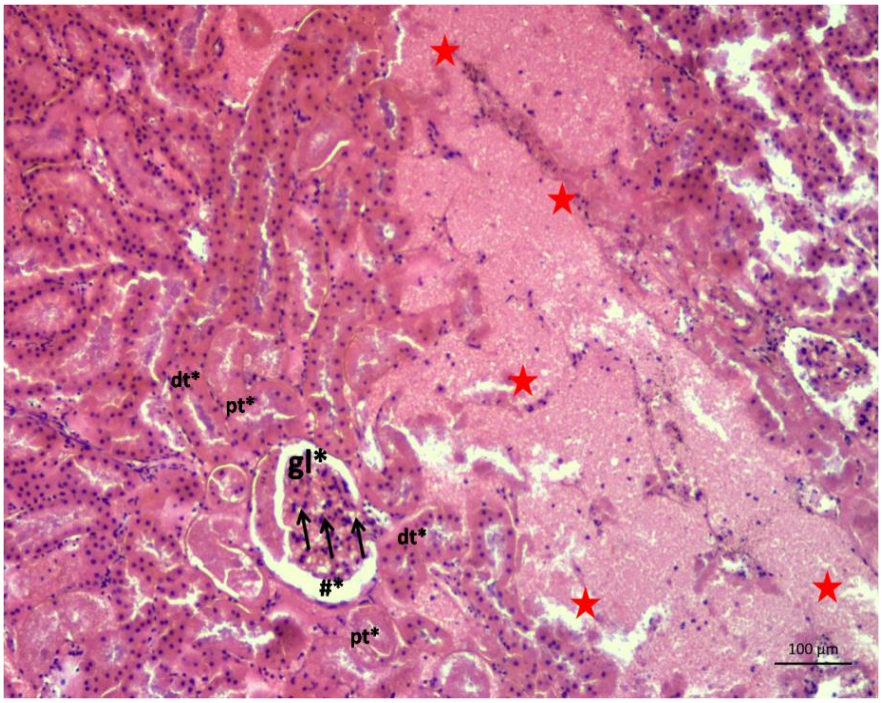
S-SNEDDS tablet formülasyonu ile 20 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde proksimal ve distal tübüllerde görülen atrezi, glomerular yumakta büzülme ve tübüler vakuolisazyon gibi bulguların 14 doz tedavi alan sıçanlara benzer şekilde oldukça düzelmiş olduğu, böbrek parankimasında fibrozis ve konjesyon gibi patolojik bulguların ise ortadan kalktığı gözlenmiştir (Resim 4.71).



Resim 4.71. 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan grup (G4) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), dejeneratif proksimal tübülB(pt*), dejeneratif distal tübül (dt*) (A: H&E, x20))

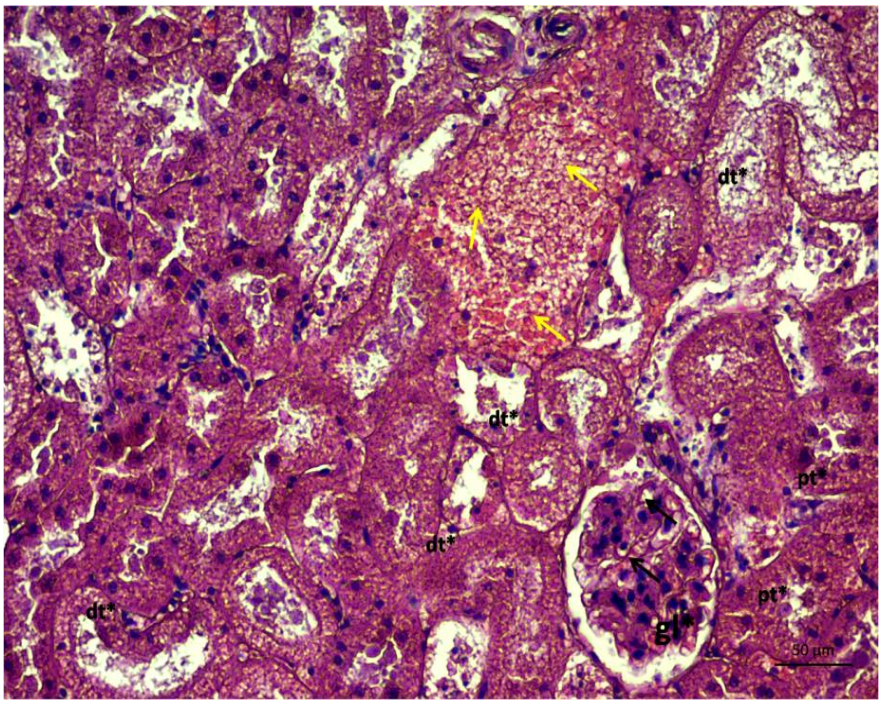
Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda referans tablet uygulanan gruba (G5) ait örnekler incelendiğinde:

Referans tablet formülasyonu ile 2 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde glomerulus kapiller endotelinde vakuolizasyon, proksimal ve distal tübül dejenerasyonları ile parankimada izlenen fibrotik alanlar aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülayonu uygulanan sıçanlarla benzer ölçüde bulunmuştur (Resim 4.72).



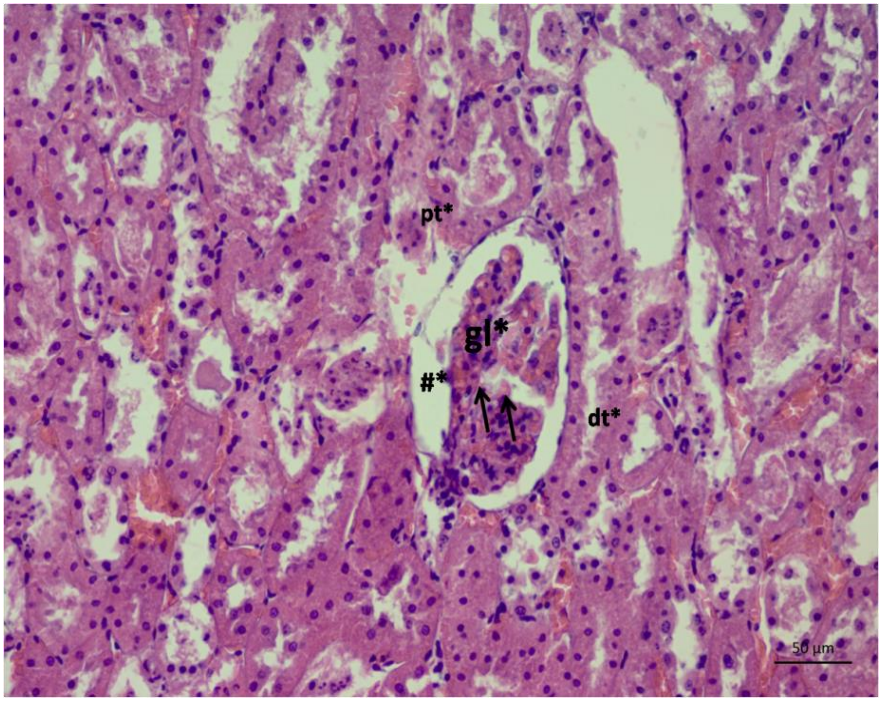
Resim 4.72. 2 doz referans tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Büzüşmüş glomerül (gl*), genişlemiş Bowman aralığı (#*), atrofik proksimal tübül (pt*), atrofik distal tübül (dt*), vakuolizasyon (siyah ok), fibrozis (kırmızı yıldız) (H&E, x10))

Referans tablet formülasyonu ile 4 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde tübüller yapılarda yaygın atrofi ve peritübiler alanlarda konjesyon saptanmıştır. Söz konusu verilerin aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu ile tedavi edilen sıçanlara kıyasla daha belirgin olduğu dikkat çekmiştir (Resim 4.73).



Resim 4.73. 4 doz referans tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), atrofik proksimal tübül (pt*), atrofik distal tübül (dt*), vakuolizasyon (siyah ok), (tk*), konjesyon (sarı ok) (H&E, x20))

Referans tablet formülasyonu ile 14 doz tedavi uygulanan sıçanların böbrek kesitlerinde tübüller yapılarda yaygın atrofi ve glomerular yumakta büzülme izlenmiştir. Söz konusu dejenerasyonlar daha düşük (8 doz) SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon tedavisi alan sıçanlarla benzer ölçüde bulunmuştur (Resim 4.74).



Resim 4.74. 14 doz referans tablet tablet uygulanan grup (G5) böbrek dokusuna ait histopatolojik görüntü
(Dejeneratif glomerül (gl*), atrofik proksimal tübül (pt*), atrofik distal tübül (dt*), vakuolizasyon (siyah ok), (tk*) (H&E, x20))

Referans tablet formülasyonu ile 15 doz tedavi uygulanan sıçanların karaciğer kesitlerinde elde edilen verilerin 14 doz referans tablet formülasyonu ile tedavi uygulanan sıçanlarla benzer olduğu görülmüştür.

Histoloji çalışmalarını özetlemek gerekirse MCT ile indüklenmiş PAH'ın akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunun histolojik yapısı ve morfolojisi üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu izlenmiştir. Hastalık modeli oluşturulan deneklere farklı dozlarda referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları ile uygulanan tedavi protokollerin bu histopatolojik değişimlere olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Grup içinde farklı dozlar karşılaştırıldığında:

SNEDDS

- 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisi görülmemiştir.
- 6 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 2 ve 4 doza kıyasla daha etkilidir ancak bu etki anlamlı ölçüde bulunmamıştır.

- 6 ve 8 doz uygulamasının tedavi edici etkisi benzer şekilde bulunmuştur.
- 14 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 8 doza kıyasla anlamlı bulunmuştur.
- 20 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 14 doza kıyasla anlamlı bulunmuştur.

S-SNEDDS tablet

- 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisi görülmemiştir.
- 8 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 2 ve 4 doza kıyasla daha etkili, ancak bu etki anlamlı ölçüde bulunmamıştır.
- 13 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 8 doza kıyasla anlamlı bulunmuştur.
- 17 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 13 doza benzer şekilde bulunmuştur.
- 20 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 17 doza kıyasla anlamlı bulunmuştur.

Referans tablet

- 1, 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisi görülmemiştir.
- 14 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 4 doza kıyasla anlamlı bulunmuştur.
- 15 doz uygulamasının tedavi edici etkisi 14 doza benzer şekilde bulunmuştur.

Gruplar karşılaştırıldığında:

Aynı dozlarda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Her iki grupta da 2, 4 ve 6 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı, iyileştirici etkinin ilk olarak 13-14. dozlarda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Benzer şekilde 2 ve 4 doz referans tablet uygulamasının da tedavi edici etkisinin olmadığı izlenmiştir. Ancak 14 ve 15 doz

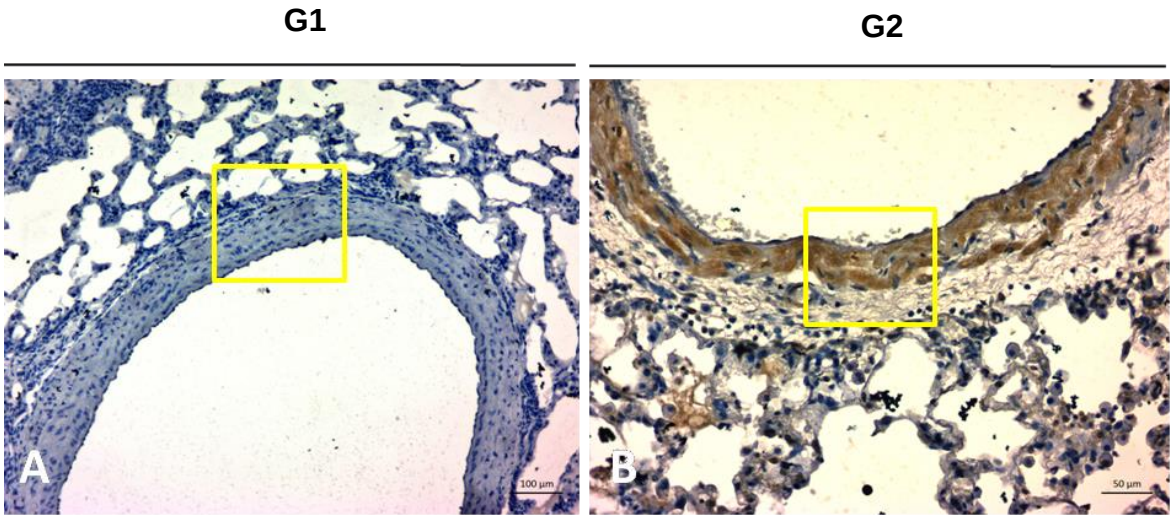
referans tablet uygulamalarının tedavi edici etkisinin daha düşük dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları uygulanan gruplara kıyasla daha ılımlı ölçüde olduğu tespit edilmiştir.

IHC boyama sonuçları

Akciğer Kaspaz-3 primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde pulmoner artere ait endotel hücrelerinde ve perivasküler alanda Kaspaz-3 tutulumunun oldukça zayıf olduğu görülmüştür (Resim 4.75).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde dejeneratif endotel hücreleri sitoplazmasında ve perivasküler alanda bulunan inflamatuvar hücrelerde oldukça kuvvetli Kaspaz-3 tutulumu izlenmiştir (Resim 4.75).



Resim 4.75. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: Hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax10), B: Hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonlar ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

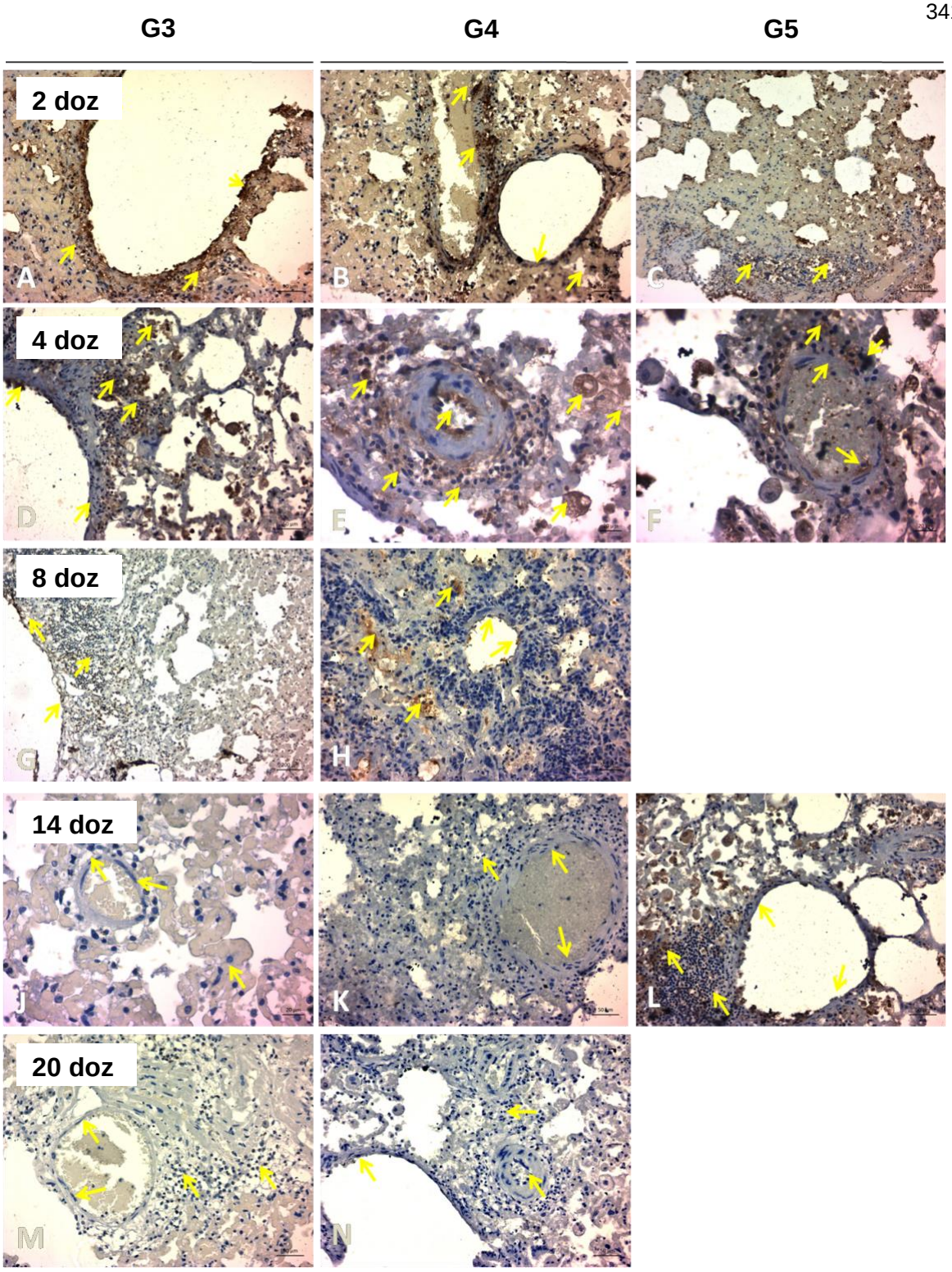
İki doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde, Kaspaz-3 tutulumunun G2'ye benzer şekilde dejeneratif endotel hücreleri sitoplazmasında ve perivasküler alanda bulunan inflamatuvar hücrelerde oldukça kuvvetli olduğu görülmüştür.

Dört doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde, hasarlı pulmoner arter duvarındaki Kaspaz-3 tutulumunun 2 doza benzer olduğu görülmüştür.

Sekiz doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde, vasküler endotelyal hücre sitoplazmasında ve inflamatuvar hücrelerdeki Kaspaz-3 ifadelenmesinin orta dereceli olduğu görülmüş, Kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin tedavi dozu artışıyla ters orantılı olarak azaldığı dikkat çekmiştir.

On dört doz tedavi uygulanan G3 ve G4 akciğer kesitlerinde, vasküler endotelyal hücre sitoplazmasında ve inflamatuvar hücrelerdeki tutulumun ise belirgin şekilde azaldığı görülmüş, ancak aynı dozda referans tablet uygulanan G5'e ait kesitlerde ise tutulumun G3 ve G4'e kıyasla daha kuvvetli olduğu izlenmiştir.

Yirmi doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde, histopatolojik parametrelerde düzelme olduğu tespit edilen akciğer dokusunda ve endotel hücrelerindeki Kaspaz-3 ifadelenmesinin nedeyse kaybolduğu izlenmiştir (Resim 4.76).



Resim 4.76. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx20), C: 2 doz referans tablet uygulanan grup (Cx5), D: 4 doz SNEDDS preparatı uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex50), F: 4 doz refrans tablet uygulanan grup (Fx50), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx5), H: 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx50), K: 14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx20), L; 14 doz referans tablet uygulanan grup (Lx20), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (MX20), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup(Nx20))

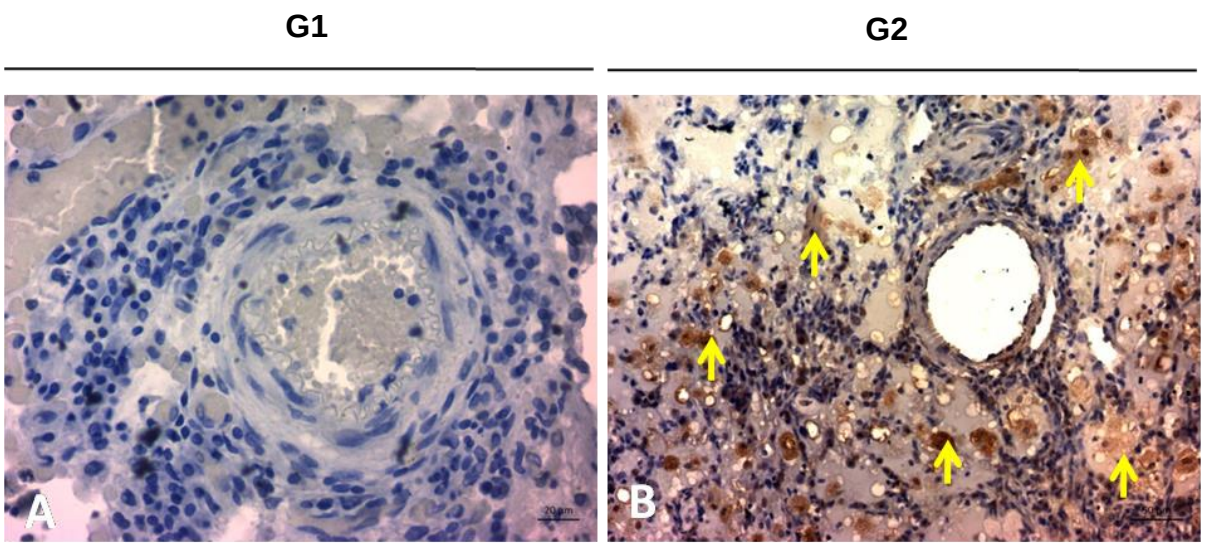
Akciğer IL-6 primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Akciğer parankimasını oluşturan bronş, bronşiyol, alveolar yapılar ve pulmoner damarlarda IL-6 tutulumunun neredeyse hiç olmadığı izlenmiştir (Resim 4.77).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Doku genelinde şiddetli dejenerasyon görülen alveolar yapılarda, damar lümenini döşeyen dejeneratif endotel hücrelerinde ve pulmoner arteri çevreleyen perivasküler alanda bulunan hücrelerde oldukça kuvvetli IL-6 tutulumu izlenmiştir (Resim 4.77).



Resim 4.77. IL-6 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: Hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax50), B: Hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

İki doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde IL-6 tutulumunun G2'ye benzer şekilde dejeneratif alveolar yapılarda, endotel hücreleri sitoplazmasında ve

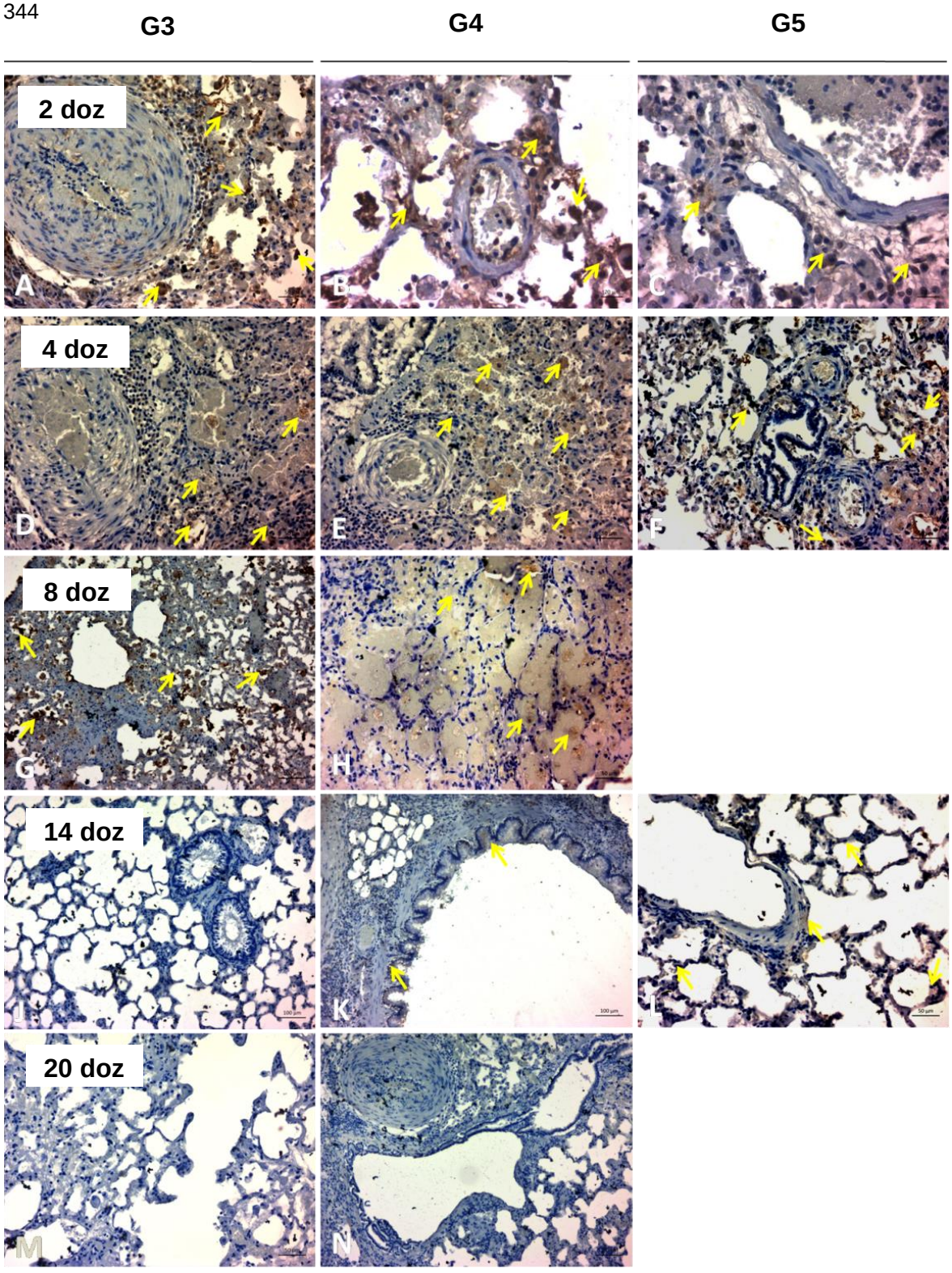
perivasküler alanda bulunan inflamatuvar hücrelerde oldukça kuvvetli olduğu görülmüştür.

Dört doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde hasarlı pulmoner arter duvarındaki IL-6 tutulumunun 2 doza benzer olduğu görülmüş, bununla birlikte terminal bronşiyolde mukozal katlantıları döşeyen hücrelerde de IL-6 ekspresyonu oldukça kuvvetli bulunmuştur.

Sekiz doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde tedavi dozu artışıyla ters orantılı olarak azaldığı görülen IL-6 ekspresyon seviyesin tüm doku genelinde orta dereceli olduğu görülmüştür.

On dört doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait akciğer kesitlerinde dejeneratif alveolar yapılarda, vasküler endotelyal hücre sitoplazmasında ve alveolar makrofaj hücrelerdeki tutulumun belirgin şekilde azaldığı görülmüş, ancak aynı dozda referans tablet uygulanan G5'e ait kesitlerde ise tutulumun G3 ve G4'e kıyasla daha kuvvetli olduğu izlenmiştir.

Yirmi doz tedavi uygulanan tüm akciğer kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme olduğu tespit edilen akciğer dokusunda ve endotel hücrelerindeki IL-6 ifadelenmesinin nedeyse kaybolduğu izlenmiştir (Resim 4.78).



Resim 4.78. IL-6 primer antikoru ile boyanmış akciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx50), C: 2 doz referans tablet uygulanan grup (Cx50), D: 4 doz SNEDDS uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex20), F: 4 doz referans tablet uygulanan grup (Fx20), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx10), H; 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx10), K: 14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx10), L: 14 doz referans tablet uygulanan grup (Lx20), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (MX20), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Nx10))

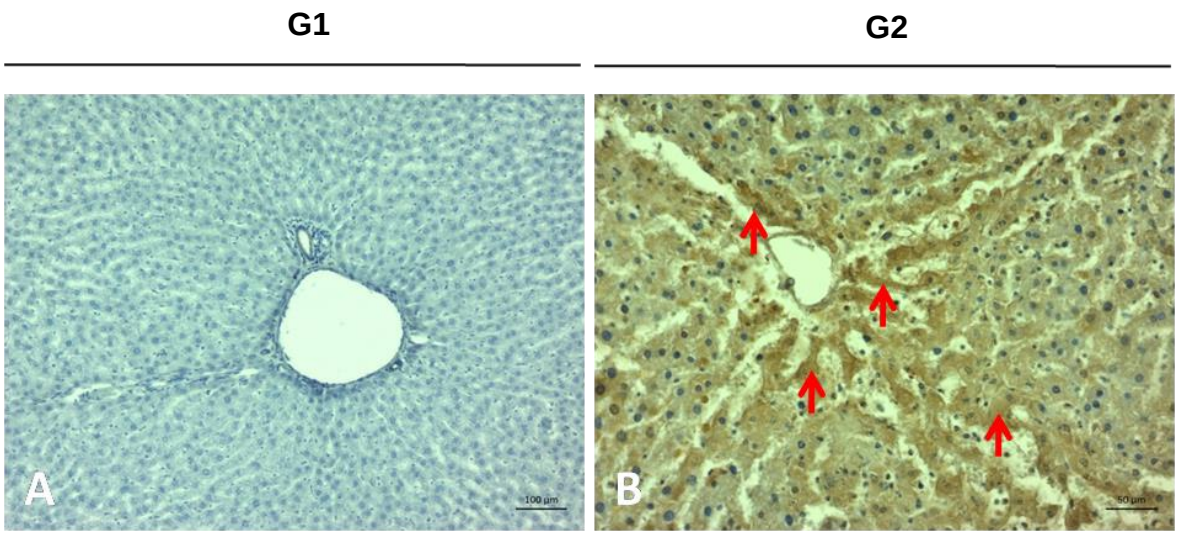
Karaciğer TNF-α primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Santral venden lobülün periferine doğru uzanan hücre kordonları, bu yapıların arasında yerleşik bulunan sinüzoidler ve bu yapıların duvarlarını oluşturan endotel hücreleri olmak üzere tüm doku genelinde TNF-α tutulumunun oldukça zayıf olduğu görülmüştür (Resim 4.79).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Düzensiz karaciğer hücre kordonlarını oluşturan dejeneratif hepatositlerin sitoplazmasında ve karaciğer parankiminde oldukça kuvvetli TNF-α tutulumu izlenmiştir (Resim 4.79).



Resim 4.79. TNF-α primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax20), B: hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonu ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

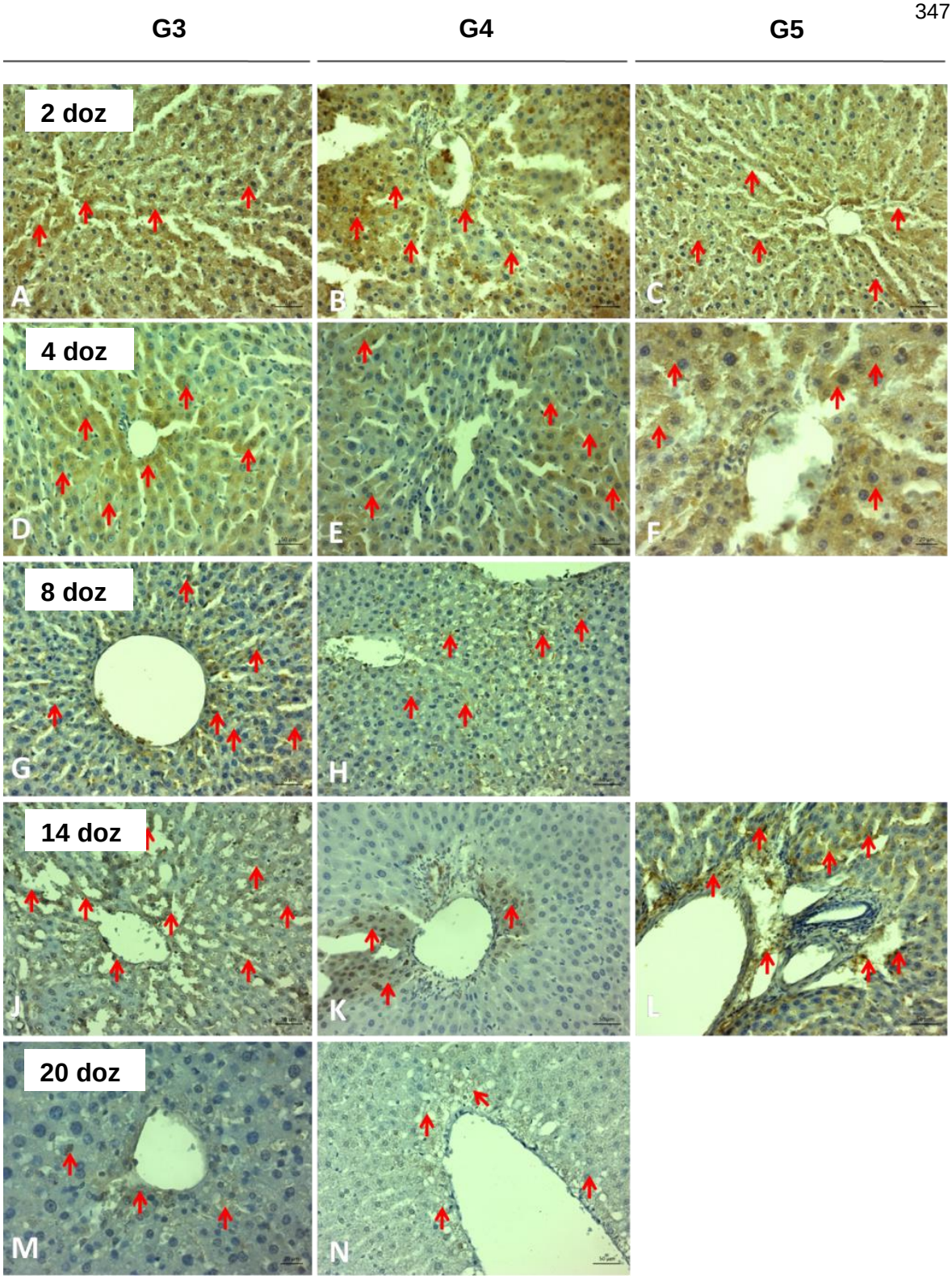
İki doz tedavi uygulanan sıçanların tüm karaciğer kesitlerinde TNF-α tutulumunun G2'ye benzer şekilde dejeneratif hepatositlerin sitoplazmasında ve santral venin hasarlı endotelinde kuvvetli olduğu görülmüştür. Ancak TNF-α ekspresyon seviyesinin tedavi dozu artışıyla ters orantılı olarak azaldığı dikkat çekmiştir.

Dört doz tedavi uygulanan sıçanların tüm karaciğer kesitlerinde dejeneratif hepatositlerin sitoplazmasında ve hasarlı damar duvarındaki TNF-α tutulumunun 2 doza kıyasla hafif azalmış olduğu görülmüştür.

Sekiz doz tedavi uygulanan sıçanların tüm karaciğer kesitlerinde hücre sitoplazmasındaki TNF-α ifadelenmesinin orta dereceli olduğu görülmüştür.

On dört doz tedavi uygulanan sıçanların G3 ve G4 karaciğer kesitlerinde santral vene yakın konumlu hepatositlerin sitoplazmasında orta dereceli bir tutulum izlenirken, daha uzak konumlu hepatositlerin sitoplazmasındaki tutulumun ise belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Ancak aynı dozda referans tablet uygulanan G5'e ait kesitlerde ise portal alan çevresindeki tutulumun G3 ve G4'e kıyasla daha kuvvetli bulunmuştur.

Yirmi doz tedavi uygulanan sıçanların tüm karaciğer kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme olduğu tespit edilen karaciğer hücre kordonlarında ve endotel hücrelerindeki TNF-α ifadelenmesinin neredeyse kaybolduğu izlenmiştir (Resim 4.80).



Resim 4.80. TNF-α primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx20), C: 2 doz referans tablet uygulanan grup (Cx20), D: 4 doz SNEDDS uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex20), F: 4 doz referans tablet uygulanan grup (Fx40), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx20), H: 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx20), K: 14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx20), L: 14 doz referans tablet uygulanan grup (Lx20), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (Mx40), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Nx20))

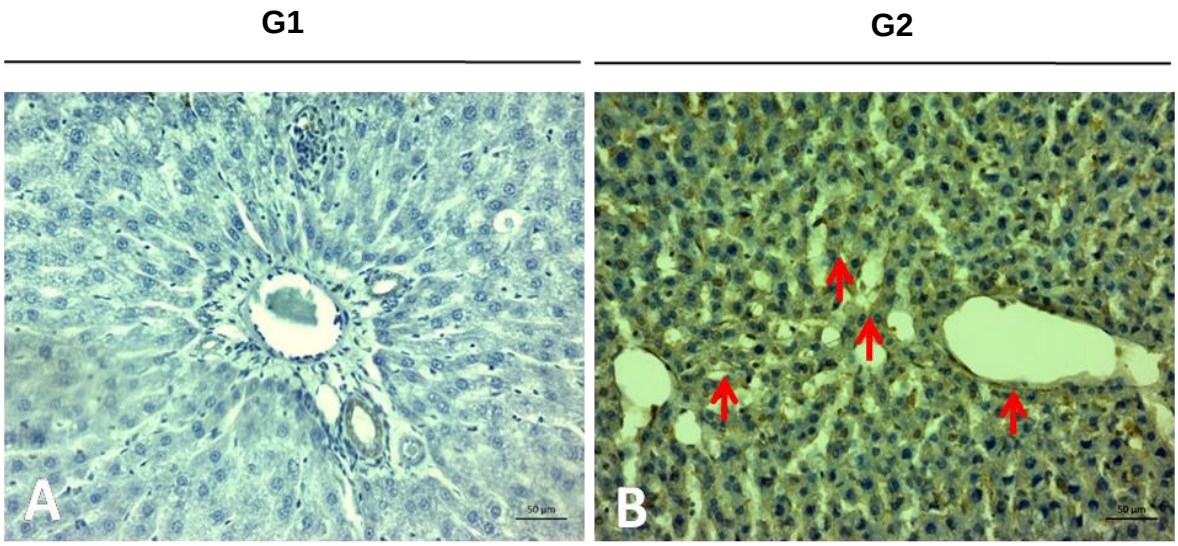
Karaciğer TROP2 primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Portal alanda yerleşik bulunan portal ven (PV), hepatik arter (HA) ve safra kanalı (SK) ile hepatosit hücre kordonlarında TROP2 tutulumunun neredeyse hiç olmadığı görülmüştür (Resim 4.81).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Düzensiz karaciğer hücre kordonlarını oluşturan dejeneratif hepatositlerin nükleusları ve hasarlı endotel hücrelerindeki TROP2 ekspresyonu oldukça kuvvetli bulunmuştur (Resim 4.81).



Resim 4.81. TROP2 primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax20), B: hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonu ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

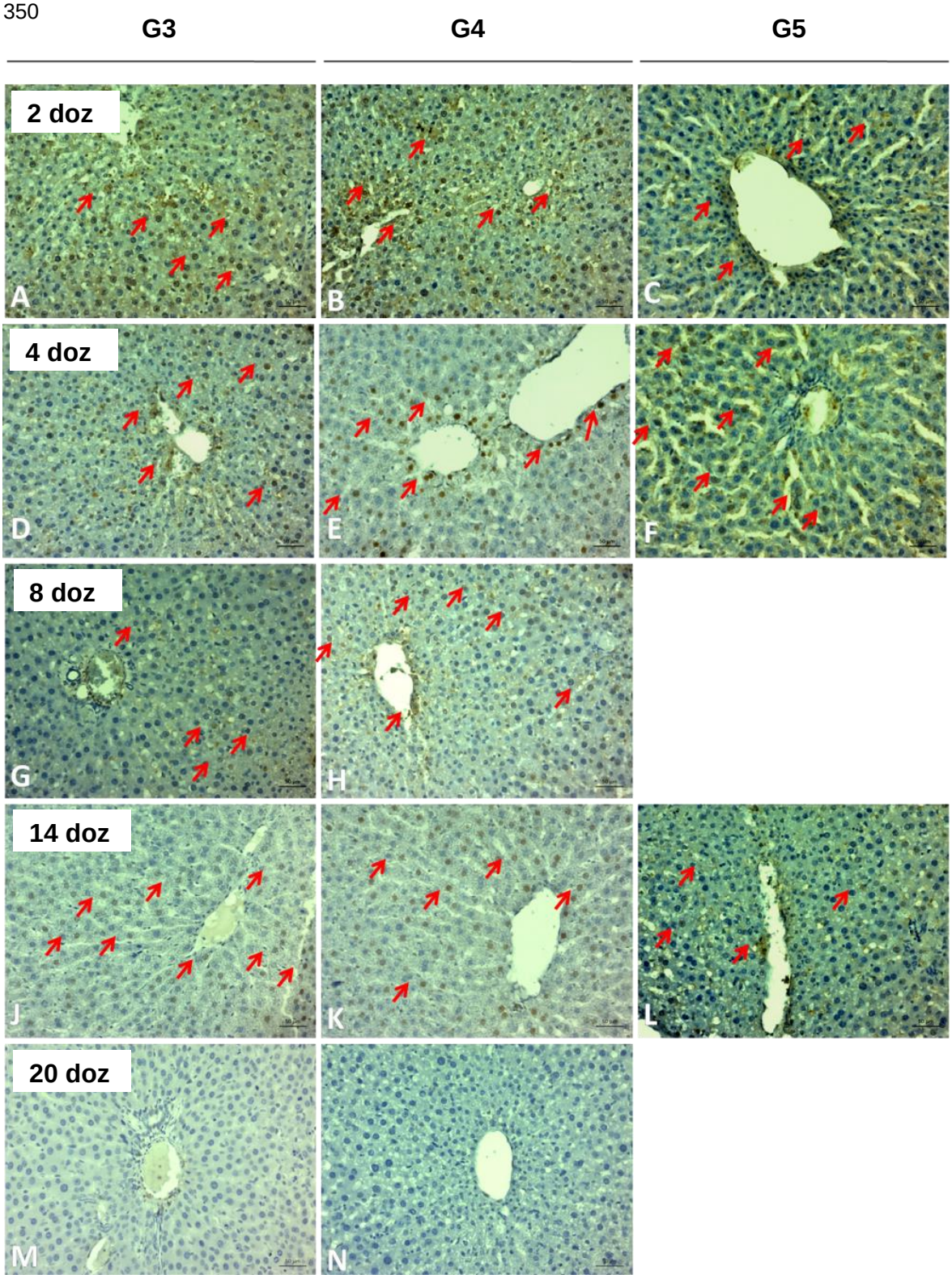
İki doz tedavi uygulanan tüm karaciğer kesitlerinde TROP2'nin nüklear ifadelenmesi tıpkı G2'de olduğu gibi dejeneratif hepatositlerde ve santral venin hasarlı endotelinde oldukça kuvvetli bulunmuştur.

Dört doz tedavi uygulanan tüm karaciğer kesitlerinde dejeneratif hepatositlerin nükleuslarındaki ve hasarlı damar duvarındaki TROP2 tutulumunun 2 doza kıyasla hafif azalmış olduğu görülmüştür.

Sekiz doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait karaciğer kesitlerinde hepatositlerdeki nüklear TROP2 tutulumunun orta dereceli olduğu izlenmiştir.

On dört doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait karaciğer kesitlerinde santral venden lobülün periferine doğru uzanan hücre kordonlarında TROP2'nin nüklear ifadelenmesinin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Aynı dozda referans tablet preparatı uygulanan G5'e ait kesitlerde ise santral vene yakın konumlu hepatositlerdeki tutulumun G3 ve G4'e kıyasla daha kuvvetli olduğu dikkat çekmiştir.

Yirmi doz tedavi uygulanan tüm karaciğer kesitlerinde karaciğer hücre kordonlarında ve endotel hücrelerindeki TROP2 ifadelenmesinin kaybolduğu izlenmiştir (Resim 4.82).



Resim 4.82. TROP2 primer antikoru ile boyanmış karaciğer dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx20), C: 2 doz referans tablet uygulanan grup (Cx20), D: 4 doz SNEDDS uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex20), F: 4 doz referans tablet uygulanan grup (Fx20), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx20), H: 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx20), K: 14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx20), L: 14 doz referans tablet uygulanan grup (Lx20), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (Mx20), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Nx20))

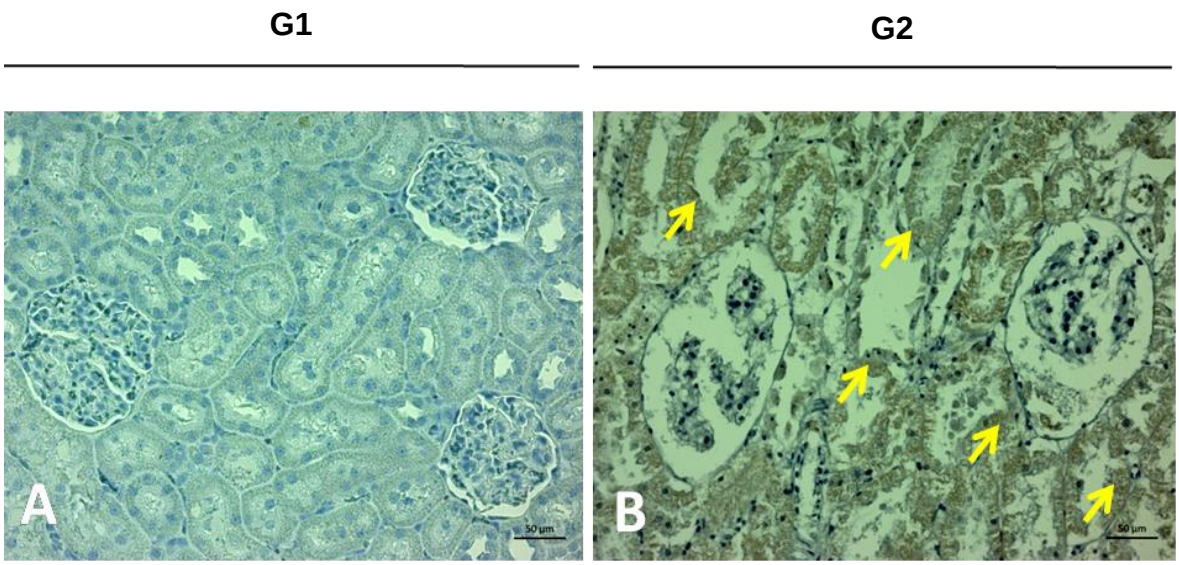
Böbrek Kaspaz-3 primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Kortekste yerleşik bulunan glomeruluslar ve Bowman kapsülleri ile proksimal ve distal tübül yapılarında Kaspaz-3 tutulumunun neredeyse hiç olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte medullada bulunan nefronların düz tübüler segmentleri ve toplayıcı kanallarda da Kaspaz-3 ekspresyonu oldukça zayıf bulunmuştur (Resim 4.83).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Böbrek dokusunda şiddetli hasar tespit edilen glomerulus kapiller endotelinde orta derecede, atrofik tübüler yapılarda ve duvar bütünlüğü bozulmuş olan dejenere toplayıcı kanallarda kuvvetli Kaspaz-3 ifadelenmesi izlenmiştir (Resim 4.83).



Resim 4.83. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax20), B: hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonu ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

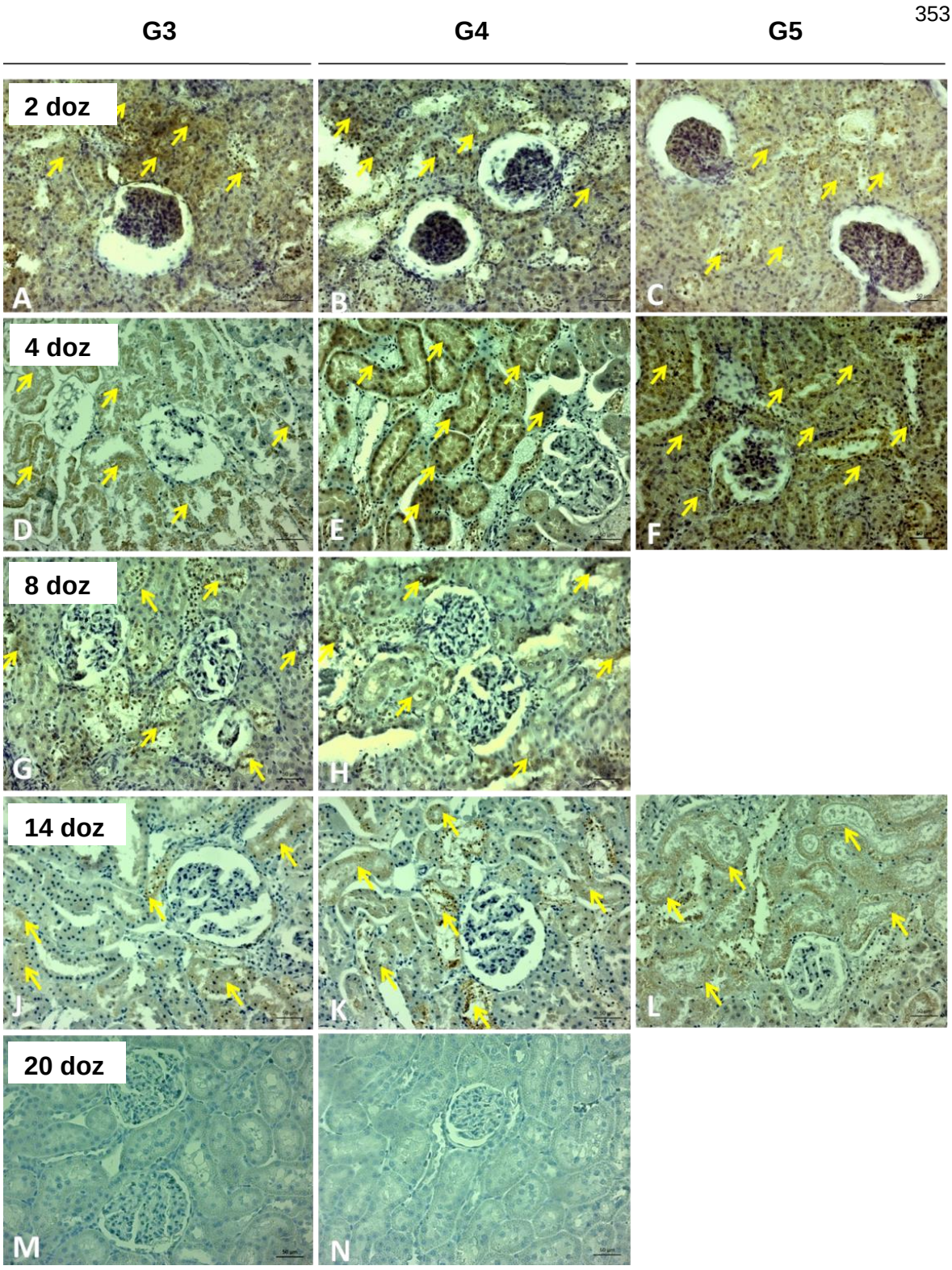
İki doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde dejeneratif proksimal ve distal tübüllerde Kaspaz-3 tutulumunun kuvvetli olduğu görülmüştür.

Dört doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde G3 ve G4'te tutulumun benzer şekilde olduğu ve 2 doz tedavi uygulanan gruba kısasla hafif azaldığı görülmüştür. Ancak G5'te izlenen Kaspaz-3 tutulumu G3 ve G4'e kıyasla daha kuvvetli bulunmuştur.

Sekiz doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait böbrek kesitlerinde tübüler yapıların hücre sitoplazmasında Kaspaz-3 ifadelenmesinin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte Kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin tedavi dozu artışıyla ters orantılı olarak azaldığı dikkat çekmiştir.

On dört doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme saptanan tüm yapılardaki Kaspaz-3 ifadelenmesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ancak aynı dozda referans tablet uygulanan G5'te ise tutulum daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Yirmi doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme saptanan yapılarda olduğu gibi Kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin neredeyse tamamen ortadan kalktığı dikkat çekmiştir (Resim 4.84).



Resim 4.84. Kaspaz-3 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx20), C: 2 doz referans tablet uygulanan grup (Cx20), D: 4 doz SNEDDS uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex20), F: 4 doz referans tablet uygulanan grup (Fx20), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx20), H: 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx20), K:14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx20), L: 14 doz referans tablet uygulanan grup (Lx20), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (MX20), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Nx20))

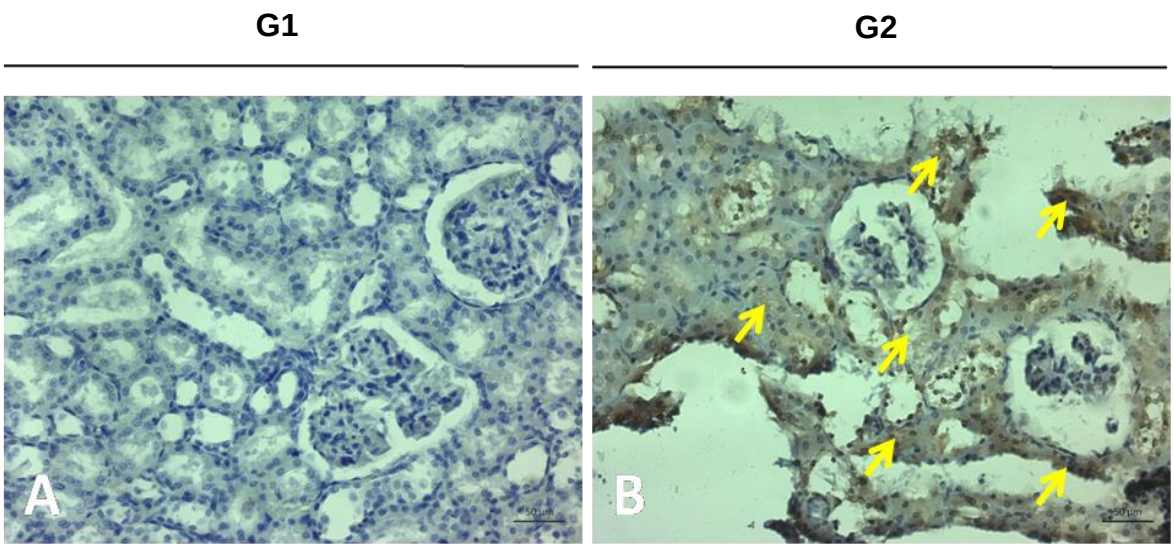
Böbrek IL-6 primer antikoruna ait sonuçlar

Kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Normal yapı sergileyen glomeruluslar ve Bowman kapsülleri ile proksimal ve distal tübül yapılarında IL-6 tutulumunun neredeyse hiç olmadığı görülmüştür (Resim 4.85).

Hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruplara (G2) ait örneklerden elde edilen kesitlerde:

Kortekste şiddetli hasar tespit edilen distal ve proksimal tübüllerde ve duvar dejeneratif toplama kanallarda kuvvetli IL-6 ifadelenmesi izlenmiştir (Resim 4.85).



Resim 4.85. IL-6 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-1
(A: hiçbir müdahale yapılmayan grup (Ax20), B: hastalık modeli oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan grup (Bx20))

Hastalık modeli sonrası farklı dozlarda SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonları ve referans tablet uygulanan gruplara ait örnekler incelendiğinde:

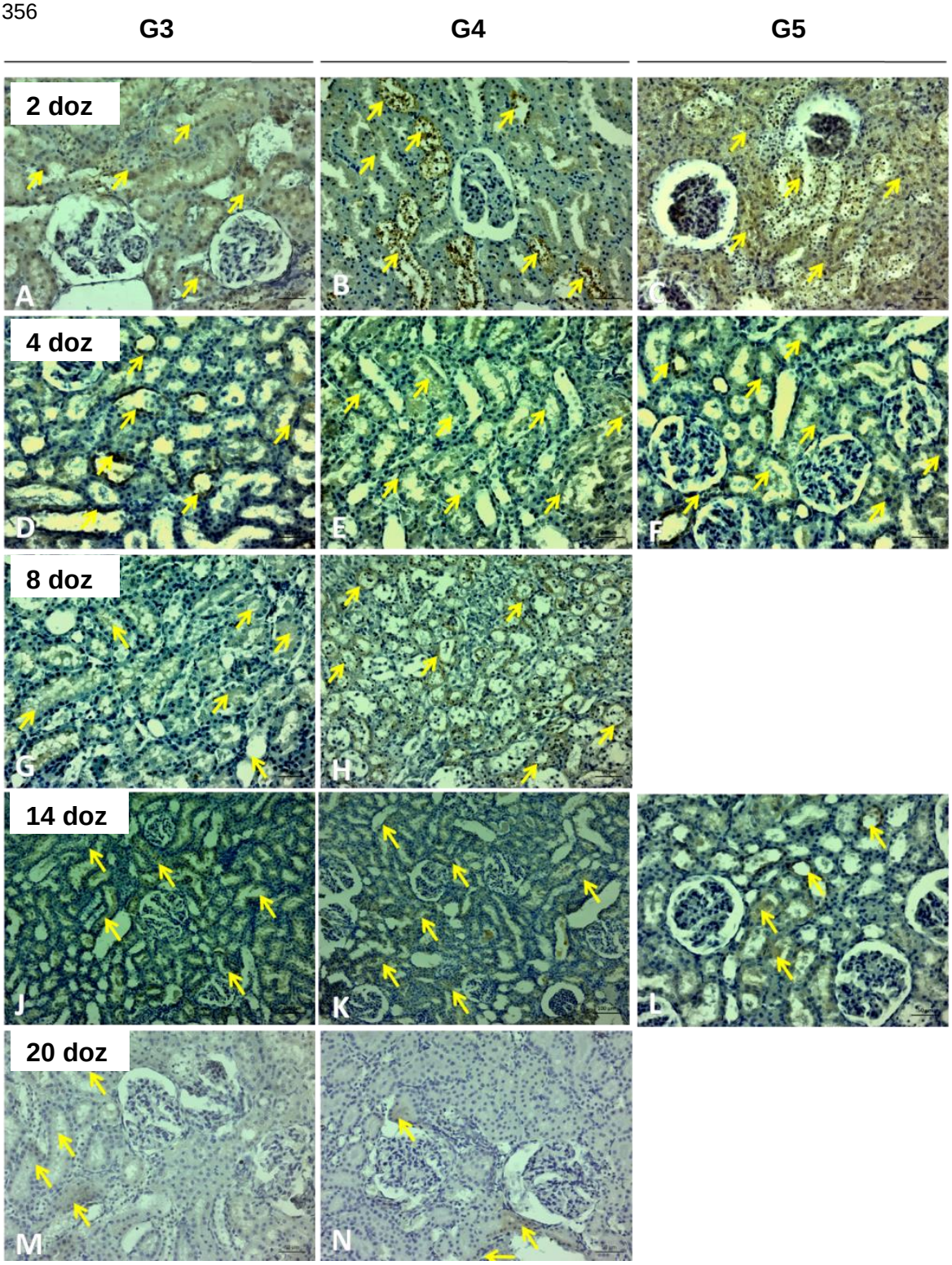
İki doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde tüm dejeneratif tübüler yapılarda kuvvetli IL-6 tutulumunun olduğu görülmüştür.

Dört doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde IL-6 ekspresyon seviyesinin kuvvetli olduğu ancak 2 doz tedavi uygulanan gruba kısasla hafif azaldığı görülmüştür.

Sekiz doz tedavi uygulanan G3 ve G4'e ait böbrek kesitlerinde tübüler yapılarında IL-6 ifadelenmesinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

On dört doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme saptanan tüm yapılardaki IL-6 ifadelenmesinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Yirmi doz tedavi uygulanan tüm böbrek kesitlerinde histopatolojik parametrelerde düzelme saptanan tübüler yapılarda IL-6 ekspresyon seviyesinin son derece zayıfladığı belirlenmiştir (Resim 4.86).



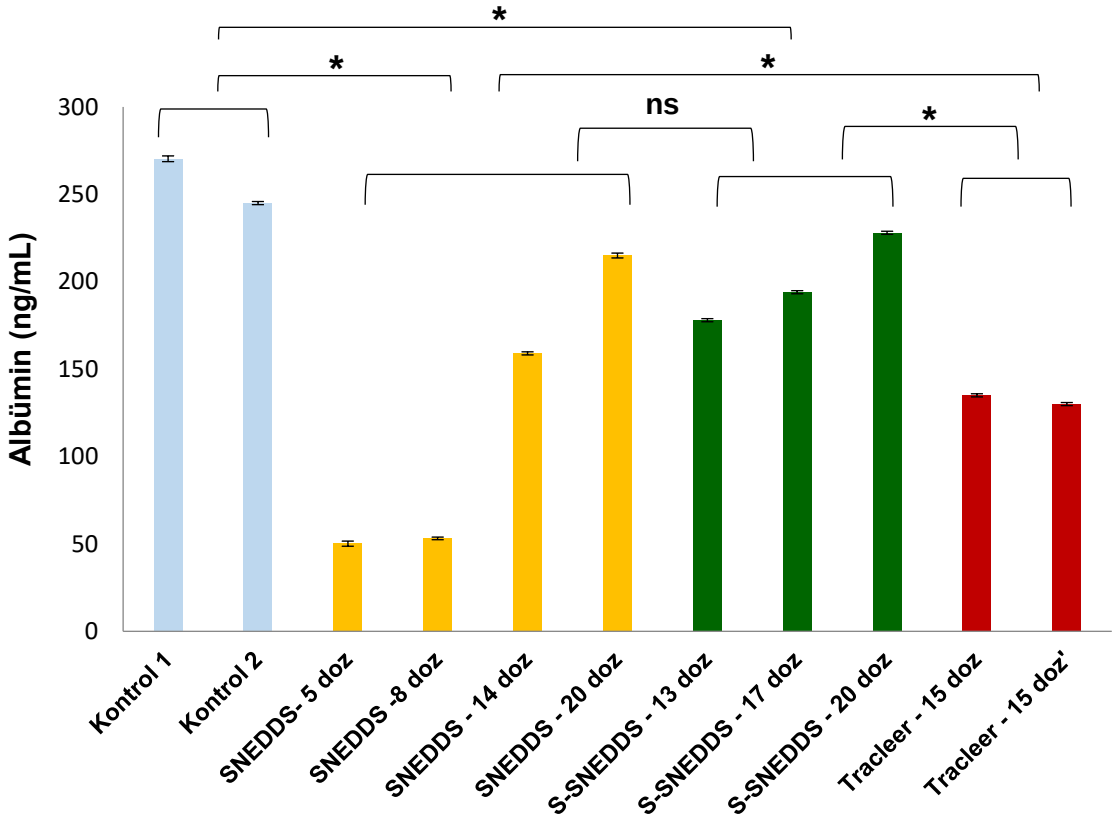
Resim 4.86. IL-6 primer antikoru ile boyanmış böbrek dokularına ait histopatolojik görüntüler-2

(A: 2 doz SNEDDS uygulanan grup (Ax20), B: S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Bx20), C: 2 doz referans uygulanan grup (Cx20), D: 4 doz SNEDDS uygulanan grup (Dx20), E: 4 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Ex20), F: 4 doz referans uygulanan grup (Fx20), G: 8 doz SNEDDS uygulanan grup (Gx20), H: 8 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Hx20), J: 14 doz SNEDDS uygulanan grup (Jx20), K:14 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Kx10), L: 14 doz referans uygulanan grup (Lx10), M: 20 doz SNEDDS uygulanan grup (MX20), N: 20 doz S-SNEDDS tablet uygulanan grup (Nx20))

Akciğer, karaciğer ve böbreğe ait kesitlerde dejenerasyon (Çizelge 4.111 - 4.114), akciğere ait kesitlerde ise Kaspaz-3 ve IL-6 primer antikorlarının (Çizelge 4.115 ve 4.116), karaciğere ait kesitlerde TROP2 ve TNFα primer antikorlarının (Çizelge 4.117 ve 4.118), böbreğe ait kesitlerde ise Kaspaz-3 ve IL-6 primer antikorlarının (Çizelge 4.119 ve 4.120) immünreaktivite seviyeleri tüm deney gruplarında H-Score yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve 14 günlük tedavi sonuçlarına ait veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve istatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.121 ve 4.122'de özetlenmiştir.

ELISA sonuçları

Hastalık modeli sonrası SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonlar ve referans tablet ile farklı dozlarda tedavi uygulanan tüm gruplarda serum albümin seviyesinin kontrole kıyasla azalmış olduğu belirlenmiştir. SNEDDS formülasyon ile 5 ve 8 doz uygulanan sıçanlarda ekspresyon seviyesi anlamlı ölçüde azaldığı, ancak 14 ve 20 doz SNEDDS formülasyon uygulanan deneklerde ise ekspresyon seviyesinin tekrar arttığı izlenmiştir. S-SNEDDS tablet formülasyon ile 13 ve 20 doz uygulanan sıçanlardaki ekspresyon seviyesi, aynı dozlarda SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlarla benzer şekilde bulunmuştur. Bununla birlikte, 15 doz referans tablet uygulanan sıçanlarda izlenen serum albümin seviyesi aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon uygulanan sıçanlara kıyasla daha düşük olarak bulunmuştur (Şekil 4.135).



Şekil 4. 135. ELISA yöntemi ile serum albümin düzeylerine ait sonuçlar

(İstatistiksel değerlendirme 14 günlük tedavi için gerçekleştirilmiştir, **ns:** p>0,05, ***** p<0,05)

Çizelge 4.111. Kontrol gruplarının akciğer, karaciğer ve böbrek kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları

	Akciğerde dejenerasyon							Karaciğerde dejenerasyon							Böbrekte dejenerasyon					
+ KG	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**+ KG**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**+ KG**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	0	0	0	1	0	0	**1. hayvan**	0	0	0	0	0	0	**1. hayvan**	1	0	0	0	0	0
2. hayvan	0	0	0	0	0	0	**2. hayvan**	0	0	0	0	0	0	**2. hayvan**	0	0	0	0	0	0
3. hayvan	0	0	0	0	0	0	**3. hayvan**	0	0	0	0	0	0	**3. hayvan**	0	0	0	0	0	0
4. hayvan	0	0	1	0	0	0	**4. hayvan**	1	0	0	0	0	0	**4. hayvan**	0	0	0	0	0	0
5. hayvan	0	0	0	0	0	0	**5. hayvan**	0	0	0	0	1	0	**5. hayvan**	0	0	0	0	0	0
6. hayvan	0	0	0	0	0	0	**6. hayvan**	0	0	0	0	0	0	**6. hayvan**	0	0	0	0	0	1
- KG	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**- KG**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**- KG**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	5	5	5	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5
2. hayvan	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	5	5	5	5	5	5
3. hayvan	5	5	4	5	5	5	**3. hayvan**	4	5	5	5	5	5	**3. hayvan**	5	5	5	5	5	5
4. hayvan	4	5	5	5	5	5	**4. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**4. hayvan**	5	5	5	5	5	5
5. hayvan	5	5	5	5	5	5	**5. hayvan**	5	5	5	5	5	4	**5. hayvan**	5	5	5	5	5	5
6. hayvan	5	5	5	5	5	5	**6. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**6. hayvan**	4	4	5	5	5	5

+ KG: Pozitif kontrol grubu, **- KG:** Negatif kontrol grubu

Çizelge 4.112. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının akciğer kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları

								Akciğerde dejenerasyon												
Referans tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	5	5	4	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5
2. hayvan	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	4	5	4	5	5	5
3. hayvan	5	5	5	5	4	5	**3. hayvan**	4	5	4	4	3	4	**3. hayvan**	3	3	3	4	4	3
4. hayvan	3	2	3	3	3	4	**4. hayvan**	4	3	3	3	3	3	**4. hayvan**	4	4	4	3	3	3
5. hayvan	4	2	3	3	4	2	**5. hayvan**	3	3	2	3	3	2	**5. hayvan**	2	2	2	2	2	3
6. hayvan	2	4	4	3	3	3	**6. hayvan**	1	2	2	2	1	1	**6. hayvan**	1	2	2	2	1	2

Çizelge 4.113. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının karaciğer kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları

								Karaciğerde dejenerasyon												
Referans tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	5	5	5	5	5	4	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	4
2. hayvan	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	4	5	4	5	5	5	**2. hayvan**	4	5	5	5	5	5
3. hayvan	5	5	5	5	4	5	**3. hayvan**	4	4	4	3	4	4	**3. hayvan**	4	4	3	4	4	4
4. hayvan	3	4	3	4	4	2	**4. hayvan**	3	4	3	3	3	3	**4. hayvan**	3	3	3	3	4	4
5. hayvan	3	2	3	3	4	4	**5. hayvan**	3	2	3	2	3	2	**5. hayvan**	2	2	2	2	3	2
6. hayvan	4	4	4	2	3	3	**6. hayvan**	2	2	2	1	1	1	**6. hayvan**	1	2	2	2	1	2

Çizelge 4.114. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının böbrek kesitlerine ait dejenerasyonun H-Score yöntemi sonuçları

								Böbrekte dejenerasyon												
Referans tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	5	5	4	5	5	5	**1. hayvan**	4	5	5	5	5	5	**1. hayvan**	5	5	5	5	5	5
2. hayvan	5	5	5	5	5	5	**2. hayvan**	5	5	5	5	4	5	**2. hayvan**	4	4	5	5	5	5
3. hayvan	5	5	5	5	4	5	**3. hayvan**	4	4	4	3	4	4	**3. hayvan**	4	3	4	4	4	3
4. hayvan	4	2	3	3	4	4	**4. hayvan**	4	3	3	3	3	3	**4. hayvan**	4	3	3	3	4	4
5. hayvan	4	2	3	3	4	2	**5. hayvan**	2	3	3	3	2	2	**5. hayvan**	2	2	2	2	3	2
6. hayvan	3	4	4	2	3	3	**6. hayvan**	2	2	1	2	1	1	**6. hayvan**	1	2	2	2	1	2

Çizelge 4.115. Kontrol gruplarının akciğer kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

	Akciğerde Kaspaz-3 ekspresyonu							**Akciğerde IL-6 ekspresyonu**						
Kaspaz-3 + Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**IL-6 + Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	0	0	0	0	0	0	**1. hayvan**	0	0	0	0	0	0
2. hayvan	0	0	0	0	0	0	**2. hayvan**	0	0	0	0	0	0
3. hayvan	0	0	0	0	0	0	**3. hayvan**	0	0	0	0	0	0
4. hayvan	0	0	0	0	0	0	**4. hayvan**	0	0	0	0	0	0
5. hayvan	0	0	0	0	0	0	**5. hayvan**	0	0	0	0	0	0
6. hayvan	0	0	0	0	0	0	**6. hayvan**	0	0	0	0	0	0
Kaspaz-3 - Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**IL-6 - Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	2	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	2	3	3
2. hayvan	3	3	2	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	2	3	2	3
3. hayvan	3	3	3	3	3	3	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	3
4. hayvan	3	3	3	3	3	2	**4. hayvan**	2	3	3	2	3	2
5. hayvan	3	3	3	3	3	3	**5. hayvan**	3	3	3	3	3	3
6. hayvan	3	3	3	3	3	3	**6. hayvan**	3	3	3	3	3	3

Çizelge 4.116. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının akciğer kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

Referans tablet	Akciğerde Kaspaz-3 ekspresyonu						Referans tablet	Akciğerde IL-6 ekspresyonu					
	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge		1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	3	3	3	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	3	3
3. hayvan	3	3	3	3	3	2	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	2
4. hayvan	2	2	2	3	2	2	**4. hayvan**	3	3	2	2	2	2
5. hayvan	2	2	2	2	2	2	**5. hayvan**	2	2	2	2	2	2
6. hayvan	2	2	2	2	2	2	**6. hayvan**	2	2	2	2	2	2
SNEDDS	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	2	2	3	3	3	**2. hayvan**	2	3	2	3	3	3
3. hayvan	3	2	3	2	3	3	**3. hayvan**	3	3	2	2	2	3
4. hayvan	2	2	2	2	2	3	**4. hayvan**	2	2	2	2	2	3
5. hayvan	2	2	1	2	1	1	**5. hayvan**	2	2	2	1	1	1
6. hayvan	1	1	1	1	1	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	1	1
S-SNEDDS tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	3	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	2	3
3. hayvan	2	3	3	2	2	3	**3. hayvan**	2	3	3	2	2	3
4. hayvan	2	1	2	2	2	2	**4. hayvan**	2	1	2	2	2	2
5. hayvan	1	2	1	2	1	2	**5. hayvan**	1	2	1	2	1	2
6. hayvan	1	1	1	1	0	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	0	1

Çizelge 4.117. Kontrol gruplarının karaciğer kesitlerine ait TROP2 ve TNF-α ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

	Karaciğerde TROP2 ekspresyonu							Karaciğerde TNF-α ekspresyonu						
TROP2 + Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**TNF-α + Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	0	0	0	0	0	0	**1. hayvan**	0	0	0	0	0	0
2. hayvan	0	0	0	0	0	0	**2. hayvan**	0	0	0	0	0	0
3. hayvan	0	0	0	0	0	0	**3. hayvan**	0	0	0	0	0	0
4. hayvan	0	0	0	0	0	0	**4. hayvan**	0	0	0	0	0	0
5. hayvan	0	0	0	0	0	0	**5. hayvan**	1	0	0	0	0	0
6. hayvan	0	0	0	0	0	0	**6. hayvan**	0	0	1	0	0	0
TROP2 - Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**TNF-α - Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	2	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	2	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	2	3	2	3
3. hayvan	3	3	3	3	3	3	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	3
4. hayvan	3	3	3	3	2	2	**4. hayvan**	3	2	2	3	3	3
5. hayvan	3	3	3	3	3	3	**5. hayvan**	3	3	3	3	3	3
6. hayvan	3	3	3	3	3	3	**6. hayvan**	3	3	3	3	3	3

Çizelge 4.118. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının karaciğer kesitlerine ait TROP2 ve TNF-α ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

	Karaciğerde TROP2 ekspresyonu							**Karaciğerde TNF-α ekspresyonu**						
Referans tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**Referans tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	-	-	-	-	-	-	**1. hayvan**	-	-	-	-	-	-
2. hayvan	3	3	3	3	3	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	3	3
3. hayvan	3	3	3	3	2	2	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	2
4. hayvan	2	3	2	2	2	2	**4. hayvan**	3	2	2	2	2	1
5. hayvan	2	2	2	2	2	2	**5. hayvan**	1	2	2	2	2	1
6. hayvan	2	2	2	2	2	2	**6. hayvan**	2	1	2	2	2	1
SNEDDS	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	2	3	2	3	3	3	**2. hayvan**	2	2	3	3	3	3
3. hayvan	3	3	3	2	2	3	**3. hayvan**	3	3	3	2	2	3
4. hayvan	2	2	2	2	2	3	**4. hayvan**	2	2	2	2	3	3
5. hayvan	1	2	2	2	1	1	**5. hayvan**	2	2	2	2	1	1
6. hayvan	1	1	1	1	1	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	1	1
S-SNEDDS tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	3	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	2	3
3. hayvan	2	3	3	2	2	3	**3. hayvan**	2	3	3	2	2	3
4. hayvan	2	1	2	2	2	3	**4. hayvan**	2	2	2	2	2	3
5. hayvan	1	2	1	2	1	2	**5. hayvan**	1	2	1	2	1	2
6. hayvan	1	1	1	1	0	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	1	1

Çizelge 4.119. Kontrol gruplarının böbrek kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

	Böbrekte Kaspaz-3 ekspresyonu							**Böbrekte IL-6 ekspresyonu**						
Kaspaz-3 + Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**IL-6 + Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	0	0	0	0	0	0	**1. hayvan**	0	0	0	0	0	0
2. hayvan	0	0	0	0	0	0	**2. hayvan**	0	0	0	0	0	0
3. hayvan	0	0	0	0	0	0	**3. hayvan**	0	0	0	0	0	0
4. hayvan	0	0	0	0	0	0	**4. hayvan**	0	0	0	0	0	0
5. hayvan	0	0	0	0	0	0	**5. hayvan**	1	0	0	0	0	0
6. hayvan	0	0	0	0	0	0	**6. hayvan**	0	0	0	0	0	0
Kaspaz-3 - Kontrol grubu	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**IL-6 - Kontrol grubu**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	2	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	2	3	3
2. hayvan	3	3	2	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	2	3	2	3
3. hayvan	3	3	3	3	3	3	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	3
4. hayvan	3	3	3	3	2	2	**4. hayvan**	3	3	3	3	2	2
5. hayvan	3	3	3	3	3	3	**5. hayvan**	3	3	3	3	3	3
6. hayvan	3	3	3	3	3	3	**6. hayvan**	3	3	3	3	3	3

Çizelge 4.120. Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarının böbrek kesitlerine ait Kaspaz-3 ve IL-6 ekspresyonun H-Score yöntemi sonuçları

Referans tablet	Böbrekte Kaspaz-3 ekspresyonu						Referans tablet	Böbrekte IL-6 ekspresyonu					
	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge		1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	3	3	3	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	3	3
3. hayvan	3	3	3	3	3	2	**3. hayvan**	3	3	3	3	3	2
4. hayvan	2	3	2	2	2	2	**4. hayvan**	2	3	2	2	2	2
5. hayvan	2	2	2	2	2	2	**5. hayvan**	2	2	2	2	2	2
6. hayvan	2	2	2	2	2	2	**6. hayvan**	2	2	2	2	2	2
SNEDDS	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**SNEDDS**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	2	3	2	3	3	3	**2. hayvan**	2	3	2	3	3	3
3. hayvan	3	3	3	2	2	3	**3. hayvan**	3	3	3	2	2	3
4. hayvan	2	2	2	2	2	3	**4. hayvan**	2	2	2	2	2	3
5. hayvan	1	2	2	2	1	1	**5. hayvan**	1	2	2	2	1	1
6. hayvan	1	1	1	1	1	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	1	1
S-SNEDDS tablet	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge	**S-SNEDDS tablet**	1. bölge	2. bölge	3. bölge	4. bölge	5. bölge	6. bölge
1. hayvan	3	3	3	3	3	3	**1. hayvan**	3	3	3	3	3	3
2. hayvan	3	3	3	3	2	3	**2. hayvan**	3	3	3	3	2	3
3. hayvan	2	3	3	2	2	3	**3. hayvan**	2	3	3	2	2	3
4. hayvan	2	1	2	2	2	2	**4. hayvan**	2	1	2	2	2	2
5. hayvan	1	2	1	2	1	2	**5. hayvan**	1	2	1	2	1	2
6. hayvan	1	1	1	1	0	1	**6. hayvan**	1	1	1	1	0	1

Çizelge 4.121. Akciğer, karaciğer ve böbreğe ait kesitlerde dejenerasyon H-Score değerlendirmesi için istatistiksel analiz sonuçları

	Grup	Medyan (Min-max)	p		Grup	Medyan (Min-max)	p		Grup	Medyan (Min-max)	p
Akciğer dejenerasyon	**Kontrol (+)**	0 (0-1) [c]	<0,001	**Karaciğer dejenerasyon**	**Kontrol (+)**	0 (0-1) [c]	<0,001	**Böbrek dejenerasyon**	**Kontrol (+)**	0 (0-1) [c]	<0,001
	Kontrol (-)	5 (4-5) [a]			**Kontrol (-)**	5 (4-5) [a]			**Kontrol (-)**	5 (4-5) [a]	
	SNEDDS	3 (1-4) [b]			**SNEDDS**	2,5 (1-4) [b]			**SNEDDS**	2,5 (1-4) [b]	
	S-SNEDDS tablet	2 (1-4) [b]			**S-SNEDDS tablet**	2 (1-4) [b]			**S-SNEDDS tablet**	2 (1-4) [b]	
	Referans tablet	3 (2-4) [b]			**Referans tablet**	3 (2-4) [b]			**Referans tablet**	3 (2-4) [b]	

a, c: hepsinden farklı, **b:** benzer, **a** ve **c**'den farklı

Çizelge 4.122. Akciğer ve böbreğe ait kesitlerde Kaspaz-3 ve IL-6, karaciğere ait kesitlerde TROP2 ve TNF-α H-Score değerlendirmesi için istatistiksel analiz sonuçları

	Grup	Medyan (Min-max)	p		Grup	Medyan (Min-max)	p		Grup	Medyan (Min-max)	p
Akciğer Kaspaz-3	**Kontrol (+)**	0 (0-0) [c]	<0,001	**Karaciğer TROP2**	**Kontrol (+)**	0 (0-0) [c]	<0,001	**Böbrek Kaspaz-3**	**Kontrol (+)**	0 (0-0) [c]	<0,001
	Kontrol (-)	3 (2-3) [a]			**Kontrol (-)**	3 (2-3) [a]			**Kontrol (-)**	3 (2-3) [a]	
	SNEDDS	1,5 (1-3) [b]			**SNEDDS**	1,5 (1-3) [b]			**SNEDDS**	1,5 (1-3) [b]	
	S-SNEDDS tablet	1 (0-2) [b]			**S-SNEDDS tablet**	1 (0-3) [b]			**S-SNEDDS tablet**	1 (0-2) [b]	
	Referans tablet	2 (2-3) [b]			**Referans tablet**	2 (2-3) [b]			**Referans tablet**	2 (2-3) [b]	
Akciğer IL-6	**Kontrol (+)**	0 (0-0) [c]	<0,001	**Karaciğer TNF-α**	**Kontrol (+)**	0 (0-1) [c]	<0,001	**Böbrek IL-6**	**Kontrol (+)**	0 (0-0) [c]	<0,001
	Kontrol (-)	3 (2-3) [a]			**Kontrol (-)**	3 (2-3) [a]			**Kontrol (-)**	3 (2-3) [a]	
	SNEDDS	1,5 (1-3) [b]			**SNEDDS**	2 (1-3) [b]			**SNEDDS**	1,5 (1-3) [b]	
	S-SNEDDS tablet	1 (0-2) [b]			**S-SNEDDS tablet**	1,5 (1-3) [b]			**S-SNEDDS tablet**	1 (0-2) [b]	
	Referans tablet	2 (2-3) [b]			**Referans tablet**	2 (1-3) [b]			**Referans tablet**	2 (2-3) [b]	

a, c: hepsinden farklı, **b:** benzer, **a ve c**'den farklı

4.11.3. Biyodağılım çalışmaları

SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların biyodağılım ve vücutta kalış sürelerinin in vivo incelenmesi

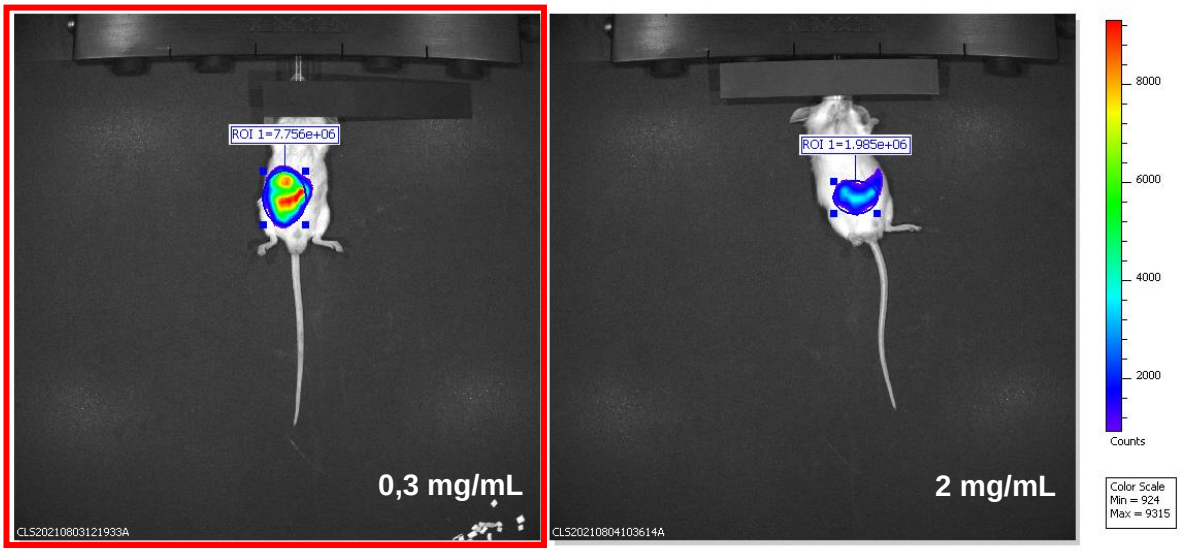
İn vivo görüntüleme çalışmaları Bölüm 3.2.9'da belirtildiği gibi yapılmıştır.

XenoLight™ DIR ile yapılan IVIS ve ex vivo görüntüleme çalışmaları

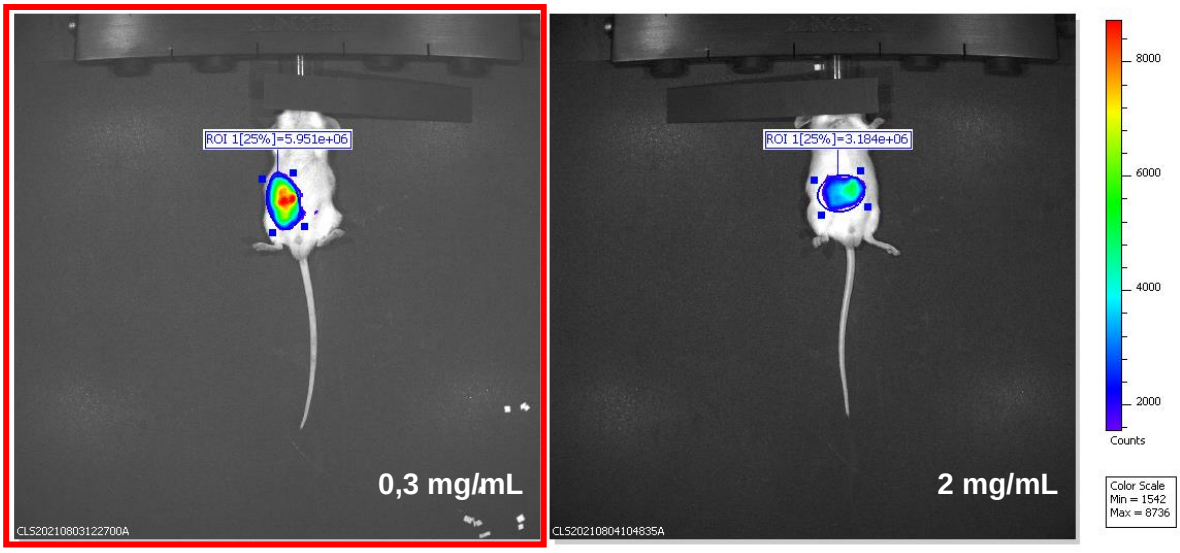
IVIS® ile yapılan görüntüleme çalışmalarında sonuçlar 15 dakika, 30 dakika, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat için sırayla verilmiştir. SNEDDS formülasyona ait biyodağılım görüntüleri Resim 4.87 - 4.94'te, S-SNEDDS tablet formülasyona ait biyodağılım görüntüleri Resim 4.95 - 4.102'de verilmiştir. Formülasyon gruplarına ait görüntüler sayfanın soluna (kırmızı çerçeveli), kontrol grubuna ait görüntüler ise sağına yerleştirilmiştir. Kontrol boya grubu, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarına ait biyodağılım görüntülerinde seçilen bölgenin emisyon değerlerine (Regions of Interest-ROI) ait grafikler ise karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 4.136 ve 4.137'de verilmiştir. Kontrol boya grubuna göre SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının emisyon değerlerindeki artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

ADME çalışmaları tamamlandıktan sonra boyanın dokulardaki tutulumunu ex vivo belirlemek amacıyla organlar çıkartılmıştır. Tek tek tablaya belirlenen sıra ile yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri belirlenmiştir. Daha iyi görüntü alabilmek için, midede yoğun absorpsiyon olduğu durumlarda, mide tabladan çıkartılarak diğer organların daha iyi görüntülenmesi sağlanmıştır. SNEDDS formülasyona ait ex vivo çalışma görüntüleri Resim 4.94'te, S-SNEDDS tablet formülasyona ait ex vivo çalışma görüntüleri Resim 4.102'de verilmiştir.

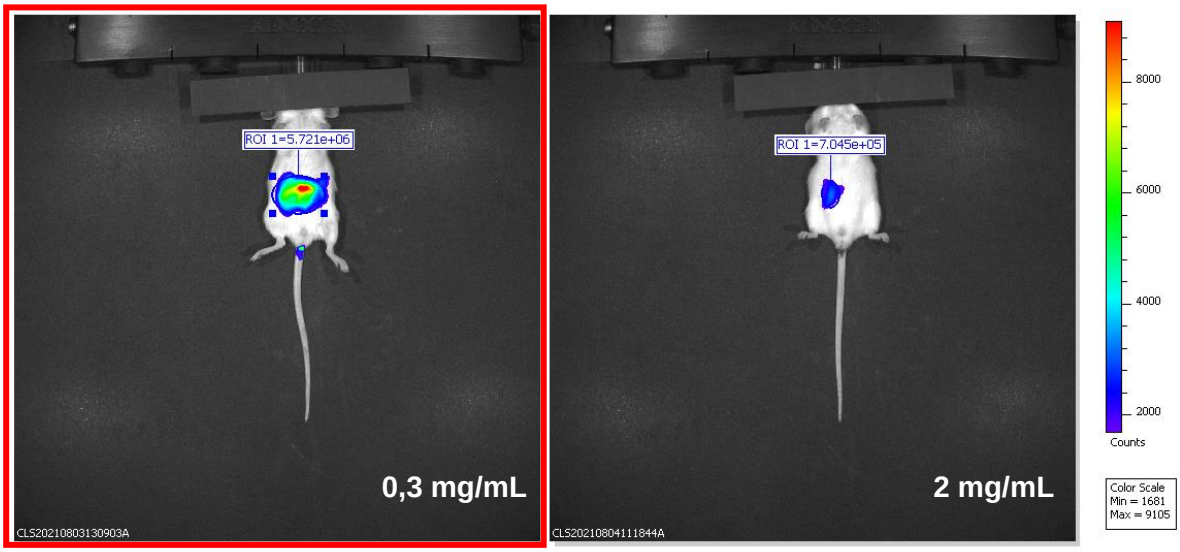
SNEDDS formülasyon



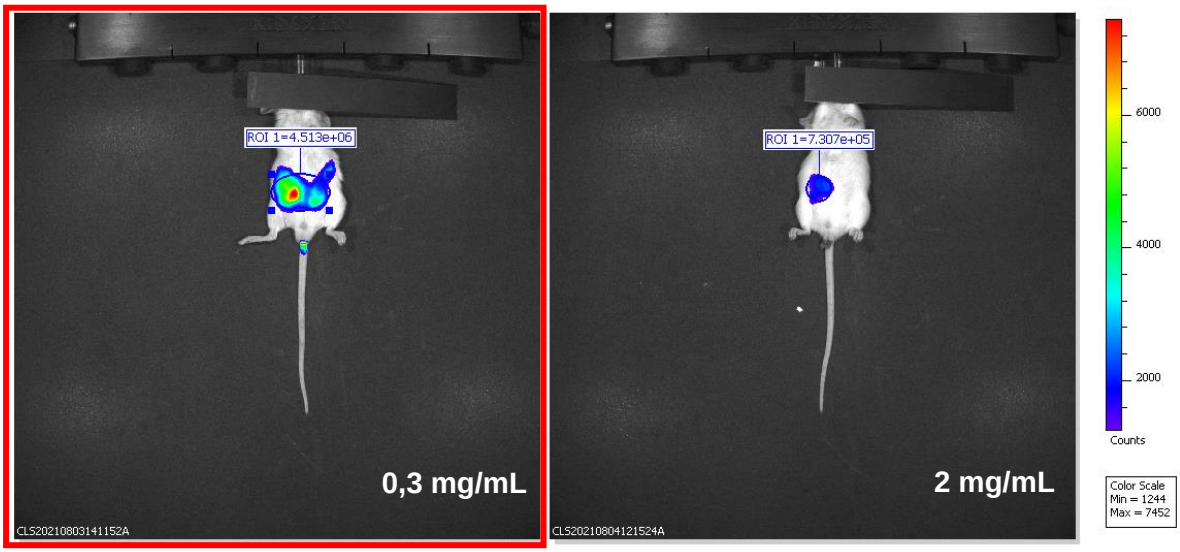
Resim 4.87. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 15. dakika görüntüleri



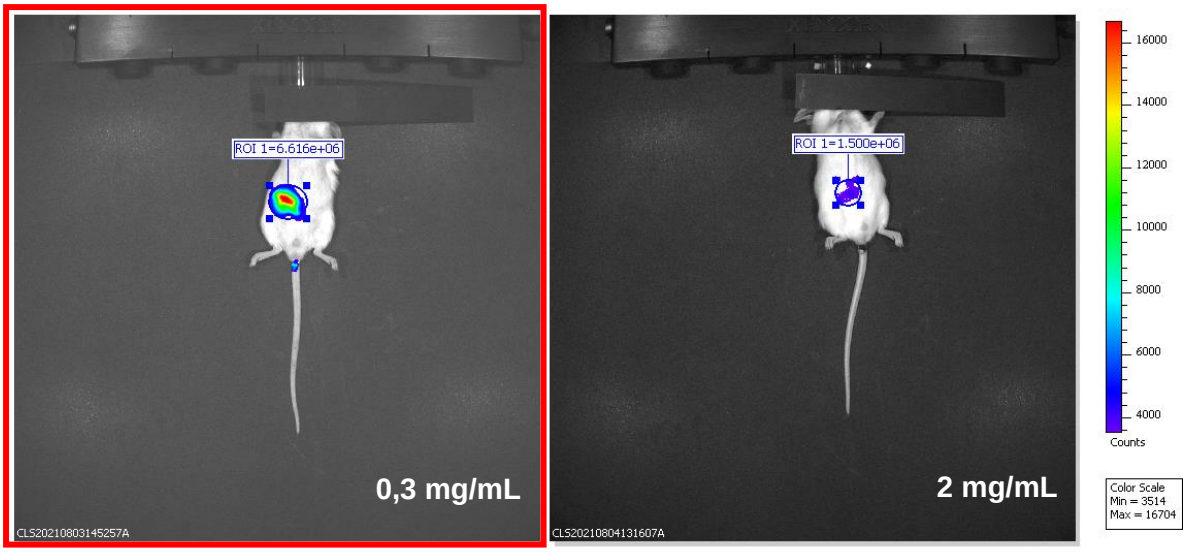
Resim 4.88. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 30. dakika görüntüleri



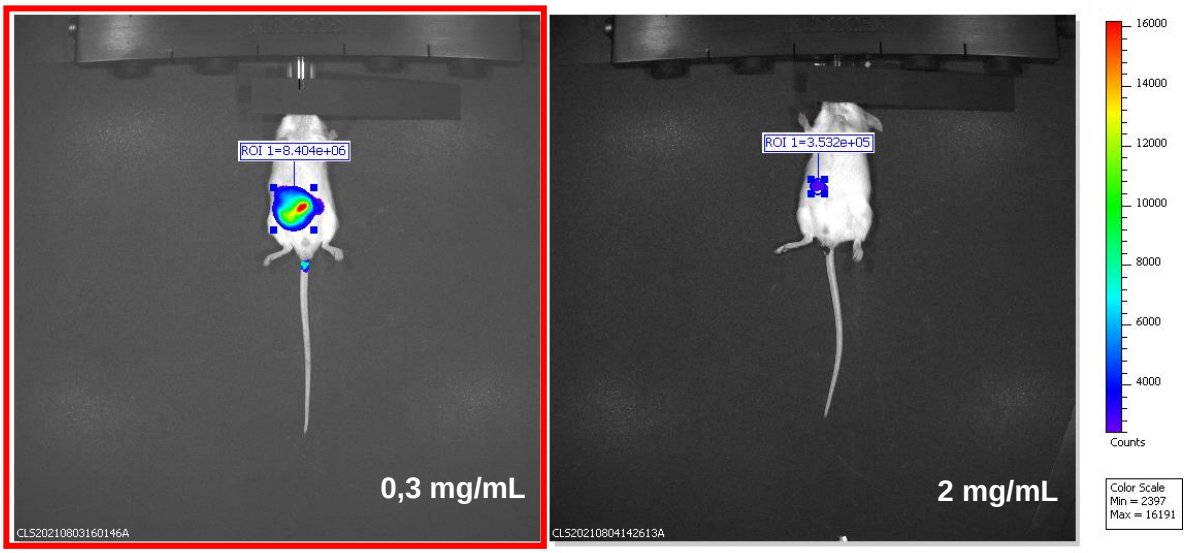
Resim 4.89. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 1. saat görüntüleri



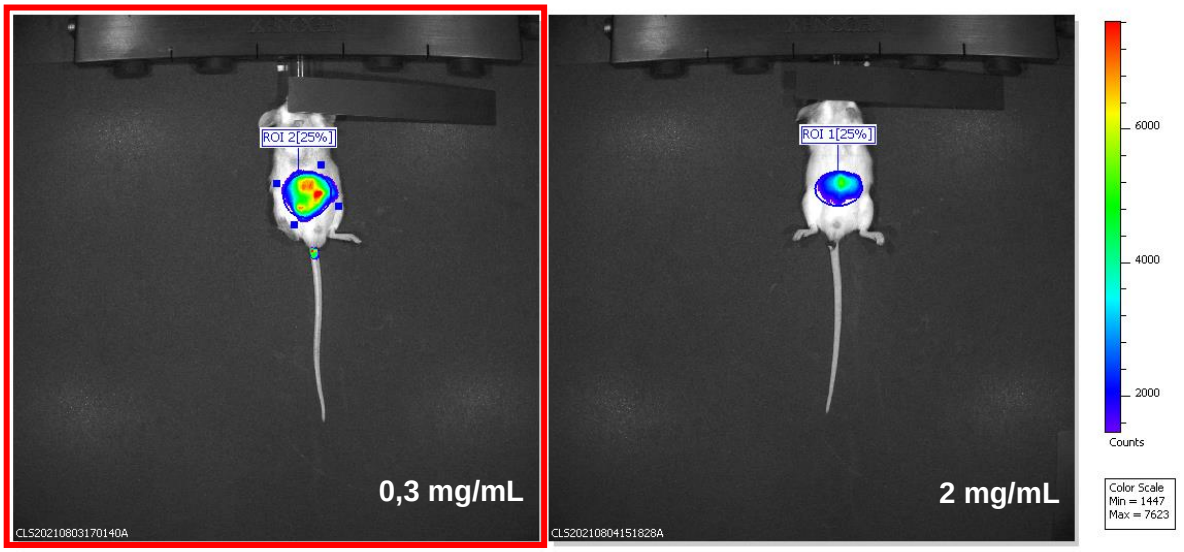
Resim 4.90. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 2. saat görüntüleri



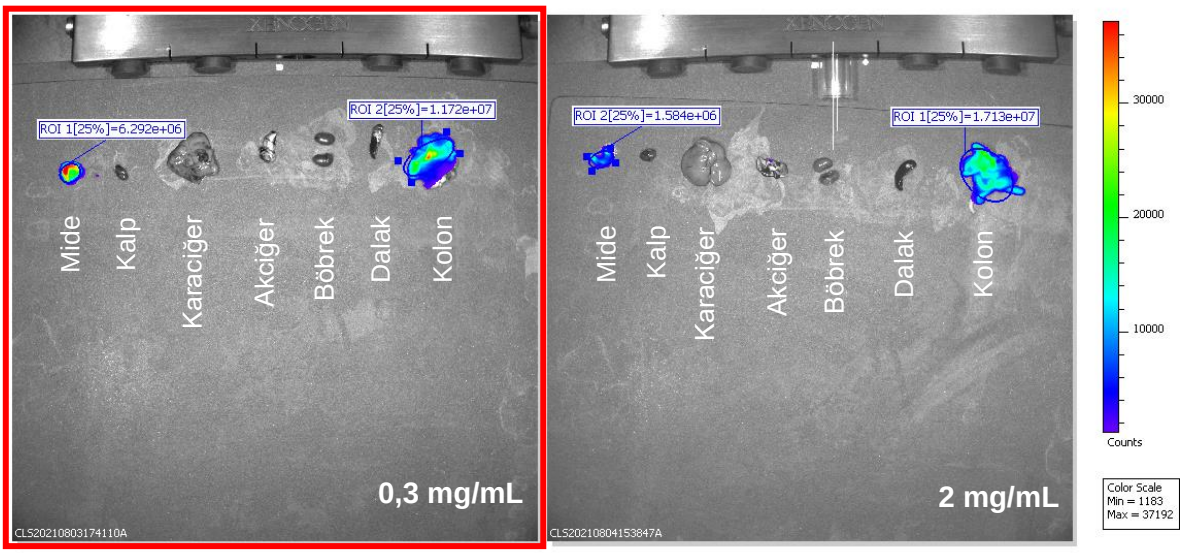
Resim 4.91. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 3. saat görüntüleri



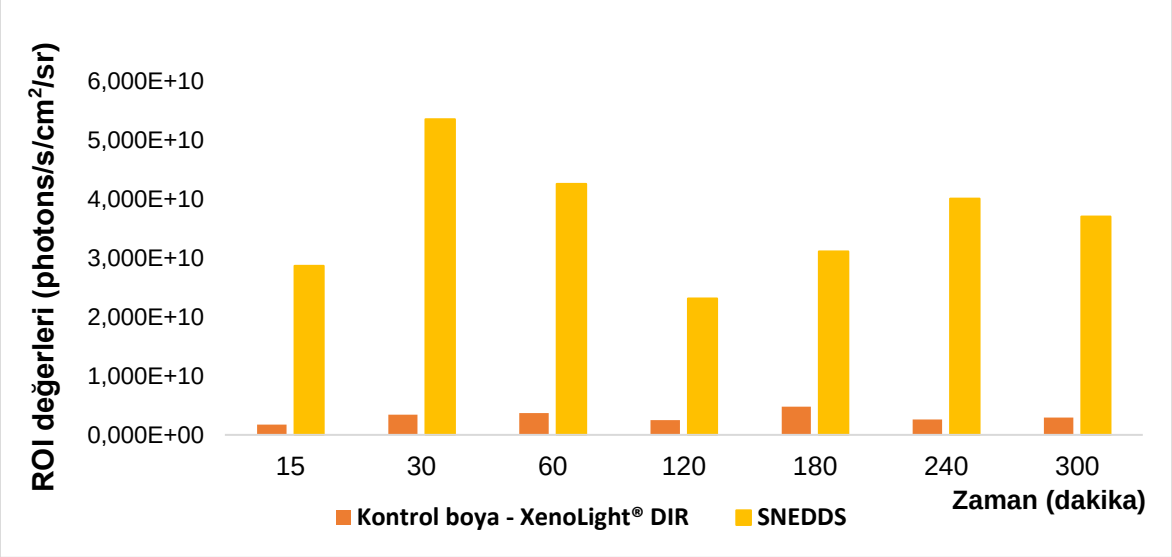
Resim 4.92. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 4. saat görüntüleri



Resim 4.93. IVIS® XenoLight™ DIR SNEDDS formülasyonu 5. saat görüntüleri



Resim 4.94. IVIS® XenoLight™ DIR kontrol-SNEDDS formülasyon ex vivo görüntüleri

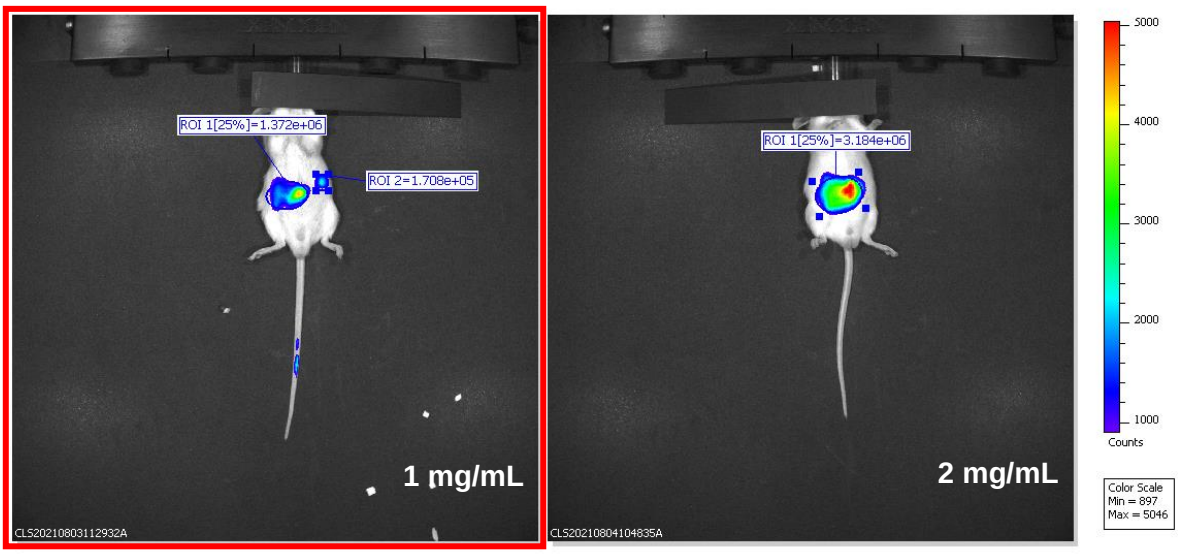


Şekil 4.136. IVIS® XenoLight™ DIR kontrol-SNEDDS formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması

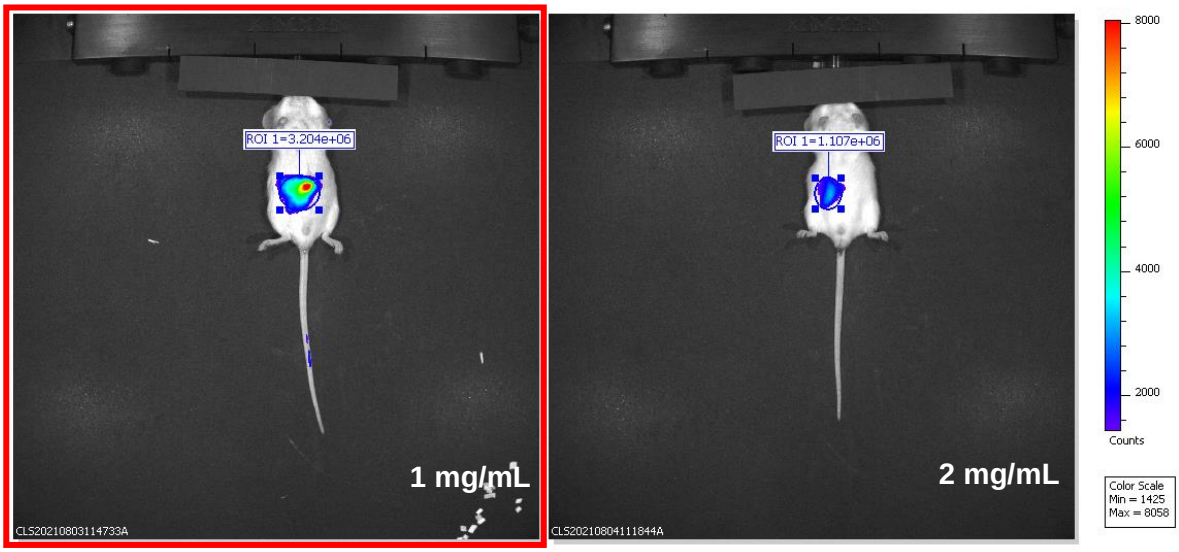
S-SNEDDS tablet formülasyon



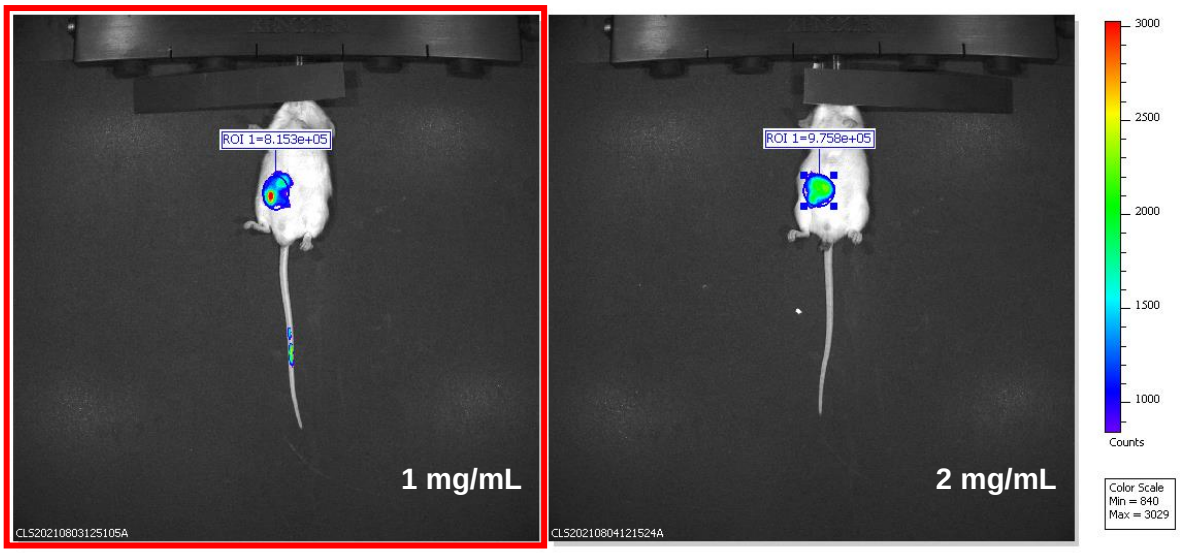
Resim 4.95. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 15. dakika görüntüleri



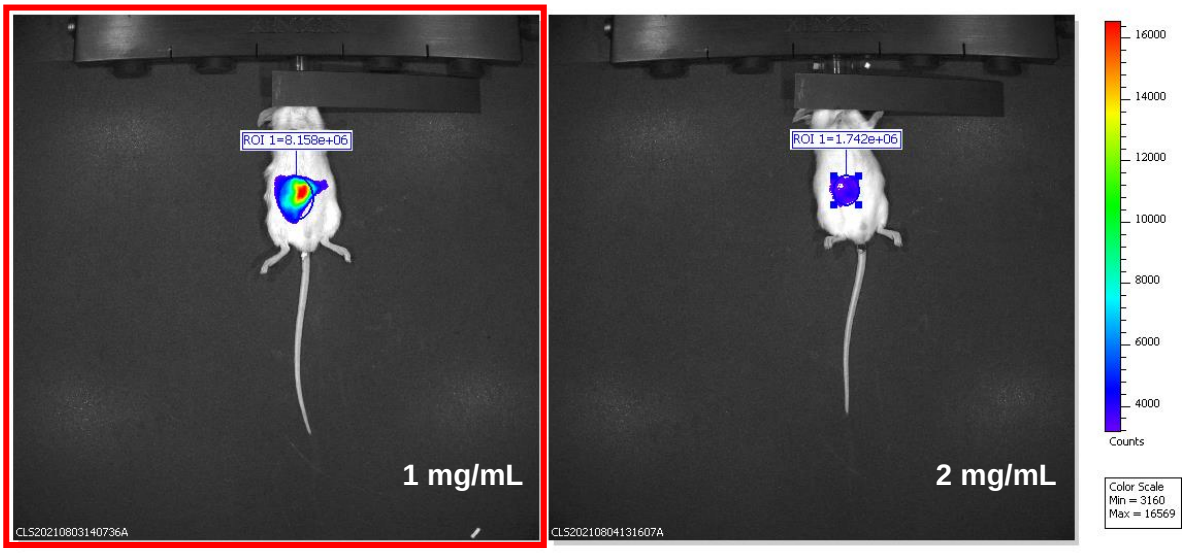
Resim 4.96. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 30. dakika görüntüleri



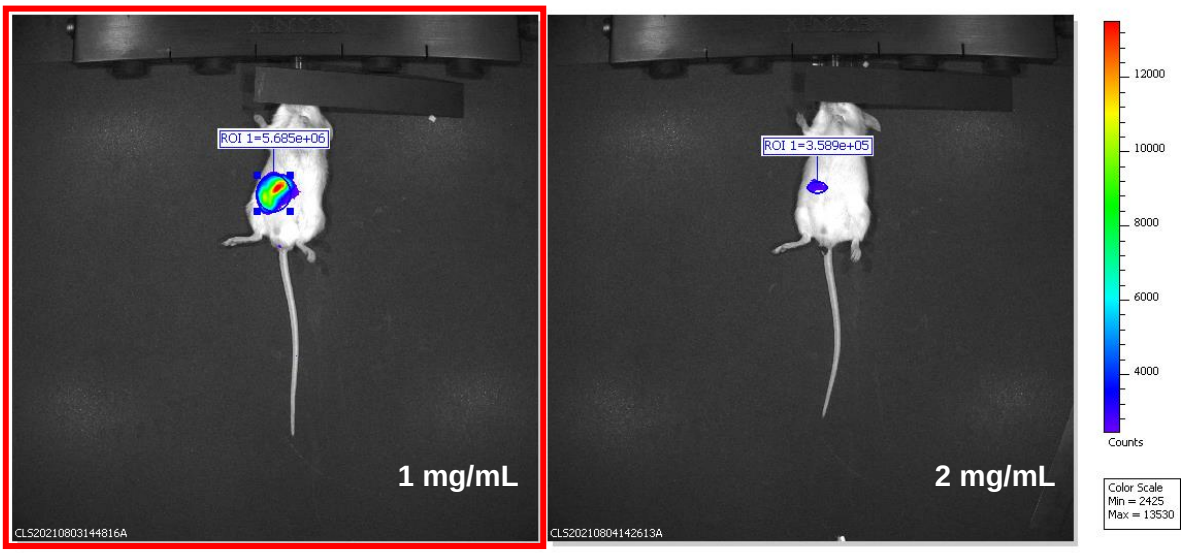
Resim 4.97. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 1. saat görüntüleri



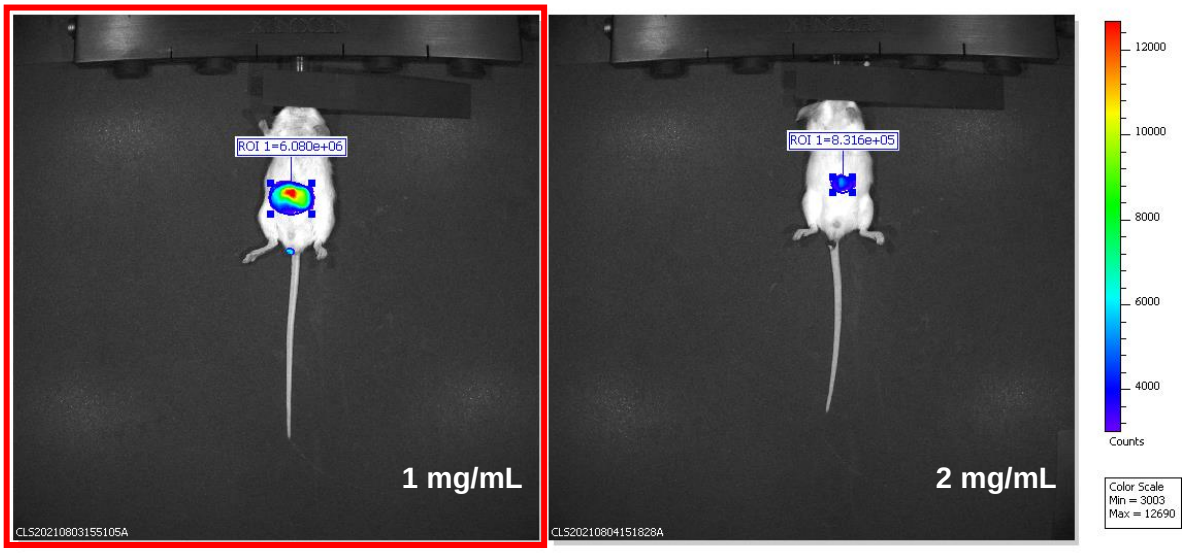
Resim 4.98. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 2. saat görüntüleri



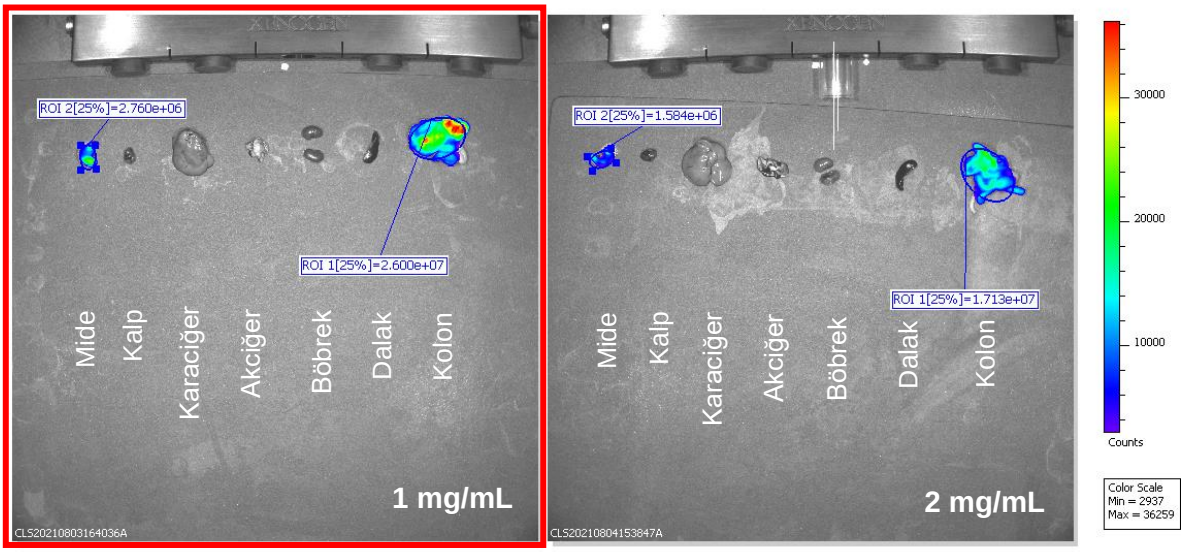
Resim 4.99. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 3. saat görüntüleri



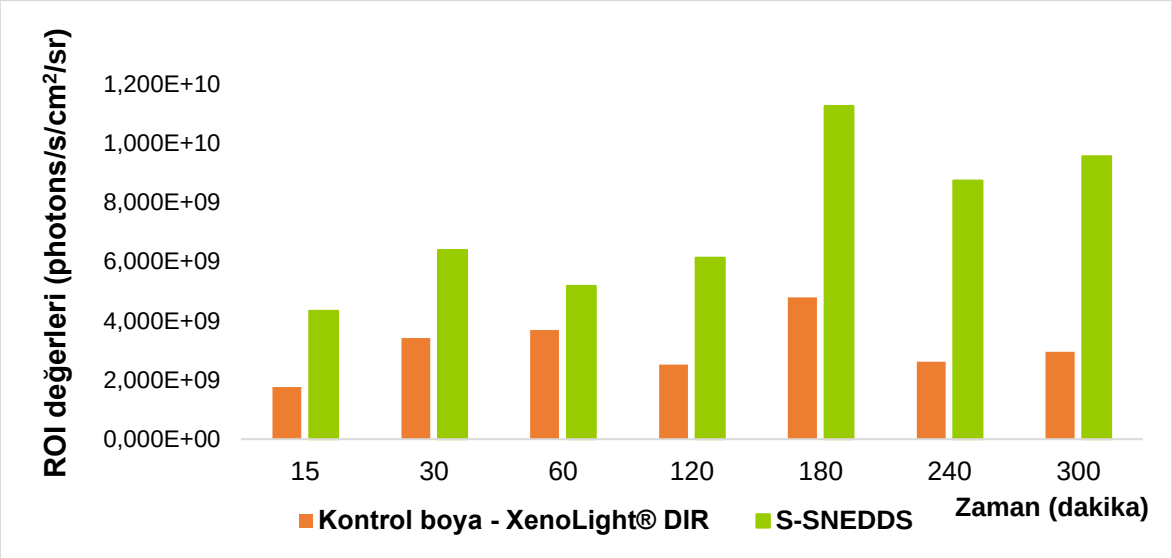
Resim 4.100. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 4. saat görüntüleri



Resim 4.101. IVIS® XenoLight™ DIR S-SNEDDS tablet formülasyonu 5. saat bulguları



Resim 4.102. IVIS® XenoLight® DIR kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon ex vivo görüntüleri



Şekil 4.137. IVIS® XenoLight® DIR kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması

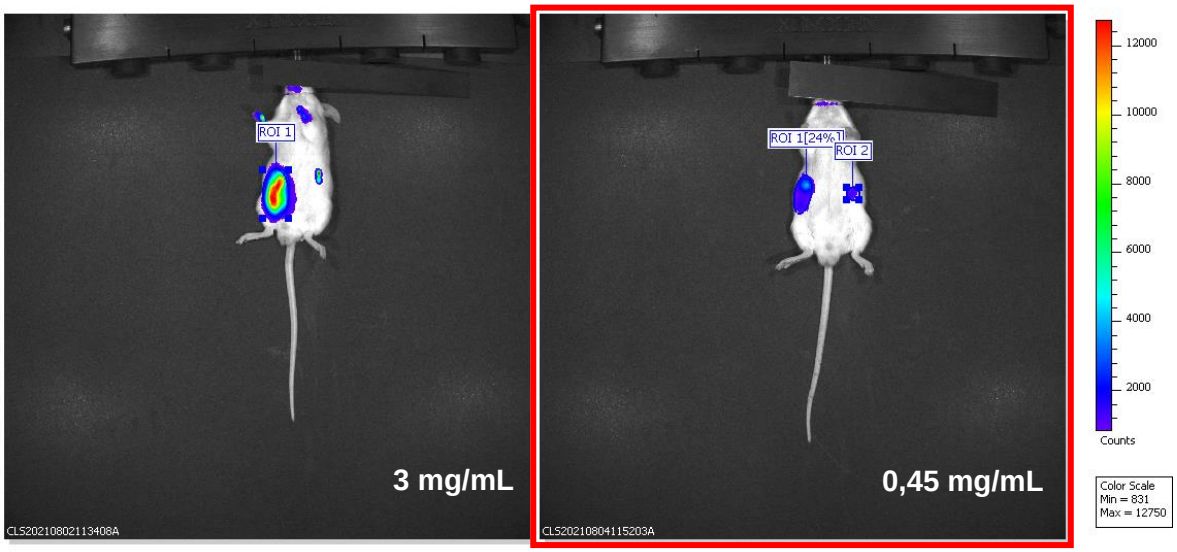
Vivotag® 680XL ile yapılan IVIS ve ex vivo görüntüleme çalışmaları

IVIS® ile yapılan görüntüleme çalışmalarında sonuçlar 15 dakika, 30 dakika, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat için sırayla verilmiştir. SNEDDS formülasyona ait biyodağılım görüntüleri Resim 4.103 - 4.110'da S-SNEDDS tablet formülasyona ait biyodağılım görüntüleri Resim 4.111 - 4.118'de verilmiştir. Formülasyon gruplarına ait görüntüler sayfanın sağına (kırmızı çerçeveli), kontrol grubuna ait görüntüler ise

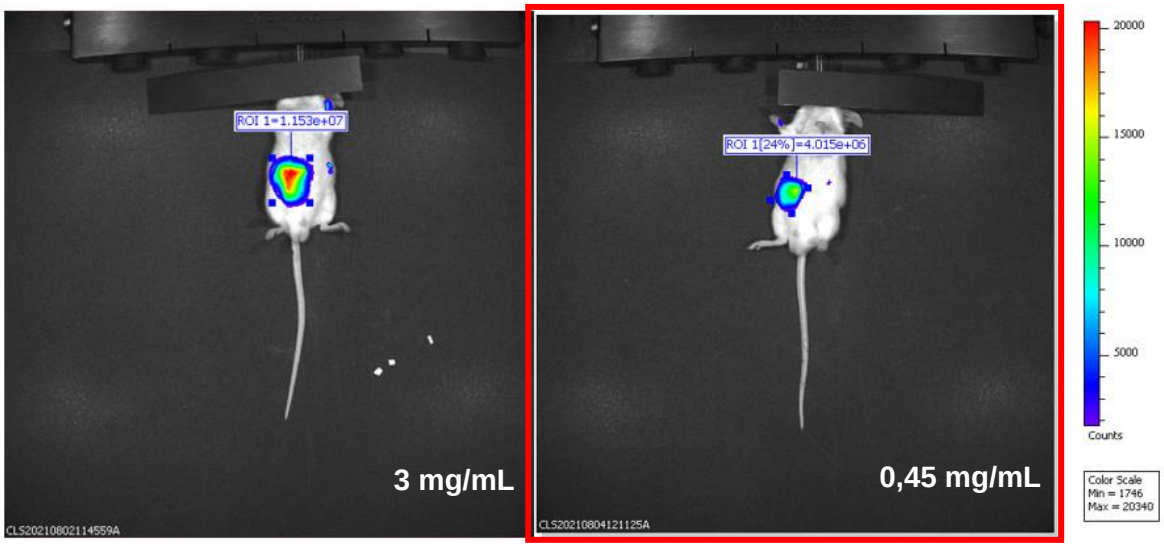
soluna yerleştirilmiştir. Kontrol boya grubu, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarına ait biyodağılım görüntülerinde seçilen bölgenin emisyon değerlerine (Regions of Interest-ROI) ait grafikler ise karışılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 4.138 ve 4.139'da verilmiştir. Kontrol boya grubuna göre SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının emisyon değerlerindeki artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

ADME çalışmaları tamamlandıktan sonra boyanın dokulardaki tutulumunu ex vivo belirlemek amacıyla organlar çıkartılmıştır. Tek tek tablaya belirlenen sıra ile yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri belirlenmiştir. Daha iyi görüntü alabilmek için, midede yoğun absorpsiyon olduğu durumlarda, mide tabladan çıkartılarak diğer organların daha iyi görüntülenmesi sağlanmıştır. SNEDDS formülasyona ait ex vivo çalışma görüntüleri Resim 4.110'da, S-SNEDDS tablet formülasyona ait ex vivo çalışma görüntüleri Resim 4.118'de verilmiştir.

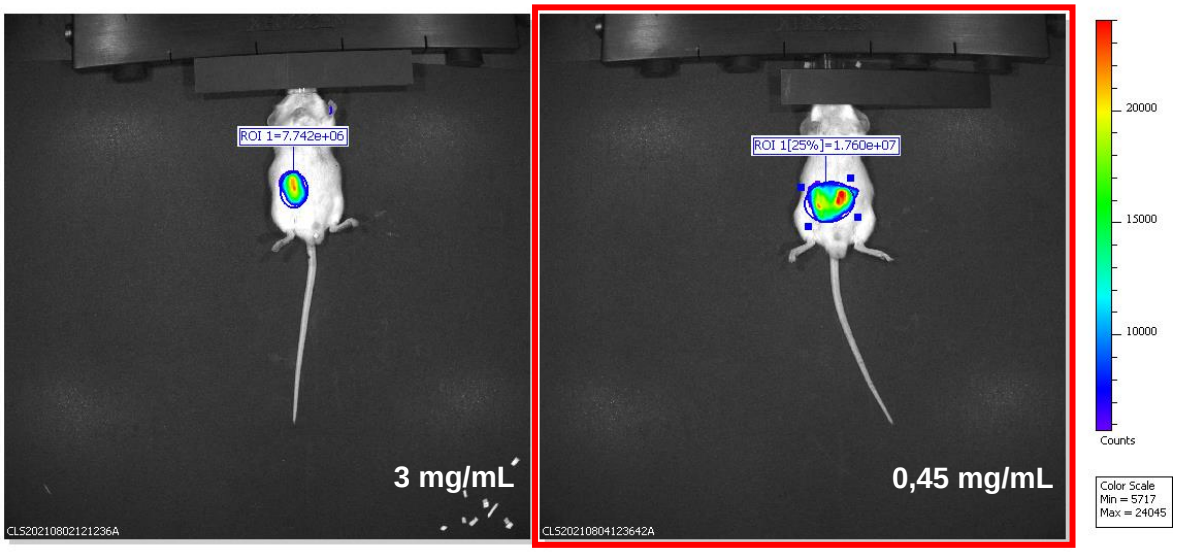
SNEDDS formülasyon



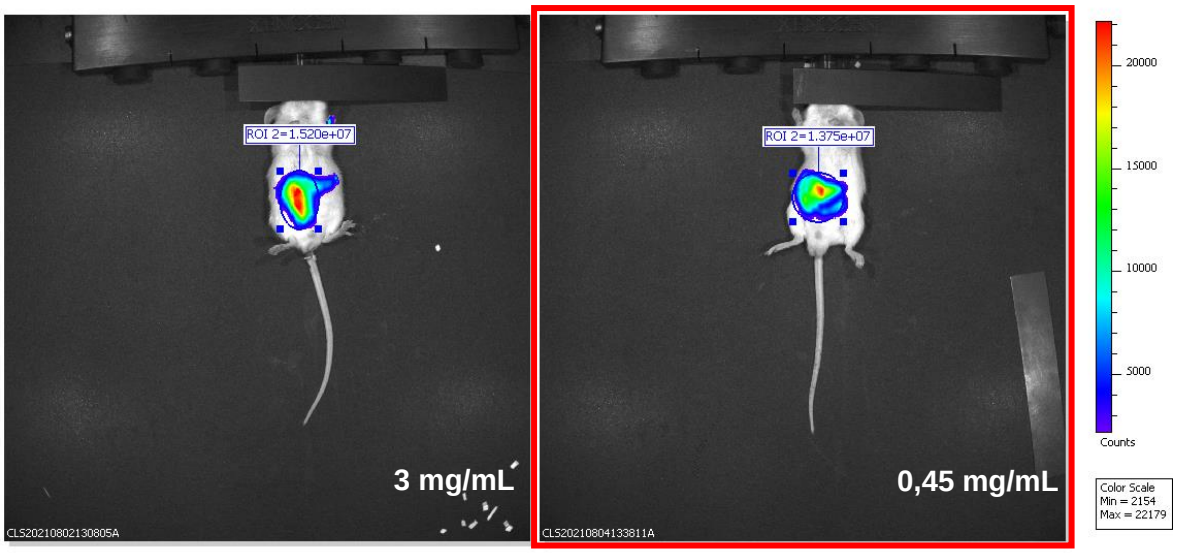
Resim 4.103. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 15. dakika bulguları



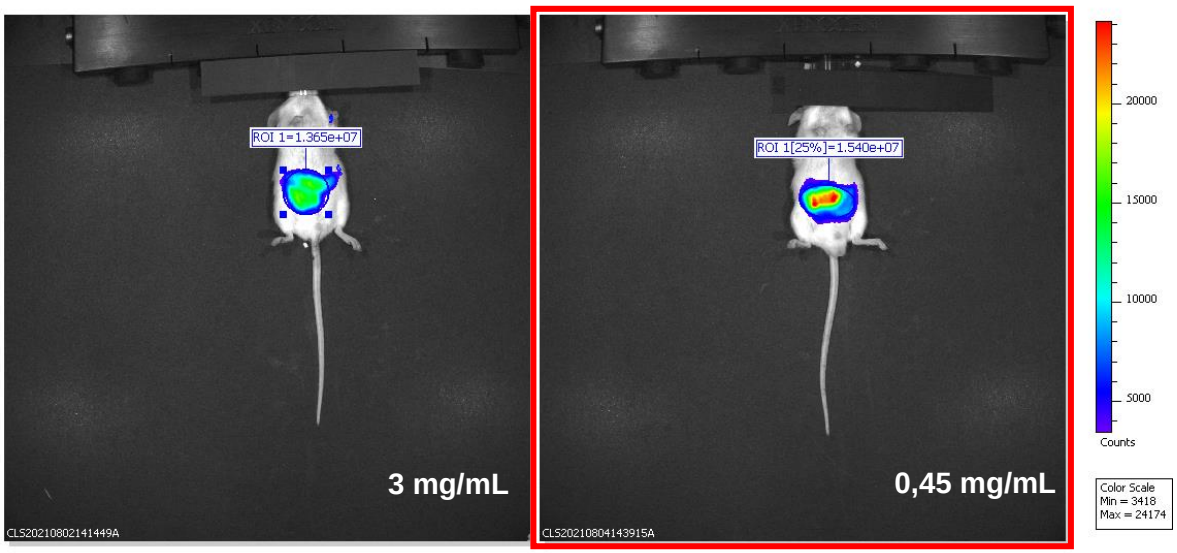
Resim 4.104. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 30. dakika bulguları



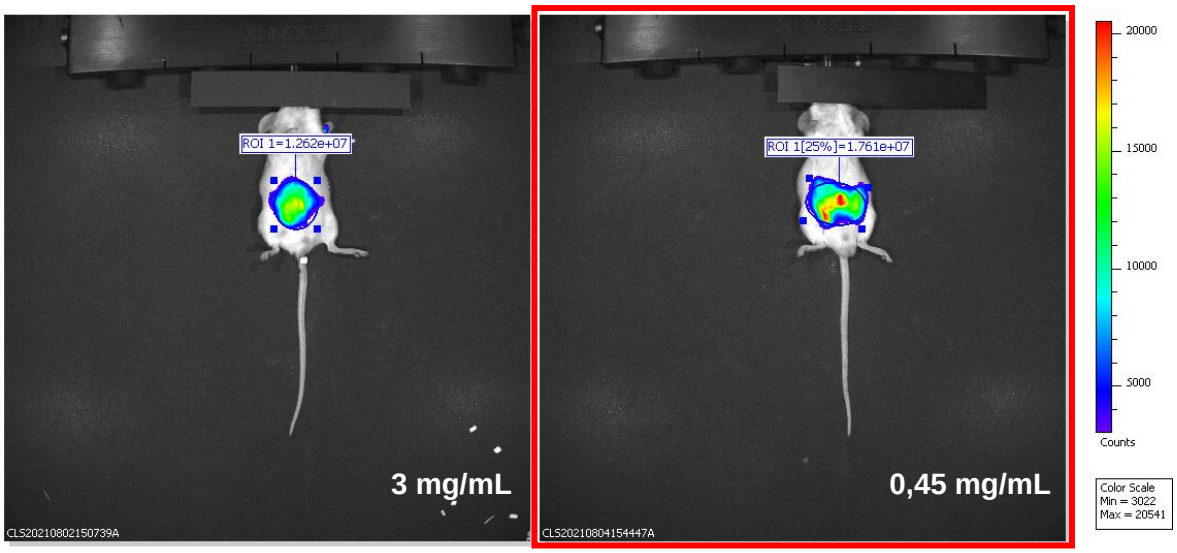
Resim 4.105. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 1. saat bulguları



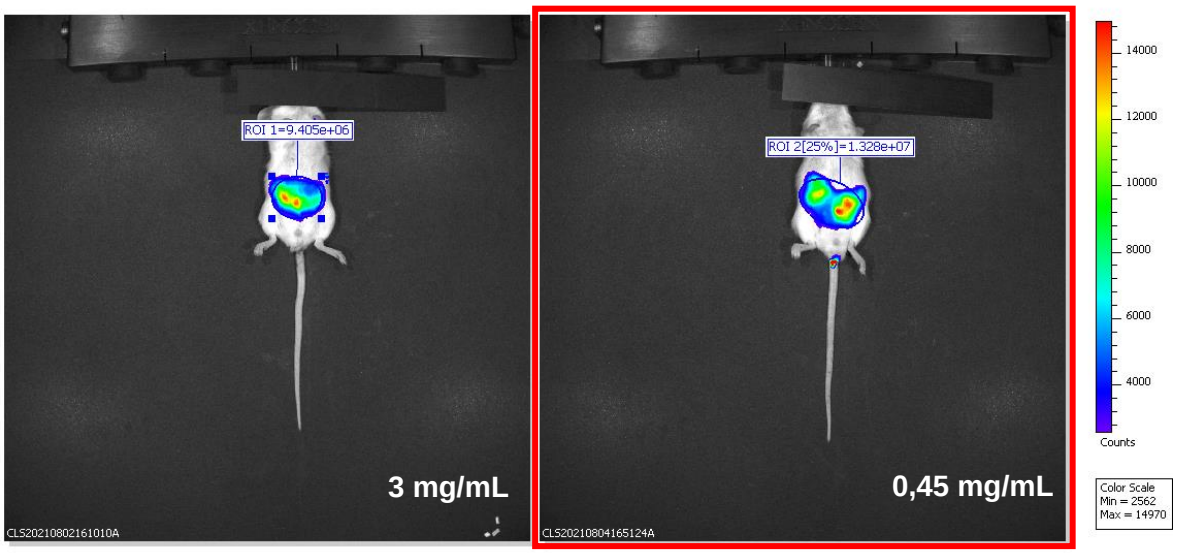
Resim 4.106. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 2. saat bulguları



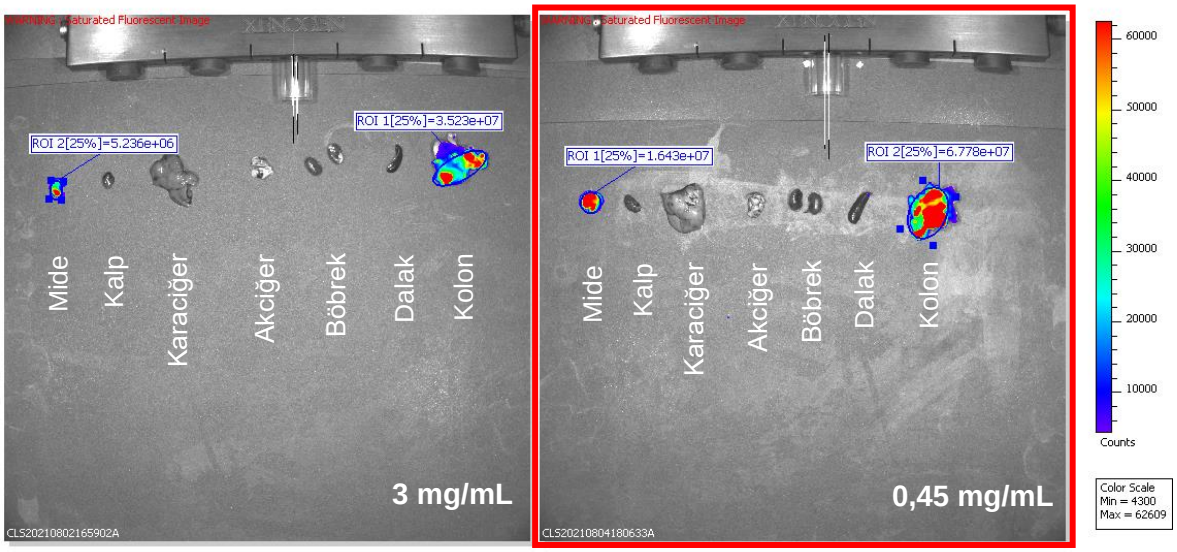
Resim 4.107. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 3. saat bulguları



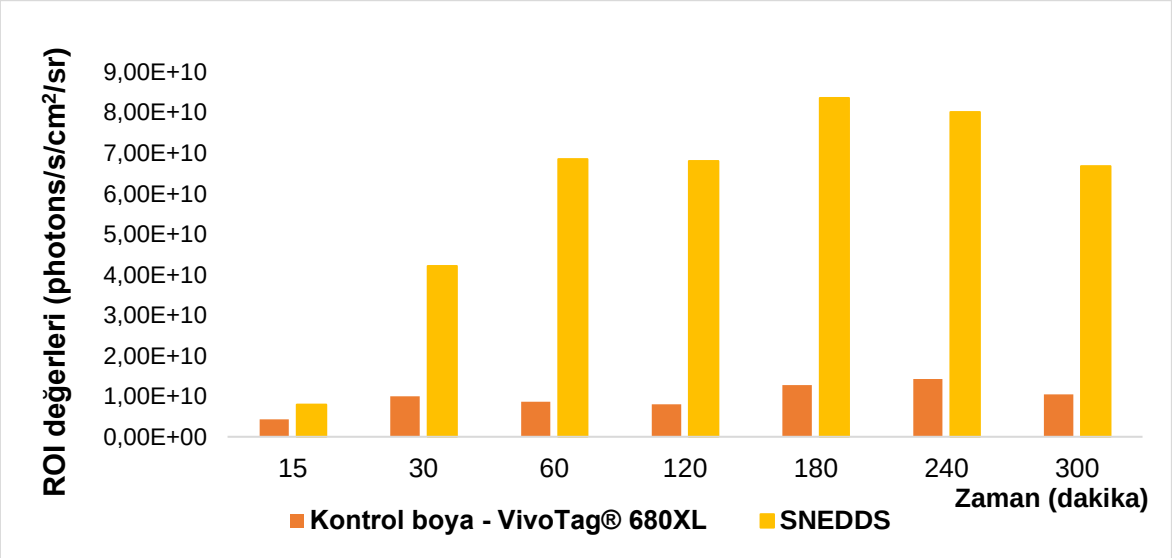
Resim 4.108. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 4. saat bulguları



Resim 4.109. IVIS® VivoTag® 680XL SNEDDS formülasyonu 5. saat görüntüleri

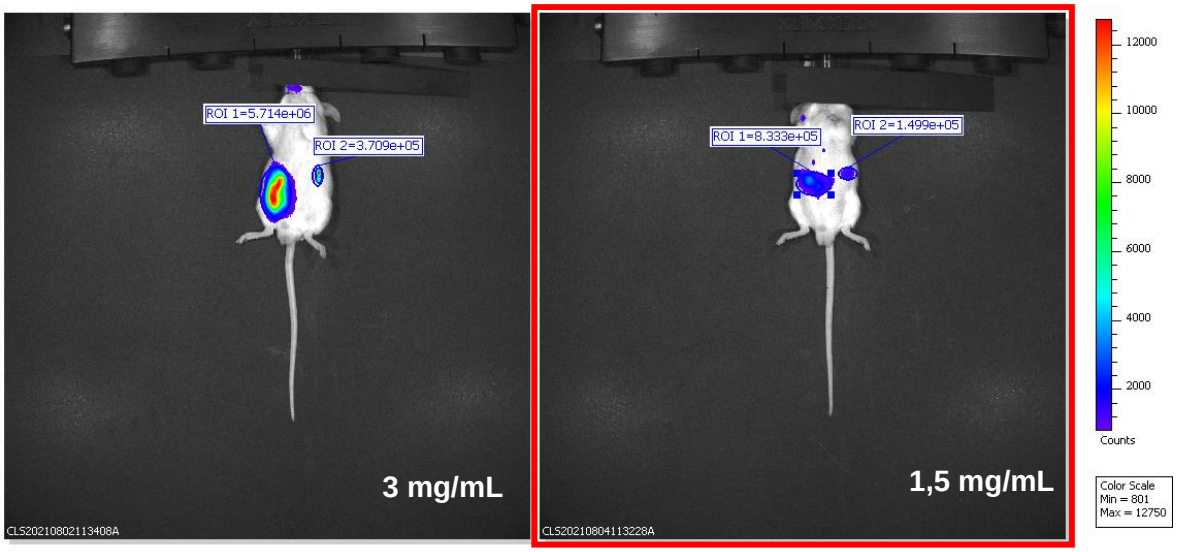


Resim 4.110. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-SNEDDS formülasyon ex vivo görüntüleri

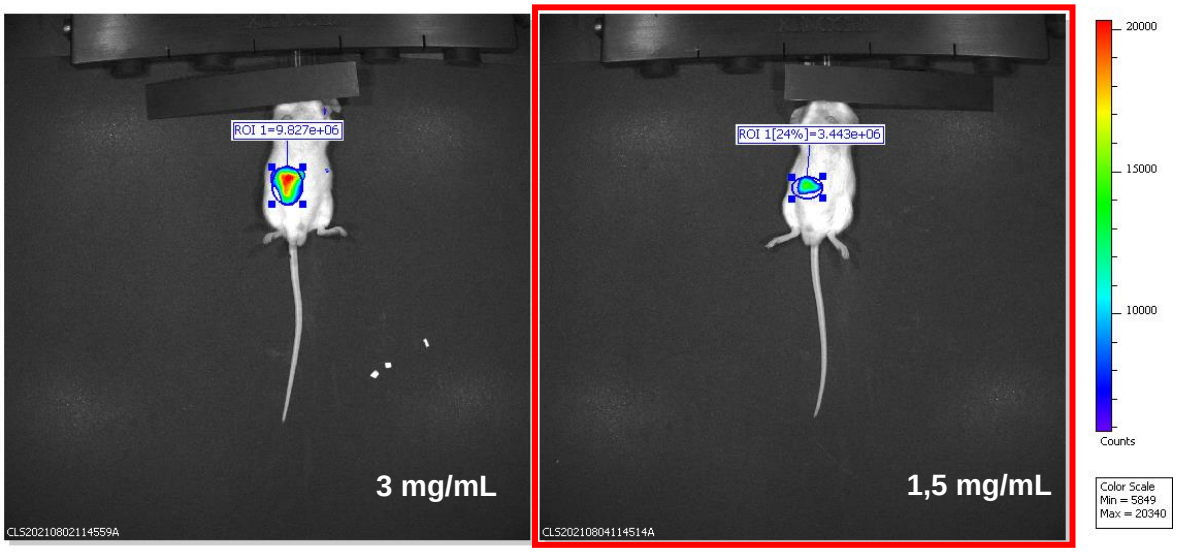


Şekil 4.138. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-SNEDDS formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması

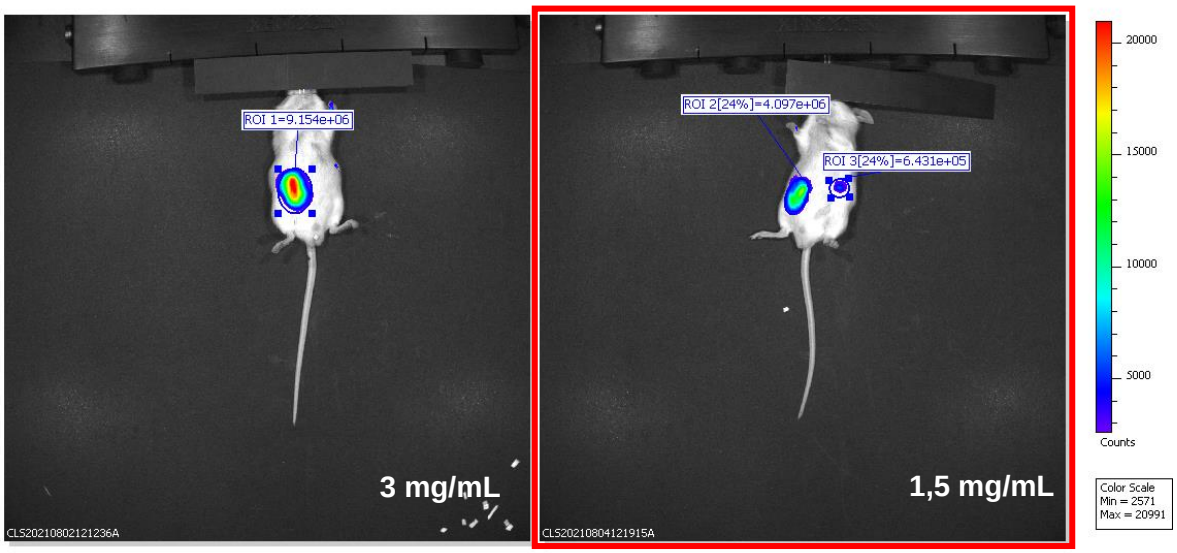
S-SNEDDS tablet formülasyon



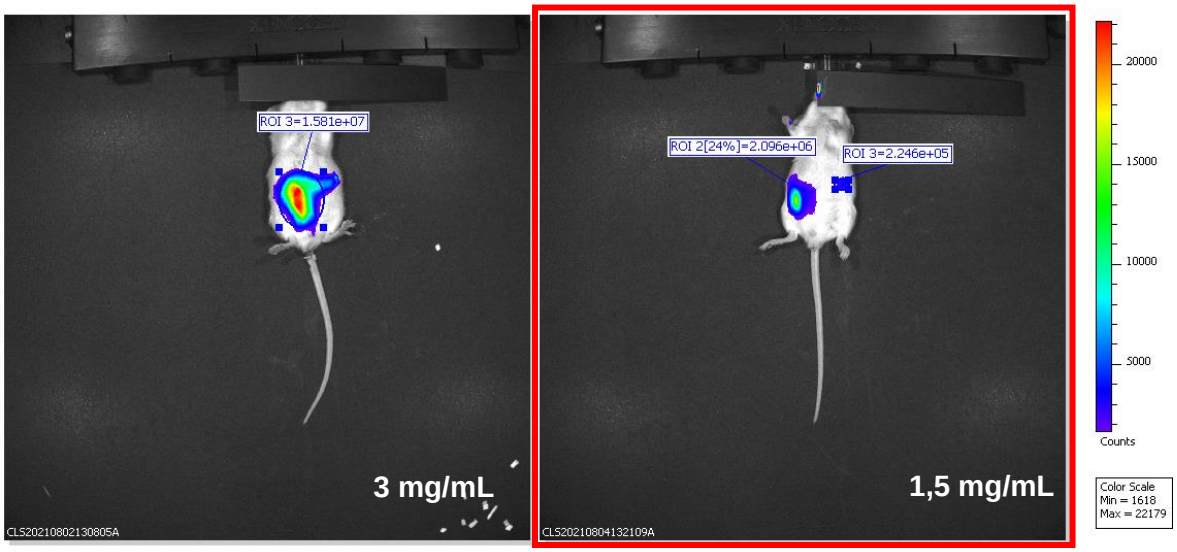
Resim 4.111. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 15. dakika bulguları



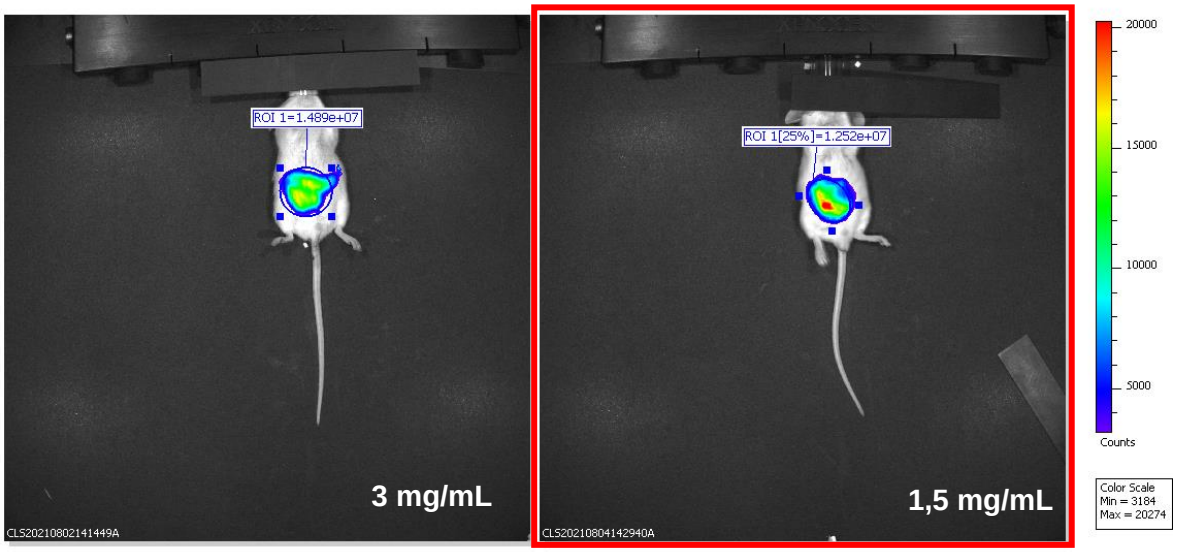
Resim 4.112. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 30. dakika bulguları



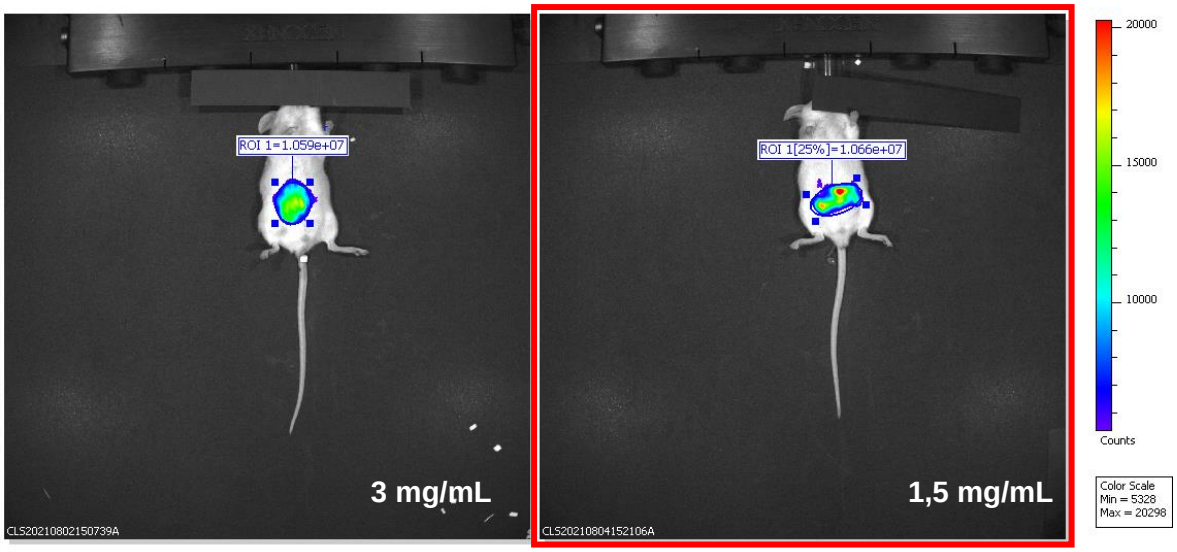
Resim 4.113. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 1. saat bulguları



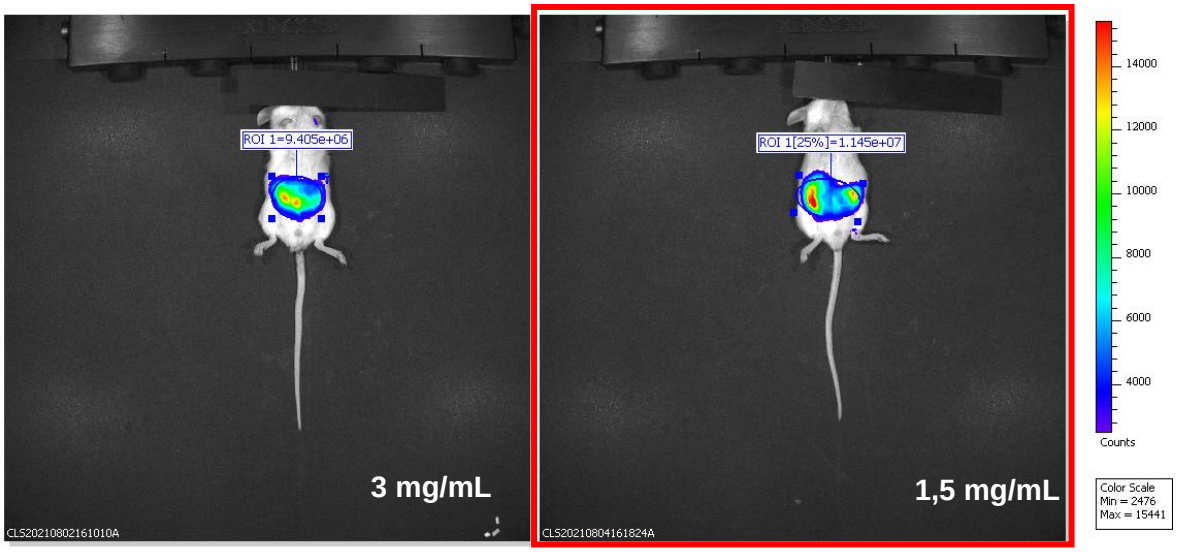
Resim 4.114. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 2. saat bulguları



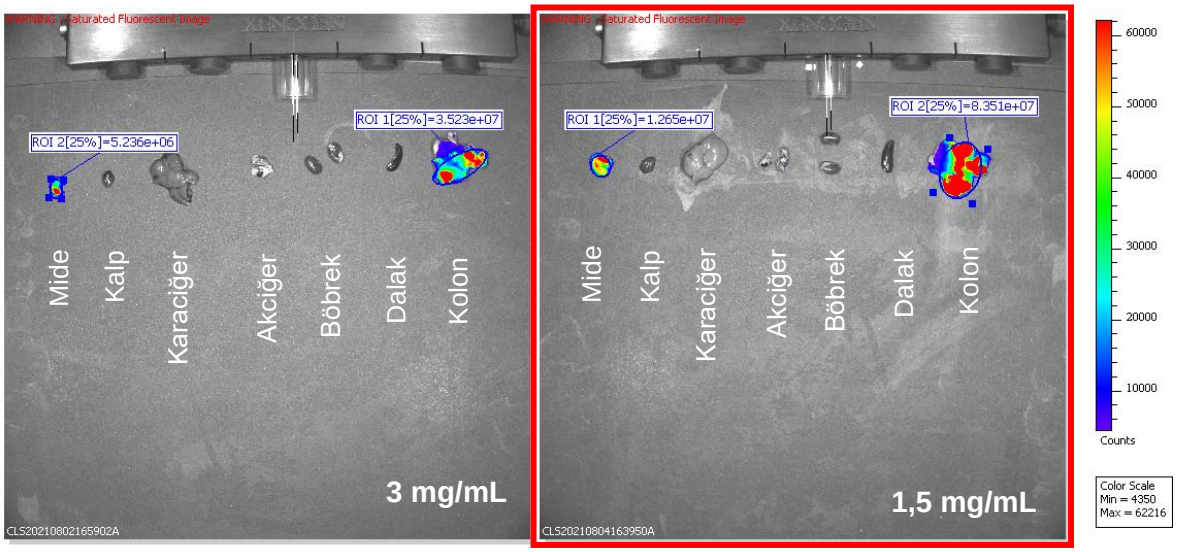
Resim 4.115. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 3. saat bulguları



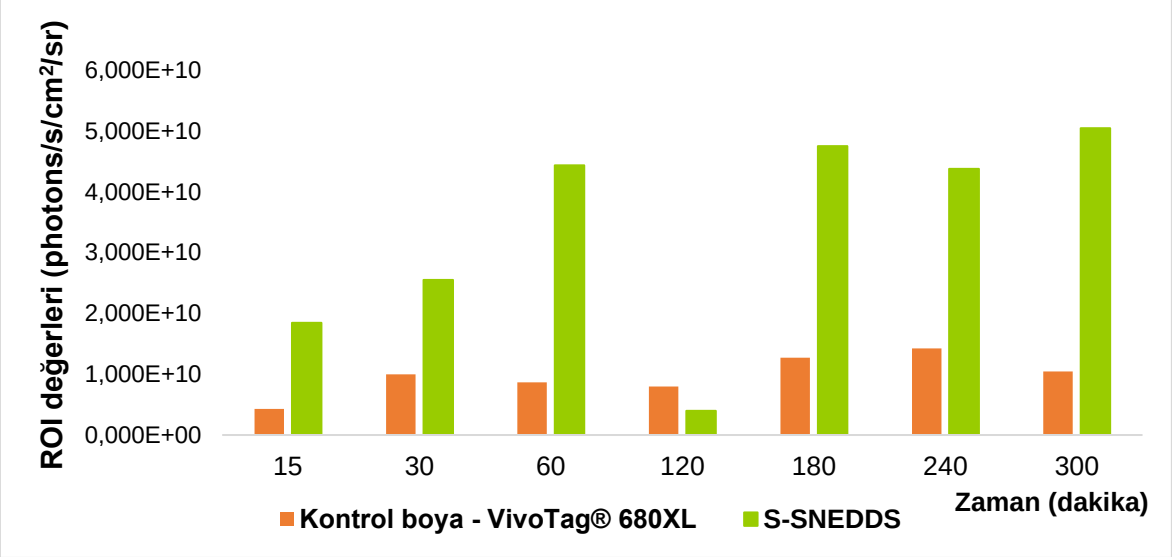
Resim 4.116. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 4. saat bulguları



Resim 4.117. IVIS® VivoTag® 680XL S-SNEDDS tablet formülasyonu 5. saat görüntüleri



Resim 4.118. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyonu ex vivo görüntüleri



Şekil 4.139. IVIS® VivoTag® 680XL kontrol-S-SNEDDS tablet formülasyon emisyon değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Bosentan monohidrat, pulmoner arteriyel hipertansiyonun spesifik tedavisi için geliştirilmiş ve onaylanmış ilk peptit olmayan oral endotelin (ET_A ve ET_B) reseptörü antagonistidir (McLaughlin ve diğerleri, 2005). pH'ya bağlı çözünürlük göstermekte ve zayıf asidik özelliğinden dolayı BCS alt sınıflandırmasına göre BCS Sınıf 2a'da yer almaktadır (Tsume ve diğerleri, 2014). Düşük ve pH'ya bağlı çözünürlüğü nedeniyle düşük absorpsiyon, bireyler arasında yüksek değişkenlikli ve zayıf biyoyararlanım göstermektedir (Moreno ve diğerleri, 2016; Sato, 2016). Bu nedenlerle BOS'un çözünürlüğünün, biyoyararlanımının, terapötik etkinliğinin arttırılması ve yüksek değişkenliğinin azaltılması için lipit temelli kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (SNEDDS)'in bir adsorban ile katılaştırılarak katı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (S-SDEDDS) tablet formülasyonu geliştirilmiştir.

Literatürde BOS'un çözünürlüğünün arttırılması amacı ile farklı lipitlerden oluşan kendiliğinden mikro ve nanoemülsiyon formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, klasik ortamlarda yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarında % çözünen BOS miktarının arttığı gösterilmiştir (Gunnam, Kovvasu, Karthan ve Chakravarthy, 2018; Panigrahi ve diğerleri, 2018; Vadlamudi ve diğerleri, 2017). Ancak BOS için SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarına ait FDA çözünme hızı veri tabanının önerdiği ortamda ve in vivoyu daha iyi taklit eden biyoyuyumlu ortamlarda in vitro çözünme hızı çalışmaları ve in vivo çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen BOS yüklü SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının in vitro ve in vivo sonuçları değerlendirilmiştir. Bu amaçla, BOS'un fizikokimyasal özellikleri, miktar tayini için geliştirilen UV spektrofotometrik, HPLC ve LC-MS/MS analiz yöntemleri ve yöntem validasyonları, iki farklı formülasyonun geliştirilmesi için yapılan önformülasyon, formülasyon çalışmaları ve geliştirilen formülasyonlara ait karakterizasyon/kontrol çalışmaları, çözünürlük, çözünme hızı, in vitro lipoliz, ex vivo permeabilite çalışmaları, in vivo farmakokinetik, açlık/tokluk biyoyararlanım çalışmaları, farmakodinamik ekokardiyografi, histoloji ve biyodağılım çalışmaları ve in vitro-in

vivo ilişki kurulması gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

5.1. Bosentanın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

BOS içeren formülasyonların geliştirilebilmesi amacıyla öncelikle fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için çözünürlük, partisyon katsayısı çalışmaları, partikül büyüklüğü, FT-IR, DSC (erime derecesi tayini) ve X-RPD analizleri gerçekleştirilmiştir.

BOS, BCS Sınıf 2 suda düşük çözünürlüğe (0,01 mg/mL) sahip, çözünürlüğü pH bağımlı olan ve pH arttıkça çözünürlüğü de (pH 7,5'te 0,43 mg/mL) artan bir etkin maddedir (FDA, 2003; Jadhav ve Pore, 2017). BOS'un log P değeri 3,1'dir ve lipofilik özellik göstermektedir (EMA, 2005; Pore ve Jadhav, 2020). Suda çözünürlük ve log P bir kimyasalın lipofilik ve hidrofobik özelliklerini tanımlayan fiziksel özelliklerdir (Meylan ve Howard, 2000). Tez çalışması kapsamında çözünürlük çalışması FDA tarafından çözünme ortamı olarak önerilen %1 SLS içeren distile su içinde 25°C ve 37°C'de gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 1,21 mg/mL ve 1,48 mg/mL olarak bulunmuştur. Çözünürlüğün %1 SLS içeren distile su ortamında sudaki çözünürlüğüne göre arttığı görülmüştür. BOS'un log P değeri ise 25°C ve 37°C için sırasıyla 3,33 ve 3,44 olarak belirlenmiş ve lipofilik özellikte olduğu görülmüştür.

BOS'un lazer ışık difraksiyonu yöntemi ile partikül büyüklüğü ölçümleri gerçekleştirilmiş ve ortalama partikül büyüklüğü 12,07 ± 0,059 µm olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).

Etkin maddeye ait spesifik piklerin FT-IR spektrumu ile belirlenmesi yapılan formülasyon çalışmalarında etkin maddenin yapısında meydana gelebilecek değişiklerinin yorumlanması açısından önem taşımaktadır. BOS'a ait karakteristik -OH tekli bağı 3625 cm^{-1}, N-H bağları 3317 cm^{-1}, aromatik halkadaki -CH bağları 2900-3100 cm^{-1} aralığında, aromatik halkadaki C=C bağı 1558 cm^{-1}, S=O bağı 1340 cm^{-1}, ikincil -C-O bağı 1169 cm^{-1} ve birincil -C-O bağı 1071 cm^{-1} bantlarında gözlenmiştir (Şekil 4.2). Elde edilen bu verilerin literatür ile uyumlu olduğu

görülmüştür (Giménez ve diğerleri, 2019; Kendre, Chaudhari, Jain ve Vibhute, 2021).

Erime derecesi maddelerin ayırt edici özelliklerinden olup her madde için spesifik bir özelliktir. Yapılan DSC analizi ile elde edilen DSC termogramında (Şekil 4.3) iki tepeli endotermik bir pik görülmektedir. Burada ilk pik etkin maddenin yapısında yer alan hidrat yapısının uzaklaşmasını, ikinci ve daha keskin olan pik ise 115°C olan BOS'ın erime derecesini doğrulamaktadır (Kendre ve Chaudhari, 2018; Laha, Das, Maiti ve Sen, 2019; Pore ve Jadhav, 2020).

BOS üzerinde yapılan X-RPD analizi sonucunda 2θ'da 9,28, 15,52, 16,72 ve 18,63° ana açılarında belirgin ve güçlü kırınım tepeleri ile kristal yapı doğrulanmıştır. BOS literatürdeki farklı çalışmalarda da benzer kırınım özelliği göstermiştir (Hanna ve diğerleri, 2017; Lee ve diğerleri, 2016).

5.2. Bosentanın Miktar Tayini Yöntemleri ve Validasyonları

5.2.1. Bosentanın in vitro miktar tayini yöntemleri ve validasyonları

BOS'un in vitro miktar tayini için UV spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Jatczak ve diğerleri, 2016; Kumar, Sreenivas, Samal, Dey ve Priyanka, 2011; Narendra, Deepika ve Annapurna, 2012). BOS'un %1 SLS içeren distile suda çözünürlük, partisyon katsayısı ve yağlardaki çözünürlüğünün miktar tayini UV spektrofotometrik yöntemle; stabilite, in vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite çalışmalarındaki miktar tayini ise HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Bu çalışmaların yürütüldüğü ortamlar olan %1 SLS içeren distile su ve biyouyumlu ortamlar için dalga boyu 220 nm, distile su ortamı için dalga boyu 271 nm ve metanol için dalga boyu 267 nm olarak belirlenmiştir.

BOS'un metanolde UV spektrofotometrik analizi, FDA'nın önerdiği çözünme hızı ortamı olan %1 SLS içeren distile su, biyouyumlu ortamlar olan FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında HPLC analizleri için miktar tayini

yöntemleri geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Literatürde, bu ortamlara ilişkin geliştirilmiş analitik yöntem bulunmamaktadır.

Analitik yöntem validasyonunda amaç kullanılan yöntemin hedeflenen amaç için uygun olduğunu göstermektir. Bu nedenle analitik yöntemin amacı iyi anlaşılmalı, yöntem validasyonu test yönteminin doğruluk ve güvenirliliğini kanıtlamalıdır (ICH Q2B, 1996). Validasyon sonuçlarının değerlendirilmesinde ICH kılavuzları temel alınmıştır (ICH Q2(R1), 1995; ICH Q2B, 1996).

BOS'un metanol ortamında kullanılmak üzere UV spektrofotometrik yöntemle geliştirilen analitik yönteme ait kalibrasyon çalışmaları sonunda R^2 değeri 0,999 bulunmuştur ve konsantrasyon-absorbans arasındaki doğrusallık gösterilmiştir (Şekil 4.16). Doğruluk ve geri elde sonuçlarının etkin madde için %97-103 arasında, dozaj şekli içinde ise %95-105 arasında olması beklenmektedir (ICH Q2(R1), 1995). Doğruluk ve geri elde sonuçları sırasıyla BOS için %99-103 aralığında bulunmuştur. % VK değeri %1,85'tir. Analiz yönteminde kesinliğe (tekrar edilebilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik) ait % VK sonuçlarının %2'nin altında olması, yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Metanol ortamı için kesinlik sonuçlarına ait % VK değerleri %0,29-1,85 ve %2'nin altında bulunmuştur. BOS'un metanol için maksimum absorbans verdiği 267 nm dalga boyunda herhangi bir pik gözlenmemiştir. BOS'un metanoldeki UV spektrofotometrik miktar tayin yönteminin LOD'si 1,46 µg/mL, LOQ'su 4,41 µg/mL olarak belirlenmiştir. BOS'un metanol için geliştirilen UV spektrofotometrik analiz yöntemi uygun bulunmuştur.

Stabilite, in vitro çözünme hızı (FDA'nın önerdiği çözünme hızı ortamı olan %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2), in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite çalışmalarında BOS miktar tayini için HPLC kullanılmıştır. Yapılan ön çalışmalarla dalga boyu 220 nm olarak belirlenmiştir. USP monografı ve yapılan çeşitli çalışmalarda da dalga boyu 220 nm olarak belirtilmiştir (Lee ve diğerleri, 2018; Prabhu, Maruthapillai ve Senadi, 2021; USP, 2012). USP monografında belirtilen çalışma parametreleri en iyi ayrımın gerçekleştirilebilmesi için modifiye edilmiştir. Mobil faz olan asetonitril: tampon oranı 55:45 olarak belirlenmiştir.

BOS'un FDA'nın çözünme hızı ortamı olarak önerdiği %1 SLS içeren distile su ortamı için geliştirilen analiz yöntemi ile yapılan çalışmada konsantrasyon ve pik alanı arasındaki ilişkinin 0,0195 µg/mL-10 µg/mL aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir (y=228,51x+18,04, R^2=1) (Şekil 4.19). Doğruluk ve geri elde ve kesinlik sonuçları için % VK'sı %2'nin altında bulunmuştur. Özgünlük ve seçicilik için yapılan çalışma sonucunda formülasyonu oluşturan bileşenlerin 220 nm olan çalışma dalga boyunda pik vermediği kanıtlanmıştır. Yöntemin LOD'si 0,08 µg/mL, LOQ'su 0,24 µg/mL olarak belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklar (4°C, 25°C ve 37°C) için yapılan stabilite çalışmaları ile BOS'un 24 saat için stabil olduğu gösterilmiş ve geliştirilen analiz yöntemi BOS'un miktar tayini için uygun bulunmuştur.

Klasik ortamların dışında açlık ve tokluk durumlarını taklit eden biyouyumlu ortamların (özellikle BOS gibi BCS Sınıf 2 ilaçların ve bunları içeren formülasyonların) in vivo performasını tahmin etmede oldukça önemli olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Mann ve diğerleri, 2017). Bu nedenle in vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz ve ex vivo çalışmalarda in vivoya benzerlik açısından biyouyumlu ortamların (FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2) kullanılması tercih edilmiştir.

BOS'un FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için geliştirilen analitik yöntemlere ait kalibrasyon çalışmaları sonucunda tüm ortamlar için 0,5 µg/mL–20 µg/mL aralığında doğrusallık (R^2≥0,999) kanıtlanmıştır (Şekil 4.24, 4.29, 4.34 ve 4.39). Geliştirilen yöntemlerin özgünlük ve seçicilik sonuçları formülasyonu oluşturan bileşenlerin 220 nm dalga boyunda pik vermedikleri kanıtlamıştır. Geliştirilen analitik yöntemlere ait LOD değerleri 0,32-0,48 µg/mL, LOQ değerleri 0,97-1,44 µg/mL arasında bulunmuştur.

Metanol, %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamları için geliştirilen in vitro analiz yöntemlerinin kalibrasyon ve validasyon çalışmaları BOS'un miktar tayini için istenilen kesinliği, doğruluğu, tutarlılığı, özgünlüğü, geçerliliği ve güvenirliği sağlanmıştır.

5.2.2. Bosentanın in vivo miktar tayini yöntemi ve validasyonu

Literatürde BOS'un in vivo çalışmalara ait analizlerin metabolitleri nedeniyle daha hassas ayrım sağlayan LC-MS/MS ile yapıldığı görülmektedir (Ganz ve diğerleri, 2012; Parekh, Shah, Sanyal, Yadav ve Shrivastav, 2012; Tanaka ve diğerleri, 2017).

LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi sırasında iç standart olarak etadolak kullanılmıştır (Atila ve diğerleri, 2014). Sıçan plazma örneklerinde konsantrasyon ve pik alanı arasındaki ilişkinin 0,12 ng/mL-100 ng/mL aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir ($y=7,84896x+0,0101739$, $R^2=0,989$) (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.46). Yöntem validasyonu için stok çözelti kararlılığı, gün içi/günler arası doğruluk ve kesinlik, yöntem seçimliği, carry-over, matriks etkisi, dilüsyon doğruluğu parametreleri, kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı ve donma erime kararlılığı parametreleri FDA kılavuzuna göre değerlendirilmiştir (FDA, 2001).

Biyolojik örnekler için stok çözelti kararlılığı % BSS ve % SS değerlerinin FDA kılavuzuna göre %15'ten az olması gerekmektedir. Sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içinde ve uygun bulunmuştur (Çizelge 4.30). Gün içi/günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçlarında LLOQ değerlerinde; % BSS sonuçları ve % SS değerleri FDA kılavuzuna göre ±%20'den küçük, derişim değerlerinde ise % BSS ve % SS değerlerinin FDA kılavuzuna göre ±%15'ten küçük olması gerekmektedir. Sonuçların kılavuza göre uygun olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.31 ve 4.32). Yöntem seçimliği sonuçlarında herhangi bir girişim gözlenmemiş ve yöntemin özgünlük ve seçiciliği doğrulanmıştır. Carry-over (taşınma), matriks etkisi, dilüsyon doğruluğu, kısa süreli oda sıcaklığı ve donma erime kararlılığına ait sonuçların % BSS ve % SS değerleri ±%15'ten küçük ve uygun bulunmuştur. Yöntemin LLOQ değeri 0,015 ng/mL olarak belirlenmiştir.

5.3. SNEDDS Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

Lipit temelli formülasyonların kullanılması suda çözünürlüğü düşük (BCS Sınıf 2) ve lipofilik etkin maddelerin çözünürlüğünün arttırılmasında başarılı bir formülasyon stratejisi olarak kabul edilmektedir (Buya, Ucakar, Beloqui,

Memvanga ve Preat, 2020; Kansara ve diğerleri, 2015). Lipit bazlı sistemde etkin maddenin çözünmüş veya çözelti halinde olması, bağırsak epitelinden emilimini artırarak GİK boyunca hareket ederken büyük avantaj sağlar (Bari, Chella, Sanka, Shastri ve Diwan, 2015). Bu nedenle, BOS'un ilk aşamada lipit temelli SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncellikle SNEDDS hazırlanmasında kullanılan farklı bileşenlerdeki çözünürlüğü belirlenmiş, üçgen faz diyagramları oluşturulmuş ve deney tasarımı ile optimum formülasyonlara karar verilmiştir.

5.3.1. Yağlardaki çözünürlük çalışmaları

Etkin maddenin başarılı bir formülasyonunu elde etmek için SNEDDS'i oluşturan bileşenlerde yeterli çözünürlüğe sahip olması gerekir ve böylece seyrelme yoluyla nanoemülsifiye olduğu bağırsak ortamında ilaç çökmesinin önüne geçilir (AboulFotouh, Allam, El-Badry ve El-Sayed, 2017). İlacın yağda çözünürlüğü arttıkça hazırlanacak sistemde ilacın daha yüksek oranda yüklenmesi mümkün olmaktadır. Bu nedenle yağ seçimi SNEDDS formülasyonları için çok önemlidir (Zhang, Liu, Feng ve Xu, 2008). Tez çalışması kapsamında SNEDDS formülasyonunu oluşturmak için BOS'un orta zincirli trigliseritler, orta zincirli mono ve digliseritler, uzun zincirli yağ asitleri, uzun zincirli mono ve digliserit karışımları ve propilen glikol esterlerinde çözünürlük çalışması yapılmış ve sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.50 - 4.53). Yapılan çözünürlük çalışmaları uzun zincirli mono ve digliserit karışımlarında BOS çözünürlüğünün diğer gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir.

<u>Bosentan formülasyonları için yağ, sürfaktan ve kosürfaktanın belirlenmesi</u>

Yapılan çözünürlük çalışmaları sonucunda en yüksek çözünürlük gösteren grup olan uzun zincirli mono ve digliseritlerden Maisine® (19,75 ± 0,69 mg/mL) ve Peceol® (19,42 ± 2,12 mg/mL) yağ olarak seçilmiştir. Sürfaktan ve kosürfaktan seçiminde yapılan ön çalışmalar ve literatür araştırmaları yol gösterici olmuştur. Bir SNEDDS'deki bileşenlerin seçimi yalnızca çözünürlüğe değil, aynı zamanda kendiliğinden nanoemülsiyon geliştirilmesi için önemli bir faktör olan HLB değerleri ile de ilişkilidir. y/s emülsiyonu için bileşenlerin uygun HLB değeri 8 ile 18 arasında

olması gerekirken, HLB değeri 12 ile 15 arasında olan yüzey aktif maddelerin genellikle iyi bir kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğine sahip olduğu kabul edilir (Do Thi ve diğerleri, 2009). Bu nedenle SNEDDS formülasyonu için bileşenler seçilirken hem çözünürlük hem de HLB dikkate alınmıştır (Subramanian ve Siddalingam, 2017a).

Maisine® ve Peceol®'ün HLB değerlerinin 1 olması nedeniyle sürfaktan ve kosürfaktan olarak HLB değeri yüksek olan bileşenler tercih edilmiştir. Sürfaktan olarak yüksek emülsifikasyon ve düşük toksisite özelliği gösteren Cremophor® RH 40 (HLB=15) seçilmiştir. Cremophor® EL'nin bilinen toksisite ve yan etkilerinin aksine (Gelderblom, Verweij, Nooter ve Sparreboom, 2001; Jin ve diğerleri, 2020) Cremophor® RH 40, inert bir çözünürlük arttırıcı yardımcı maddedir ve sistemik etkinliği bulunmaz (Tayrouz ve diğerleri, 2003). Kosürfaktan olarak ise non iyonik özellik gösteren Labrasol® (HLB=14) seçilmiştir. Labrasol®'ün intestinal membrandaki sıkı bağlantı noktalarının açılmasını kolaylaştırdığı bu sayede intestinal absorpsiyonu artırdığı belirtilmektedir (Chavda ve Shah, 2017). Maisine® ve Peceol® iki farklı yağ olmak üzere geliştirilen iki formülasyonda aynı sürfaktan ve kosürfaktan çifti seçilmiştir.

5.3.2. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması

Üçgen faz diyagramı kendiliğinden nanoemülsiyonun meydana geldiği alanın belirlenmesinde ve bir SNEDDS formülasyonu için gereken en uygun içerik yüzdesinin belirlenmesinde önemlidir (Beg ve diğerleri, 2013). Kendiliğinden nanoemülsifiye olan bölgeler şeffaf izotropik bölgelerdir. Üçgen faz diyagramlarında taralı alan herhangi bir aktif madde içermeyen nanoemülsiyonun kendiliğinden oluştuğu ve su titrasyonu ile belirlendiği alanlardır (Akartas ve Karasulu, 2020).

Uzun zincirli mono ve digliserit karışımlarından oluşan Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için faz diyagramları başarılı bir şekilde oluşturulmuştur (Şekil 4.56 ve 4.57). SNEDDS formülasyonları için faz diyagramlarının oluşturulmasında aynı işlem basamakları uygulanmıştır. Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarda kullanılacak Maisine®/Peceol®, Cremophor® RH 40 ve

Labrasol®'ün karışabilirliğini saptamak amacıyla farklı sürfaktan: kosürfaktan (K_m) oranları denenmiştir. Denemeler sonucunda en uygun K_m oranı 9:1 olarak belirlenmiştir. Yağ damlacıklarını stabilize etmek, daha büyük yüzey alanı sağlayan küçük damlacık boyutları ve stabil formülasyonlar elde etmek için daha yüksek bir K_m oranı gereklidir (Agrawal, Kumar ve Gide, 2015). Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için yağ, sürfaktan, kosürfaktan yüzdeleri ise sırasıyla %10,11 - %80,90 - %8,99 olarak belirlenmiştir.

5.3.3. Deney tasarımı ile optimum formülasyonların bulunması

Deney tasarımı lipit temelli kendiliğinden emülsifiye sistemlerin geliştirilmesinde sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır (Kanwal ve diğerleri, 2019; Md ve diğerleri, 2021; Rasoanirina ve diğerleri, 2020).

Faz diyagramları oluşturularak deney tasarımı ile optimum formülasyonların geliştirilmesi için kritik bileşenler olan yağ (X_1), sürfaktan (X_2) ve kosürfaktan (X_3) miktarları bağımsız değişkenler olarak BBD için seçilmiş ve gerekli olan alt-üst değerleri tespit edilmiştir. Deney tasarımının bağımlı değişkenleri ise damlacık (*Y1*) büyüklüğü ve PDİ (*Y2*)'dir. Bağımlı değişken olarak seçilen damlacık boyutu ve PDİ, formülasyonun hedeflenen özellikte olup olmadığını gösteren en önemli karakterizasyon parametreleridir. Aşağıda sırası ile Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için BBD sonuçları ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

<u>Maisine® SNEDDS formülasyonu için BBD</u>

Bağımsız değişkenler olan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan miktarları Maisine® SNEDDS formülasyonunda alt ve üst değerler olmak üzere Maisine® için 0,9 - 2 g, Cremophor® RH 40 için 4,95 - 7,2 g, Labrasol® için 0,55 - 0,8 g'dır (Çizelge 4.44). Bağımlı değişken olan damlacık büyüklüğü ve PDİ'ne ait sonuçlar oluşturulan tasarım doğrultusundaki deneyler ile elde edilmiştir.

Damlacık büyüklüğü için Design Expert® programı tarafından önerilen matematiksel model lineer modeldir (Çizelge 4.45) (R^2=0,982). Modelde Maisine® (A) ve Cremophor® RH 40 (B) miktarı damlacık büyüklüğü cevabı için istatistiksel

olarak anlamlı etkiye sahiptir (Çizelge 4.46) ($p<0,0001$). SNEDDS'de sistemi oluşturan bütün bileşenlerin etkisi olduğu bilinmekle birlikte Maisine® için elde edilen üçgen faz diyagramında seçilen uç değerler dar olduğu için (Maisine®; *X1*; %9-15, Cremophor® RH 40; *X2*; %50-72), Labrasol®; *X3;* %5-8) (SNEDDS tanımında da yer alan sistemin yağ içeriğinin ≤%20, sürfaktan ve kosürfaktan içeriklerinin de %20-50 olmasından dolayı) (Feeney ve diğerleri, 2016) sistemde en az oranda yer alan kosürfaktan olarak kullanılan Labrasol® miktarındaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,2666$). Ayrıca yine seçilen uç değerlerin dar olması ile ilgili olarak matematiksel model Lineer bulunmuş ve program ikili etkileşimlere ait sonuçları vermemiştir.

Şekil 4.58 ve 4.59'daki grafikler incelendiğinde kosürfaktan olan Labrasol oranı 0,675 g olarak sabit tutularak istatistiksel olarak anlamlı çıkan ($p<0,0001$) Maisine® ve Cremophor® RH 40 miktarlarının damlacık büyüklüğü üzerine olan etkisi tek tek incelendiğinde; yağ olarak seçilen Maisine® miktarı azaldıkça, sürfaktan olarak kullanılan Cremophor® RH 40 miktarı arttıkça damlacık boyutunun küçüldüğü görülmüştür.

PDİ için BBD sonuçları incelendiğinde program tarafından önerilen matematiksel model Lineer modeldir (Çizelge 4.45) ($R^2=0,941$). Modelde yine Maisine® (A) ve Cremophor® RH 40 (B) miktarı PDİ cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahiptir (Çizelge 4.47) ($p<0,0001$). PDİ cevapları için de yukarıda damlacık büyüklüğü için anlatılan nedenlerden dolayı model lineer bulunmuş ve program ikili etkileşimlere ait sonuçları vermemiştir. Kosürfaktan olan Labrasol® oranı 0,675 g olarak sabit tutularak istatistiksel olarak anlamlı çıkan ($p<0,0001$) Maisine® ve Cremophor® RH 40 miktarları PDİ üzerine olan etkisi tek tek incelendiğinde; yağ olarak seçilen Maisine® miktarı azaldıkça, sürfaktan olarak kullanılan Cremophor® RH 40 miktarı arttıkça PDİ'nin küçüldüğü görülmüştür.

Damlacık boyutu ve PDİ için elde edilen sonuçlar ile model sonucu oluşan tahmini sonuçlar birbirine yakın ve anlamlı çıkmıştır (Şekil 4.62 ve 4.63).

Optimum formülasyonun elde edilmesinde hedeflenen karakterizasyon özellikleri damlacık boyutunun <100 nm ve PDİ'nin ise <0,2 olmasıdır. Deney tasarımından

en uygun sonucu veren hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri belirlenmiştir (Şekil 4.64). Formülasyon deney şartlarında, 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri olması gereken sınırlar arasında yer almaktadır (Çizelge 4.48). Hedeflenen karakterizasyon ölçütlerine göre seçilen optimum formülasyonun deneysel çalışmalar sonucunda damlacık boyutu 16,27 ± 0,49 nm ve PDİ'si 0,140 ± 0,044 olarak bulunmuş ve %95 güven aralığında istenilen aralıkta çıkmıştır.

Peceol® SNEDDS formülasyonu için BBD

Bağımsız değişkenler olan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan miktarları Peceol® SNEDDS formülasyonunda alt ve üst değerler olmak üzere Peceol® için 0,9 - 2 g, Cremophor® RH 40 için 4,5 - 7,2 g, Labrasol® için 0,5 - 0,8 g'dır (Çizelge 4.51). Bağımlı değişken olan damlacık büyüklüğü ve PDİ'ne ait sonuçlar oluşturulan tasarım doğrultusundaki deneyler ile elde edilmiştir.

Damlacık büyüklüğü için Design Expert® programı tarafından önerilen matematiksel model 2 FI'dır (Çizelge 4.52) (R^2=0,997). Modelde Peceol® (A), Cremophor® RH 40 (B), Labrasol® (C), Peceol® miktarı-Cremophor® RH 40 miktarı etkileşimi (AB) ve Peceol® miktarı-Labrasol® miktarı etkileşimi (AC) damlacık büyüklüğü cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahiptir (Çizelge 4.53) ($p<0,0001$). Şekil 4.65 ve 4.66'da modelin verdiği etkili bileşenlerin grafikleri incelendiğinde kosürfaktan olan Labrasol® oranı 0,675 g olarak sabit tutularak istatistiksel olarak anlamlı çıkan Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarlarının etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde, yağ olarak seçilen Peceol® miktarı azaldıkça sürfaktan olarak kullanılan Cremophor® RH 40 miktarı arttıkça damlacık boyutunun küçüldüğü görülmüştür. Şekil 4.67 ve 4.68'deki grafik incelendiğinde ise sürfaktan olan Cremophor® RH 40 oranı 5,85 g olarak sabit tutularak istatistiksel olarak anlamlı çıkan ($p<0,0001$) Peceol® - Labrasol® miktarlarının etkileşiminin damlacık büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde yağ olarak seçilen Peceol® miktarı azaldıkça etkisi göreceli olarak az olmakla birlikte kosürfaktan olarak kullanılan Labrasol®'un miktarı arttıkça damlacık boyutunun küçüldüğü görülmüştür.

PDİ için BBD sonuçları incelendiğinde program tarafından önerilen matematiksel model Kuadratik modeldir (Çizelge 4.52) (R^2=0,966). Modelde Peceol® (A), Cremophor® RH 40 (B) ve Peceol® miktarı-Cremophor® RH 40 miktarı etkileşimi (AB) PDİ cevabı için istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahiptir ($p<0,05$) (Çizelge 4.47). Şekil 4.69 ve 4.70'deki grafik incelendiğinde kosürfaktan olan Labrasol® oranı 0,65 g olarak sabit tutularak istatistiksel olarak anlamlı çıkan Peceol® - Cremophor® RH 40 miktarlarının etkileşiminin PDİ üzerine etkisi incelendiğinde yağ olarak seçilen Peceol® miktarı azaldıkça sürfaktan olarak kullanılan Cremophor® RH 40 miktarı arttıkça PDİ'nin küçüldüğü görülmüştür.

Damlacık büyüklüğü ve PDİ deney verileri ile matematiksel model sonucunda elde edilen tahmini veriler arasındaki ilişkinin korelasyon grafiği Şekil 4.71 ve 4.72'de görülmektedir. 100 nm altındaki formülasyonlarda PDİ için deney sonuçları ve tahmini sonuçlar yakın iken 100 nm üzerinde ilişki azalmaktadır.

Optimum formülasyonun elde edilmesinde hedeflenen karakterizasyon özellikleri damlacık boyutunun <100 nm ve PDİ'nin ise <0,2 olmasıdır. Deney tasarımından en uygun sonucu veren hedef formülasyonun bileşimi ve karakterizasyon özellikleri belirlenmiştir (Şekil 4.73). Çizelge 4.55'te formülasyonun deney şartlarında, 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri olması gereken sınırlar arasında yer almaktadır. Hedeflenen karakterizasyon ölçütlerine göre seçilen optimum formülasyon deneysel çalışmalar sonucunda damlacık boyutu 14,44 ± 0,21 nm ve PDİ'si 0,149 ± 0,008 olarak bulunmuş ve %95 güven aralığında istenen aralıkta olduğu görülmüştür.

5.3.4. Etkin madde yükleme çalışmaları

BBD ile geliştirilen optimum 1 g Maisine® SNEDDS formülasyonuna 30 mg ve 1 g Peceol® SNEDDS formülasyonuna 28 mg BOS yüklenmiştir. Bu miktarlar boş sistemlerin karakteristik özelliklerini bozmadan sistemlere yüklenebilecek en yüksek etkin madde miktarlarıdır.

5.4. SNEDDS Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon ve Stabilite Çalışmaları

5.4.1. Kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi

SNEDDS formülasyonlar GİS lümeninde salındığı zaman peristaltik aktiviteye bağlı GİS'te hafif çalkalama altında gastrointestinal sıvı ile nanoemülsiyon oluşturmak üzere tamamen ve hızlı bir şekilde dağılmalıdır (Balakumar ve diğerleri, 2013). Oluşan nanoemülsiyonun, gastrointestinal sıvılarda seyrelme ile fazların ayrılması ve faz ayrılmasını takiben çökme meydana getirmemesi önemlidir. Bu durum faz geçişine uğrayan suda çözünürlüğü zayıf olan etkin maddelerde daha belirgin olarak görülmektedir (Shakeel, Haq, Alanazi ve Alsarra, 2014). Bu durumun değerlendirilmesi için oral nanoemülsiyonların kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi yaygın olarak yapılmaktadır (Thakur, Singh, Sangamwar ve Bansal, 2017). Bu nedenle tez çalışması kapsamında kendiliğinden emülsifikasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için disperse olabilme ve kendiliğinden emülsifiye olma zamanı değerlendirilmiştir (Senapati ve diğerleri, 2016).

Disperse olabilme çalışmaları

SNEDDS formülasyonları mide-bağırsak sıvısı ile nanoemülsiyonlar oluşturmak için GİS lümeninde dağılır. Bu dağılabilirlik GİS koşulları altında tamamen ve hızlı bir şekilde gerçekleşmelidir. Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların disperse olabilme özellikleri Seviye A'dır (hızlı bir şekilde (1 dakika içinde) nanoemülsiyon oluşturur, berrak veya mavimsi bir görünüme sahiptir). Seviye A formülasyonlarının GİS'te nanoemülsiyonlar ürettiği bilinmektedir (Parmar, Singla, Amin ve Kohli, 2011) .

Kendiliğinden emülsifiye olma zamanı

Sistemin kendiliğinden emülsifiye olma özelliği şeffaf bir emülsifikasyon için geçen zamana göre değerlendirilebilir. Emülsifikasyon hızı sistemin kendiliğinden emülsifiye olmasının değerlendirilmesi için önemli bir parametredir (Agrawal ve

diğerleri, 2015). SNEDDS formülasyonları hafif bir çalkalama altında su ile seyrelmeye tabi tutulduğunda, ilacın çökme olmaksızın hızlı ve tamamen dağılması istenir (Prajapat ve diğerleri, 2017). Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların kendiliğinden emülsifiye olma süresi 1 dakikanın altında bulunmuş ve bu süre içerisinde şeffaf sistemler oluşturmuştur (Çizelge 4.58).

5.4.2. % Transmittans

Yüksek % transmittans değerleri küçük damlacık büyüklüğüne sahip şeffaf bir sistemin oluştuğunun ve dolayısıyla daha az saçılma olduğunun göstergesidir ve transmittans yüzdesi >%99 ise formülasyonun şeffaf olduğu kabul edilmektedir. Her bir formülasyonu ve formülasyonu oluşturan bileşenlere ait % transmittans değerleri Çizelge 4.59'da verilmiştir. Değerlendirilen etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların %99'ın üzerinde transmittans değerleri vermiş ve formülasyonların şeffaf olduğunu ve nanoemülsifikasyon etkinliği doğrulamıştır (A. Patel ve diğerleri, 2014).

5.4.3. Damlacık büyüklüğü ve PDİ

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemler sulu bir ortamla karşılaştığında hafif bir çalkalama ile nanoemülsiyonlar oluşturabilen kinetik olarak dayanıklı ilaç sistemleridir. SNEDDS'in suyla hafifçe karıştırılması, yağ ve sürfaktan karışımının suya eklenmesi sonucunda yağ ve su fazları arasında bir ara yüzey oluşur. Sürfaktan maddenin ara yüzeye nüfuz etmesi sonucunda ara yüzey bozulur ve damlacıklar oluşur. Sistemin kendiliğinden emülsifikasyon özelliği ne kadar iyi olursa, sistemde oluşan damlacıklar o kadar küçük olur. SNEDDS'in 20-200 nm arasında damlacık boyutlarına sahip olduğu çeşitli literatürlerde gözlenmiştir (Kohli ve diğerleri, 2010; Rao ve Shao, 2008; Villar ve diğerleri, 2012). Oluşacak olan nanoemülsiyonun damlacık büyüklüğü in vivo ilaç salım oran ve hızını belirlediği, küçük damlacık boyutunun yüzey alanın genişlemesi ve zayıf çözünürlüklü ilacın biyoyararlanımını arttırması nedeniyle kendiliğinden emülsifikasyon performansında önemli bir faktördür (Garg, Katare, Beg, Lohan ve Singh, 2016;

Gupta, Chavhan ve Sawant, 2011; Kassem, Mohsen, Ahmed ve Essam, 2016; Qureshi, Mallikarjun ve Kian, 2015).

PDİ standart sapmanın ortalama damlacık boyutuna oranıdır ve bu oran formülasyon içindeki damlacık büyüklüğünün tekdüzeliğini gösterir (Abdelbary, Amin ve Salah, 2013). PDİ değeri ne kadar yüksekse formülasyondaki damlacık boyutu o kadar heterojendir. PDİ'nin düşük değerleri ise seçilen sistemlerin partikül büyüklüğünün iyi bir dağılıma sahip olduğunu gösterir. PDİ (<0,1) homojen bir popülasyonu gösterirken, PDİ (>0,3) daha yüksek heterojen bir dağılımı işaret eder (Kallakunta ve diğerleri, 2012).

BOS yüklü Maisine® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü 17,11 nm PDİ'si 0,180 iken, BOS yüklü Peceol® SNEDDS formülasyonun damlacık büyüklüğü 16,76 nm PDİ'si 0,200 olarak bulunmuş ve sistem özelliklerini doğrulamıştır (Çizelge 4.60).

5.4.4. Damlacık büyüklüğü ve PDİ'ye pH ve sıvı hacminin etkisi

Farklı seyreltme koşullarında SNEDDS'in kendiliğinden emülsifikasyonu ile tekdüze nanoemülsiyonların oluşmasını sağlamak önemlidir (Gupta ve diğerleri, 2011). Emülsiyon oluşumu, üç bileşenin belli oranlarının bir fonksiyonu olmakla birlikte, mide barsak kanalındaki sıvı hacmi ve pH'sı kişiden kişiye değişir. Değişen pH ve sıvı hacimlerinde in vitro koşullarda emülsiyon oluşumu ve etkin maddenin çökmesi üzerine etkisinin araştırılması, in vivo uygulamada başarının sağlanmasına yardımcı olmaktadır (Balakumar ve diğerleri, 2013).

Farklı ortamların ve oranlarının SNEDDS'in seyreltme üzerindeki etkisi mide ortamını taklit için pH 1,2, bağırsak ortamını taklit için pH 6,8 fosfat tamponu ve distile su ile 100, 250 ve 500 kez seyreltilerek çalışılmıştır. Sonuçlar görsel değişim, sistemlerin damlacık büyüklüğü ve PDİ ile değerlendirilmiştir (Prajapat ve diğerleri, 2017).

Hem etkin madde içermeyen ve hem de BOS yüklü SNEDDS formülasyonlar için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.61 ve Çizelge 4.62'de verilmiştir. Farklı oranlardaki

farklı ortamların formülasyonların damlacık büyüklüğü ve PDİ üzerine etkisi olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Asidik veya alkali ortamda çökme gözlemlenmemiş, formülasyonlar seyrelme ile şeffaflığını korumuş ve SNEDDS'nin farklı koşullarda seyrelmeye karşı sağlamlığını göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlar in vivo olarak homojen bir ilaç salım profili elde edileceğini de desteklemiştir.

5.4.5. Türbidite ve viskozite

Türbidite değerleri SNEDDS karakterizasyonunda kullanılan bir diğer parametredir (Nazzal ve diğerleri, 2002b). Türbidite ölçümünde saçılan ışığın miktarı Rayleigh teorisine göre ölçülerek belirlenir (Pouton, 1985). Viskozite ise sıvı olarak kullanılacak SNEDDS formülasyonların fiziksel karakterizasyonunda önemli bir parametredir. Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonlarının türbiditesi sistemlerin şeffaf olduğunu ve türbidite değerlerinin damlacık büyüklüğü ile doğru orantılı sonuç verdiğini göstermiştir. Viskozite için kesin bir sayısal değer bulunmamakla birlikte, SNEDDS'in viskozitesi S-SNEDDS tablet elde edilmesi için uygun bulunmuştur (Çizelge 4.63 ve 4.64).

5.4.6. Termodinamik stabilite çalışmaları

Termodinamik stabilite çalışmaları, formülasyonların herhangi bir faz ayrımı ve etkin madde çökmesi olmaksızın çeşitli sıcaklık değişimlerine ve stres koşullarına olan termodinamik dayanıklılıklarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır (Kallakunta ve diğerleri, 2012; Kanuganti, Jukanti, Veerareddy ve Bandari, 2012).

Isıtma-soğutma, santrifüj ve dondurma-çözme stres koşullarında, formülasyonlarda herhangi bir çökelme ve faz ayrımı gözlenmemiştir. Tez çalışmasında önce etkin madde içermeyen SNEDDS formülasyonlarının, daha sonra BOS yüklü SNEDDS formülasyonlarının termodinamik stabilitesi doğrulanmıştır. Fiziksel değerlendirmenin yanında formülasyonlar distile su ile 250 kat seyreltilmiş ve damlacık boyutu ve PDİ değerleri bulunmuştur. Çalışma öncesi ve sonrası sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.65, 4.66 ve 4.67).

5.4.7. Morfolojik analiz

Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların yapısal ve morfolojik analizi TEM ile gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma ile nanoemülsiyonların oluştuğu, damlacık büyüklüğünün 10-100 nm arasında küresel şekle sahip olduğu ve etkin madde yüklemesi ile yapısal bütünlüklerinin bozulmadığı gözlenmiş ve Malvern Zeta Sizer ile ölçülen damlacık boyutlarının büyüklükleri TEM görüntüleri üzerinde ImageJ 1.53o programı ile doğrulanmıştır (Resim 4.5 - 4.8).

5.4.8. Uzun dönem stabilite çalışmaları

Etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların stabiliteleri 6 aylık bir süre için değerlendirilmiştir. Uzun süreli stabilite çalışmaları sırasında etkin madde içermeyen ve BOS yüklü SNEDDS formülasyonların fiziksel görünümü değişmemiş ve hiçbir bulanıklık veya çökelme belirtisi olmadan berrak kalmıştır. Formülasyonlar için 0, 1, 3 ve 6. aylarda tüm saklama koşullarında incelendiğinde damlacık boyutu ve PDİ sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Çizelge 4.68) ($p>0,05$). Bu sonuçlara göre hem etkin madde içermeyen hem de BOS yüklü SNEDDS formülasyonları uzun süreli (25±2°C/60±5 BN) ve hızlandırılmış (4°C ve 40±2°C/75±5 BN) stabilite koşullarında 6 ay için stabil bulunmuştur.

5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları – I

İlaç geliştirme sürecinde formülasyon faktörlerinin biyoyararlanım üzerine etkisini tanımlamak için in vitro çözünme hızı çalışmaları sıklıkla kullanılmaktadır. SNEDDS formülasyonlarda yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarında diyaliz membran (Inugala ve diğerleri, 2015; Kang ve diğerleri, 2004) ya da kapsül (Hong, Kim, Song, Park ve Kim, 2006; Syukri ve diğerleri, 2018) kullanılabilmektedir. Tez çalışması kapsamında SNEDDS formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları formülasyonların 00el sert jelatin kapsüllerin içerisine konulması ile yapılmıştır.

BOS pH'ya bağımlı çözünürlük nedeniyle GİS pH'sında (pH 1,2-6,8) tam olarak çözünmemektedir. İlacın pH ve pK_a değeri ile ilgili olan zayıf bir asidin iyonlaşma derecesi, doygun çözünürlüğünü ve dolayısıyla çözünme hızı ve derecesini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle ilaç GİS boyunca ilerledikçe değişen pH'ya bağlı olarak ilacın doymuş çözünürlük, çözünme hızı ve çözünme oranı değişebilir. pH, viskozite, farklı tampon tipleri ve konsantrasyonları, osmolalite ve yüzey gerilimine sahip biyouyumlu ortamlar, klasik ortam sorunlarının üstesinden gelmek için geliştirilmiştir ve in vivodaki performansı tahmin etmek için daha uygundur. Klasik çözünme hızı ortamları, BCS Sınıf 2 gibi az çözünen ilaçların çözünme hızlarının ve çözünürlüğünün değerlendirilmesi için temel bilgiler sağlamasına rağmen fizyolojik koşulların değerlendirilmesi için yetersizdir ve klasik farmakope ortamları yerine biyouyumlu ortamların kullanılması daha iyi sonuçlar vermektedir (Klumpp ve diğerleri, 2020; Mudie, Samiei, Marshall, Amidon ve Bergstrom, 2020). Bu nedenle, in vitro çözünme hızı çalışmaları FDA tarafından çözünme hızı ortamı olarak önerilen %1 SLS içeren distile suyun yanında in vivoyu daha iyi taklit ettiği düşünülen FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 biyouyumlu ortamlarında da gerçekleştirilmiştir.

%1 SLS içeren distile su çözünme hızı ortamı için Bölüm 4.5'te verilen referans tablet, Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarının bağıl sink koşul değerleri (C_S/C_D) 3'ten büyük bulunmuş ve sink koşulu sağladığı doğrulanmıştır (Incecayir, Olgac, Usta ve Teksin, 2021; USP, 2007).

Referans tablet, Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonları için FDA tarafından çözünme hızı ortamı olarak önerilen %1 SLS içeren distile su ortamında % kümülatif çözünen etkin madde miktarı için anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.69 ve Şekil 4.78).

BOS SNEDDS formülasyonları içinde tamamen çözünmüş halde bulunurken, referans tabletten BOS'un çözünmesi ortamda kullanılan SLS'nin birden fazla mekanizma ile çözünürlük üzerine etki etmesi ile ilişkilendirilmiştir. SLS yüksek çözünürlük potansiyeline sahip anyonik bir yüzey aktif maddedir ve suda az çözünen ilaçların suda çözünürlüğünü artırmak için oral formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Ng ve diğerleri, 2016). Distile suya %1 SLS ilave edildiğinde

ortamının pH'sı yaklaşık 8 olmaktadır (Paaver ve diğerleri, 2012). pH'daki bu artış çözünürlüğü pH bağımlı olan zayıf asidik özellikli ilaçların alkali ortamlarda çözünürlüğünün artması ile sonuçlanmıştır. Literatürde ibuprofen, nimesulid ve mefenamik asit gibi diğer asidik ilaçlar için de benzer sonuçlar gösterilmiştir (Park ve Choi, 2006). SLS sürfaktan özellikli bir yardımcı madde olup, etkin maddenin yüzeyine absorbe olarak ıslanabilirliğini arttırarak da çözünürlüğe katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca SLS'nin kritik misel konsantrasyonun (%0,2-0,3) üzerinde bir konsantrasyonda kullanılması miseller oluşumuna, böylelikle miseller yapı içinde de BOS'un çözünürlüğünün artmasına yardımcı olmaktadır (Barreiro-Iglesias, Alvarez-Lorenzo ve Concheiro, 2003).

Referans tablete kıyasla Maisine® SNEDDS formülasyonu % kümülatif çözünen BOS miktarını FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2'de sırasıyla 3,0, 7, 97, 4,23 ve 4,94 kat; Peceol® SNEDDS formülasyonu ise 2,98, 7,88, 3,84 ve 4,37 kat artırmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.69 ve 4.73). Referans tablete kıyasla geliştirilen SNEDDS formülasyonlar tokluk koşullarında (FeSSIF ve FeSSIF-V2) açlık koşullarına göre (FaSSIF ve FaSSIF-V2) % kümülatif çözünen BOS miktarını daha fazla arttırmıştır. FaSSIF ve FaSSIF-V2 ile FeSSIF ve FeSSIF-V2 arasındaki farklar ise anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Elde edilen tüm karakterizasyon verilerinden hareketle geliştirilen SNEDDS formülasyonlardan Maisine® SNEDDS formülasyonu sıvı sistem olarak sonraki çalışmalar için seçilmiştir.

5.6. S-SNEDDS Tablet Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

SNEDDS'ler kimyasal olarak stabil olmaması, ilaçların çökmesi, kapsül yaşlanması, yardımcı madde-kapsül uyumsuzluğu, kapsülden sızma, taşınabilirlik, GI tahriş ve yüksek üretim maliyetleri gibi dezavantajlara sahiptir (Choi ve diğerleri, 2021; Patel ve diğerleri, 2016). Bu dezavantajların üstesinden gelmek için SNEDDS sistemin adsorban Neusilin® US2 kullanılarak tablet şekline getirilmesi amaçlanmıştır. Neusilin® US2 sahip olduğu gözenekli yapısı nedeniyle geniş bir yüzey alanına sahip, yağları adsorbe etme kapasitesi yüksek ve lipit temelli formülasyonları adsorbe etmek için sıklıkla kullanılan silika türevi bir adsorbandır

(Gumaste, Freire ve Serajuddin, 2017). SNEDDS Neusilin® US2 kullanılarak ve adsorpsiyon yöntemi ile SNEDDS toz S-SNEDDS haline getirilmiştir. Yapılan bu katılaştırma işlemi formülasyon kolaylığı, yüksek yağ yükleme kapasitesi ve daha düşük maliyet gibi birçok avantaja sahiptir (Beg ve diğerleri, 2016). S-SNEDDS sulu ortamda 200 nm'den küçük damlacık boyutlarına sahip y/s nanoemülsiyonlar oluşturur (Kang, Oh, Oh, Yong ve Choi, 2012). Bu nanoemülsiyon damlacıkları, artan ve tekrarlanabilir bir biyoyararlanım ile sonuçlanan, ilaç absorpsiyonu için geniş bir ara yüzey alanı sağlar (Kang ve diğerleri, 2012). Tez çalışması kapsamında tablet formülasyonu geliştirilebilmesi için elde edilen farklı oranlardaki BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 karışımlarının toz özellikleri incelenmiş ve katı hal karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.6.1. S-SNEDDS için toz özelliklerinin incelenmesi

Bir S-SNEDDS formülasyonu geliştirilmesinde en büyük zorluk iyi akış özelliklerine sahip bir toz kütlesi elde etmektir. Toz akışı, tek bir parametre ile karakterize edilemeyen, farklı faktörlerden etkilenen kompleks bir özellik olduğundan S-SNEDDS akışkanlığını değerlendirmek için küme dansitesi, sıkıştırılmış dansite, yığın açısı, Carr indeksi ve Hausner oranı belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

Toz özelliklerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi ise Avrupa Farmakopesi 8.0 Bölüm 2.9.34 ve 2.9.36'ya göre gerçekleştirilmiştir. Küme ve sıkıştırılmış dansite sonuçları başlangıç ve 12. ay için değişkenlik göstermemiştir. Yığın açısı 25°-40° arasında olan tozlar kabul edilebilir akış potansiyeline sahipken, 25°'ye yakın açılara sahip tozlar çok iyi akış özelliklerine karşılık gelir. %5 ile %18 arasında bir Carr indeksine sahip tozlar tabletleme için uygundur ve Hausner oranı 1,25'in altında olanlar iyi akışkanlığa sahiptir. Tüm bu toz özellikleri incelendiği zaman BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2'nin 1,25:1 oranı için elde edilen sonuçlar hem başlangıç hem 12. ay için uygun bulunmuştur. S-SNEDDS toz kütlelerinin stabilitesi 4°C, 25±2°C/%60±5 BN ve 40±2°C/%75±5 BN olmak üzere farklı saklama koşulu altında 1, 3, 6 ve 12. ay için değerlendirilmiştir. Üç paralel olarak hazırlanan toz kütlelerinde toz özellikleri ve fiziksel özellikler açısından herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

5.6.2. S-SNEDDS tozun katı hal karakterizasyonu

SEM görüntüleme

BOS, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen S-SNEDDS (1:1, 1.25:1, 1.5:1) ve BOS yüklü S-SNEDDS (1:1, 1.25:1, 1.5:1) örneklerinin şekil ve yüzey özellikleri araştırılmıştır. Resim 4.12'de görülebileceği gibi, BOS düzensiz şekilli kristaller veya pürüzlü yüzey özelliklerine sahipken, Neusilin® US2'nin yüzeyi pürüzsüz küresel partiküller olarak görüntülenmiştir (Resim 4.13). Etkin madde içermeyen S-SNEDDS (1:1, 1.25:1, 1.5:1) ve BOS yüklü S-SNEDDS (1:1, 1.25:1, 1.5:1) örneklerinde Neusilin® US2 pürüzsüz yüzey özelliklerini ve küresel yapısını korumuştur (Resim 4.14 - 4.19). BOS yüklü S-SNEDDS tozların hiçbir oranında adsorbanın yüzeyinde ilaç kristali gözlenmemiştir. Bu durum BOS'un SNEDDS içinde çözündüğünü ve SNEDDS'in Neusilin® US2'nin porları içine adsorbe olduğunu kanıtlamıştır.

DSC analizi

Formülasyonlardaki etkin maddenin durumu hakkında kalitatif bilgi elde etmek için DSC tekniği kullanılmıştır. BOS erime noktası olan 115°C'de endotermik bir pik gösterir. Tablet formülasyonunda kullanılacak olan yardımcı maddelerin, etkin madde içermeyen S-SNEDDS ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarının DSC termogramları Şekil 4.83 - 4.86'da verilmiştir. BOS'un yardımcı maddelerle etkileşim göstermediği, etkin maddeye ait endotermik spesifik pikin fiziksel karışımlarda korunduğu, hazırlanan sistemlerde ise Neusilin® US2'nin porları içine tam olarak yüklendiği, adsorbanın yüzeyinde BOS içeren SNEDDS'in bulunmadığı ve etkin maddeye ait pikin görülmediği tespit edilmiş ve literatürde yapılan farklı etkin maddelere ait S-SNEDDS çalışmalarının DSC sonuçlarının da benzer olduğu bulunmuştur (Abd-Elhakeem, Teaima, Abdelbary ve El Mahrouk, 2019; Radwan, ElMeshad ve Shoukri, 2017).

FT-IR analizi

BOS ile Neusilin® US2, Maisine® SNEDDS ve tablet formülasyonunda kullanılacak olan yardımcı maddeler arasındaki geçimlilik FT-IR analizleri ile değerlendirilmiştir. BOS'a ait karakteristik -OH tekli bağı 3625 cm^{-1}, N-H bağları 3317 cm^{-1}, aromatik halkadaki -CH bağları 2900-3100 cm^{-1} aralığında, aromatik halkadaki C=C bağı 1558 cm^{-1}, S=O bağı 1340 cm^{-1}, ikincil -C-O bağı 1169 cm^{-1} ve birincil -C-O bağı 1071 cm^{-1} bantlarında gözlenmiştir (Bölüm 5.1) (Krupa, Majda, Mozgawa, Szlek ve Jachowicz, 2017). Şekil 4.87 - 4.94'te verilen spektrumlar incelendiğinde, etkin maddeye ait spesifik bantların korunduğu ve Neusilin® US2, sıvı SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyon bileşenleri ile etkileşmediği tespit edilmiştir. Başarılı bir S-SNEDDS formülasyonu geliştirilebilmesi için etkin madde ile kullanılan yardımcı maddelerin etkileşim göstermemesi gerektiği açıktır (Bhagwat ve diğerleri, 2021).

X-RPD analizi

BOS, Neusilin® US2, etkin madde içermeyen ve BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarının kristal özellikleri X-RPD ile araştırılmıştır. BOS'un 2θ'da 9,28°, 15,52°, 16,72° ve 18,63° ana açılarında belirgin ve güçlü kırınım pikleri ile kristal yapısı doğrulanmıştır (Bölüm 5.1) (Hanna ve diğerleri, 2017). Neusilin® US2 amorf yapısını doğrulayan belirgin kırınım piki göstermemiştir (Dangre, Tattu, Borikar, Surana ve Chalikwar, 2021). BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonlarında da karakteristik BOS kırınım pikleri olmaması benzer çalışmalarda da gözlemlendiği gibi etkin maddenin kristal yapısını kaybederek amorf forma geçtiğini SNEDDS içerisinde tamamen çözündüğünü ve başarı ile adsorbana yüklendiğini göstermiştir (Kim ve diğerleri, 2021; Vithani, Hawley, Jannin, Pouton ve Boyd, 2018; Zafar ve diğerleri, 2019).

BET analizi

BET sonuçlarına göre Neusilin® US2 porozitesi %19 ve gözenek çapı yaklaşık 12,3 nm (1,227E+02 Å ~ 12,27 nm) olarak literatür ile uyumlu bulunmuştur (Gumaste ve Serajuddin, 2017) (Çizelge 4.80). Etkin madde içermeyen S-SNEDDS formülasyonları için (1:1, 1,25:1 ve 1,5: 1) gözeneklilik sırasıyla %16,

13 ve 4; BOS yüklü S-SNEDDS formülasyonları için (1:1, 1,25:1 ve 1,5: 1) gözeneklilik sırasıyla %10, 8 ve 7 bulunmuştur. Por çapı, yüzey alanı ve mikro gözenek hacmi sonuçları adsorban oranı sabit olduğundan, adsorbana adsorbe ettirilen formülasyon miktarı arttıkça por gözenek çapının, gözenekliliğin ve mikro gözenek hacminin azaldığını ve adsorpsiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

5.6.3. S-SNEDDS tablet basımı

Mikromeritik özellikler (küme ve sıkıştırılmış dansite, yığın açısı, Carr indeksi, Hausner oranı) ve katı hal karakterizasyon (SEM, DSC, FT-IR, X-RPD ve BET) çalışmaları sonucunda en uygun sistem olarak BOS yüklü Maisine® SNEDDS: Neusilin® US2 1,25:1 oranı seçilerek doğrudan basım yöntemi ile tabletler başarı ile elde edilmiştir.

5.6.4. S-SNEDDS toz ile geliştirilen tablet formülasyonunda yapılan kontroller

Geliştirilen tabletler için sertlik (152 N), çap-kalınlık (11,1 mm-8,9 mm), ağırlık sapması, ufalanma-aşınma (%0,001), dağılma süresi (23 dakika), içerik tek düzeliği (%103) değerlendirilmiş ve tüm sonuçlar Avrupa Farmakopesi 8.0 spesifikasyon limitlerine göre kabul edilen aralıkta bulunmuştur.

Geliştirilen formülasyonların 4°C, 25±2°C/60±5 BN ve 40±2°C/75±5 BN'de 12 ay boyunca hem fiziksel hem de kimyasal olarak stabilitesi incelenmiştir. 4°C ve 25±2°C/60±5 BN stabilitesinde BOS yüklü S-SNEDDS tabletlerinin fiziksel görünümleri, bütünlükleri ve BOS içerikleri (Çizelge 4.84) bakımından 12 aylık süreçte stabil bulunmuştur. 40±2°C/75±5 BN stabilite koşulu için tabletlerde çok hafif bir sararma (SNEDDS'in yüzeye taşınması nedeni ile) meydana gelmiş, % BOS içeriği 12. ay hariç limitler içinde kalmıştır (%85-115).

<u>Rekonstitüsyon çalışması</u>

Geliştirilen S-SNEDDS tabletler su ile rekonstitüye edildikten sonra (başlangıç ve 12 aylık 25±2°C/60±5 BN stabilitesi için) damlacık boyutu ve PDİ açısından

değerlendirilmiş BOS yüklü SNEDDS'e kıyasla tabletlerden meydana gelen damlacıkların, boyutlarında değişiklik olmadığı ve tabletleme işleminin damlacık boyutu ve dağılımı üzerine önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Bölüm 4.6.4).

5.7. Referans Tablette Yapılan Kontroller

Referans tablet için sertlik (32 N), çap-kalınlık (5,1 mm-4,1 mm), ağırlık sapması, ufalanma-aşınma (%0,001), dağılma süresi (1,2 dakika), içerik tek düzeliği (%90) değerlendirilmiş ve tüm sonuçlar Avrupa Farmakopesi 8.0 spesifikasyon limitlerine göre kabul edilen aralıkta bulunmuştur.

5.8. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları – II

İn vitro çözünme çalışmaları ve kullanılan ortamların öneminden Bölüm 5.5'te ayrıntılı olarak bahsedilmiş, bu bölümde geliştirilen S-SNEDDS tabletlerin in vitro çözünme hızı çalışma sonuçlarına ait veriler tartışılmıştır.

Referans tablet, BOS yüklü Maisine® SNEDDS ve BOS yüklü S-SNEDDS tabletin %1 SLS içeren distile su, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı sonuçları Çizelge 4.88 - 4.92'de, çözünme hızı profilleri ise Şekil 4.103 - 4.107'de verilmiştir. FDA tarafından önerilen %1 SLS içeren distile suda % kümülatif çözünen BOS miktarı referans tablet ve SNEDDS'de benzer bulunurken, S-SNEDDS tablet %100'e ulaşamamış ve aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Biyouyumlu ortamlarda ise SNEDDS ve S-SNEDDS tabletten % kümülatif çözünen BOS miktarı referans tablete kıyasla FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2'de sırasıyla Maisine® SNEDDS için 3,0, 7, 97, 4,23 ve 4,94 kat; S-SNEDDS tablette 2,47, 7,49, 3,70 ve 4,39 kat arttırmıştır ve artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak yine bu ortamlarda da % kümülatif çözünen BOS miktarı %100'e ulaşamamıştır.

Çözünme hızı çalışmamızda ve literatürde yapılan diğer çalışmalarda % kümülatif çözünen etkin madde çıkışının yavaş olduğu ve çalışma sonunda %100'e ulaşamadığı görülmektedir (Ito ve diğerleri, 2005; Mandic ve diğerleri, 2021; Van Speybroeck ve diğerleri, 2011). Bu durum S-SNEDDS'ler için birden fazla

mekanizma ile açıklanabilmektedir. Bunlardan ilki Neusilin® US2'den desorbsiyonu etkileyen yüklenen lipit temelli sistem içeriğinin, çözünme hızı için kullanılan ortamın ve ilacın (asidik, bazik ya da nötral gibi) tipi ile ilgili kompleks bir süreci içermesi olduğu ileri sürülmüştür (Williams, Van Speybroeck, Augustijns ve Porter, 2014). Ancak, ilacın ve adsorbanın iyonizasyonu ile ilişkili davranışların daha anlaşılabilir olduğu görülmektedir. Neusilin® US2'nin asidik koşullarda yüzeydeki silanol gruplarının protonasyonu nedeniyle ağırlıklı olarak pozitif yüklü olduğu, alkali koşullarda ise silanol gruplarının deprotonasyonu nedeniyle negatif yüklendiği bilinmektedir (Goyne ve diğerleri, 2002; Jara, Goldberg ve Mora, 2005). BOS zayıf asidik bir etkin madde olmasından dolayı alkali ortamlarda negatif yüklenmekte ve alkali ortamda negatif yüklenen Neusilin® US2'den desorbsiyonu kolaylaşmaktadır. İlaç desorbsiyonuna ait elektrostatik etkileşim ile ilgili benzer sonuçlar mezogözenekli silika malzemeler üzerinde adsorbe edilen zayıf asidik ilaçlar için daha önce rapor edilmiştir (Van Speybroeck ve diğerleri, 2011). %1 SLS içeren ortamın pH'sı yaklaşık 8, FaSSIF-FaSSIF-V2 pH'sı 6,5, FeSSIF pH'sı 5,0 ve FeSSIF-V2 için pH'sı 5,8'dir. BOS'un zayıf asidik özelliği göz önüne alındığında Neusilin® US2'den desorbsiyonu pH arttıkça artacaktır ki elde edilen sonuçlarla (Çizelge 4.88 - 4.92) bu durum doğrulanmıştır. BOS'un adsorbandan çözünme ortamında desorbe olması benzer özellik gösteren çözünme ortamlarından asidik özellik gösteren etkin maddelerin daha az etkilemesinden dolayı FaSSIF ve FaSSIF-V2 ile FeSSIF ve FeSSIF-V2 arasındaki sonuçlar yakın ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Williams ve diğerleri, 2014) ($p>0,05$).

Yavaş ve tamamlanmamış ilaç salımının diğer bir nedenin gözenekli bir yapıya sahip olan Neusilin® US2'nin gözenek çapının küçük (yaklaşık 15 nm) olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Christophersen ve diğerleri, 2014; Gumaste ve diğerleri, 2017). Tez çalışması kapsamında yapılan BET analizi ile Neusilin® US2'nin yaklaşık 12 nm gözenek çapına sahip olduğu doğrulanmıştır (Bölüm 4.6.2). SNEDDS'in su ile temastan sonraki damlacık boyutu yaklaşık 17 nm olduğundan adsorbanın gözeneklerinden çıkması zorlaşmaktadır. Ayrıca Maisine® SNEDDS Neusilin® US2'ye yeni yüklendiğinde adsorbanın makro gözenekli alanında tutulmaları ve dispersiyon ortamıyla temas ettikten sonra emülsifikasyon için kolayca hidrate olması çok olasıdır. Ancak zamanla bu lipit formülasyonları Neusilin® US2'nin mezogözeneklerine daha derine nüfuz edebilmekte ve bu da

emülsifikasyonun gecikmesine ve dolayısıyla formülasyonlardan düşük ilaç salımına neden olabilmektedir (Krupa ve diğerleri, 2015).

Yavaş ve tamamlanmamış etkin madde çıkışına rağmen geliştirilen S-SNEDDS tablet formülasyonunda artan % kümülatif çözünen BOS miktarı kendiliğinden oluşan nanoemülsiyon sonucunda damlacık boyutunun küçük olması ve yüzey alanının genişlemesi sonucunda gerçekleşmektedir. Referans tablete göre geliştirilen S-SNEDDS tablet formülasyonu ile artan çözünürlük ve çözünme hızının etkin maddenin daha yüksek emilim ve daha yüksek oral biyoyararlanım göstermesine olanak sağlayacağı açıktır.

DDSolver® ile elde edilen model bağımsız f_2 benzerlik faktörü sonuçları Maisine® SNEDDS için %1 SLS içeren distile su ortamı için f_2 değeri 63 ile benzer bulunurken FaSSIF(f_2)=11, FeSSIF(f_2)=9, FaSSIF-V2(f_2)=9 ve FeSSIF-V2(f_2)=7; S-SNEDDS tablet için %1 SLS(f_2)=31, FaSSIF(f_2)=24, FeSSIF(f_2)=14, FaSSIF-V2(f_2)=15 ve FeSSIF-V2(f_2)=13 ile benzer bulunmamıştır. Yine DDSolver® ile elde edilen referans tablet ve S-SNEDDS tabletler için gerçekleştirilen model bağımlı değerlendirmede determinasyon katsayısı (R^2adj), model seçim kriteri (MSC) ve Akaike bilgi ölçütü (AIC) kullanılmıştır. R^2adj ve MSC'nin yüksek ve AIC'nin düşük olduğu model en uygun model olarak belirlenmiştir.

Modele bağlı sonuçlar tüm ortamlarda referans tablet ve S-SNEDDS tabletleri için farklılık göstermiştir (Çizelge 4.95). Ancak uyarlanan modellerde model parametreleri incelendiğinde çözünme ve zaman (α) ve şekil (β) faktörlerinin hemen hemen tüm sonuçlar üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Farklı ortamlar için modeller arasındaki farkın referans tablet için pH'ya bağlı düşük çözünürlükten; S-SNEDDS tableti için yine ortamın farklı pH'sına bağlı olarak SNEDDS'in Neusilin® US2'den desorpsiyon mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.9. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

İn vitro çözünme hızı çalışmaları % çözünen madde miktarı hakkında bilgi verirken; lipitlerin sindirimi, emilen kısmı, misel karışımları ve bunların çözünürlük üzerindeki etkileri hakkında bilgi vermemektedir. Çözünme hızı ortamına lipit

sindirim enzimleri eklemek yerine, bu tür lipit temelli sistemler için in vitro lipoliz çalışmalarının yapılması bu nedenle daha uygun bulunmaktadır. Bu şekilde NaOH ile sindirim sonucunda açığa çıkan yağ asitlerinin titrasyonu ile lipoliz hızı ve oranı belirlenebilmektedir (Williams ve diğerleri, 2012).

SNEDDS'ler oral olarak uygulandığında duodenumda pankreatik lipaz tarafından hidrolize olma eğilimindedir, bu durum sindirimin bir sonucu olarak çözücü kapasitelerini kaybetmelerine ve bu da ilaç çökmesine yol açabilir. Bu çalışma kapsamında sindirim etkisini görmek için biyouyumlu ortamlar lipoliz ortamı olarak kullanılmış, lipoliz numuneleri fazlara ayırmak için santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası pellet ve sulu faz olarak iki faz oluşmuştur. Pellet faz çöken ilaç moleküllerini ve yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarını içerirken, etkin maddeler sulu fazda karışık miseller, veziküller ve sıvı kristal fazlarda bulunabilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2014). Lipoliz çalışmasında etkin madde veziküller ve miseller içeren sulu fazda çözünmüş halde bulunduğundan ilacın absorpsiyon için uygun olduğu varsayılır ve sulu fazdaki ilaç içeriğinin belirlenmesi için önem arz eder (Berthelsen, Klitgaard, Rades ve Mullertz, 2019). İn vitro lipoliz çalışmalarında absorpsiyon için uygun olduğu düşünülen sulu fazdaki ilaç miktarının formülasyonun in vivo performansını tahmin etmede de daha başarılı olduğu görülmüştür (Chatterjee ve diğerleri, 2016; Dahan ve Hoffman, 2007).

FaSSIF ve FaSSIF-V2'de yapılan lipoliz çalışmasında referans tabletin lipolizi sırasında ise ilacın büyük bir kısmı çökmüş BOS miktarının %7,1'i FaSSIF lipoliz ortamında, %6,0'sı FaSSIF V2 lipoliz ortamında çözünür halde bulunmuştur (Şekil 4.108, 4.109 ve 4.112). SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlar ise BOS'u sulu fazda çözünmüş olarak muhafaza edebilmiştir. Sulu fazdaki BOS miktarına göre referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının FaSSIF ve FaSSIF-V2 sonuçları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). BOS'un SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonlar için sulu fazda çözünmüş olması misel ve vezikül oluşumu ile açıklanabilir. SNEDDS formülasyonları mono-, di- ve trigliserit karışımından oluşan Maisine® ve pankreas lipaz substratları olan açilgliserol ve PEG esterlerinin karışımından oluşan Labrasol® içermektedir (Fernandez ve diğerleri, 2013; Sek, Porter, Kaukonen ve Charman, 2002). Bu bileşenlerin pankreatin enzimi ile sindirimi sonucu oluşan yağ asidi ve monogliseritin FaSSIF

ve FaSSIF-V2 ortamlarının içeriğinde bulunan fosfolipit ve safra tuzları ile karışık misel ve veziküller oluşturması sayesinde bu kolloidal fazların BOS'u çözünür halde tutabildiği düşünülmektedir (Berthelsen ve diğerleri, 2019; Vithani, Jannin, Pouton ve Boyd, 2019). Oluşan kolloidal fazlar çözünmüş halde bulunan BOS için hem taşıyıcı hem de depo görevi sağlamaktadır. Yağlı bileşen içermeyen referans tablet ise misel ve vezikül oluşumunu destekleyemediği için BOS'u çözünür halde tutamamış ve bu durumun yüksek miktarda ilacın çökmesine yol açtığı gözlemlenmiştir. Açlık ortamında yapılan lipoliz çalışmasında referans tablete kıyasla sulu fazda yaklaşık 10 kat daha fazla çözünmüş BOS sağlayabildiği için SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının in vivo performansının daha yüksek olacağı düşünülmektedir.

Tokluk lipoliz ortamlarında hem SNEDDS hem de S-SNEDDS tablet formülasyonu için % sulu faz BOS miktarı azalma eğilimi göstermiş ve açlık ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). BOS miktarında görülen azalmaya ait bu sonuç farklı şekillerde açıklanabilir. Bunlardan ilki enzim aktivitesidir. Açlık durumu lipoliz çalışmaları pH 6,5'te gerçekleştirilirken, tokluk durumu lipoliz çalışmaları pH 6,5'ten daha düşük pH'larda gerçekleştirilmiştir. FeSSIF ortamı için pH değeri 5 iken FeSSIF-V2 için pH değeri 5,8'dir. Pankreatin lipaz enziminin aktivitesi pH bağımlıdır ve optimum aktiviteyi pH 6,5-8 arasında göstermektedir (Larsen ve diğerleri, 2011). Çalışılan tokluk ortamlarında optimum pH değeri sağlanamadığından SNEDDS formülasyonunun sindirimi gerçekleşememiştir. Kolloidal yapıların oluşumu sindirim sonucu açığa çıkan yağ asidi ve monogliseritler ile desteklenemediği için sulu faz BOS miktarı azalma eğilimi göstermiştir. Diğer bir durum ise Cremophor® RH 40'ın sindirilmeyen bir sürfaktan olduğu ve lipolitik enzim aktivitesini inhibe etmesi ile ilgilidir. Literatürde bulunan çalışmalar Cremophor® RH 40'ın sindirim kapasitesinin %7,5 olduğunu, Cremophor RH® 40 ve sindirilemeyen sürfaktanların lamellar fazın oluşumunu engellemediğini ancak geciktirdiğini göstermiştir (Cuine ve diğerleri, 2008; Lv ve diğerleri, 2018; Vithani, Hawley, Jannin, Pouton ve Boyd, 2017). Bu nedenle kolloidal yapıların (SNEDDS sindirimi sonucu oluşan serbest yağ asitleri ve fosfolipitler sonucu oluşan serbest yağ asitleri) oluşumu sayesinde BOS'un sulu fazda ilaçta çözünen durum açlık durumunda lipolizde korunurken,

tokluk durum lipolizinde enzim aktivitesinin olmaması veya daha az olması nedeniyle sulu fazdaki BOS miktarı zamanla azalmıştır.

FeSSIF-V2 lipoliz ortamı ile karşılaştırıldığında 90. dakika sonunda FeSSIF lipoliz ortamında % sulu faz BOS miktarı SNEDDS ve S-SNEDDS tablet için daha azdır (Şekil 4.112). Bu durum iki farklı şekilde açıklanabilir. İlk olarak BOS zayıf asidik ve pH bağımlı çözünürlüğe sahip bir ilaçtır. BOS çözünürlüğünün pH'daki artış ile artmasının sulu faz BOS miktarında artışa yol açtığı düşünülebilir. İkinci olarak FeSSIF ortamına kıyasla daha yüksek pH'ya sahip olan FeSSIF-V2 ortamının enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığına daha yakın olması sayesinde az miktarda sindirimin gerçekleşmesi, kolloidal yapıların oluşumunu sağlamış ve bu durumun sulu faz BOS miktarına artış olarak yansıdığı düşünülmüştür.

Lipoliz sonuçları doğrultusunda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının referans tablete göre BOS'u daha fazla çözünür halde bulunduracağından daha yüksek biyoyararlanım sağlayacağı görülmüştür.

5.10. Ex Vivo Permeabilite Çalışmaları

BCS Sınıf 2 ilaçlar permeabilite sorunu göstermemekle birlikte, çözünürlük artışına bağlı olarak ve SNEDDS'in su ile temasından sonra oluşan nano boyutlu damlacıklar sayesinde geçirgenlikleri artabilir. BOS'un çözünürlüğü pH'a bağlı olduğundan ve zayıf asidik özellik gösterdiğinden, pH arttıkça çözünürlüğü artmış, dolayısıyla emilebilen miktarda artmıştır. Bu çalışmada, in vivo koşulları daha iyi simüle etmek ve in vitro çözünme hızı çalışmalarıyla korelasyon kurmak için ortam olarak FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 kullanılmış, %1 SLS içeren distile su ortamı in vivo koşulları yansıtmadığı için çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmalar referans tablete göre SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların % difüze olan BOS miktarını artırdığını göstermiştir (Şekil 4. 113 ve Şekil 4.114). Meydana gelen bu artış SNEDDS içinde hem BOS'un artan çözünürlüğünden hem de SNEDDS'in suyla teması sonunda geniş bir ara yüzeyi sağlayan nano boyutlu damlacıklar oluşturmasına ve/veya pasif difüzyon, pinositoz, endositoz gibi absorbsiyonu artıran süreçlerle ilişkilendirilmiştir (Avachat ve Patel, 2015; Kazi ve

diğerleri, 2019). Akı ve permeabilite katsayıları hesaplanmış ve Çizelge 4.97'de sunulmuştur. Permeabilite katsayıları referans tablete kıyasla FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2 ve FeSSIF-V2 ortamlarında sırasıyla SNEDDS formülasyonu için 1,53, 19,2, 16,4 ve 17,0 kat; S-SNEDDS tablet formülasyonu için 5,06, 1,17, 3,79 ve 1,8 kat artmıştır. SNEDDS formülasyon için artışlar (FaSSIF hariç) istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0,05$) S-SNEDDS tablet için artışlar anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Geliştirilen S-SNEDDS tabletlerde BOS Neusilin® US2'ye yüklenen SNEDDS içinde tamamen çözünmektedir, ancak daha önce Bölüm 5.8'de S-SNEDDS tabletlerin çözünme hızında bahsedildiği üzere BOS yüklü SNEDDS'in Neusilin® US2'den yavaş ve tamamlanmayan desorbsiyonu pH bağımlıdır ve bioyuyumlu ortamlarda pH nedeniyle değişkenlik göstermektedir. Daha alkali özellik gösteren FaSSIF ve FaSSIF-V2'de (pH 6,5) FeSSIF (pH 5,0) ve FeSSIF-V2'ye (pH 5,8) kıyasla daha yüksek permeabilite göstermesi bu durumu doğrulamıştır (Şekil 4.114 ve 4.97).

5.11. İn Vivo Çalışmalar

5.11.1. Farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları

İn vivo çalışmalar referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları için açlık ve tokluk olarak iki grupta yürütülmüştür. BOS'un konsantrasyon-zaman profilleri referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının Wistar sıçanlarına (n=6) 50 mg/kg'lık bir dozda gavaj yoluyla oral yoldan verilmesini takiben plazmada BOS'un belirlenmesi ile oluşturulmuştur (Şekil 4.115 - 4.128). Referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının farmakokinetik parametreleri WinNonlin™ 8.3 ile elde edilmiştir.

Referans tablet için t_{maks} açlık ve tokluk durumlarında sırasıyla yaklaşık 5 ve 4 saat iken, BOS yüklü SNEDDS için açlık ve tokluk durumları için sırasıyla sadece 1,8 ve 1 saat bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.101 ve 4.102). t_{maks}'taki azalma artan çözünürlük nedeniyle SNEDDS'den BOS'un maksimum plazma konsantrasyonuna daha erken ulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. BOS yüklü SNEDDS açlık ve tokluk koşullarında referans tablete kıyasla C_{max} ve AUC'yi artırmıştır. Açlık grubunda SNEDDS formülasyonunun $AUC_{0–24}$ ve C_{max} değerleri sırasıyla

18426±7879 ng.saat/mL ve 3649±805 ng.saat/mL bulunmuş, referans tablete kıyasla $AUC_{0–24}$ ve C_{max}'ı sırasıyla 2,12 ve 1,67 kat artırmıştır (Çizelge 4.101). Ancak açlık koşullarında sadece AUC_{0-24}'teki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tokluk koşullarında BOS yüklü SNEDDS formülasyonunun $AUC_{0–24}$ ve C_{max} değerleri sırasıyla 14458±5375 ng.sa/mL ve 5682±1761 ng.sa/mL bulunmuş, referans tablete kıyasla sırasıyla $AUC_{0–24}$'ü 1,84 kat ve C_{max}'ı 5,15 kat artırmıştır ve her iki artış da istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.102) ($p<0,05$) ve SNEDDS formülasyonunun bağıl biyoyararlanımındaki % artış açlık durumu için %212, tokluk durumu için %184 bulunmuştur.

S-SNEDDS tabletleri açlık ve tokluk koşullarında referans tablete kıyasla C_{max} ve $AUC_{0–24}$'yi artırmıştır. Açlık grubu için S-SNEDDS tabletlerinin $AUC_{0–24}$ ve C_{max} değerleri sırasıyla 11081±2252 ng.saat/mL ve 5766±2057 ng.saat/mL'dir ve referans tablete kıyasla $AUC_{0–24}$ ve C_{max}'ı sırasıyla 1,28 ve 2,65 kat artırmıştır (Çizelge 4.101). Açlık koşulu için sadece C_{max}'taki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tokluk grubunda S-SNEDDS tabletlerinin $AUC_{0–24}$ ve C_{max} değerleri sırasıyla 18632±5588 ng.saat/mL ve 5215±2609 ng.saat/mL'dir ve referans tablete kıyasla sırasıyla $AUC_{0–24}$ değeri 2,37 kat ve C_{max} değeri 4,73 kat artmıştır ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.102) ($p<0,05$). Referans tablet için t_{maks} her iki koşulda da yaklaşık 4 saat iken, S-SNEDDS tableti için sırasıyla açlık ve tokluk durumda 0,5 ve 1 saat olmuştur ($p<0,05$). t_{maks}'taki azalma artan çözünürlük nedeniyle S-SNEDDS tabletinden BOS'un maksimum plazma konsantrasyonuna daha erken ulaşılmasından kaynaklanmıştır. S-SNEDDS tabletlerin açlık ve tokluk koşullarında bağıl biyoyararlanımdaki artış ise sırasıyla %128 ve %237 olarak bulunmuştur.

Literatürde BOS için yapılan çalışmaların çoğu klinik çalışmalardan oluşmaktadır ve BOS ile ilgili çok fazla formülasyon geliştirme çalışması yoktur. Var olan formülasyon çalışmalarında ise in vivo farmakokinetik hayvan çalışmaları ve değerlendirmeleri oldukça sınırlıdır. Çözünürlüğü pH'a bağlı olan BOS gibi zayıf asidik ilaçların (BCS Sınıf 2a) GİS'teki çözünürlüğünden daha önceki bölümlerde bahsedilmiştir. Artan çözünürlük absorpsiyon hızında bir artışa yol açar bu da özellikle açlık koşullarında birey içi ve bireyler arası yüksek C_{max} değişkenliği ile sonuçlanır (Dressman ve diğerleri, 1990). BOS SNEDDS formülasyonunda

tamamen çözünmüş ve SNEDDS ile çözünürlüğü pH'dan bağımsız hale gelmiştir. İn vitro çözünme hızı, in vitro lipoliz ve ex vivo permeabilite çalışmaları ile de korelasyon gösteren çözünürlükteki bu artış fizikokimyasal dezavantajları ve değişkenliği ortadan kaldırmaya yardımcı olmuştur.

Sonuçları yukarıda ayrıntılı olarak verilen BOS'un oral biyoyararlanımının artması tek başına veya kombinasyon halinde bir veya daha fazla faktörün etkisinin bir sonucu olarak görülebilir. Aşağıda biyoyararlanımı etkileyen bu faktörlerden ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Referans tablet oral uygulamadan sonra enterohepatik döngüye girmektedir. Geliştirilen Neusilin® US2 temelli S-SNEDDS tableti bağırsaklarda alkali ortam koşulları altında yüzeydeki silanol gruplarının deprotonasyonu nedeniyle negatif yüklenirken, SNEDDS'de tamamen çözünen zayıf asit BOS aynı ortamda negatif olarak yüklenip desorbe edilir (Williams ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda geliştirilen S-SNEDDS tablet formülasyonunda, BOS'un pH'a bağlı düşük çözünürlüğü nedeniyle bireyler arasında görülen yüksek değişkenlik profilinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.119 ve 4.126). SNEDDS formülasyonda görülen artışlar bireyler arası değişkenlik profiline tam anlamıyla yansımamıştır. S-SNEDDS tablet ile yüksek değişkenlik profili düzelmiştir. Bu durumun SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2'nin önce makrogözeneklerden daha sonra mezogözeneklerden yavaş desorbsiyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

S-SNEDDS tabletteki adsorbandan ayrılan SNEDDS, sıvı SNEDDS ile aynı şekilde değerlendirilir. SNEDDS'lerin dispersiyon ortamı ile teması sonucu nano boyutlu damlacıklar oluşturarak yüzey alanını artırdığı, ince bağırsaklardan emildiği ve lenfatik sistem yoluyla sistemik dolaşıma girerek biyoyararlanımı artırdığı bilinmektedir (Mahmoud ve diğerleri, 2014; Porter ve Charman, 2001; Porter ve diğerleri, 2007). Literatürdeki çalışmalar uzun zincirli (Maisine® gibi) ve orta zincirli yağ asitlerden ve yüksek sürfaktan (Cremophor®, Labrasol® ve Tween® 80 gibi) bileşiminden oluşan lipit temelli sistemlerin çoğunun portal dolaşımı atladığını ve bağırsaktan Peyer plakları ile lenflatik sisteme gidiğini ileri

sürmektedir (Beg, Sandhu, Batra, Khurana ve Singh, 2015; Caliph, Charman ve Porter, 2000; Parveen ve diğerleri, 2011).

Biyoyararlanım üzerine etkisi olan diğer bir mekanizma ise ilaç difüzyonu/emilimi için hız sınırlayıcı basamak olan bağırsak epitel tabakası ile ilişkilidir. Formülasyondaki yüksek sürfaktan varlığı bağırsaklarda lipit çift tabakasının polar baş grubu ile etkileşerek yapının bütünlüğünü bozup, sıkı bağlantı noktalarını açarak geçirgenliği ve biyoyararlanımı arttırır (Patel ve Patel, 2021; Shafiq ve diğerleri, 2007; Wu, Wang ve Que, 2006). Farklı tipte sürfaktanlar (Labrasol® ve Cremophor® gibi) içeren SNEDDS formülasyonlarının hücre içi ve transselüler absorpsiyonu kolaylaştırarak absorbe edilen ilaçların biyoyararlanımını artırdığı bildirilmektedir (Basalious ve diğerleri, 2010; Kamboj, Sethi ve Rana, 2018). Labrasol® gibi bazı özel sürfaktanların, sıkı bağlantı noktalarındaki proteinlerle (Factin ve aktin bağlayıcı protein gibi) etkileşime girerek sıkı bağlantıların açılmasına yardımcı olduğu da bilinmektedir (Wu ve diğerleri, 2015).

Tüm bu değerlendirmeler göz önüne alındığında tez kapsamında geliştirilen S-SNEDDS tabletin bireyler arası değişkenliği azalttığı, biyoyararlanımı artırdığı, literatür ile desteklenen sonuçlar doğrultusunda karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramadığı düşünüldüğünden doza bağlı BOS kullanımında karaciğer enzimleri üzerinde görülen yan etkileri azaltmak için tedavide umut vaat ettiği düşünülmektedir.

<u>İn vitro - in vivo ilişki kurulması</u>

Edwards (1951) ve Nelson'un (1957) oral uygulama sonrasında aspirin ve teofilin çözünme oranlarını in vivo davranışlarıyla ilişkilendirmedeki öncü çalışmaları ile veriler arasında ilişki kurmak farmasötik ürün geliştirme alanında yıllar içerisinde giderek daha fazla önem kazanmıştır (Lu, Kim ve Park, 2011).

Yaptığımız çalışmalar kapsamında geliştirilen formülasyonların in vitro çözünme hızı (% kümülatif çözünen etkin madde miktarı) ile in vivo biyoyararlanım (% kümülatif plazma konsantrasyonu) verileri arasındaki IVIVR başarıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde de metoprolol (BCS Sınıf 1), piroksikam (BCS Sınıf

2) ve ranitidin (BCS Sınıf 3) gibi farklı BCS sınıfına ait etkin maddelerin formülasyonları için IVIVR kurulduğu görülmektedir (Polli ve Ginski, 1998; Polli, Rekhi, Augsburger ve Shah, 1997).

IVIVR değerlendirmesinde çözünme profilinin pratikte çözünme çalışmasının sonunda veya sonsuzda %100'e ulaşması istenen durumdur (Cardot ve diğerleri, 2007). İn vitro çözünme hızı çalışmasının son zaman noktasında %100'e ulaşma gerekliliğini sağlayan tek ortam olan %1 SLS içeren distile su ortamında elde edilen korelasyon katsayıları incelendiğinde SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu referans tablete göre yüksek korelasyon sergilemiştir (Şekil 4.129 - 4.134). Değerlendirme için in vitro çözünme verileri için örnek alma zamanının son noktasında en az %80 çözünme gösteren formülasyonlarda kullanılabildiğinden (Zhou ve Qiu, 2010) ve in vivo şartları daha iyi yansıttığından biyouyumlu ortamlarda da IVIVR için değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Biyouyumlu ortamlarda yürütülen in vitro çözünme hızı çalışmasından elde edilen veriler ile in vivo açlık/tokluk plazma konsantrasyonları verileri arasındaki ilişki incelendiğinde de SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonu referans tablete göre daha yüksek korelasyon sağlamıştır (Şekil 4.129 - 4.134). Bu durumun tek istisnası referans ürünün FaSSIF ve FaSSIF-V2 in vitro çözünme hızı ile in vivo açlık plazma konsantrasyonu arasında kurulan ilişkidir. Bu iki ilişkinin korelasyon katsayısı SNEDDS formülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun tokluk durumunda duedonum pH'ının açlık durumuna göre daha yüksek olması nedeniyle BOS çözünürlük artışına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

5.11.2. Farmakodinamik ve histolojik çalışmalar

<u>Ekokardiyografi çalışmaları</u>

Gerçekleştirilen ekokardiyografi çalışması ile başlangıç (sağlıklı hayvanların), tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün ve 14. gün tedavi için ekokardiyografik parametreler değerlendirilmiştir. Tek doz intraperitonel (60 mg/kg) MCT uygulandıktan 28 gün sonra başlangıçta ölçümleri yapılan hayvanlar için tekrar ölçümler gerçekleştirilmiş ve hastalık modelinin başarı ile oluşturulduğu belirlenmiştir (Resim 4.24, Çizelge 4.103, 4.104 ve 4.106). Hastalık modelinin

oluşturulmasında modelin belirleyicisi olan parametreler için izlenen değişiklikler ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Artan sağ ventrikül sonu diastolik çapları pulmoner vasküler direncin arttığını, azalan TAPSE değerleri pulmoner hipertansiyona bağlı olarak sağ ventrikül sistolik fonksiyonunun bozulduğu, PAAcT sürelerinin kısalması pulmoner vasküler direncin artmış olduğunu, sağ ventrikül ön duvar sistolik ve diastolik kalınlıklarının artması pulmoner basıncın ciddi oranda arttığını, artan pulmoner arter basıncı pulmoner yetmezliğin arttığını göstermiştir. Pulmoner arter anulus çaplarının artmış olması da artan pulmoner arter basıncının önemli bir kanıtı olmuştur (Forfia ve Vachiery, 2012).

Başlangıç ve tek doz MCT uygulaması sonrası 28. gün incelenen ekokardiyografik parametrelerin sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (Çizelge 4.106) ($p<0,05$), başlangıç ve referans tablet, SNEDDS ve S-SNEDDS tedavi grupları ile gerçekleştirilen 14 günlük tedavi sonrası incelenen ekokardiyografik parametrelerin sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.107 - 4.109). Aynı zamanda tedavi grupları 14. gündeki tedavi etkinliği açısından birbiri ile karşılaştırıldığında aralarında yine istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.110).

Formülasyon gruplarında beklenen anlamlı klinik tedavi etkinliğinin görülememesinin en temel nedeni çalışma başında planlanan bir aylık tedavi sürecinin gerçekleştirilememesidir. MCT uygunlanan hayvanlar 28 günlük hastalık oluşum periyodunda özellikle 21. günden sonra büyük bir hızla kilo vererek kötüleşmeye başlamış, içgüdüsel olan kendini temizleme eğilimleri oldukça azalmış, strese bağlı kızıl stres tüyleri gözlemlenmiştir. 21. gün ile 28. gün 7 hayvan ölmüş, tedavinin 5. gününe gelindiğinde gruplar referans tablet için n=3, SNEDDS için n=5 ve S-SNEDDS tablet için n=4'e düşmüştür. Ölen hayvanların hemen hemen hepsinde burun ve ağız kenarlarında kan bulunurken, yapılan nekropsilerinde iç organlarının büyük oranda tahrip olduğu, kalp, akciğer, dalak ve böbreklerin büyüdüğü, şiddetli sarılık bulunduğu, akciğer ve bağırsaklarında kanama odakları olduğu görülmüştür. Günde 50 mg/kg dozda iki kez uygulanması planlanan tedavi hayvanların gavaj sırasında ağız ve burunda kanama olması sebebi ile tek doz 50 mg/kg olarak uygulanabilmiş ve tedavi gruplarda istatistiksel değerlendirme yapılabilecek sayıda hayvan bulunduğu durum (n=3) olan 14. güne

kadar devam edilebilmiştir. Sıçanların genel durumları ve solunumlarının kötü olması nedeni ile ölçüm sırasında kullanılacak anestezik maddeler de değiştirilmiş, hayvanlar ekokardiyografik ölçümden hemen sonra anestezik maddenin antidotu ile anesteziden çıkarılmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda PAH oluşturulması için en yaygın olan modelin MCT uygulaması olduğu ve en çok tercih edilen dozun 60 mg/kg olmasından dolayı çalışmalarımızda bu model ve doz tercih edilmiştir (Coste ve diğerleri, 2017; Ferraz ve diğerleri, 2021; Holda ve diğerleri, 2020; Li ve diğerleri, 2017; Novelli ve diğerleri, 2019). Ancak, hayvanların çalışma sırasında hızla kötüleşmesi ve ölümlerin artması, nekropsilerinde iç organlarında karşılaşılan kötü tablo MCT uygulaması ve dozu için tekrar değerlendirmeye yönlendirmiştir.

MCT, *Crotalaria retusa* tohumlarından izole edilen oldukça toksik biyoaktif bir pirolizidin alkaloididir (Germano ve diğerleri, 2021). Oldukça reaktif olan bu alkaloidin akciğer, böbrek ve GİS'te hasarlara neden olurken, karaciğer hepatositleri ve endotel hücrelerinde mikroskobik olarak dejenerasyon, nekroz, fibroz veya sarılık ve siroza neden olduğu görülmüştür (Stegelmeier, Colegate ve Brown, 2016). Bu bulgu hayvanlarda görülen iç organ hasarlarını ve sarılık durumunu desteklemektedir. Ayrıca 60 veya 80 mg/kg olan MCT dozlarının 3-6 hafta içinde ölümcül olduğu, MCT'nin uzun vadeli etkilerini incelemenin ve etkilerinin geri çevrilebilirliğini görebilmek için tek olası yolun daha düşük bir doz kullanması olduğu görülmüştür (Handoko ve diğerleri, 2009; Ruiter ve diğerleri, 2013; Ryan, Bloch ve Archer, 2011).

Bütün bu sonuçlar literatürde yapılan çalışmalar için dozlar açısından bir standardizasyon olmadığını göstermekle birlikte, elde ettiğimiz sonuçlar 60 mg/kg doz MCT uygulamasının tedavi etkinliğinin tam incelenmesine izin vermeksizin hayvanlarda ölümle sonuçlandığını göstermiştir. Anlamlı bir klinik tedavi etkinliği ekokardiyografik çalışmalar ile elde edilememiştir. Anlamlı bir klinik tedavi etkinliğinin elde edilebilmesi için hastalık modeli oluşturucu ajan olan MCT'nin daha düşük dozda, daha yüksek sayıda hayvan içeren gruplara uygulanmasının ve bu uygulama sonrasında tedavi sürecinin daha uzun sürdürülebildiği takdirde daha etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Histoloji çalışmaları

PAH, mortalitesi yüksek bir kardiyopulmoner hastalıktır. Son yıllarda PAH'ın akciğer, kalp ve karaciğer gibi hayati organların yanı sıra sistemik dolaşımı, böbrekleri, iskelet kaslarını ve merkezi sinir sistemini içeren çok organlı bir sistem hastalığı olduğu kabul edilmiştir (Nickel ve diğerleri, 2020; Rosenkranz, Howard, Gomberg-Maitland ve Hoeper, 2020).

Tez çalışması kapsamında sıçanlarda MCT ile PAH modeli oluşturulmuştur. Primer olarak akciğeri etkileyen hastalık sağ kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve böbrek fonksiyon bozukluğu ile ilerlediğinden bu organlar üzerinde aynı doz BOS içeren, farklı dozlama sürelerinde uygulanan SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonlar ve referans tabletin tedavi etkinliği ve BOS'un geliştirilen formülasyonlarında karaciğer üzerindeki yan etkileri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Aşağıda incelenen organ ve ilgili parametreleri ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

PAH'da endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin düzensiz büyümesi, inflamasyon ve fibrozis ile endotel fonksiyon kaybı gözlenir. Fibrozis, düz kas ve endotelyal hücrelerin proliferasyonu nedeniyle tunika intima ve tunika media tabakalarında kalınlaşma meydana gelir. Oluşan hasar yalnızca hücre çoğalmasını ve apoptozu değil aynı zamanda endotelin homeostatik işlevlerini (pıhtılaşma yolakları, büyüme faktörleri ve vazoaktif ajanlar üretimi) de değiştirebilir. Çeşitli çalışmalarda, pulmoner endotel hücrelerinin bozulmuş apoptozu artmış endotel proliferasyonu ve damar daralması ile ilişkilendirilmiştir (Haworth ve Reid, 1978; Smadja ve diğerleri, 2009). PAH'lı hastalarda apoptoz belirteçlerinin hem vasküler hücreler hem de enflamatuar hücrelerdeki ekspresyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada proapoptotik belirteçler olan Kaspaz-3 ve p53 proteinlerin endotel tabakası tarafından yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (Lévy ve diğerleri, 2007).

Tez çalışması kapsamında PAH'a bağlı olarak gelişen pulmoner endotel hasarını ve tedavi amacıyla farklı dozlarda uygulanan SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonları ve referans tablet (G5)'in akciğer dokusunda olası iyileştirici

etkilerini Kaspaz-3 ekspresyon seviyesi üzerinden değerlendirilmiştir. Buna göre hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grupta (G2) akciğer dokusunda tespit edilen şiddetli hasarın, kontrol grubuna kıyasla artmış olan Kaspaz-3 ekpresyon seviyesi ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonları ve referans tablet (G5) uygulanan G3, G4 ve G5 tedavi gruplarında ise 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı ve buna paralel olarak bu gruplardaki Kaspaz-3 ekpresyonun G2'ye benzer şekilde güçlü olduğu görülmüştür. Tedavinin iyileştirici etkilerinin ilk olarak ortaya çıktığı 13. ve 14. dozlarda ise azalan Kaspaz-3 ekspresyon seviyesi histopatolojik parametrelerdeki düzelme ile ilişkilendirilmiştir.

Akciğer, kalp ve karaciğer arasında çift yönlü karmaşık bir ilişki bulunmaktadır ve bu durum PAH'da açıkça karşımıza çıkmaktadır. PAH'da ilk etkilenen organ olan kalpte sağ kalp yetmezliği gelişmektedir. Sağ kalp yetmezliği ile yakın anatomik ve fizyolojik ilişkisi nedeniyle karaciğer PAH ile ilişkili sağ kalp yetmezliğinden etkilenmekte, sağ kalp yetmezliği karaciğer biyokimyası ve histolojisi üzerinde doğrudan sonuçları olan konjestif hepatopatiye neden olmaktadır (Nickel ve diğerleri, 2021). Karaciğer hepatositler, kolonjiyositler, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücresel bileşenlerden oluşur. Hepatositlerin güçlü rejeneratif yeteneği olmasına rağmen, yetişkinlerde rejenerasyon için alternatif bir mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, sıçan karaciğerinde toksin kaynaklı hasar ile hepatosit proliferasyonu inhibe edildiğinde ve karaciğer rejenerasyonu tehlikeye girdiğinde, periportal bölgede "duktuler hepatositler ya da daha yaygın olarak "oval hücreler," adı verilen çok sayıda küçük hücrelerin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu hücreler, ciddi şekilde yaralanmış karaciğerde hepatositlere ve kolanjiyositlere farklılaşan fakültatif hepatik kök hücreler olarak kabul edilmektedir (Roskams, Libbrecht ve Desmet, 2003; Roskams ve diğerleri, 2004; Roskams, Katoonizadeh ve Komuta, 2010).

Birçok deney, oval hücrelerin sağlıklı karaciğerde mevcut olmayan ve periportal bölgede sadece yaralanma koşulları altında ortaya çıkan bir hücre popülasyonu olduğunu desteklemektedir (Tanaka ve Miyajima, 2012). Oval hücreleri, kolanjiositlerden ve hepatositlerden ayırt etmek için çeşitli yüzey belirteçlerinden yararlanılmaktadır. Yetişkin sıçan karaciğerinde hepatositlerin; albümin ve alfa-

fetoprotein (AFP), kolanjiositlerin; CK-7, CK-19, OV-6 ve oval hücrelerin ise epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM), albümin, OV-6, alfa-fetoprotein (AFP), sitokeratin-19 (CK-19), CK-7, CK8, CK18, CD24, CD44, CD133, Claudin-7, kaderin-22 gibi yüzey belirteçlerini eksprese ettikleri bilinmektedir (Ceulemans ve diğerleri, 2017).

Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasında normal karaciğerde eksprese olmayan, ancak sıçanlara ait hasarlı karaciğerde eksprese edildiği bilinen TROP2 (Human Trophoblast Cell Surface Antigen 2) yüzey belirtecinin ekspresyon seviyesi yapılan IHC analizler ile tüm deney gruplarında ölçülmüştür. Buna göre kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen sağlıklı karaciğer kesitlerinde TROP2 ekpresyonu olmadığı, ancak hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruba (G2) ait dejeneratif karaciğer kesitlerde ise yüksek seviyede TROP2 ekpresyonu olduğu tespit edilmiştir. SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonlar ve referans tablet (G5) uygulanan tedavi gruplarında ise 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı ve buna paralel olarak TROP2 ekpresyonun güçlü olduğu görülmüştür. Tedavinin iyileştirici etkilerinin ilk olarak ortaya çıktığı 13. ve 14. dozlarda ise bu ekspresyonun giderek azaldığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu TROP2 ekspresyon verileri literatürdeki çalışmalar ile benzer şekilde yalnızca hasarlı karaciğerde ortaya çıkan oval hücreler ile ilişkilendirilmiştir (Okabe ve diğerleri, 2009; Yamazaki, Moore ve Negishi, 2011).

Karaciğer hasarı ve rejenerasyonu kompleman sistem, trombositler, inflamatuar sitokinler (TNF-a, IL-6, IL-1b), büyüme faktörleri (HGF, EGF, VGF) ve anti-inflamatuar faktörler (IL-10, TGF-b) gibi doku yaralanması düzenleyicileri ile ilişkilendirilen oldukça karmaşık bir süreçtir (Cienfuegos ve diğerleri, 2014). TNF-α (Tümör nekroz faktörü alfa) sistemik inflamasyonda yer alan bir hücre sinyal proteinidir. Yapılan çalışmalarda çeşitli organlarda, cerrahi ya da toksin kaynaklı stres durumlarında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Kamei, Yoshida, Yamasaki, Tajiri ve Shirouzu, 2001; Mawarti, Rajin ve Asumta, 2017).

Literatür araştırmaları doğrultusunda tez çalışması kapsamında hücrede pro-enflamatuar sitokinlerin artması gibi olguların hepatosit hasarına bağlı olduğu düşüncesi ile TNF-α ekspresyon seviyesi yapılan IHC analizleri ile tüm deney

gruplarında ölçülmüştür. Buna göre TROP2 ekpresyon bulguları ile tutarlı şekilde, kontrol grubuna (G1) ait örneklerden elde edilen sağlıklı karaciğer kesitlerinde TNF-α ekpresyonu olmadığı, ancak hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen gruba (G2) ait dejeneratif karaciğer kesitlerde ise yüksek seviyede TNF-α ekpresyonu olduğu tespit edilmiştir. SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonları ve referans tablet (G5) uygulanan tedavi gruplarında ise 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı ve buna paralel olarak TNF-α ekpresyonun güçlü olduğu görülmüştür. Tedavinin iyileştirici etkilerinin ilk olarak ortaya çıktığı 13. ve 14. dozlarda ise bu ekspresyonun giderek azaldığı belirlenmiştir.

Sıçanlarda hepatosit hasarının bir diğer göstergesi ise azalan albümin miktarıdır (Özerkan, Özsoy, Akbulut, Güney ve Öztürk, 2017). Tez çalışması kapsamında hepatositlerde oluşan hasarı ve uygulanan tedavilerin olası iyileştirici etkileri hepatosit-ilişkili transkripsiyon faktörü olan albümin seviyesi ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre hastalık modeli sonrası SNEDDS, S-SNEDDS tablet ve referans tablet ile farklı dozlarda tedavi uygulanan tüm gruplarda serum albümin seviyesinin kontrole kıyasla azalmış olduğu belirlenmiştir. 14 ve 20 doz SNEDDS formülasyon uygulanan sıçanlarda ise ekspresyon seviyesinin tekrar arttığı izlenmiştir. Serum albümin seviyesindeki bu artış söz konusu gruplarda izlenen histopatolojik parametrelerdeki iyileşme ile tutarlı bulunmuştur. 13 ve 20 doz S-SNEDDS tablet formülasyonu uygulanan sıçanlardaki ekspresyon seviyesi aynı dozlarda SNEDDS fromülasyon uygulanan sıçanlara benzer şekilde izlenmiştir. Bununla birlikte, 15 doz referans tablet uygulanan sıçanlarda izlenen serum albümin seviyesi aynı dozda SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon uygulanan deneklere kıyasla daha düşük olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

PAH ve kronik böbrek hastalığı arasındaki ilişkiye ait sınırlı veri bulunmakla birlikte gün geçtikçe konu üzerine olan çalışmalar artmaktadır. Serum kreatinin veya tahmini glomerüler filtrasyon hızı ile belirlenen böbrek disfonksiyonu, PAH'da sık görülen bir komorbiditedir ve bozulmuş böbrek fonksiyonu, mortalitenin güçlü ve bağımsız bir öngördürücüsüdür (Nickel ve diğerleri, 2017). PAH'ın böbrekleri etkileyen ve böbrek fonksiyon bozukluğunun yüksek prevalansını açıklayan çok sayıda potansiyel mekanizma mevcuttur. Bunlardan başlıcaları artan venöz

tıkanıklık, azalmış kalp debisi, kalp ve böbrek arasındaki ikili etkileşim (kardiyorenal sendrom-CRS) ve sağ kalp yetmezliği ortamındaki nörohormonal aktivasyondur (Ronco ve Di Lullo,2014).

Apoptoz, normal ve patolojik süreçlerde önemli bir hücre ölüm yolağıdır. Kaspaz (cysteine-aspartic acid protease) ailesinin bir üyesi olan Kaspaz-3 ise iyi bilinen ve böbrek fonksiyon bozukluğuna kritik bir katkısı olduğu düşünülen apoptotik enzimlerden biridir (Alnemri ve diğerleri, 1996). Ying ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sepsis kaynaklı akut böbrek hasarı sonrasında, böbrek dokusunda Kaspaz-3 ifadesinin arttığını belirlemişlerdir (Ying ve diğerleri, 2020). Benzer bir çalışmada iskemi-reperfüzyona bağlı ortaya çıkan böbrek fonksiyon bozukluğu, pro-apoptotik bir faktör olan Kaspaz-3'ün aktivitesindeki artış ile ilişkilendirilmiştir (Kunduzova ve diğerleri, 2003).

Tez çalışmaları kapsamında PAH'a bağlı olarak gelişen böbrek hasarında tedavi amacıyla farklı dozlarda uygulanan SNEDDS, S-SNEDDS tablet formülasyonlar ve referans tablet ile tedavide böbrek dokusunda olası iyileştirici etkileri Kaspaz-3 ekspresyon seviyesi üzerinden değerlendirilmiştir. Buna göre hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grup (G2) böbrek dokusunda tespit edilen şiddetli hasar, kontrol grubuna kıyasla artmış olan Kaspaz-3 ekpresyon seviyesi ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonları ve referans tablet (G5) uygulanan G3, G4 ve G5 tedavi gruplarında ise 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı ve buna paralel olarak bu gruplardaki Kaspaz-3 ekpresyonun G2'ye benzer şekilde güçlü olduğu görülmüştür. Tedavinin iyileştirici etkilerinin ilk olarak ortaya çıktığı 13. ve 14. dozlarda ise azalan Kaspaz-3 ekspresyon seviyesinin histopatolojik parametrelerdeki düzelme ile ilişkilendirilmiştir.

Sıçanlarda çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişen ve PAH'ında dahil olduğu bazı pulmoner hipertansiyon tiplerinde inflamatuar mekanizmaların önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6, sitoprotektif ve proliferatif etkileri nedeniyle doku rejenerasyonu ile yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, PAH hastalarında dolaşımdaki, otoantikorların yanı sıra, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (De Oliveira

Gomes ve diğerleri, 2020; Dorfmüller, Perros, Balabanian, ve Humbert, 2003). Bununla birlikte IL-6, akciğerlerde birçok inflamatuar sürece aracılık ettiği bilinen ve düzensiz salındığında çeşitli solunum bozukluklarının patogenezinde yer alan bir sitokindir (Park ve diğerleri, 2001) Çeşitli genetik çalışmalarda IL-6 ile fibrozis gelişimi arasındaki potansiyel ilişki gösterilmiştir (Pantelidis, Fanning, Wells, Welsh, ve Du Bois, 2001; Qiu, Fujimura, Kurashima, Nakao ve Mukaida, 2004). Yine benzer bir çalışmada pulmoner dejenerasyonda IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (Pedroza ve diğerleri, 2011).

Tez çalışması kapsamında, hastalık modeline bağlı gelişen akciğer ve böbrek hasarı sonrasında uygulanan tedavilerin olası iyileştirici etkilerini, söz konusu dokulardaki IL-6 ekspresyon seviyesi ile değerlendirmesi amaçlanmış, buna göre hastalık modeli oluşturulan ve tedavi edilmeyen grupta (G2) böbrek ve akciğer dokusunda tespit edilen şiddetli hasarı, kontrol grubuna kıyasla artmış olan IL-6 ekpresyon seviyesi ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte SNEDDS (G3), S-SNEDDS tablet (G4) formülasyonları ve referans tablet (G5) uygulanan G3, G4 ve G5 tedavi gruplarında ise 2 ve 4 doz uygulamalarının tedavi edici etkisinin olmadığı ve buna paralel olarak bu gruplardaki IL-6 ekpresyonun G2'ye benzer şekilde güçlü olduğu görülmüştür. Tedavinin iyileştirici etkilerinin ilk olarak ortaya çıktığı 13. ve 14. dozlarda ise azalan IL-6 ekspresyon seviyesi histopatolojik parametrelerdeki düzelme ile ilişkilendirilmiştir.

Elde ettiğimiz tüm bu veriler ışığında SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının akciğerde parankimada fibrozis ve konjesyon, bağ dokuda lenfatik hücre infiltrasyonu, pulmoner arter duvarında intimal kalınlaşma ve endotel hücre dejenerasyonu; karaciğerde sinüzoidal dilatasyon, fibrozis, vasküler konjesyon, hücresel vakuolizasyon; böbrekte vasküler konjesyon, glomerular dejenerasyon, tübüler dilatasyon ve nötrofil infiltrasyonu gibi histopatolojik olgular üzerindeki tedavi edici etkisinin benzer ölçüde olduğu ve söz konusu bu formülasyonların daha düşük dozlarının referans tabletten daha etkili olduğu belirlenmiştir. Hedeflenen tedavi süresinden daha kısa devam ettirilebilen 14 günlük kısa tedavi süresinden elde edilen sonuçlar doz azaltılması açısından oldukça umut verici olup, yan etki profilinde anlamlı bir azalma ile

sonuçlanabileceği düşünülmektedir. Elde edilen histoloji sonuçları yapılan diğer in vivo çalışmalar ile de birbirini desteklemektedir.

5.11.3. Biyodağılım çalışmaları

Son yıllarda özellikle optik çözünürlükte önemli gelişmeler sağlanmasıyla insanlar ve hayvanlarda spesifik moleküler yolları görüntülemeye yönelik farklı araçlar, reaktifler ve yöntemler geliştirilmesi umut verici bir alan olmuştur. Noninzavif olan bu görüntüleme tekniklerinden çoğu hayvan çalışmaları için kullanılabilmekte ve hayvanların bütün olarak floresans görüntülenmesindeki son gelişmeler ilaçların ve diğer özel yapıların nicel analizini mümkün kılmaktadır (Wessels ve diğerleri, 2007).

SNEDDS ve S-SNEDDS tabletin biyodağılımı ve vücutta kalış süreleri in vivo olarak IVIS® ile incelenmiş, IVIS®'in farklı nanoemülsiyon çalışmalarında başarıyla uygulandığı görülmüştür (Afzal, Shareef ve Kishan, 2016; Ahmad ve diğerleri, 2017; Komesli, Yildirim ve Karasulu, 2021; Shin ve diğerleri, 2017). IVIS® ile cihazın hassasiyet sınırlarındaki dalga boyunda alınan görüntüler dakika dakika karşılaştırılarak kontrol boya grubu, SNEDDS ve S-SNEDDS tabletin ADME'sine dair bir görsel profil oluşturulmak amacıyla çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir. XenoLight™ DIR ve VivoTag® 680XL ile başarılı bir şekilde işaretlenen SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonların ilk zaman noktalarında floresan sinyalinin midenin anatomik konumu ile uyumlu olan farelerin sol orta tarafında tespit edildiği (De Lima ve diğerleri, 2018) ve daha sonraki deneysel zaman noktalarında sinyalin midede azalırken bağırsaklarda ilerlemesi bu bölgede sinyalin şiddetini arttırdığını göstermiştir.

XenoLight™ DIR işaretli SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarında vücuttaki gerçek zamanlı biyodağılımı kontrol boya grubuna göre sırasıyla toplam emisyonu 11,8 ve 2,4 kat ($p<0,05$) (Şekil 4.136 ve 4.137); VivoTag® 680XL işaretli SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarında vücuttaki gerçek zamanlı biyodağılımı kontrol boya grubuna göre sırasıyla toplam emisyonu 6,1 ve 3,4 kat artırdığı ($p<0,05$) (Şekil 4.138 ve 4.139) bulunmuştur.

ADME çalışmaları tamamlandıktan sonra boyanın dokulardaki tutulumunu belirlemek ve in vivo görüntülemeden elde edilen gerçek zamanlı biyodağılım sonuçlarını doğrulamak amacıyla organlar çıkartılmış, tek tek tablaya (mide, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kolon) yerleştirilmiş ve ışık absorplama değerleri hesaplanmak suretiyle alan değerleri (ROI) belirlenmiştir.

Ex vivo sonuçlar incelendiğinde XenoLight™ DIR işaretli SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyon gruplarında organ tutulumları kontrol boya grubuna göre sırasıyla toplam emisyonu 6,5 ve 2,8 kat ($p<0,05$) (Resim 4.94 ve 4.102); VivoTag® 680XL işaretli SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyon gruplarında organ tutulumları kontrol boya grubuna göre sırasıyla emisyonu 6,0 ve 3,1 kat arttığı ($p<0,05$) (Resim 4.110 ve 4.118) görülmüştür. Gerçek zamanlı biyodağılım ve ex vivo organ tutulumlarındaki artışlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışma sırasında SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonları farelerde mide ve daha yoğun olarak bağırsaklarda floresan emisyonu göstermiştir. SNEDDS'ler lenfatik sistem aracılığı ile sistemik dolaşıma katılmakta böylelikle karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramamaktadır. Karaciğerde emisyon görülmemesi ilk geçiş etkisine uğramadığını göstermiştir. Bu sonuç in vivo farmakokinetik sonuçlarımızı desteklemiştir. Böylelikle SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının BOS'un oral biyoyararlanımını artırdığını doğrulamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız kapsamında, pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılan BCS Sınıf 2 etkin madde olan bosentanın (BOS) lipit kaynaklı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemin adsorban bir taşıyıcı ile katı dozaj şekli olarak geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Katı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem (S-SNEDDS) tableti ile BOS'un çözünürlüğü artmış, daha düşük dozda, daha biyoyararlı, terapötik olarak daha etkili ve yüksek dozdan oluşabilecek yan etkilerin azaltılmasını amaçlayan çalışmamız hedefine ulaşmıştır.

İn vitro ve in vivo olarak yürütülmüş olan kapsamlı çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Önformülasyon çalışmaları sonucunda uzun zincirli mono ve digliserit karışımlarından Maisine® ve Peceol® (yağlar), Cremophor® RH 40 (sürfaktan) ve Labrasol® (kosürfaktan) içeren formülasyonlar faz diyagramlarından hareketle geliştirilmiştir.
- Box-Behnken deney tasarımı (BBD) ile optimum Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlar geliştirilmiştir ve BOS başarı ile yüklenmiştir.
- Karakterizasyon çalışmaları Maisine® ve Peceol® SNEDDS formülasyonlarında başarı ile gerçekleştirilmiştir.
- Sıvı SNEDDS karakterizasyon ve in vitro çözünme hızı çalışmaları doğrultusunda S-SNEDDS geliştirilmesi amacıyla Maisine® içeren SNEDDS formülasyonu seçilmiştir.
- Maisine® SNEDDS formülasyonun Neusilin® US2 ile katılaştırma işlemi için en uygun oran 1,25:1 olarak belirlenmiş, toz ve katı hal karakterizasyon çalışmaları başarı ile gerçekleştirilmiştir.
- S-SNEDDS tabletler doğrudan basım yöntemi ile elde edilmiştir. S-SNEDDS tabletlerde yapılan kalite denetimleri Avrupa Farmakopesi 8.0 spesifikasyon limitlerine göre kabul edilen aralıkta olup S-SNEDDS tabletler 12 aylık süreç için stabil bulunmuştur.

- İn vivoyu taklit eden biyouyumlu ortamlarda ise S-SNEDDS tabletten % kümülatif çözünen BOS miktarı referans tablete kıyasla artmış ve artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
- Tez çalışmaları kapsamındaki verilerin desteklenmesi amacı ile gerçekleştirilen in vitro lipoliz çalışmaları ile SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonların referans tablete göre BOS'u daha fazla çözünür halde bulundurmuş ve bu nedenle yüksek biyoyararlanım sağlama amacını desteklemiştir.
- Ex vivo permeabilite çalışmaları BOS çözünürlüğünün artması ile permeabilitesinin de artacağını göstermiştir.
- İn vivo farmakokinetik çalışmalarda, referans tablete göre SNEDDS ve S-SNEDDS tabletin açlık ve tokluk durumunda AUC ve C_{max}'ı artırdığı, her iki formülasyon için de tokluk durumundaki AUC ve C_{max} artışlarının anlamlı olduğu bulunmuştur. Yani, BCS Sınıf 2 olan BOS'un tokluk koşullarında gıda etkisi nedeniyle biyoyararlanımı artmıştır. Aynı zamanda S-SNEDDS tablet, referans tablette görülen yüksek bireyler arası değişkenliği de önemli ölçüde azaltmıştır.
- İn vitro çözünme hızı ve in vivo plazma konsantrasyonu arasında kurulan IVIVR, geliştirilen SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonunda referans tablete göre daha yüksek korelasyon göstermiştir.
- Farmakodinamik ekokardiyografi çalışmasında hastalık modeli başarı ile oluşturulmuş, 14 günlük tedavide tedavi grupları arasında fark bulunamamıştır.
- Histoloji çalışmaları SNEDDS ve S-SNEDDS tablet formülasyonlarının akciğer, karaciğer ve böbrek dokularındaki histopatolojik olgular üzerine tedavi edici etkisinin benzer ölçüde olduğu ve söz konusu bu formülasyonların daha düşük dozlarının referans tabletten daha etkili olduğunu göstermiştir.
- Biyodağılım çalışması ile SNEDDS ve S-SNEDDS tabletin ADME'sine dair görsel profil başarı ile oluşturulmuştur. SNEDDS ve S-SNEDDS formülasyonların lenfatik sistem aracılığı ile sistemik dolaşıma katılması ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramaması karaciğerde emisyon görülmemesi doğrulanmıştır. Bu sonuç farmakokinetik çalışmalardaki emilim ve biyoyararlanım artışıyla desteklenmiştir.

Tez çalışmamızda, in vitro-in vivo çalışmalar sonucunda oral biyoyararlanımı artırmada ve daha düşük dozda etkinlik göstererek yan etki profilini azaltmada

S-SNEDDS tablet formülasyonu ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Hedeflenen tedavi süresinden daha kısa devam ettirilebilen 14 günlük kısa tedavi süresinden elde edilen sonuçlar doz azaltılması açısından oldukça umut verici olup, yan etki profilinde anlamlı bir azalma sağlayabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen tüm bu sonuçlar doğrultusunda formülasyon, laboratuvar ölçekli üretim ve Faz 0 - preklinik çalışmalarda başarılı olan BOS içeren prototip S-SNEDDS formülasyonu patent (TR 2019 15787 B) ile tescillenmiştir. Bundan sonraki süreçlerde, umut vaadeden BOS yüklü S-SNEDDS tablet formülasyonunun in vivo çalışmalarda denek sayısının artırılarak tekrarlanması sonucunda ölçek büyütme ve klinik çalışmalarla ilerleyebilmesi önemli bir adım olacaktır.

Elde edilen tüm olumlu sonuçlara rağmen çalışmada görülen sorunlar ve bu sorunlara karşı çözüm önerileri aşağıda sunulmaktadır:

- Farmakodinamik ekokardiyografi çalışmasında hastalık modeli MCT ile başarı şekilde oluşturulmuş, ancak hastalığın hayvanların sağ kalımı üzerine etkisi öngörülememiş, hayvanların hızlı ölümüne bağlı olarak planlanan tedavi süresi uygulanmadığından tedavi grupları arasında fark bulunamamıştır. Mikroskobik olarak histoloji sonuçlarından elde edilen veriler anlamlı tedavi etkinliğinin görülebildiği en kısa süreyi 14 gün olarak belirlemiş ve tedavi grupları arasında anlamlı bulunamayan farkı desteklemiştir.
- Bu nedenle ekokardiyografi çalışmaları için:
    - PAH oluşturulmasında kimyasal ajan olan MCT'nin daha düşük dozda ve daha yüksek sayıda sıçan grubuna uygulanması
    - Yukarıdaki iki koşulun sağlanması ile tedavinin klinik açıdan aradaki farkı gösterebilmesi için planlanan süre boyunca devam ettirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abd-Elhakeem, E., Teaima, M.H.M., Abdelbary, G.A., and El Mahrouk, G.M. (2019). Bioavailability enhanced clopidogrel-loaded solid SNEDDS: Development and in-vitro/in-vivo characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 49, 603-614.

Abdalla, A., Klein, S., and Madder, K. (2008). A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: Characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 35(5), 457-464.

Abdelbary, G., Amin, M., and Salah, S. (2013). Self nano-emulsifying simvastatin based tablets: Design and in vitro/in vivo evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology,* 18(6), 1294-1304.

AboulFotouh, K., Allam, A.A., El-Badry, M., and El-Sayed, A.M. (2017). Development and in vitro/in vivo performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems loaded with candesartan cilexetil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 109, 503-513.

Aboutaleb, H.A., Kharshoum, R.M., and Ismail, H.R. (2016). Formulation and optimization of solid self-nanoemulsifying system using porous carriers for oral delivery of cinnarizine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 8(1), 433-438.

Abu-Izza, K.A., Garcia-Contreras, L., and Lu, D.R. (1996). Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: Optimization of the release characteristics using response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 85(2), 144-149.

Adanalı, M. (2011). *Pulmoner Hipertansiyon Oluşturulmuş Ratlarda Desfluranın Sağ Ventrikül Basıncı Üzerine Etkisinin Araştırılması*, Tıpta Uzmanlık, Dokuz Eylül Üniversitesi.

Afzal, S.M., Shareef, M.Z., and Kishan, V. (2016). Transferrin tagged lipid nanoemulsion of docetaxel for enhanced tumor targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 36, 175-182.

Agarwal, V., Siddiqui, A., Ali, H., and Nazzal, S. (2009). Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics,* 366(1-2), 44-52.

Aghamohammadzadeh, R., Zhang, Y.Y., Stephens, T.E., Arons, E., Zaman, P., Polach, K.J., Matar, M., Yung, L.M., Yu, P.B., Bowman, F.P., Opotowsky, A.R., Waxman, A.B., Loscalzo, J., Leopold, J.A., and Maron, B.A. (2016). Up-regulation of the mammalian target of rapamycin complex 1 subunit Raptor by aldosterone induces abnormal pulmonary artery smooth muscle cell survival patterns to promote pulmonary arterial hypertension. *The FASEB Journal,* 30(7), 2511-2527.

Agrawal, A.G., Kumar, A., and Gide, P.S. (2015). Self emulsifying drug delivery system for enhanced solubility and dissolution of glipizide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 126, 553-560.

Ahmad, E., Feng, Y., Qi, J., Fan, W., Ma, Y., He, H., Xia, F., Dong, X., Zhao, W., and Lu, Y. (2017). Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles. *Nanoscale,* 9(3), 1174-1183.

Akartas, I., 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.

Akkuş Aslan, Ş. (2013). *Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Aksu, B. (2013). *İlaçta Kalite Tasarımı (QbD) ve İlgili Yasal Düzenlemeler* (Birinci Baskı). İstanbul: Neta Reklam Tanıtım Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.

Aktas, Y., Celik Tekeli, M., ve Celebi, N. (2020). Development and characterization of exendin-4 loaded self-nanoemulsifying system and in vitro evaluation on Caco-2 cell line. *Journal of Microencapsulation*, 37(1), 41-51.

Alan, B., and Nalbantgil, S. (2010). Genetic, cellular and molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi,* 10 (1), 9-13.

Ali, H.H., and Hussein, A.A. (2017). Oral nanoemulsions of candesartan cilexetil: Formulation, characterization and in vitro drug release studies. *AAPS Open,* 3(1).

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.

Amidon, G.L., Lennernas, 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(3), 413-420.

Archer, S.L., and Michelakis, E.D. (2009). Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine,* 361(19), 1864-1871.

Atila, A., Ozturk, M., Kadioglu, Y., Halici, Z., Turkan, D., Yayla, M., and Un, H. (2014). Development and validation of UFLC-MS/MS method for determination of bosentan in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 97, 33-38.

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.

Bagadi, S. (2015). Excipients used in self nanoemulsifying drug delivery systems. *World Journal of Pharmaceutical Research,* 4(7), 1343-1359.

Bajaj, A., Rao, M.R., Khole, I., and Munjapara, G. (2013). Self-nanoemulsifying drug delivery system of cefpodoxime proxetil containing tocopherol polyethylene glycol succinate. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 39(5), 635-645.

Balakumar, K., Raghavan, C.V., Selvan, N.T., Prasad, R.H., and Abdu, S. (2013). Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of rosuvastatin calcium: Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 112, 337-343.

Banik, S., Halder, S., Sato, H., and Onoue, S. (2021). Self-emulsifying drug delivery system of (R)-alpha-lipoic acid to improve its stability and oral absorption. *Biopharmaceutics & Drug Disposition,* 42(5), 226-233.

Bari, A., Chella, N., Sanka, K., Shastri, N.R., and Diwan, P.V. (2015). Improved anti-diabetic activity of glibenclamide using oral self nano emulsifying powder. *Journal of Microencapsulation,* 32(1), 54-60.

Barreiro-Iglesias, R., Alvarez-Lorenzo, C., and Concheiro, A. (2003). Poly(acrylic acid) microgels (carbopol (R) 934)/surfactant interactions in aqueous media Part I: Nonionic surfactants. *International Journal of Pharmaceutics,* 258(1-2), 165-177.

Barst, R.J., Ivy, D., Dingemanse, J., Widlitz, A., Schmitt, K., Doran, A., Bingaman, D., Nguyen, N., Gaitonde, M., and van Giersbergen, P.L. (2003). Pharmacokinetics, safety, and efficacy of bosentan in pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* 73(4), 372-382.

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.

Beg, S., Jena, S.S., Patra Ch, N., Rizwan, M., Swain, S., Sruti, J., Rao, M.E., and Singh, B. (2013). Development of solid self-nanoemulsifying granules (SSNEGs) of ondansetron hydrochloride with enhanced bioavailability potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 101, 414-423.

Beg, S., Katare, O.P., Saini, S., Garg, B., Khurana, R.K., and Singh, B. (2016). Solid self-nanoemulsifying systems of olmesartan medoxomil: Formulation development, micromeritic characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Powder Technology,* 294, 93-104.

Beg, S., Sandhu, P.S., Batra, R.S., Khurana, R.K., and Singh, B. (2015). QbD-based systematic development of novel optimized solid self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of lovastatin with enhanced biopharmaceutical performance. *Drug Delivery,* 22(6), 765-784.

Beg, S., Swain, S., Singh, H.P., Patra Ch, N., and Rao, M.E. (2012). Development, optimization, and characterization of solid self-nanoemulsifying drug delivery systems of valsartan using porous carriers. *AAPS PharmSciTech,* 13(4), 1416-1427.

Beghetti, M., Haworth, S.G., Bonnet, D., Barst, R.J., Acar, P., Fraisse, A., Ivy, D.D., Jais, X., Schulze-Neick, I., Galie, N., Morganti, A., Dingemanse, J., Kusic-Pajic, A., and Berger, R.M. (2009). Pharmacokinetic and clinical profile of a novel formulation of bosentan in children with pulmonary arterial hypertension: The future-1 study. *British Journal of Clinical Pharmacology,* 68(6), 948-955.

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.

Berger, R.M.F., Gehin, M., Beghetti, M., Ivy, D., Kusic-Pajic, A., Cornelisse, P., Grill, S., and Bonnet, D. (2017). A bosentan pharmacokinetic study to investigate dosing regimens in paediatric patients with pulmonary arterial hypertension: FUTURE-3. *British Journal of Clinical Pharmacology,* 83(8), 1734-1744.

Berthelsen, R., Klitgaard, M., Rades, T., and Mullertz, 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.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., and Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta,* 76(5), 965-977.

Bhagwat, D.A., Swami, P.A., Nadaf, S.J., Choudhari, P.B., Kumbar, V.M., More, H.N., Killedar, S.G., and Kawtikwar, P.S. (2021). Capsaicin Loaded Solid SNEDDS for Enhanced Bioavailability and Anticancer Activity: In-Vitro, In-Silico, and In-Vivo Characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 110(1), 280-291.

Bogaard, H.J., Natarajan, R., Henderson, S.C., Long, C.S., Kraskauskas, D., Smithson, L., Ockaili, R., McCord, J.M., and Voelkel, N.F. (2009). Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure. *Circulation,* 120(20), 1951-U1920.

Boutet, K., Montani, D., Jais, X., Yaici, A., Sitbon, O., Simonneau, G., and Humbert, M. (2008). Therapeutic advances in pulmonary arterial hypertension. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease,* 2(4), 249-265.

Bulut, P., and Özer, A.Y. (1991). Bir deney planlama yöntemi: Faktöriyel tasarım. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences,* 16, 89-97.

Buya, A.B., Ucakar, B., Beloqui, A., Memvanga, P.B., and Preat, V. (2020). Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDSs) for senicapoc. *International Journal of Pharmaceutics,* 580, 119180.

Caliph, S.M., Charman, W.N., and Porter, C.J. (2000). Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 89(8), 1073-1084.

Cardot, J.M., Beyssac, E., and Alric, M. (2007). In vitro-in vivo correlation: Importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution Technologies,* 14(1), 15-19.

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.

Cerpnjak, K., Zvonar, A., Gasperlin, M., and Vrecer, F. (2013). Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharmaceutica,* 63(4), 427-445.

Cetkovic, Z., Cvijic, S., and Vasiljevic, D. (2018). In vitro/in silico approach in the development of simvastatin-loaded self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 44(5), 849-860.

Ceulemans, A., Verhulst, S., Van Haele, M., Govaere, O., Ventura, J.J., Van Grunsven, L. A., and Roskams, T. (2017). RNA-sequencing-based comparative analysis of human hepatic progenitor cells and their niche from alcoholic steatohepatitis livers. *Cell death & Disease*, 8(11), e3164.

Channick, R.N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I.M., Frost, A., Tapson, V.F., Badesch, D.B., Roux, S., Rainisio, M., Bodin, F., and Rubin, L.J. (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: A randomised placebo-controlled study. *Lancet,* 358(9288), 1119-1123.

Chatterjee, B., Almurisi, S.H., Dukhan, A.A.M., 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.

Chavda, V.P., and Shah, D. (2017). Self-emulsifying delivery systems: One step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs. In A. Ficai and A.M. Grumezescu (Eds.), *Nanostructures for Cancer Therapy.* Elsevier, 653-718.

Choi, J.E., Kim, J.S., Choi, M.J., Baek, K., Woo, M.R., Kim, J.O., Choi, H.G., and Jin, S.G. (2021). Effects of different physicochemical characteristics and supersaturation principle of solidified SNEDDS and surface-modified microspheres on the bioavailability of carvedilol. *International Journal of Pharmaceutics,* 597, 120377.

Christophersen, P.C., Christiansen, M.L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., and Mullertz, 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.

Cienfuegos, J.A., Rotellar, F., Baixauli, J., Martínez-Regueira, F., Pardo, F., and Hernández-Lizoáin, J.L. (2014). Liver regeneration--the best kept secret. A model of tissue injury response. *Revista espanola de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 106(3), 171-194.

Clozel, M., Hess, P., Rey, M., Iglarz, M., Binkert, C., and Qiu, C. (2006). Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 231(6), 967-973.

Cohen, H., Chahine, C., Hui, A., and Mukherji, R. (2004). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Health-System Pharmacy,* 61(11), 1107-1119.

Coste, F., Guibert, C., Magat, J., Abell, E., Vaillant, F., Dubois, M., Courtois, A., Diolez, P., Quesson, B., Marthan, R., Savineau, J.P., Muller, B., and Freund-Michel, V. (2017). Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease. *Respiratory Research,* 18(1), 47.

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.

D'Orleans-Juste, P., Labonte, J., Bkaily, G., Choufani, S., Plante, M., and Honore, J.C. (2002). Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacology & Therapeutics,* 95(3), 221-238.

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.

Dangre, P.V., Tattu, A.D., Borikar, S.P., Surana, S.J., and Chalikwar, S.S. (2021). Development and statistical optimization of alginate-Neusilin US2 micro-composite beads to elicit gastric stability and sustained action of hesperidin. *International Journal of Biological Macromolecules,* 171, 514-526.

De Lima, L.I., Py-Daniel, K.R., Guimaraes, M.A., Muehlmann, L.A., Mafud, A.C., Mascarenhas, Y.P., Moraes, J., de Souza de Almeida Leite, J.R., Jiang, C.S., Azevedo, R.B., and Figueiro Longo, J.P. (2018). Self-nanoemulsifying drug-delivery systems improve oral absorption and antischistosomal activity of epiisopiloturine. *Nanomedicine,* 13(7), 689-702.

De Oliveira Gomes, C.G., de Andrade, M.V.M., Guedes, L.R., Rocha, H.C., Guimarães, R. G., Carvalho, F.A.C., and Vilela, E.G. (2020). Evaluation of the Biomarkers HMGB1 and IL-6 as Predictors of Mortality in Cirrhotic Patients with Acute Kidney Injury. *Mediators of Inflammation*, 2867241, 1-8.

Dhillon, S., and Keating, G. (2009). A review of its use in the management of mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Cardiovascular Drugs,* 9(5), 331-350.

Dingemanse, J., Bodin, F., Weidekamm, E., Kutz, K., and van Giersbergen, P. (2002). Influence of food intake and formulation on the pharmacokinetics and metabolism of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Journal of Clinical Pharmacology,* 42(3), 283-289.

Dingemanse, J., and van Giersbergen, P.L. (2004). Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clinical Pharmacokinetics,* 43(15), 1089-1115.

Dixit, R.P., and Nagarsenker, M.S. (2008). Self-nanoemulsifying granules of ezetimibe: Design, optimization and evaluation. *European Journal of Pharmacetical Sciences* 35(3), 183-192.

Do Thi, T., Van Speybroeck, M., Barillaro, V., Martens, J., Annaert, P., Augustijns, P., Van Humbeeck, J., Vermant, J., and Van den Mooter, G. (2009). Formulate-ability of ten compounds with different physicochemical profiles in SMEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 38(5), 479-488.

Dorfmüller, P., Perros, F., Balabanian, K., and Humbert, M. (2003). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 22(2), 358-363.

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(7), 756-761.

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(12), 3029-3044.

EMA. (2005). *Tracleer: EPAR - Scientific Discussion*. Module 8B.

EMA. (2012). *Tracleer, Annex I Summary of Product Characteristics*.

EMA. (2015). *Tracleer*. EPAR summary for the public. EMA/85270/2015/ EMEA/H/C/000401.

Farber, H.W., and Loscalzo, J. (2004). Mechanisms of Disease Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England Journal of Medicine,* 351(16), 1655-1665.

FDA. (2001) *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

FDA. (2003). *Tracleer*®.

Feeney, O.M., Crum, M.F., McEvoy, C.L., Trevaskis, N.L., Williams, H.D., Pouton, C.W., Charman, W.N., Bergstrom, C.A.S., and Porter, C.J.H. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 101, 167-194.

Fernandez, S., Jannin, V., Chevrier, S., Chavant, Y., Demarne, F., and Carriere, F. (2013). In Vitro Digestion of the Self-Emulsifying Lipid Excipient Labrasol(A (R)) by Gastrointestinal Lipases and Influence of its Colloidal Structure on Lipolysis Rate. *Pharmaceutical Research,* 30(12), 3077-3087.

Ferraz, A.P., Seara, F.A.C., Baptista, E.F., Barenco, T.S., Sottani, T.B.B., Souza, N.S.C., Domingos, A.E., Barbosa, R.A.Q., Takiya, C.M., Couto, M.T., Resende, G.O., Campos de Carvalho, A.C., Ponte, C.G., and Nascimento, J.H.M. (2021). BKCa Channel Activation Attenuates the Pathophysiological Progression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Wistar Rats. *Cardiovascular Drugs and Therapy,* 35(4), 719-732.

Forfia, P.R., and Vachiery, J.L. (2012). Echocardiography in pulmonary arterial hypertension. *The American Journal of Cardiology,* 110(6 Suppl), 16S-24S.

Fricker, G., Kromp, T., Wendel, A., Blume, A., Zirkel, J., Rebmann, H., Setzer, C., Quinkert, R.O., Martin, F., and Muller-Goymann, C. (2010). Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research,* 27(8), 1469-1486.

FujiChemical. (2021). Neusilin®.

Fukuda, K., Date, H., Doi, S., Fukumoto, Y., Fukushima, N., Hatano, M., Ito, H., Kuwana, M., Matsubara, H., Momomura, S.I., Nishimura, M., Ogino, H., Satoh, T., Shimokawa, H., Yamauchi-Takihara, K., Tatsumi, K., Ishibashi-Ueda, H., Yamada, N., Yoshida, S., Abe, K., Ogawa, A., Ogo, T., Kasai, T., Kataoka, M., Kawakami, T., Kogaki, S., Nakamura, M., Nakayama, T., Nishizaki, M., Sugimura, K., Tanabe, N., Tsujino, I., Yao, A., Akasaka, T., Ando, M., Kimura, T., Kuriyama, T., Nakanishi, N., Nakanishi, T., Tsutsui, H., Japanese Circulation, S., the Japanese Pulmonary, C., and Pulmonary Hypertension Society Joint Working, G. (2019). Guidelines for the Treatment of Pulmonary Hypertension (JCS 2017/JPCPHS 2017). *Circulation Journal,* 83(4), 842-945.

Gabbay, E., Fraser, J., and McNeil, K. (2007). Review of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk Management,* 3(6), 887-900.

Gaine, S.P., and Rubin, L.J. (1998). Primary pulmonary hypertension. *Lancet,* 352(9129), 719-725.

Galie, N., Torbicki, A., Barst, R., Dartevelle, P., Haworth, S., Higenbottam, T., Olschewski, H., Peacock, A., Pietra, G., Rubin, L.J., Simonneau, G., Priori, S.G., Garcia, M.A., Blanc, J.J., Budaj, A., Cowie, M., Dean, V., Deckers, J., Burgos, E.F., Lekakis, J., Lindahl, B., Mazzotta, G., McGregor, K., Morais, J., Oto, A., Smiseth, O.A., Barbera, J.A., Gibbs, S., Hoeper, M., Humbert, M., Naeije, R., Pepke-Zaba, J., and Task, F. (2004). Guidelines on diagnosis and

treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal,* 25(24), 2243-2278.

Ganz, N., Singrasa, M., Nicolas, L., Gutierrez, M., Dingemanse, J., Dobelin, W., and Glinski, M. (2012). Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the Sample Card And Prep DBS System. *Journal of Chromatography B,* 885-886, 50-60.

Garg, B., Katare, O.P., Beg, S., Lohan, S., and Singh, B. (2016). Systematic development of solid self-nanoemulsifying oily formulations (S-SNEOFs) for enhancing the oral bioavailability and intestinal lymphatic uptake of lopinavir. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 141, 611-622.

Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., and Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer,* 37(13), 1590-1598.

Germano, G.F., Souto, A.L., De Almeida, W.A.M., Freire, F.D., Porto, D.L., Gomes, A.P.B., Ferreira, L.S., Nogueira, F.H.A., Sebastiao, R.C.O., Giordani, R.B., and Aragao, C.F.S. (2021). A new approach for the thermal characterization of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry,* 146(6), 2533-2542.

Gershanik, T., and Benita, S. (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 50(1), 179-188.

Ghasemian, E., Motaghian, P., and Vatanara, A. (2016). D-optimal design for preparation and optimization of fast dissolving bosentan nanosuspension. *Advanced Pharmaceutical Bulletin,* 6(2), 211-218.

Giménez, V.M., Sperandeo, N., Faudone, S., Noriega, S., Manucha, W., and Kassuha, D. (2019). Preparation and characterization of bosentan monohydrate/ε-polycaprolactone nanoparticles obtained by electrospraying. *Biotechnology Progress,* 35(2), e2748.

Goo, Y.T., Song, S.H., Yeom, D.W., Chae, B.R., Yoon, H.Y., Kim, C.H., Park, S.Y., Kang, T.H., Lee, S.E., and Choi, Y.W. (2020). Enhanced oral bioavailability of valsartan in rats using a supersaturable self-microemulsifying drug delivery system with P-glycoprotein inhibitors. *Pharmaceutical Development and Technology,* 25(2), 178-186.

Goyne, K.W., Zimmerman, A.R., Newalkar, B.L., Komarneni, S., Brantley, S.L., and Chorover, J. (2002). Surface charge of variable porosity Al 2 O 3 (s) and SiO 2 (s) adsorbents. *Journal of Porous Materials,* 9(4), 243-256.

Gumaste, S. G., Pawlak, S. A., Dalrymple, D. M., Nider, C. J., Trombetta, L. D., and Serajuddin, A. (2013). Development of solid SEDDS, IV: effect of adsorbed lipid and surfactant on tableting properties and surface structures of different silicates. *Pharmaceutical Research*, 30 (12), 3170-3185.

Gumaste, S.G., Freire, B.O.S., and Serajuddin, A.T.M. (2017). Development of solid SEDDS, VI: Effect of precoating of Neusilin (R) US2 with PVP on drug release from adsorbed self-emulsifying lipid-based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 110, 124-133.

Gumaste, S.G., and Serajuddin, A.T.M. (2017). Development of solid SEDDS, VII: Effect of pore size of silica on drug release from adsorbed self-emulsifying lipid-based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 110, 134-147.

Gunnam, S., Kovvasu, S.P., Karthan, J., and Chakravarthy, J.K. (2018). Formulation and Evaluation of Self-emulsifying Drug Delivery System of Bosentan. *Asian Journal of Pharmaceutics,* 12(2), 822-833.

Gupta, S., Chavhan, S., and Sawant, K.K. (2011). Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovir dipivoxil: Design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 392(1), 145-155.

Gürsoy, R.N., and Çevik, Ö. (2011). Kendiliğinden emülsifiye olabilen İlaç taşıyıcı sistemler ve farmasötik alanda uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi,* 31(2), 151-170.

Handoko, M.L., de Man, F.S., Happe, C.M., Schalij, I., Musters, R.J., Westerhof, N., Postmus, P.E., Paulus, W.J., van der Laarse, W.J., and Vonk-Noordegraaf, A. (2009). Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation,* 120(1), 42-49.

Hanna, L.A., Basalious, E.B., and ELGazayerly, O.N. (2017). Respirable controlled release polymeric colloid (RCRPC) of bosentan for the management of pulmonary hypertension: In vitro aerosolization, histological examination and in vivo pulmonary absorption. *Drug Delivery,* 24(1), 188-198.

Harish, R., Murthy, T.E.G.K., and Chandrasekhar, K.B. (2017). Formulation and evaluation of bosentan solid dispersion. *Asian Journal of Pharmaceutics,* 11(1), 75-82.

Hartley, G.S. (1967). Emulsions as carriers of pesticides. *Chemistry & Industry,* 14, 575-580.

Haworth, S. G., and Reid, L. (1978). A morphometric study of regional variation in infants with pulmonary hypertension and congenital heart defect. A justification of lung biopsy. *British Heart Journal*, 40, 825-31.

Hayashi, Y., Hussa, J.F., and Lalich, J.J. (1967). Cor pulmonale in rats. *Laboratory Investigation,* 16(6), 875-881.

Hentzschel, C.M., Sakmann, A., and Leopold, C.S. (2011). Suitability of various excipients as carrier and coating materials for liquisolid compacts. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 37(10), 1200-1207.

Heresi, G.A., and Minai, O.A. (2008). Bosentan in systemic sclerosis. *Drugs Today* 44(6), 415-428.

Hoeper, M.M. (2005). Drug treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drugs,* 65(10), 1337-1354.

Holda, M.K., Szczepanek, E., Bielawska, J., Palka, N., Wojtysiak, D., Fraczek, P., Nowakowski, M., Sowinska, N., Arent, Z., Podolec, P., and Kopec, G. (2020). Changes in heart morphometric parameters over the course of a monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. *Journal of Translational Medicine,* 18(1), 262.

Hong, J.Y., Kim, J.K., Song, Y.K., Park, J.S., and Kim, C.K. (2006). A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *Journal of Controlled Release,* 110(2), 332-338.

Huetsch, J.C., Jiang, H., Larrain, C., and Shimoda, L.A. (2016). The Na+/H+ exchanger contributes to increased smooth muscle proliferation and migration in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Physiological Reports,* 4(5), e12729.

Humbert, M., Sitbon, O., and Simonneau, G. (2004). Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *The New England Journal of Medicine,* 351(14), 1425-1436.

Hussain, M.A., Krishna, K.M., and Anjum, M. (2015). Formulation and in vitro evaluation of bosentan osmatic controlled release tablets. *International Journal of Pharmacy and Analytical Research,* 4(4), 491-499.

ICH - Text on validation of analytical procedures, (1994).

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).

ICH Q2B validation of analytical procedures: Methodology, (1996).

Im-Emsap, W., Paeratakul, O., and Siepmann, J. (2002). Disperse systems. In G.S. Banker and C.T. Rhodes (Eds.), *Modern pharmaceutics.* New York, 237-285.

Incecayir, T., Olgac, S., Usta, D.Y., and Teksin, Z.S. (2021). Role of Surfactants on Dissolution Behavior of Tamoxifen. *Dissolution Technologies,* 28(2).

İnternet: Biorelevant. Media Preparation Tool. URL: https://biorelevant.com/#media_prep_tool_tab, Son Erişim Tarihi: 10.01.2022.

İnternet: ImageJ. URL: https://imagej.nih.gov/ij/download.html, Son Erişim Tarihi: 13.02.2022.

İnternet: The United States Food and Drug Administration. Bosentan dissolution methods.URL:https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm, Son Erişim Tarihi: 10.01.2022.

Inugala, S., Eedara, B.B., Sunkavalli, S., Dhurke, R., Kandadi, P., Jukanti, R., and Bandari, S. (2015). Solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) of darunavir for improved dissolution and oral bioavailability: In vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 74, 1-10.

Ioselevich, A., Nogid, B., and Rozenfeld, V. (2001). Endothelin Receptor Antagonism: Focus on Bosentan. *Drug Forecast,* 26(9), 465-467.

Ito, Y., Arai, H., Uchino, K., Iwasaki, K., Shibata, N., and Takada, K. (2005). Effect of adsorbents on the absorption of lansoprazole with surfactant. *International Journal of Pharmaceutics,* 289(1-2), 69-77.

Jadhav, P., and Pore, Y. (2017). Physicochemical, thermodynamic and analytical studies on binary and ternary inclusion complexes of bosentan with hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University,* 55(1), 147-154.

Jara, A.A., Goldberg, S., and Mora, M.L. (2005). Studies of the surface charge of amorphous aluminosilicates using surface complexation models. *Journal of Colloid and Interface Science,* 292(1), 160-170.

Jatczak, M., Sidoryk, K., Kossykowska, M., Luniewski, W., Zagrodzka, J., and Lipiec-Abramska, E. (2016). Development and Validation of a UHPLC UV Method for the In-Process Control of Bosentan Monohydrate Synthesis. *Chromatographia,* 79(17), 1131-1141.

Jin, I.S., Jo, M.J., Park, C.W., Chung, Y.B., Kim, J.S., and Shin, D.H. (2020). Physicochemical, pharmacokinetic, and toxicity evaluation of soluplus® polymeric micelles encapsulating fenbendazole. *Pharmaceutics,* 12(10), 1000.

Kachigan, S.K. (1991). *Statistical multivariate statistical analysis: A Conceptual Introduction* (Second Edition). New York, New York: Radius Press.

Kahr, G., and Madsen, F.T. (1995). Determination of the cation exchange capacity and the surface area of bentonite, illite and kaolinite by methylene blue adsorption. *Applied Clay Science,* 9(5), 327-336.

Kalem, Z., Kalem, M.N., Anadol, E., Bakırarar, B., Yılmaz, C., Elmas, Ç., Yalçınkaya, P., Ruso, H., and Gürgan, T. (2018). Maternal nutrition and reproductive functions of female and male offspring. *Reproduction,* 156(4), 353-364.

Kallakunta, V.R., Bandari, S., Jukanti, R., and Veerareddy, P.R. (2012). Oral self emulsifying powder of lercanidipine hydrochloride: Formulation and evaluation. *Powder Technology,* 221, 375-382.

Kamal, M.M., Salawi, A., Lam, M., Nokhodchi, A., Abu-Fayyad, A., El Sayed, K.A., and Nazzal, S. (2020). Development and characterization of curcumin-loaded solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) by spray drying using Soluplus® as solid carrier. *Powder Technology,* 369, 137-145.

Kamboj, S., Sethi, S., and Rana, V. (2018). Lipid based delivery of Efavirenz: An answer to its erratic absorption and food effect. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 123, 199-216.

Kamei, H., Yoshida, S., Yamasaki, K., Tajiri, T., and Shirouzu, K. (2001). Carbon dioxide pneumoperitoneum reduces levels of TNF-a mRNA in the brain, liver, and peritoneum in mice. *Surgical Endoscopy*, 15(6), 609-613.

Kang, B.K., Lee, J.S., Chon, S.K., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., Khang, G., Lee, H.B., and Cho, S.H. (2004). Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics,* 274(1-2), 65-73.

Kang, J.H., Oh, D.H., Oh, Y.K., Yong, C.S., and Choi, H.G. (2012). Effects of solid carriers on the crystalline properties, dissolution and bioavailability of flurbiprofen in solid self-nanoemulsifying drug delivery system (solid SNEDDS). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 80(2), 289-297.

Kansara, H., Panola, R., and Mishra, A. (2015). Techniques used to enhance bioavailability of BCS Class II drugs: A review. *International Journal of Drug Development and Research,* 7(1), 82-93.

Kanuganti, S., Jukanti, R., Veerareddy, P.R., and Bandari, S. (2012). Paliperidone-loaded self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery. *Journal of Dispersion Science and Technology,* 33(4), 506-515.

Kanwal, T., Kawish, M., Maharjan, R., Ghaffar, I., Ali, H.S., Imran, M., Perveen, S., Saifullah, S., Simjee, S.U., and Shah, M.R. (2019). Design and development of permeation enhancer containing self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for ceftriaxone sodium improved oral pharmacokinetics. *Journal of Molecular Liquids,* 289, 111098.

Karakucuk, A., Teksin, Z.S., Eroglu, H., and Celebi, N. (2019). Evaluation of improved oral bioavailability of ritonavir nanosuspension. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 131, 153-158.

Karim, F.T., Kalam, A., Anwar, R., Miah, M.M., Rahman, M.S., and Islam, S.M. (2015). Preparation and evaluation of SEDDS of simvastatin by in vivo, in vitro and ex vivo technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 41(8), 1338-1342.

Karpuz, D., Hallioğlu, O., Büyükakıllı, B., Gürgül, S., and Taşdelen, B. (2017). Effects of bosentan, sildenafil and their combination on T-wave amplitude and QT ınterval in a rat model of pulmonary hypertension. *Journal of Turgut Ozal Medical Center,* 24(1), 37-43.

Karwal, R., Garg, T., Rath, G., and Markandeywar, T.S. (2016). Current Trends in Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDSs) to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(1), 1-39.

Kassem, A.A., Mohsen, A.M., Ahmed, R.S., and Essam, T.M. (2016). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids,* 218, 219-232.

Katteboina, S., Chandrasekhar, P.V.S.R., and Balaji, S. (2009). Approaches for the development of solid self-emulsifying drug delivery systems and dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 4(4), 240-253.

Kaur, M., Jasinski, J.P., Keeley, A.C., Yathirajan, H.S., Betz, R., Gerber, T., and Butcher, R.J. (2013). Bosentan monohydrate. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online,* 69(Pt 1), o12-13.

Kazi, M. (2017). Lipid-based nano-delivery for oral administration of poorly water soluble drugs (PWSDs): Design, optimization and in vitro assessment. In S. Maiti and K.K. Sen (Eds.), *Advanced Technology for Delivering Therapeutics.* Intech, 32-51.

Kazi, M., Al-Qarni, H., and Alanazi, F.K. (2017). Development of oral solid self-emulsifying lipid formulations of risperidone with improved in vitro dissolution and digestion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 114, 239-249.

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.

Kelan, D., and Khutle, N. (2015). A review on: Solid self- microemulsifying drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Sciences,* 4(5), 573- 587.

Kendre, P.N., and Chaudhari, P.D. (2018). Effect of amphiphilic graft co-polymer-carrier on physical stability of bosentan nanocomposite: Assessment of solubility, dissolution and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 126, 177-186.

Kendre, P.N., Chaudhari, P.D., Jain, S.P., and Vibhute, S.K. (2021). An effort to augment solubility and efficiency of the oral bosentan-bucco-adhesive drug delivery system using graft co-polymer as the carrier. *Polymer Bulletin,* 78(10), 5851-5871.

Khan, J., Rades, T., and Boyd, B. (2016). The precipitation behavior of poorly water-soluble drugs with an emphasis on the digestion of lipid based formulations. *Pharmaceutical Research,* 33(3), 548-562.

Khedekar, K., and Mittal, S. (2013). Self emulsifying drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 4(12), 4494.

Khoo, S.M., Humberstone, A.J., Porter, C.J.H., 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.

Kim, J.S., Din, F.U., Lee, S.M., Kim, D.S., Choi, Y.J., Woo, M.R., Kim, J.O., Youn, Y.S., Jin, S.G., and Choi, H.G. (2021). Comparative study between high-pressure homogenisation and Shirasu porous glass membrane technique in sildenafil base-loaded solid SNEDDS: Effects on physicochemical properties and in vivo characteristics. *International Journal of Pharmaceutics,* 592, 120039.

Klumpp, L., Leigh, M., and Dressman, J. (2020). Dissolution behavior of various drugs in different FaSSIF versions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 142, 105138.

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,* 15(21-22), 958-965.

Komesli, Y., Yildirim, Y., and Karasulu, E. (2021). Visualisation of real-time oral biodistribution of fluorescent labeled self-microemulsifying drug delivery system of olmesartan medoxomil using optical imaging method. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics,* 36, 100365.

Kovvasu, S.P., Kunamaneni, P., Joshi, R., and Betageri, G.V. (2019). Self-emulsifying drug delivery systems and their marketed products: A review. *Asian Journal of Pharmaceutics,* 13(2), 73-84.

Krupa, A., Majda, D., Mozgawa, W., Szlek, J., and Jachowicz, R. (2017). Physicochemical Properties of Bosentan and Selected PDE-5 Inhibitors in the Design of Drugs for Rare Diseases. *AAPS PharmSciTech,* 18(4), 1318-1331.

Krupa, A., Szlek, J., Jany, B.R., and Jachowicz, R. (2015). Preformulation Studies on Solid Self-Emulsifying Systems in Powder Form Containing Magnesium Aluminometasilicate as Porous Carrier. *AAPS PharmSciTech,* 16(3), 623-635.

Kumar, D., Sreenivas, S.A., Samal, H.B., Dey, S., and Priyanka, Y. (2011). Method development and estimation of bosentan monohydrate in bulk and pharmaceutical dosage forms using UV-Visible spectrophotometer. *Journal of Pharmacy Research,* 4(6), 1713-1715.

Kumar, S., and Singh, P. (2016). Various techniques for solubility enhancement: An overview. *The Pharma Innovation Journal,* 5(1), 23-28.

Kumar, Y.G., Sreekanth, J., and Satyavati, D. (2014a). Formulation and characterization of SR matrix of endothelin receptor antagonist of bosentan by various natural polymers. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research,* 4(10), 3984-3996.

Kumar, Y.G., Sreekanth, J., and Satyavati, D. (2014b). Formulation development and in vitro evaluation of sustained release matrix tablets of bosentan by using synthetic polymers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 6(11), 111-118.

Kunduzova, O.R., Escourrou, G., Seguelas, M.H., Delagrange, P., De La Farge, F., Cambon, C., and Parini, A. (2003). Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *The FASEB Journal*, 17(8), 1-17.

Laha, B., Das, S., Maiti, S., and Sen, K.K. (2019). Novel propyl karaya gum nanogels for bosentan: In vitro and in vivo drug delivery performance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 180, 263-272.

Larsen, A.T., Sassene, P., and Mullertz, 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.

Lawrence, M.J., and Rees, G.D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 45(1), 89-121.

Lee, D.W., Marasini, N., Poudel, B.K., Kim, J.H., Cho, H.J., Moon, B.K., Choi, H.G., Yong, C.S., and Kim, J.O. (2014). Application of Box-Behnken design in the preparation and optimization of fenofibrate-loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). *Journal of Microencapsulation,* 31(1), 31-40.

Lee, H.J., Kang, J.H., Lee, H.G., Kim, D.W., Rhee, Y.S., Kim, J.Y., Park, E.S., and Park, C.W. (2016). Preparation and physicochemical characterization of spray-dried and jet-milled microparticles containing bosentan hydrate for dry powder inhalation aerosols. *Drug Design, Development and Therapy,* 10, 4017-4030.

Lee, H.J., Lee, H.G., Kwon, Y.B., Kim, J.Y., Rhee, Y.S., Chon, J., Park, E.S., Kim, D.W., and Park, C.W. (2018). The role of lactose carrier on the powder behavior and aerodynamic performance of bosentan microparticles for dry powder inhalation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 117, 279-289.

Lee, H.S., Morrison, E.D., Frethem, C.D., Zasadzinski, J.A., and McCormick, A.V. (2014). Cryogenic electron microscopy study of nanoemulsion formation from microemulsions. *Langmuir,* 30(36), 10826-10833.

Leemans, J.C., Stokman, G., Claessen, N., Rouschop, K.M., Teske, G.J., Kirschning, C.J., Akira, S., van der Poll, T., Weening, J.J., and Florquin, S. (2005). Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *The Journal of Clinical Investigation,* 115(10), 2894-2903.

Lei, Y., Lu, Y., Qi, J., Nie, S., Hu, F., Pan, W., and Wu, W. (2011). Solid self-nanoemulsifying cyclosporin A pellets prepared by fluid-bed coating: preparation, characterization and in vitro redispersibility. *International Journal of Nanomedicine,* 6, 795-805.

Leichner, C., Menzel, C., Laffleur, F., and Bernkop-Schnurch, A. (2017). Development and in vitro characterization of a papain loaded mucolytic self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics,* 530(1-2), 346-353.

Lévy, M., Maurey, C., Celermajer, D. S., Vouhé, P. R., Danel, C., Bonnet, D., and Israël-Biet, D. (2007). Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(7), 803-810.

Li, P., Tan, A., Prestidge, C.A., Nielsen, H.M., and Mullertz, A. (2014). Self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery: In vitro and in vivo evaluations of enteric coating and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics,* 477(1-2), 390-398.

Li, Q., Wang, J., Zhu, X., Zeng, Z., Wu, X., Xu, Y., Xie, J., and Yu, J. (2017). Dihydromyricetin prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 96, 825-833.

Liu, Y., Zhao, X., Ding, J., Xing, Y., Zhou, M., Wang, X., Zhu, W., Huo, L., and Yang, J. (2020). Evidence of Accumulated Endothelial Progenitor Cells in the Lungs of Rats with Pulmonary Arterial Hypertension by 89Zr-oxine PET Imaging. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 17, 1108-1117.

Lu, Y., Kim, S., and Park, K. (2011). In vitro-in vivo correlation: perspectives on model development. *International Journal of Pharmaceutics,* 418(1), 142-148.

Lv, X., Zhang, S., Ma, H., Dong, P., Ma, X., Xu, M., Tian, Y., Tang, Z., Peng, J., Chen, H., and Zhang, J. (2018). In situ monitoring of the structural change of microemulsions in simulated gastrointestinal conditions by SAXS and FRET. *Acta Pharmaceutica Sinica B,* 8(4), 655-665.

Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F., and Sliwa, K. (2013). A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary Circulation,* 3(4), 739-756.

Mahajan, S., Singh, D., Sharma, R., Singh, G., and Bedi, N. (2021). pH-Independent Dissolution and Enhanced Oral Bioavailability of Aripiprazole-Loaded Solid Self-microemulsifying Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech,* 22(1), 24.

Mahmoud, D.B., Shukr, M.H., and Bendas, E.R. (2014). In vitro and in vivo evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral

and parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics,* 476(1-2), 60-69.

Mahmoud, E.A., Bendas, E.R., and Mohamed, M.I. (2009). Preparation and evaluation of self-nanoemulsifying tablets of carvedilol. *AAPS PharmSciTech,* 10(1), 183-192.

Mandic, J., Kosmac, I., Kovacevic, M., Hodnik, B., Hodnik, Z., Vrecer, F., Gasperlin, M., Perissutti, B., and Zvonar Pobirk, A. (2021). Evaluation of solid carvedilol-loaded SMEDDS produced by the spray drying method and a study of related substances. *International Journal of Pharmaceutics,* 605, 120783.

Mann, J., Dressman, J., Rosenblatt, K., Ashworth, L., Muenster, U., Frank, K., Hutchins, P., Williams, J., Klumpp, L., Wielockx, K., Berben, P., Augustijns, P., Holm, R., Hofmann, M., Patel, S., Beato, S., Ojala, K., Tomaszewska, I., Bruel, J.L., and Butler, J. (2017). Validation of Dissolution Testing with Biorelevant Media: An OrBiTo Study. *Molecular Pharmaceutics,* 14(12), 4192-4201.

Mannam, R., and Yallamalli, I.M. (2015). Formulation and evaluation of matrix membrane moderated transdermal patches of bosentan monohydrate. *International Journal of Scientific & Engineering Research,* 6(10), 746-755.

Marasini, N., Yan, Y.D., Poudel, B.K., Choi, H.G., Yong, C.S., and Kim, J.O. (2012). Development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system with enhanced bioavailability by Box-Behnken design and desirability function. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 101(12), 4584-4596.

Mawarti, H., Rajin, M., and Asumta, Z. (2017). The effects of Aloe Vera on TNF-a levels, the percentage of Nk cells and Th 17 cells in rat that received izoniazid and rifampycin. *Medical Archives*, 71(5), 308.

Mazières, J., Brugger, W., Cappuzzo, F., Middel, P., Frosch, A., Bara, I., Klingelschmitt, G., and Klughammer, B. (2013). Evaluation of EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: Re-analysis of the SATURN study. *Lung Cancer,* 82(2), 231-237.

McLaughlin, V.V., Sitbon, O., Badesch, D.B., Barst, R.J., Black, C., Galie, N., Rainisio, M., Simonneau, G., and Rubin, L.J. (2005). Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal,* 25(2), 244-249.

Md, S., Alhakamy, N.A., Aldawsari, H.M., Ahmad, J., Alharbi, W.S., and Asfour, H.Z. (2021). Resveratrol loaded self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for pancreatic cancer: Formulation design, optimization and in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 64, 102555.

Meinel, K., Koestenberger, M., Sallmon, H., Hansmann, G., and Pieles, G.E. (2021). Echocardiography for the Assessment of Pulmonary Hypertension and Congenital Heart Disease in the Young. *Diagnostics,* 11(1), 49.

Mendyk, A., Tuszynski, P.K., Polak, S., and Jachowicz, R. (2013). Generalized in vitro-in vivo relationship (IVIVR) model based on artificial neural networks. *Drug Design, Development and Therapy,* 7, 223-232.

Menzel, C., Holzeisen, T., Laffleur, F., Zaichik, S., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., and Bernkop-Schnurch, A. (2018). In vivo evaluation of an oral self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for exenatide. *Journal of Controlled Release,* 277, 165-172.

Meylan, W.M., and Howard, P.H. (2000). Estimating log P with atom/fragments and water solubility with log P. *Perspectives in Drug Discovery and Design,* 19(1), 67-84.

Mocumbi, A.O., Thienemann, F., and Sliwa, K. (2015). A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. *Canadian Journal of Cardiology,* 31(4), 375-381.

Mohsin, K., Shahba, A.A., and Alanazi, F.K. (2012). Lipid based self emulsifying formulations for poorly water soluble drugs-an excellent opportunity. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research,* 46(2), 88-96.

Moreno, I., Ochoa, D., Roman, M., Cabaleiro, T., and Abad-Santos, F. (2016). Utility of pilot studies for predicting ratios and intrasubject variability in high-variability drugs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,* 119(2), 215-221.

Mudie, D.M., Samiei, N., Marshall, D.J., Amidon, G.E., and Bergstrom, C.A.S. (2020). Selection of In Vivo Predictive Dissolution Media Using Drug Substance and Physiological Properties. *The AAPS Journal,* 22(2), 1-13.

Mullertz, 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.

Narendra, A., Deepika, D., and Annapurna, M.M. (2012). New Spectrophotometric Method for the Determination of Bosentan - An Anti-Hypertensive Agent in Pharmaceutical Dosage Forms. *E-Journal of Chemistry,* 9(2), 700-704.

Nazzal, S., and Khan, M.A. (2006). Controlled release of a self-emulsifying formulation from a tablet dosage form: Stability assessment and optimization of some processing parameters. *International Journal of Pharmaceutics,* 315(1-2), 110-121.

Nazzal, S., Nutan, M., Palamakula, A., Shah, R., Zaghloul, A.A., and Khan, M.A. (2002a). Optimization of a self-nanoemulsified tablet dosage form of Ubiquinone using response surface methodology: effect of formulation ingredients. *International Journal of Pharmaceutics,* 240(1-2), 103-114.

Nazzal, S., Smalyukh, II, Lavrentovich, O.D., and Khan, M.A. (2002b). Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of

emulsion formation. *International Journal of Pharmaceutics,* 235(1-2), 247-265.

Nazzal, S., Zaghloul, A.A., and Khan, M.A. (2002c). Effect of extragranular microcrystalline cellose on compaction, surface roughness, and in vitro dissolution of a self-nanoemulsified solid dosage form of ubiquinone. *Pharmaceutical Technology,* 26(4), 86-86.

Ng, C.L., Lee, S.E., Lee, J.K., Kim, T.H., Jang, W.S., Choi, J.S., Kim, Y.H., Kim, J.K., and Park, J.S. (2016). Solubilization and formulation of chrysosplenol C in solid dispersion with hydrophilic carriers. *International Journal of Pharmaceutics,* 512(1), 314-321.

Nickel, N.P., Yuan, K., Dorfmuller, P., Provencher, S., Lai, Y. C., Bonnet, S., Austin, E.D., Koch, C.D., Morris, A., Perros, F., Montani, D., Zamanian, R.T., and de Jesus Perez, V.A. (2020). Beyond the lungs: systemic manifestations of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(2), 148-157.

Nickel, N.P., Galura, G.M., Zuckerman, M.J., Hakim, M.N., Alkhateeb, H., Mukherjee, D., Austin, E.D., and Heresi, G.A. (2021). Liver abnormalities in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, 11(4), 1-12.

Nickel, N.P., O'Leary, J.M., Brittain, E.L., Fessel, J.P., Zamanian, R.T., West, J.D., and Austin, E.D. (2017). Kidney dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, 7(1), 38-54.

Novelli, D., Fumagalli, F., Staszewsky, L., Ristagno, G., Olivari, D., Masson, S., De Giorgio, D., Ceriani, S., Affatato, R., De Logu, F., Nassini, R., Milioli, M., Facchinetti, F., Cantoni, S., Trevisani, M., Letizia, T., Russo, I., Salio, M., and Latini, R. (2019). Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: Time-course of injury and comparative evaluation of macitentan and Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *European Journal of Pharmacology,* 865, 172777.

Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver*. Development and Disease*, *136 (11)*, 1951-1960.

Oldfield, V., and Lyseng-Williamson, K.A. (2006). Bosentan: a review of its use in pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis. *American Journal of Cardiovascular Drugs,* 6(3), 189-208.

Olsson, K.M., and Hoeper, M.M. (2009). Novel approaches to the pharmacotherapy of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today,* 14(5-6), 284-290.

Ono, K., and Matsumori, A. (2002). Endothelin antagonism with bosentan: current status and future perspectives. *Cardiovascular Drug Reviews,* 20(1), 1-18.

Özensoy, E. (1982). *Teknolojik ve Bilimsel Araştırmalarda Modern Deney Tasarımcılığı ve Optimizasyon Yöntemleri*. Ankara: Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü.

Özerkan, D., Özsoy, N., Akbulut, K. G., Güney, Ş., and Öztürk, G. (2017). The protective effect of vitamin D against carbon tetrachloride damage to the rat liver. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(7), 513-523.

Öztürk, Ö., and Şahin, Ü. (2009). Pulmoner arteriyel hipertansiyon: tanı ve tedavisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi,* 16(1), 39-47.

Paaver, U., Lust, A., Mirza, S., Rantanen, J., Veski, P., Heinamaki, J., and Kogermann, K. (2012). Insight into the solubility and dissolution behavior of piroxicam anhydrate and monohydrate forms. *International Journal of Pharmaceutics,* 431(1-2), 111-119.

Palmer, M.J. (2009). Leads for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opinion on Therapeutic Patents,* 19(5), 575-592.

Panda, T., Das, D., and Panigrahi, L. (2016). Formulation Development of Solid Dispersions of Bosentan using Gelucire 50/13 and Poloxamer 188. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 6, 027-033.

Panigrahi, K.C., Jena, J., Jena, G.K., Patra, C.N., and Rao, M.E.B. (2018). QBD-based systematic development of bosentan SNEDDS: Formulation, characterization and pharmacokinetic assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 47, 31-42.

Pantelidis, P., Fanning, G. C., Wells, A. U., Welsh, K. I., and Du Bois, R.M. (2001). Analysis of tumor necrosis factor-α, lymphotoxin-α, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(6), 1432-1436.

Panthani, M.G., Khan, T.A., Reid, D.K., Hellebusch, D.J., Rasch, M.R., Maynard, J.A., and Korgel, B.A. (2013). In vivo whole animal fluorescence imaging of a microparticle-based oral vaccine containing (Cuinse X S2–X)/Zns core/shell quantum dots. *Nano Letters,* 13(9), 4294-4298.

Parekh, J.M., Shah, D.K., Sanyal, M., Yadav, M., and Shrivastav, P.S. (2012). Development of an SPE-LC-MS/MS method for simultaneous quantification of bosentan and its active metabolite hydroxybosentan in human plasma to support a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 70, 462-470.

Park, S.H., and Choi, H.K. (2006). The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics,* 321(1-2), 35-41.

Park, W.Y., Goodman, R.B., Steinberg, K.P., Ruzinski, J.T., Radella, F., Park, D.R., Pugin, J., Pugin, J., Skerrett, S.J., Hudson, L.D., and Martin, T.R. (2001). Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory

distress syndrome, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(10), 1896–1903.

Parmar, K., Patel, J., and Sheth, N. (2015). Self nano-emulsifying drug delivery system for embelin: Design, characterization and in-vitro studies. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 10(5), 396-404.

Parmar, N., Singla, N., Amin, S., and Kohli, K. (2011). Study of cosurfactant effect on nanoemulsifying area and development of lercanidipine loaded (SNEDDS) self nanoemulsifying drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 86(2), 327-338.

Parveen, R., Baboota, S., Ali, J., Ahuja, A., Vasudev, S.S., and Ahmad, S. (2011). Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: In vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics,* 413(1-2), 245-253.

Patel, A., Shelat, P., and Lalwani, A. (2014). Development and optimization of solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) using Scheffe's design for improvement of oral bioavailability of nelfinavir mesylate. *Drug Delivery and Translational Research,* 4(2), 171-186.

Patel, G., Shelat, P., and Lalwani, A. (2016). Statistical modeling, optimization and characterization of solid self-nanoemulsifying drug delivery system of lopinavir using design of experiment. *Drug Delivery,* 23(8), 3027-3042.

Patel, J., Dhingani, A., Garala, K., Raval, M., and Sheth, N. (2014). Quality by design approach for oral bioavailability enhancement of irbesartan by self-nanoemulsifying tablets. *Drug Delivery,* 21(6), 412-435.

Patel, J., Patel, A., Raval, M., and Sheth, N. (2011). Formulation and development of a self-nanoemulsifying drug delivery system of irbesartan. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research,* 2(1), 9-16.

Patel, P., and Patel, M. (2021). Enhanced oral bioavailability of nintedanib esylate with nanostructured lipid carriers by lymphatic targeting: In vitro, cell line and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 159, 105715.

Patel, R., Kamble, M., Katedeshmukh, R., Zarikar, N., and Kulkarni, A. (2013). A review on solid self emulsifying drug delivery system. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research,* 2(4), 52-56.

Patel, V., Lalani, R., Bardoliwala, D., Ghosh, S., and Misra, A. (2018). Lipid-based oral formulation strategies for lipophilic drugs. *AAPS PharmSciTech,* 19(8), 3609-3630.

Pathak, K., and Raghuvanshi, S. (2015). Oral bioavailability: Issues and solutions via nanoformulations. *Clinical Pharmacokinetics,* 54(4), 325-357.

Patil, P., and Paradkar, A. (2006). Porous polystyrene beads as carriers for self-emulsifying system containing loratadine. *AAPS PharmSciTech,* 7(1), E199-E205.

Pedroza, M., Schneider, D.J., Karmouty-Quintana, H., Coote, J., Shaw, S., Corrigan, R., Molina, J.G., Alcorn, J.L., Galas, D., Gelinas, R., and Blackburn, M.R. (2011). Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PloS One*, 6(7), e22667.

Polli, J.E. (2000). IVIVR versus IVIVC. *Dissolution Technologies,* 7(3), 6-9.

Polli, J.E., and Ginski, M.J. (1998). Human drug absorption kinetics and comparison to Caco-2 monolayer permeabilities. *Pharmaceutical Research,* 15(1), 47-52.

Polli, J.E., Rekhi, G.S., Augsburger, L.L., and Shah, V.P. (1997). Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 86(6), 690-700.

Pore, Y.V., and Jadhav, P.H. (2020). Descriptive Study: In silico and Physicochemical Assessment of the Effectiveness of Hydroxy/Amino Acids as Auxiliary Substances to Improve the Complexation Efficiency of β-cyclodextrin towards Bosentan. In W.M.M. Saad (Ed.), Current Perspectives on Chemical Sciences (First Edition): Book Publisher International.

Porter, C.J., and Charman, W.N. (2001). In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 50 Suppl 1, S127-147.

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 Review Drug Discovery,* 6(3), 231-248.

Poudel, B.K., Marasini, N., Tran, T.H., Choi, H.G., Yong, C.S., and Kim, J.O. (2012). Formulation, characterization and optimization of valsartan self-microemulsifying drug delivery system using statistical design of experiment. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* 60(11), 1409-1418.

Pouton, C.W. (1985). Self-emulsifying drug delivery systems: Assessment of the efficiency of emulsification. *International Journal of Pharmaceutics,* 27(2-3), 335-348.

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, 93-98.

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. (2007). *Properties and uses of common formulation lipids, surfactants and cosolvents.* American Association Pharmaceutical Scientists Workshop, Victorian College of Pharmacy, Monash University, Melbourne.

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.

Prabhu, R.C., Maruthapillai, A., and Senadi, G.C. (2021). Use of Stage-Wise AQbD and an Orthogonality Approach to Develop a Short-Runtime Method for the Simultaneous Quantification of Bosentan and Impurities using UPLC Equipped with PDA and ESI-MS. *Analytical Chemistry,* 93(9), 4175-4182.

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 and Technology,* 39, 59-68.

Prakash, A., and Perry, C.M. (2002). Bosentan. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2(5), 335-342.

Pramanik, S., and Thakkar, H. (2020). Development of Solid Self-Microemulsifying System of Tizanidine Hydrochloride for Oral Bioavailability Enhancement: In Vitro and In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech,* 21(5), 182.

Qiu, Z., Fujimura, M., Kurashima, K., Nakao, S., and Mukaida, N. (2004). Enhanced airway inflammation and decreased subepithelial fibrosis in interleukin 6-deficient mice following chronic exposure to aerosolized antigen. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(8), 1321-1328.

Qureshi, M.J., Mallikarjun, C., and Kian, W.G. (2015). Enhancement of solubility and therapeutic potential of poorly soluble lovastatin by SMEDDS formulation adsorbed on directly compressed spray dried magnesium aluminometasilicate liquid loadable tablets: A study in diet induced hyperlipidemic rabbits. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 10(1), 40-56.

Radwan, S.A.A., ElMeshad, A.N., and Shoukri, R.A. (2017). Microemulsion loaded hydrogel as a promising vehicle for dermal delivery of the antifungal sertaconazole: design, optimization and ex vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 43(8), 1351-1365.

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.

Rao, S.V.R. and Shao, J. (2008). Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs: I. Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1-2), 2-9.

Rasoanirina, B.N.V., Lassoued, M.A., Kamoun, A., Bahloul, B., Miladi, K., and Sfar, S. (2020). Voriconazole-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) to improve transcorneal permeability. *Pharmaceutical Development and Technology,* 25(6), 694-703.

Rehman, F.U., Shah, K.U., Shah, S.U., Khan, I.U., Khan, G.M., and Khan, A. (2017). From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). *Expert Opinion Drug Delivery,* 14(11), 1325-1340.

Reiss, H. (1975). Entropy-induced dispersion of bulk liquids. *Journal of Colloid and Interface Science,* 53(1), 61-70.

Rhodes, C.J., Davidson, A., Gibbs, J.S., Wharton, J., and Wilkins, M.R. (2009). Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & Therapeutics,* 121(1), 69-88.

Rieger, M. (1986). *Emulsions*. In L. Lachman, H. Lieberman, and J.L. Kanig (Eds.), *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.* Philadelphia: Lea and Febiger.

Rojas Gomez, R., and Restrepo Valencia, P. (2015). In vitro-in vivo Pharmacokinetic correlation model for quality assurance of antiretroviral drugs. *Colombia Médica,* 46(3), 109-116.

Ronco, C., and Di Lullo, L. (2014). Cardiorenal syndrome. *Heart Failure Clinics*, 10(2), 251-280.

Roskams, T.A., Libbrecht, L., and Desmet, V.J. (2003). Progenitor cells in diseased human liver. *Seminars in Liver Disease*, 23, 385-396.

Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V.,Finegold, M.J., Geller, S.A, Gouw, A.S.H., Hytiroglou, P., Knisely, A.S., Kojiro, M., Lefkowitch, J.H., Nakanuma, Y., Olynyk, J.K., Park, Y.N.,Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P.J., Strain, A.J., Thung, S.N., Wanless, I.R., and West, A.B. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 39(6), 1739-1745.

Roskams, T., Katoonizadeh, A., and Komuta, M. (2010). Hepatic progenitor cells: an update. *Clinics in Liver Disease*, 14(4), 705-718.

Rosenkranz, S., Howard, L.S., Gomberg-Maitland, M., and Hoeper, M.M. (2020). Systemic consequences of pulmonary hypertension and right-sided heart failure. *Circulation*, 141(8), 678-693.

Roux, S., Breu, V., Ertel, S.I., and Clozel, M. (1999). Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential applications. *Journal of Molecular Medicine,* 77, 364-376.

Rubin, L.J., Badesch, D.B., Barst, R.J., Galie, N., Black, C.M., Keogh, A., Pulido, T., Frost, A., Roux, S., Leconte, I., Landzberg, M., and Simonneau, G. (2002). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine,* 346(12), 896-903.

Ruiter, G., de Man, F.S., Schalij, I., Sairras, S., Grunberg, K., Westerhof, N., van der Laarse, W.J., and Vonk-Noordegraaf, A. (2013). Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. *European Respiratory Journal,* 42(2), 553-556.

RxMediaPharma. (2021). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. from GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik Sanayi ve Tic. A.Ş.

Ryan, J., Bloch, K., and Archer, S.L. (2011). Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *International Journal of Clinical Practice,* 65(172), 15-34.

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 and Physics of Lipids,* 235, 105052.

Sanghai, B., Aggarwal, G., and HariKumar, S.L. (2013). Solid self microemulsifying drug deliviry system: A review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics,* 3(3), 168-174.

Sato, M. (2016). *Investigation of factors affecting the exposure of orally-administered drugs*, PhD Thesis, Kitasato University, Tokyo, Japan.

Sato, M., Toshimoto, K., Tomaru, A., Yoshikado, T., Tanaka, Y., Hisaka, A., Lee, W., and Sugiyama, Y. (2018). Physiologically based pharmacokinetic modeling of bosentan identifies the saturable hepatic uptake as a major contributor to its nonlinear pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition,* 46(5), 740-748.

Saudagar, R.B., and Patil, M.K. (2016). Solubility and dissolution enhancement of bosentan monohydrate by solid dispersion technique. *International Journal of Innovative Research and Advanced Studies,* 3(8), 221-226.

Scheubel, E. (2010). *Predictive in vitro dissolution tools : application during formulation development,* PhD Thesis, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.

Sek, L., Porter, C.J.H., Kaukonen, A.M., and Charman, W.N. (2002). Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 54(1), 29-41.

Senapati, P.C., Sahoo, S.K., and Sahu, A.N. (2016). Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz

for enhancement of oral bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 80, 42-51.

Shafiq-un-Nabi, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ali, J., Baboota, S., Ahuja, A., Khar, R.K., and Ali, M. (2007). Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. *AAPS PharmSciTech,* 8(2), E12-E17.

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., and Ali, M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 66(2), 227-243.

Shaji, J., and Lodha, S. (2008). Response Surface Methodology for the Optimization of Celecoxib Self-microemulsifying Drug delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 70(5), 585-590.

Shakeel, F., Haq, N., Alanazi, F.K., and Alsarra, I.A. (2014). Polymeric solid self-nanoemulsifying drug delivery system of glibenclamide using coffee husk as a low cost biosorbent. *Powder Technology,* 256, 352-360.

Sharma, G., Wilson, K., van der Walle, C.F., Sattar, N., Petrie, J.R., and Ravi Kumar, M.N. (2010). Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 76(2), 159-169.

Shin, S.H., Park, E.J., Min, C., Choi, S.I., Jeon, S., Kim, Y.H., and Kim, D. (2017). Tracking Perfluorocarbon Nanoemulsion Delivery by (19)F MRI for Precise High Intensity Focused Ultrasound Tumor Ablation. *Theranostics,* 7(3), 562-572.

Shukla, J.B., Koli, A.R., Ranch, K.M., and Parikh, R.K. (2010). Self micro emulsifying drug delivery system *Pharma Science Monitor an International Journal of Pharmaceutical Sciences,* 1(2), 19-33.

Shukla, S.N., Modi, D.C., and Shah, D.P. (2016). A review on solid self-nanoemulsifying drug delivery system: An approach for bioavailability enhancement. *World Journal of Pharmaceutical Sciences,* 5(5), 302-316.

Silva, L.A.D., Almeida, S.L., Alonso, E.C.P., Rocha, P.B.R., Martins, F.T., Freitas, L.A.P., Taveira, S.F., Cunha-Filho, M.S.S., and Marreto, R.N. (2018). Preparation of a solid self-microemulsifying drug delivery system by hot-melt extrusion. *International Journal Pharmaceutics,* 541(1-2), 1-10.

Simonneau, G., Galie, N., Rubin, L.J., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., Gibbs, S., Lebrec, D., Speich, R., Beghetti, M., Rich, S., and Fishman, A. (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology,* 43(12 Suppl S), 5S-12S.

Singh, B., Beg, S., Khurana, R.K., Sandhu, P.S., Kaur, R., and Katare, O.P. (2014). Recent advances in self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems,* 31(2), 121-185.

Singh, B., Singh, R., Bandyopadhyay, S., Kapil, R., and Garg, B. (2013). Optimized nanoemulsifying systems with enhanced bioavailability of carvedilol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 101, 465-474.

Singh, G., and Pai, R.S. (2014). Optimized self-nanoemulsifying drug delivery system of atazanavir with enhanced oral bioavailability: In vitro/in vivo characterization. *Expert Opinion on Drug Delivery,* 11(7), 1023-1032.

Sitbon, O., Gressin, V., Speich, R., Macdonald, P.S., Opravil, M., Cooper, D.A., Fourme, T., Humbert, M., Delfraissy, J.F., and Simonneau, G. (2004). Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,* 170(11), 1212-1217.

Sitbon, O., McLaughlin, V.V., Badesch, D.B., Barst, R.J., Black, C., Galie, N., Humbert, M., Rainisio, M., Rubin, L.J., and Simonneau, G. (2005). Survival in patients with class III idiopathic pulmonary arterial hypertension treated with first line oral bosentan compared with an historical cohort of patients started on intravenous epoprostenol. *Thorax,* 60(12), 1025-1030.

Smadja, D.M., Gaussem, P., Mauge, L., Israël-Biet, D., Dignat-George, F., Peyrard, S., Agnoletti, G., Vouhé, P.R., Bonnet, D., Lévy, M. (2009). Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation,* 119(3):374-81.

Snela, A., Jadach, B., Froelich, A., Skotnicki, M., Milczewska, K., Rojewska, M., Voelkel, A., Prochaska, K., and Lulek, J. (2019). Self-emulsifying drug delivery systems with atorvastatin adsorbed on solid carriers: formulation and in vitro drug release studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 577, 281-290.

Soliman, K.A., Ibrahim, H.K., and Ghorab, M.M. (2016). Formulation of avanafil in a solid self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced oral delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 93, 447-455.

Sri, B.U., and Muzib, Y.I. (2015). A review on SEDDS and solid SEDDS: An emerging dosage forms for poorly soluble drugs. *American Journal of Pharmatech Research,* 5(2), 31-47.

Stegelmeier, B.L., Colegate, S.M., and Brown, A.W. (2016). Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. *Toxins,* 8(12), 356.

Subramanian, P., and Siddalingam, R. (2017a). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of poorly soluble drug dutasteride: Formulation and in-vitro characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 7(04), 011-022.

Subramanian, P., and Siddalingam, R. (2017b). Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Poorly Soluble Drug Dutasteride: Formulation and In-Vitro characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.

Suram, D., Narala, A., and Veerabrahma, K. (2020). Development, characterization, comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of iloperidone solid SMEDDS and liquisolid compact. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 46(4), 587-596.

Syukri, Y., Martien, R., Lukitaningsih, E., and Nugroho, A.E. (2018). Novel Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of andrographolide isolated from Andrographis paniculata Nees: characterization, in-vitro and in-vivo assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 47, 514-520.

Taha, E.I., Samy, A.M., Kassem, A.A., and Khan, M.A. (2005). Response surface methodology for the development of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate. *Pharmaceutical Development and Technology,* 10(3), 363-370.

Talegaonkar, S., Azeem, A., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Pathan, S.A., and Khan, Z.I. (2008). Microemulsions: A novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation,* 2(3), 238-257.

Tan, A., Rao, S., and Prestidge, C.A. (2013). Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: An overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. *Pharmaceutical Research,* 30(12), 2993-3017.

Tanaka, H., Oasa, S., Kinjo, M., Tange, K., Nakai, Y., Harashima, H., and Akita, H. (2017). Temperature and pH sensitivity of a stabilized self-nanoemulsion formed using an ionizable lipid-like material via an oil-to-surfactant transition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 151, 95-101.

Tanaka M., and Miyajima A. (2012). Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. In: T. Ochiya (Eds.), *Liver Stem Cells: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, New York: Springer, Vol 826, 25-32.

Tayrouz, Y., Ding, R., Burhenne, J., Riedel, K., Weiss, J., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W.E., and Mikus, G. (2003). Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* 73(5), 397-405.

Thakur, P.S., Singh, N., Sangamwar, A.T., and Bansal, A.K. (2017). Investigation of need of natural bioenhancer for a metabolism susceptible drug-raloxifene, in a designed self-emulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech,* 18(7), 2529-2540.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., and Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry,* 74(5), 835-855.

Tiwari, B.D., Shikare, O.N., and Sontakke, A.M. (2014). Bioequivalence study: Overview. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation,* 3(5), 421-424.

Tokgoz, H.C., Can, M.M., and Kaymaz, C. (2010). Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi,* 10 Suppl 2, 9-15.

Tran, T., Siqueira, S., Amenitsch, H., Rades, T., and Mullertz, A. (2017). Monoacyl phosphatidylcholine inhibits the formation of lipid multilamellar structures during in vitro lipolysis of self-emulsifying drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 108, 62-70.

Trana, P.H.L., Tran, T.T.D., Piao, Z.Z., Vo, T.V., Park, J.B., Lim, J., Oh, K.T., Rhee, Y.S., and Lee, B.J. (2013). Physical properties and in vivo bioavailability in human volunteers of isradipine using controlled release matrix tablet containing self-emulsifying solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutics,* 450(1-2), 79-86.

Tsume, Y., Mudie, D.M., Langguth, P., Amidon, G.E., and Amidon, G.L. (2014). The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 57, 152-163.

USP In vitro and in vivo evaluation of dosage forms, (2007).

USP Pending Monograph Version 1-Bosentan, (2012).

Vadlamudi, H.C., Yalavarthi, P.R., Basaveswara Rao, M.V., Rasheed, A., and Tesejwari, N. (2017). In vitro characterization studies of self-microemulsified bosentan systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 43(6), 989-995.

Van Speybroeck, M., Mellaerts, R., Mols, R., Thi, T.D., Martens, J.A., Van Humbeeck, J., Annaert, P., Van den Mooter, G., and Augustijns, P. (2010). Enhanced absorption of the poorly soluble drug fenofibrate by tuning its release rate from ordered mesoporous silica. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 41(5), 623-630.

Van Speybroeck, M., Mellaerts, R., Thi, T.D., Martens, J.A., Van Humbeeck, J., Annaert, P., Van den Mooter, G., and Augustijns, P. (2011). Preventing release in the acidic environment of the stomach via occlusion in ordered mesoporous silica enhances the absorption of poorly soluble weakly acidic drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 100(11), 4864-4876.

Van Zoonen, P., Hoogerbrugge, R., Gort, S.M., van de Wiel, H.J., and van 't Klooster, H.A. (1999). Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *TrAC Trends in Analytical Chemistry,* 18(9-10), 584-593.

Vani, S.V., and Maravajala, V. (2016). Preparation and in vitro characterisation of bosentan monohydrate mucoadhesive mıicrospheres. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research,* 3(5), 340-350.

Villar, A.M.S., Naveros, B.C., Campmany, A.C.C., Trenchs, M.A., Rocabert, C.B., and Bellowa, L.H. (2012). Design and optimization of self-nanoemulsifying

drug delivery systems (SNEDDS) for enhanced dissolution of gemfibrozil. *International Journal of Pharmaceutics*, 431(1-2), 161-175.

Visnagri, A., Kandhare, A.D., Ghosh, P., and Bodhankar, S.L. (2013). Endothelin receptor blocker bosentan inhibits hypertensive cardiac fibrosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Cardiovascular Endocrinology & Metabolism,* 2(4), 85-97.

Vithani, K., Hawley, A., Jannin, V., Pouton, C., and Boyd, B.J. (2017). Inclusion of Digestible Surfactants in Solid SMEDDS Formulation Removes Lag Time and Influences the Formation of Structured Particles During Digestion. *The AAPS Journal,* 19(3), 754-764.

Vithani, K., Hawley, A., Jannin, V., Pouton, C., and Boyd, B.J. (2018). Solubilisation behaviour of poorly water-soluble drugs during digestion of solid SMEDDS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 130, 236-246.

Vithani, K., Jannin, V., Pouton, C.W., and Boyd, B.J. (2019). Colloidal aspects of dispersion and digestion of self-dispersing lipid-based formulations for poorly water-soluble drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 142, 16-34.

Volz, A.K., Krause, A., Haefeli, W.E., Dingemanse, J., and Lehr, T. (2017). Target-Mediated Drug Disposition Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Bosentan and Endothelin-1. *Clinical Pharmacokinetics,* 56(12), 1499-1511.

Vranikova, B., and Gajdziok, J. (2013). Liquisolid systems and aspects influencing their research and development. *Acta Pharmaceutica,* 63(4), 447-465.

Wang, Y.P., Gan, Y., and Zhang, X.X. (2011). Novel gastroretentive sustained-release tablet of tacrolimus based on self-microemulsifying mixture: In vitro evaluation and in vivo bioavailability test. *Acta Pharmacologica Sinica,* 32(10), 1294-1302.

Wang, Z., Sun, J., Wang, Y., Liu, X., Liu, Y., Fu, Q., Meng, P., and He, Z. (2010). Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics,* 383(1-2), 1-6.

Weber, C., Schmitt, R., Birnboeck, H., Hopfgartner, G., Eggers, H., Meyer, J., van Marle, S., Viischer, H.W., and Jonkman, J.H.G. (1999). Multiple-Dose Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Bosentan, an Endothelin Receptor Antagonist, in Healthy Male Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology,* 39, 703-714.

Weber, C., Schmitt, R., Birnboeck, H., Hopfgartner, G., van Marle, S.P., Peeters, P.A., Jonkman, J.H., and Jones, C.R. (1996). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* 60(2), 124-137.

Weerapol, Y., Limmatvapirat, S., Kumpugdee-Vollrath, M., and Sriamornsak, P. (2015). Spontaneous emulsification of nifedipine-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech,* 16(2), 435-443.

Wei, L., Li, J., Guo, L., Nie, S., Pan, W., Sun, P., and Liu, H. (2007). Investigations of a novel self-emulsifying osmotic pump tablet containing carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 33(9), 990-998.

Wessels, J.T., Busse, A.C., Mahrt, J., Dullin, C., Grabbe, E., and Mueller, G.A. (2007). In vivo imaging in experimental preclinical tumor research--a review. *Cytometry A,* 71(8), 542-549.

Williams, H.D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N'Goma, J.C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Carriere, F., Mullertz, A., Porter, C.J., and Pouton, C.W. (2012). 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., Van Speybroeck, M., Augustijns, P., and Porter, C.J. (2014). Lipid-based formulations solidified via adsorption onto the mesoporous carrier Neusilin(R) US2: effect of drug type and formulation composition on in vitro pharmaceutical performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 103(6), 1734-1746.

Wu, L., Qiao, Y., Wang, L., Guo, J., Wang, G., He, W., Yin, L., and Zhao, J. (2015). A Self-microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) for a Novel Medicative Compound Against Depression: a Preparation and Bioavailability Study in Rats. *AAPS PharmSciTech,* 16(5), 1051-1058.

Wu, W., Wang, Y., and Que, L. (2006). Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 63(3), 288-294.

Yadav, P., Rastogi, V., and Verma, A. (2020). Application of Box–Behnken design and desirability function in the development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced dissolution of ezetimibe. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences,* 6(1), 1-20.

Yaghi, S., Novikov, A., and Trandafirescu, T. (2020). Clinical update on pulmonary hypertension. *Journal of Investigative Medicine,* 68(4), 821-827.

Yamazaki, Y., Moore, R., and Negishi, M. (2011). Nuclear receptor CAR (NR1I3) is essential for DDC-induced liver injury and oval cell proliferation in mouse liver. *Laboratory Investigation*, 91(11), 1624-1633.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature,* 332(6163), 411-415.

Yang, S., Gursoy, R.N., Lambert, G., and Benita, S. (2004). Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharmaceutical Research,* 21(2), 261-270.

Yılmaz Usta, D., ve Teksin, Z.S. (2021). Türkiye Patent No: 2019 15787. Türk Patent ve Marka Kurumu.

Yilmaz 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.

Ying, J., Wu, J., Zhang, Y., Han, Y., Qian, X., Yang, Q., Chen, Y., Chen, Y., and Zhu, H. (2020). Ligustrazine suppresses renal NMDAR1 and caspase-3 expressions in a mouse model of sepsis-associated acute kidney injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 464(1), 73-81.

You, R., Qian, X., Tang, W., Xie, T., Zeng, F., Chen, J., Zhang, Y., and Liu, J. (2018). Cost Effectiveness of Bosentan for Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review. *Canadian Respiratory Journal,* 2018, 1015239.

Yu, A.H., Zhai, G.X., Cui, J., and Liu, H. (2006). [Preparation of puerarin solid self-microemulsion]. *Journal of Chinese Medicinal Materials,* 29(8), 834-838.

Zafar, A., El-Bagory, I., Alruwaili, N.K., Elkomy, M.H., Ahmad, J., Afzal, M., Ahmad, N., Elmowafy, M., Alharbi, K.S., and Alam, M.S. (2019). Development of novel dapagliflozin loaded solid self-nanoemulsifying oral delivery system: Physiochemical characterization and in vivo antidiabetic activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 54, 101279.

Zhang, J., Lv, Y., Zhao, S., Wang, B., Tan, M., Xie, H., Lv, G., and Ma, X. (2014). Effect of lipolysis on drug release from self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) with different core/shell drug location. *AAPS PharmSciTech,* 15(3), 731-740.

Zhang, P., Liu, Y., Feng, N., and Xu, J. (2008). Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *International Journal of Pharmaceutics,* 355(1-2), 269-276.

Zhang, X., Yi, Y., Qi, J., Lu, Y., Tian, Z., Xie, Y., Yuan, H., and Wu, W. (2013). Controlled release of cyclosporine A self-nanoemulsifying systems from osmotic pump tablets: Near zero-order release and pharmacokinetics in dogs. *International Journal of Pharmaceutics,* 452(1-2), 233-240.

Zhou, D., and Qiu, Y. (2010). Understanding Biopharmaceutics Properties for Pharmaceutical Product Development and Manufacturing IIDissolution and In Vitro-In Vivo Correlation. *Journal of Validation Technology,* 16(1), 57.

Zisowsky, J., Gehin, M., Kusic-Pajic, A., Krause, A., Beghetti, M., and Dingemanse, J. (2017). Pediatric Development of Bosentan Facilitated by Modeling and Simulation. *Pediatric Drugs,* 19(2), 121-130.

Zolgharnein, J., Shahmoradi, A., and Ghasemi, J.B. (2013). Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics,* 27(1-2), 12-20.

Zvonar, A., Berginc, K., Kristl, A., and Gasperlin, M. (2010). Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide. *International Journal of Pharmaceutics,* 388(1-2), 151-158

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/08/2017-E.118760

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zeynep Şafak TEKSİN, Duygu YILMAZ USTA, Serdar KULA, Çiğdem ELMAS, Perihan YALÇINKAYA'dan oluşan, G.Ü.ET-17.061 kod numaralı ve ***"Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo 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-17.061 and entitled ***"Development of Solid Self Emulsifying Drug Delivery Systems and in Vitro in Vivo Evaluations"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Sıçan Wistar (Erkek)
Hayvan Sayısı : 96

Ek:1 Liste

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/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Etik Kurul Onayı

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2017-088 23.08.2017
KONU: Onay

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **"KATI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRMELER"** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: **Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN, Gazi Ü. Eczacılık F.Farmasötik Teknoloji ABD**
Arş. Gör. Duygu YILMAZ USTA, Gazi Ü. Eczacılık F.Farmasötik Teknoloji ABD
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM, EÜ ARGEFAR

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU — Prof. Dr. Aytül ÖNAL (KATILMADI)

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL — Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN — Prof. Dr. Figen KIRKPINAR (KATILMADI)

Prof. Dr. Uğur KAYA — Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI

Öğr. Gör. Dr. M. Ayberk OKTAY — Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU — Tingiz ÖZCAN (KATILMADI)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILMAZ USTA, Duygu
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
	Hacettepe Üniversitesi İlköğretim Matematik Öğretmenliği	2007-2009
Lise	Giresun Anadolu Öğretmen Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
04.2014-08.2014	Özel Giresun Kent Hastanesi	Mesul Müdür
2014- Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce - 91,25 (YÖKDİL)
76,25 (YDS)
6 (IELTS)

Yayınlar

1. Yılmaz Usta D, Tımur 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, Revizyonda.

2. Olgaç S, **Yılmaz Usta D**, Inceçayır T. (2021). Comparison of tablet splitting techniques for dosing accuracy of nebivolol tablets: Hand splitting versus tablet cutter and knife. Saudi Pharmaceutical Journal, 29 (12) (2021) 1486-1491.

3. Inceçayır T, Olğaç S, **Yılmaz Usta D**, Teksin ZŞ. (2021). Role of surfactants on the dissolution behavior of tamoxifen, a weakly basic BCS class II drug. Dissolution Technologies, 28 (2), 6-15.

4. Yılmaz Usta D, Teksin ZŞ. (2020). Biopharmaceutics pharmacokinetics and patent evaluations of drugs used in the treatment of COVID-19: Current status in the development of generic drugs in Turkey. Gazi Medical Journal, 31 (3A), 498-509.

5. Yılmaz Usta D, Demirtaş Ö, Ökçelik C, Uslu A, Teksin ZŞ. (2018). Evaluation of in vitro dissolution characteristics of flurbiprofen, a BCS Class IIa drug. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 43 (2), 27-34.

6. Yılmaz Usta D, Teksin ZŞ. (2017). New approaches to in vitro dissolution rate studies, FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 40, 33-44.

7. Gülbağ S, **Yılmaz Usta D**, Gültekin HE, Oktay AN, Demirtaş Ö, Karaküçük AE, Çelebi FN. (2017). New perspective to develop memantine orally disintegrating tablet formulations: SeDeM expert system. Pharmaceutical Development and Technology, 23 (5), 512-519.

Patentler

1. Teksin ZŞ, **Yılmaz Usta D.** “Bosentan monohidrat yüklü sıvı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem ve tablet formülasyonu” Türk Patent ve Marka Kurumu. İncelemeli Ulusal Patent. Patent Başvuru No: 2019/15787. Tescil Tarihi: 21.05.2021.

2. Teksin ZŞ, **Yılmaz Usta D.** “Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları ile hazırlanan bosentan monohidrat yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin (SNEDDS) formülasyonu”. Türk Patent ve Marka Kurumu. İncelemeli Ulusal Patent. Patent Başvuru No: 2020/18841 (2020). Başvuru aşamasında.

3. Teksin ZŞ, **Yılmaz Usta D.** “Bosentan monohydrate loaded liquid self nanoemulsifying drug carrier system and tablet formulation”, PCT Başvurusu, Patent Başvuru No: PCT/TR2020/050945 (2020), Olumlu araştırma raporu 23.05.2021.

4. Teksin ZŞ, **Yılmaz Usta D.** “Formulations of bosentan monohydrate loaded self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) prepared with long-chain mono and diglyceride mixture”, PCT Başvurusu, Patent Başvuru No: PCT/TR2021/051258 (2021), Başvuru aşamasında.

Kitap Bölümü

1. Coban O, **Usta Yılmaz D**, Gulbag Pınar S. (2022). “Nanomaterials for photodynamic therapy”, Liposomes in photodynamic therapy, Prashant Kesharwani (Ed.), Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Elsevier Science Inc., New York, ABD (In press).

Proje

1. Çoban Ö (Yürütücü), **Yılmaz Usta D,** Gülbağ Pınar S**.** “Türkiye ilaç pazarında bulunan montelukast sodyum içeren tabletlerde USP çözünme ortamı ve biyouyumlu ortamlar için çözünme özelliklerinin değerlendirilmesi”, Proje No: THD-2021-9749, Araştırmacı, Başlama Tarihi: 28.09.2021, Süre: 6 ay.

2. Teksin ZŞ**, Yılmaz Usta D,** Kula S, Elmas Ç, Sezginer P. **“**Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro - İn Vivo Değerlendirmeler”, 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Kodu: 217S602, Bursiyer, 01.11.2018-01.11.2021.

Bildiriler

1. **Yılmaz Usta D**, Olgaç S, Teksin ZS: “Solid-state characterization studies of Bosentan-loaded solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) comprising of Neusilin® US2”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
2. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: “Modeling and comparison of *in vitro* dissolution profiles of bosentan monohydrate: commercial tablet *vs* S-SNEDDS tablet”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
3. **Yılmaz Usta D**, Olgaç S, Teksin ZS: “Development and validated of UV spectrophotometric and HPLC method of bosentan monohydrate for *in vitro* and *ex-vivo* samples”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
4. Olgac S, **Yılmaz Usta D**, Incecayir T: “Comparison of tablet splitting techniques for dosing accuracy of nebivolol tablets: Hand splitting versus tablet cutter and knife”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
5. 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.
6. Tımur B, **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: “Development of in vitro lipolysis-permeation method to estimate oral absorption of exemestane-loaded lipid-based formulation”**,** 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September, 2021.
7. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: “Development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system of bosentan using Box-Behnken design”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey, 22-25 June 2021.
8. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: “Comparison of biorelevant dissolution of medium chain mono and diglycerides based bosentan-loaded self-nanoemulsifying formulations”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey, 22-25 June 2021.

9. Tımur 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.

10. Olgac S, **Yılmaz Usta D**, Erman NA, Incecayir T, Teksin ZS: “Validated HPLC method for the determination of tenofovir and its application for *in-vitro* and *ex-vivo* investigations of tenofovir loaded double nanoemulsion”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey, 22-25 June 2021.

11. Olgac S, **Yılmaz Usta D**, Demirdaş B, Erman NA, Teksin ZS: “Modeling and comparison of in vitro dissolution profiles of naproxen sodium tablets in biorelevant media”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey, 22-25 June 2021.

12. 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, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.

13. 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, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.

14. 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.

15. Olgaç S, **Yılmaz Usta D**, Incecayır T, Teksin ZS: “Evaluation of *In-vitro* Dissolution *Ex-vivo* Permeability of Tenofovir Double Nanoemulsion Produced with the High Energy Method for Oral Drug Administration”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.

16. Yılmaz Usta D, Teksin ZS: "Evaluation of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery systems containing peceol", 48th Annual Meeting

of the Controlled Release Society, Virtual Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 25-29 July, 2021.

17. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: "Evaluation of ex-vivo permeability and in vitro dissolution of BOS-loaded S-SNEDDS tablets", 48th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Virtual Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 25-29 July, 2021.
18. Timur B, **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: "Assessment the correlation between in vitro dissolution and in vitro intestinal lipolysis data for bosentan loaded lipid-based formulations", 48th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Virtual Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 25-29 July, 2021.
19. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: "Development and in vitro characterization of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system", 12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Virtual Meeting, Vienna, Austria, 11-14 May, 2021.
20. Timur B, **Yılmaz Usta D**, Teksin ZS: "Comparison of in vitro lipolysisof 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.
21. **Yılmaz Usta D**, Tuğcu-Demiröz F, Teksin ZS: "Investigation of nanostructured lipid carriers (NLC)-based gel for thetransdermal delivery of ibuprofen: Preparation, characterization, textural properties and ex vivo skin permeation Studies", 12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Virtual Meeting, Vienna, Austria, 11-14 May, 2021.
22. **Yılmaz Usta D**, Olgaç S, Teksin ZŞ. "Development and Characterization of Bosentan Loaded Solid Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (S-SNEDDS)", 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Çeşme- İzmir, Turkey, October 14-16, 2019.
23. 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.
24. Olgaç S, **Yılmaz Usta D**, İnceçayır T, Teksin ZŞ. "Role of surfactants and pH on dissolution behavior of tamoxifen, a weakly basic BCS class II drug", AAPS PharmSci 360 Annual Meeting, Washington DC, USA, November 4-7, 2018.

25. **Yılmaz Usta D**, Olgaç S, İnceçayır T, Teksin ZŞ. “Modeling and comparison of in-vitro dissolution profiles of tamoxifen citrate immediate release tablets”, 19th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS 2018), Antalya, Turkey, p: 168-169, September 17-19, 2018.
26. **Yılmaz Usta D**, Tuğcu Demiröz FN, Teksin ZŞ. “Mechanical properties and ex-vivo skin permeation evaluations of ibuprofen emulsion gel for topical delivery”, ISOPS 2018, Ankara, Turkey, June 26-29, 2018.
27. **Yılmaz Usta D**, Teksin ZŞ. “The development of SNEDDS containing bosentan using long chain mono and diglyceride mixtures”, European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2018, Athens, Greece, May 24-28, 2018.
28. **Usta Yılmaz D**, Teksin ZŞ. “Construction of Pseudo-Ternary Phase Diagrams for the Preformulation SNEDDS Development of Bosentan, a BCS Class IIa”, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, 2018.
29. **Usta Yılmaz D**. Teksin ZŞ. “Evaluation of water and oil solubilities of bosentan. a BCS class IIa drug”, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, Turkey, October 11-13, 2017.
30. **Usta Yılmaz D**. Demirtaş Ö. Uslu A. Ökçelik C. Teksin ZŞ. “Evaluation of in vitro dissolution characteristics of non-steroidal antiinflammatory drugs in the turkish drug market-1: Flurbiprofen. a BCS Class IIa drug”, International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Turkey, November 12-15, 2015.
31. Oktay AN, Gülbağ S, Demirtaş Ö, **Usta Yılmaz D**, Gültekin HE. Karaküçük AE. Çelebi N. New perspective for memantine orally disintegrating tablet: SeDeM expert system, International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Turkey, November 12-15, 2015.

Burslar

1. Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü. 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2014 - 2. 01.10.2014 - 30.09.2018.

2. Bursiyer, 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı. Proje Kodu: 217S602. 01.11.2018-01.02.2019/11.01.2021.

Ödül

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Yayın Ödülü, 2018.

Sertifikalar

1. Eğiticilerin Eğitimi Sertifikası. Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi ve Uzaktan Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi. 08.05.2017- 02.06.2017.
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM), Türkiye, 19-27 Ekim, 2015.

Üye Olunan Kuruluşlar

1. Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
2. Farmasötik Bilimler Ankara Derneği (FABAD)
3. International Society for Drug Delivery Sciences and Technology (APGI)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

