

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

**DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜK GÖSTEREN İLAÇLARIN ORAL
FORMÜLASYONLARI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Farmasötik Teknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Mine Diril

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Yeşim KARASULU

İZMİR

2016

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

**DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜK GÖSTEREN İLAÇLARIN ORAL
FORMÜLASYONLARI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Farmasötik Teknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Mine Diril

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Yeşim KARASULU

İZMİR

2016

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan : Prof. Dr. H. Yeşim KARASULU

Üye : Prof. Dr. Özgen ÖZER

Üye : Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:.....

ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince değerli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım, manevi desteğini hiçbir konuda esirgemeyen, beni yüreklendiren ve yaşamım boyunca her zaman yanında olacağım yüksek lisans projemi baştan sona tamamlamama yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Yeşim Karasulu'ya,

Gerek ders, gerekse tez aşamamda her zaman desteğini gördüğüm ve başarımlarım konusunda inancını her zaman hissettiğim Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özgen Özer'e,

Çalışmamın Thessaloniki Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümünde gerçekleştirilen kısmında her türlü desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Ioannis Nikolakakis ve Sayın Dr. Athanasia Panagopoulou'ya,

Çalışmalarım süresince yardımları ve destekleri ile her zaman yanımda olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tezimin yazım ve istatistiksel değerlendirme aşamalarında bana yardımcı olan Sayın Dr. Mehmet Ali Ege'ye,

Lisans ve yüksek lisans eğitiminde beraber olduğum ve tez çalışmalarım sırasında anlayış gösteren arkadaşım Sayın Sevinç Aslan'a,

Beni hayatım boyunca destekleyen, fedakarlık ve sevgilerini esirgemeyen canım anneme, babama, ablalarım Özlem Diril ve Merve Diril, kardeşim İrem Diril, abilerim Alper Büyükbaş ve Koray Başar'a,

Varlıklarıyla mutluluk ve huzur bulduğum tezimi ilerletmemde en büyük manevi desteğim olan biricik yeğenlerimden ilk göz ağrım Çınar, Öykü, Miralp, Derin ve Defne'ye teşekkür ederim.

İzmir, 2016

Mine DİRİL

ÖZET

Bu çalışmanın amacı düşük çözünürlük gösteren etkin maddelerden biri olan atorvastatin kalsiyum (AtrCa) ile yenilikçi formülasyonlar geliştirip, bu formülasyonların in vitro salım, permeabilite özelliklerini ticari formülasyon ile karşılaştırmaktır.

Tez kapsamında primer hiperkolesterolemi, heterozigot hiperkolesterolemi veya kombine (karma) hiperlipidemili yetişkinlerde toplam kolesterol, LDL kolesterol, apolipoprotein B ve trigliseridin düşürülmesi tedavisinde oral yolla kullanılacak AtrCa içeren kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin (Self Microemulsion/Nanoemulsion Drug Delivery Systems; SMEDDS/SNEDDS/SEDDS), mikroemülsifiye sistemlerin katılaştırılması yöntemi ile hazırlanan pellet formülasyonlarının hazırlanışı, kalite kontrolü ve ticari formülasyon ile karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Bu amaçla seçilen etkin madde ile öncelikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile (HPLC) metot geliştirilip validasyonları gerçekleştirildi. AtrCa'un çeşitli yağ, YEM, YYEM ve tamponlarda çözünürlük çalışması yapıldı. Çözünürlük çalışması sonrası belirlenen yardımcı maddeler ile üçgen faz diyagramları çizilip en yüksek alan değeri veren üç formülasyona karar verildi. Termodinamik stabilite çalışmaları sonucu faz ayrışması gözlenmeyen stabil formülasyon kararlaştırıldı ve bu formülasyonun fizikokimyasal özellikleri incelendi. SMEDD formülasyonun içerik miktarı HPLC ile geliştirilen yöntem kullanılarak tayin edildi. Bu SMEDD formülasyonunun $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ %60±5 bağıl nemde ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ % 75±5 bağıl nemde altı ay boyunca stabilite çalışmaları gerçekleştirildi.

AtrCa'un bir diğer yenilikçi formülasyonu olan pellet formülasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için katı faza emdirilecek mikroemülsiyon bileşenleri çözünürlük çalışmaları ile, su miktarı ise viskozite değerlerine göre belirlendi. Katı faza emdirilen mikroemülsiyon ile pellet formülasyonları oluşturuldu ve bu

formülasyonda fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. Stabilitate ve içerik miktarı tayinleri yapıldı.

AtrCa etkin maddesinin, geliştirilen SMEDD formülasyonu ve pellet formülasyonunun in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilip ticari formülasyon ile kıyaslamalar gerçekleştirildi. İn vitro ortamda Caco-2 hücreleri ile yapılan permeabilite çalışmalarında AtrCa etkin maddesinin, SMEDD ve pellet formülasyonunun ve de ticari formülasyonun geçiş çalışmaları gerçekleştirildi. 0., 24., 48. ve 72. saatlerde etkin madde içermeyen ve etkin madde içeren SMEDD ve pellet formülasyonunun, AtrCa etkin maddesinin ve ticari formülasyonunun sitotoksitate çalışmaları yapıldı.

Gerçekleştirilen tüm çalışmalar sonucunda, elde edilen bulguların ışığında AtrCa içeren SMEDD ve SMEDD-pellet formülasyonlarının gelecekte yapılacak ileri çalışmalar ile hiperkolesterolemi tedavisinde umut vaat eden formülasyonlar olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Atorvastatin Kalsiyum, SMEDDS, SMEDD-pellet, in vitro permeabilite.

ABSTRACT

This study aimed to develop innovative formulations with low solubility active agent is one of atorvastatin calcium, formulations of this in vitro release experiment was to compare the permeability properties of the commercial formulation.

Within the content of this thesis, studies have been conducted for the preparation and quality control of atorvastatin calcium containing self micro/nano emulsion drug delivery systems (Self Microemulsion Drug Delivery Systems; SMEDDs) and preparation of pellet formulations by the method of the solidification of microemulsified systems that can be administered by peroral route for the treatment of primary hypercholesterolemia, heterozygous hypercholesterolemia or combined (mixed) hyperlipidemia in adults with total cholesterol, LDL cholesterol, apolipoprotein B and lowering triglyceride will be compared with the commercial formulation.

For this purpose, firstly the methods was developed and validated in selected active ingredients by HPLC. Atorvastatin calcium's solubility studies were done in various oil phases, surfactans, cosurfactans and buffers. After working with the solubility studies, triangle phase diagrams were drawn with specified compounds and three formulations were decided that the highest area value. Thermodynamic stability of study results was determined stable formulation was not observed phase separation and examined physicochemical properties of this formulation. The amount of ingredients of the SMEDD formulation was performed by HPLC. This SMEDD formulation's stability studies were carried out 25 ± 2 °C %60 \pm 5 relative humidity and 40 ± 2 °C %75 \pm 5 relative humidity for six months.

Another innovative formulation of atorvastatin calcium is the pellet formulation which formulation studies were conducted. Microemulsion components adsorbed solid-phase were determined by solubility studies and the amount of water was determined according to the viscosity of microemulsion

formulation. Pellet formulations were prepared by solid phase adsorbed microemulsion. Studies were made to specify physicochemical properties of this formulation. Stability and amount of content studies was carried out.

The active ingredient of atorvastatin calcium, developed SMEDD formulation and pellet formulations was studied in vitro release studies and compared with the commercial formulation. In vitro permeation studies were carried out with the Caco-2 cells for absorption studies of active ingredient of atorvastatin calcium, the pellet formulation, SMEDD formulations and commercial formulation. Cytotoxicity studies were conducted for atorvastatin calcium, without containing the active ingredient and with containing active ingredient of SMEDD formulation, without containing the active ingredient and with containing active ingredient of pellet formulation and commercial formulations for 0., 24., 48. and 72. hours.

As a result of all the studies performed, it was concluded that the findings are SMEDD and SMEDD- pellet formulations containing of the AtrCa, promising in the treatment of hypercholesterolaemia formulations with further studies to be done in the future.

Key words: Atorvastatin calcium, SMEDDS, SMEDDS-pellet, in vitro permeability.

İçindekiler

ÖNSÖZ	I
ÖZET	III
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ	XII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV
KISALTMALAR LİSTESİ.....	XIX
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 LİPİD BAZLI SİSTEMLERİN TANIMI VE GENEL ÖZELLİKLERİ (1, 2, 3, 4, 5)	3
2.1.1 Lipid Bazlı Sistemlerin Avantajları ve Dezavantajları (7, 11, 12, 13)	5
2.1.1.1 Lipid Bazlı Sistemlerin Avantajları	5
2.1.1.2 Lipid Bazlı Sistemlerin Dezavantajları	6
2.2 LİPİD BAZLI SİSTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI (10, 14, 15, 16)	6
2.2.1 Lipid Bazlı SEDD, SMEDD, SNEDD Sistemleri (11, 12, 22).....	8
2.2.1.1 Lipid Bazlı Sistemler ile Absorpsiyon ve Biyoyararlanımın Arttırılması	9
2.2.2 Lipid Bazlı Sistemlerin Formülasyonunda Yardımcı Madde Seçiminin Rolü (11, 15)	11
2.2.2.1 Lipidler	12
2.2.2.2 Yüzey Etkin Maddeler.....	13
2.2.2.3 Hidrofilik Çözeltiler	14
2.2.2.4 Yardımcı Çözücüler (11).....	15
2.2.3 Lipid Bazlı Sistemlerde Lenfatik Taşınma.....	15
2.2.4 Lipid Bazlı Sistemlerde Gıda Etkisini Azaltma (50, 57, 58)	17
2.2.5 Lipid Bazlı Sistemler ve Effluks Proteinleri ile Taşınma	18
2.2.6 Lipid Bazlı Formülasyonlarda İn vitro- İn vivo Korelasyon (68)	19
2.2.6.1 Lipid Bazlı Formülasyonlarda İn vitro Dağılım/Çökeltme Testi ve İn vivo Veriler (54, 30, 69)	19
2.2.6.2 Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gerçekleştirilen İn vitro Lipoliz Testleri ve İn vivo Veriler (52, 70, 71).....	21
2.2.6.3 Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Ex vivo Bağırsak Geçirgenliği Testleri ve İn vivo verileri (73, 74, 75, 76).....	24
2.2.7 Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gelecek Beklentiler	25
2.3 EKSTRÜSYON-SFERONİZASYON GRANÜLASYON TEKNİĞİ (79, 80).....	26
2.3.1 Ekstrüsyon- Sferonizasyon Tekniğinde Uygulama (81, 82, 83)	27
2.3.2 Ekstrüsyon- Sferonizasyon Tekniğinde Yöntem Tanımlama (84)	28
2.3.3 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Ekipman Dizaynı ve Proses Parametreleri.....	30
2.3.3.1 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Kuru Karıştırma Basamağı (84, 79)	30
2.3.3.2 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Granülasyon Basamağı (85, 86)	30
2.3.3.3 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Ekstrüsyon Basamağı (87, 88, 89, 90, 91, 92)	30
2.3.3.4 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Sferonizasyon Basamağı (88, 93, 94, 96)	33
2.3.3.5 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Kurutma Basamağı (97)	35
2.3.4 Ekstrüsyon- Sferonizasyon Tekniğinde Formülasyon Değişkenlerinin Ürüne Etkisi (80, 98, 99)	36
2.4 ATORVASTATİN KALSİYUM HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	38
2.4.1 Atorvastatin Kalsiyumun Farmakodinamik Özellikleri(100, 101,102, 103).....	38
2.4.2 Atorvastatin Kalsiyumun Farmakokinetik Özellikleri (104, 105, 106)	38
2.4.3 Atorvastatin Kalsiyumun İlaç Etkileşimleri (116)	40
2.4.4 Atorvastatin Kalsiyumun Terapötik Etkisi (117, 118, 119, 120)	41

2.4.5	<i>Hiperkolesterolemi</i>	43
2.4.5.1	Hiperkolesterolemi Tedavisinde Plasebo ile Karşılaştırma Verileri (124, 125, 126, 127, 128)	43
2.4.5.2	Hiperkolesterolemi Tedavisinde Diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile Karşılaştırma Verileri (120, 129, 130, 131, 132)	44
2.4.5.3	Homozigot Ailesel Hiperkolesterol Tedavisi Verileri (133).....	45
2.4.5.4	Hipertrigliseridemi ve Hiperlipidemi Tedavisi Verileri (134, 135, 136)	45
2.4.6	<i>Atorvastatin Kalsiyumun Tolere edilebilirlik Verileri (105, 111, 112, 113, 114, 130, 131, 137)</i>	46
2.4.7	<i>Atorvastatin Kalsiyum Kullanımında Doz ve Miktar (101, 138, 139)</i>	47
2.5	ORAL FORMÜLASYONLARDA HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI (140, 141).	48
2.5.1	<i>Caco-2 Hücreleri</i>	51
3	DENEYSEL BÖLÜM	55
3.1	ÇALIŞMANIN GENEL PLANI.....	55
4	GEREÇ VE YÖNTEM	57
4.1	KULLANILAN KİMYASAL MADDE, ARAÇ VE GEREÇLER	57
4.1.1	<i>Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	57
4.1.2	<i>Kullanılan Araç ve Gereçler</i>	57
4.2	YÖNTEM	58
4.2.1	<i>Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Atorvastatin Kalsiyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi</i>	58
4.2.1.1	Atorvastatin Kalsiyumun Infrared (IR) Spektrumu.....	58
4.2.1.2	Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre (UV) Spektrumu	58
4.2.2	<i>Atorvastatin Kalsiyumun Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi</i>	59
4.2.2.1	Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimi.....	59
4.2.2.2	Atorvastatin Kalsiyumun HPLC ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimi	59
4.2.2.2.1	Metanollü Ortamda Kalibrasyon Eğrisi Çizimi	59
4.2.2.2.2	pH 1.2 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi	60
4.2.2.2.3	pH 6.8 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi	60
4.2.2.2.4	HBSS Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi.....	60
4.2.3	<i>Analitik Yöntem Validasyonu</i>	60
4.2.3.1	Doğrusallık.....	60
4.2.3.2	Kesinlik	60
4.2.3.2.1	Deney İçi Kesinlik	60
4.2.3.2.2	Deneyler Arası Kesinlik.....	60
4.2.3.3	Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik	61
4.2.3.4	Özgünlük ve Seçicilik	61
4.2.3.5	Duyarlılık ve Saptama Sınırı	61
4.2.3.6	Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı	62
4.2.4	<i>Formülasyon Çalışmaları</i>	62
4.2.4.1	Kendiliğinden Mikroemülsiyeye Olan İlaç Taşıyıcı Sistem (SMEDDS) Formülasyonu Çalışmaları	62
4.2.4.1.1	Formülasyonunun Terkibinde Yeralacak Maddelerin Seçimi	62
4.2.4.1.2	SMEDD Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramları	63
4.2.4.1.3	Atorvastatin Kalsiyum ile Formülasyon Çalışmaları.....	63
4.2.5	<i>Termodinamik Stabilitate (197)</i>	63
4.2.5.1	Santrifüj Çalışmaları	64
4.2.5.1.1.1	Isıtma-Soğutma Çalışmaları	64
4.2.5.1.1.2	Dondurma-Çözme Çalışmaları	64
4.2.6	<i>Optimal SMEDD Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi</i>	64
4.2.6.1	SMEDD Formülasyonunun Fiziksel Görünüşü.....	64
4.2.6.2	SMEDD Formülasyonunun pH Ölçümleri.....	65
4.2.6.3	SMEDD Formülasyonunun Elektrik İletkenliği	65
4.2.6.4	SMEDD Formülasyonunun Dansite Ölçümleri	65
4.2.6.5	SMEDD Formülasyonunun Refraktif İndisi Ölçümleri	65
4.2.6.6	SMEDD Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümleri.....	66
4.2.6.7	SMEDD Formülasyonunun Emülsifikasyon Zamanı (197)	66
4.2.6.8	SMEDD Formülasyonunun Disperse Olabilme Özelliği (197)	66
4.2.6.9	SMEDD Formülasyonunun Dağılım Dayanıklılığı.....	66
4.2.6.10	SMEDD Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması	67
4.2.6.11	SMEDD Formülasyonunun Zetapotansiyel değeri (197)	67
4.2.6.12	SMEDD Formülasyonunun % Geçirgenlik Değeri (197).....	67

4.2.6.13	SMEDD Formülasyonunun Bulanıklık Tayini (197).....	67
4.2.6.14	SMEDD Formülasyonunun İçerik Miktar Tayini	67
4.2.6.15	SMEDD Formülasyonunun Stabilité Çalışmaları	68
4.2.7	<i>Pellet Formülasyonu Geliştirme</i>	68
4.2.7.1	Pellet Formülasyonu Oluşturmak için Mikroemülsiyon Formülasyonu Terkibinin Belirlenmesi	68
4.2.7.2	YYEM İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonun Yağ/YEM Oranı	68
4.2.7.3	YYEM İçermeyen Formülasyonlarda Çözünürlük Tayini.....	68
4.2.7.4	YYEM İçeren Formülasyonun Yağ/YEM Oranı.....	69
4.2.7.5	YYEM İçeren Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesi.....	69
4.2.7.6	Farklı Yüzdelerde Su İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması.....	69
4.2.7.7	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	70
4.2.7.7.1	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Tipi.....	70
4.2.7.7.2	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Viskozite Ölçümü	70
4.2.7.7.3	Mikroemülsiyon Formülasyonlarında Bulanıklık Ölçümü	70
4.2.7.8	Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesi	70
4.2.7.8.1	%60 Oranında Yağ/YEM/YYEM İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesi	70
4.2.7.8.1.1	P1 ve P2 Pellet Formülasyonlarının Hazırlanışı	71
4.2.7.8.1.2	P3 ve P4 Pellet Formülasyonlarının Hazırlanışı	71
4.2.7.9	Pelletlerde Yapılan Fizikokimyasal Analizler	74
4.2.7.9.1	Pelletlerin Yoğunluklarının Ölçülmesi	74
4.2.7.9.2	Pelletlerin Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite Ölçümleri.....	74
4.2.7.9.3	Pelletlerin Friabilitesinin Ölçülmesi.....	75
4.2.7.9.4	Pelletlerin Mikroskop Görüntüsü Analizi.....	75
4.2.7.9.5	Pelletlerin Titreşimli Elek Testi ile Boyut Analizi.....	75
4.2.7.9.6	Pellet Formülasyonlarının Emülsifikasyon Zamanı ve Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi.....	75
4.2.7.9.7	Pellet Formülasyonlarında İçerik Miktar Tayini	76
4.2.7.9.8	Pellet Stabilitesi	76
4.2.8	<i>İn vitro Salım Çalışmaları</i>	76
4.2.8.1	İn vitro Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirilmesi	77
4.2.9	<i>İn vitro Permabilite ve Sitotoksisite Çalışmaları</i>	77
4.2.9.1	Hücre Kültür Sistemleri ile İlgili Çalışmalar	77
4.2.9.1.1	Caco-2 Hücrelerinin Pasajlanması	77
4.2.9.1.2	Caco-2 Hücrelerinin Polikarbonat Filtre Üzerine Ekimi.....	78
4.2.9.1.3	Atorvastatin Kalsiyumun Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları	80
4.2.9.1.4	Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerinin Ölçülmesi.....	81
4.2.9.2	Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Testi	82
4.2.10	<i>İstatistiksel Değerlendirme</i>	83
5	BULGULAR	84
5.1.1	<i>Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Atorvastatin Kalsiyumun Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular</i>	84
5.1.1.1	Atorvastatin Kalsiyumun Infrared (IR) Spektrum Analiz Bulguları	84
5.1.1.2	Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometrik Spektrum Analizi Bulguları	84
5.1.2	<i>Atorvastatin Kalsiyumun Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimine Ait Bulgular</i>	85
5.1.2.1	Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	85
5.1.2.2	Atorvastatin Kalsiyumun HPLC ile Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	86
5.1.2.2.1	Metanollü Ortamda Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	87
5.1.2.2.2	pH 1.2 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	88
5.1.2.2.3	pH 6.8 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	88
5.1.2.2.4	HBSS Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular	89
5.1.3	<i>Atorvastatin Kalsiyumun Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular</i>	90
5.1.3.1	Doğruluk Sonuçları	90
5.1.3.1.1	Keskinlik Sonuçları	92
5.1.3.1.1.1	Deney İçi Keskinlik Sonuçları	92
5.1.3.1.1.2	Deneyler Arası Keskinlik Sonuçları.....	94
5.1.3.1.2	Özgünlük ve Seçicilik	95
5.1.3.1.3	Duyarlılık ve Saptama Sınırı.....	96
5.1.3.1.4	Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı	97
5.1.4	<i>Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular</i>	99

5.1.4.1	Kendiliğinden Mikroemülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistem (SMEDDS) Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	99
5.1.4.1.1	Formülasyon Terkibinde Yer Alacak Bileşenlerin Seçimine Ait Bulgular	99
5.1.4.1.2	SMEDD Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramlarına Ait Sonuçlar	100
5.1.4.1.3	Atorvastatin Kalsiyum ile Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	108
5.1.5	Termodinamik Stabilité Sonuçlarına Ait Bulgular	110
5.1.6	Optimal SMEDD Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	110
5.1.6.1	SMEDD Formülasyonunun Fiziksel Görünümü	110
5.1.6.2	SMEDD Formülasyonunun pH Ölçüm Bulgusu	110
5.1.6.3	SMEDD Formülasyonunun Elektrik İletkenliği Ölçüm Bulgusu	110
5.1.6.4	SMEDD Formülasyonunun Dansite Ölçüm Bulgusu	111
5.1.6.5	SMEDD Formülasyonunun Refraktif İndisi Ölçüm Bulgusu	111
5.1.6.6	SMEDD Formülasyonunun Viskozite Ölçüm Bulgusu	111
5.1.6.7	SMEDD Formülasyonunun Emülsifikasyon Zamanı Bulgusu	111
5.1.6.8	SMEDD Formülasyonunun Disperse Olabilme Bulgusu	112
5.1.6.9	SMEDD Formülasyonunun Dağılım Dayanıklılığı Bulguları	112
5.1.6.10	SMEDD Formülasyonunun Partikül Büyüklüğü Bulguları	115
5.1.6.11	SMEDD Formülasyonunun Zeta Potansiyel Bulguları	115
5.1.6.12	SMEDD Formülasyonunun % Geçirgenlik Bulgusu	115
5.1.6.13	SMEDD Formülasyonunun Bulanıklık Bulgusu	116
5.1.6.14	SMEDD Formülasyonunun İçerik Miktarı Bulgusu	116
5.1.6.15	SMEDDS Formülasyonunun Stabilité Çalışmaları	116
5.1.7	Pellet Formülasyonu Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular	117
5.1.7.1	Pellet Formülasyonları Oluşturmak için Geliştirilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarına Ait Bulgular	117
5.1.7.1.1	YYEM İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	117
5.1.7.1.2	YYEM İçeren Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	118
5.1.7.1.3	Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	118
5.1.7.1.3.1	Mikroemülsiyon Tipinin Belirlenmesi	118
5.1.7.1.3.2	Mikroemülsiyonların Viskozite Ölçümleri	118
5.1.7.1.3.3	Mikroemülsiyonların Bulanıklık Ölçümü	119
5.1.7.1.4	Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesine Ait Bulgular	119
5.1.7.1.4.1	%60 Oranında Yağ/ YEM/YYEM İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesine Ait Bulgular	119
5.1.7.1.5	Pelletlerde Yapılan Fizikokimyasal Analizlere Ait Bulgular	120
5.1.7.1.5.1	Pelletlerin Yoğunluk Analizi Bulguları	120
5.1.7.1.5.2	Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite Değerleri Sonuçları	120
5.1.7.1.5.3	Friabilite Analizi Sonuçları	121
5.1.7.1.5.4	Pelletlerin Mikroskop Görüntüsü Bulguları	121
5.1.7.1.5.5	Pelletlerin Titreşimli Elek Testi Bulguları	122
5.1.7.2	Pellet Formülasyonlarının Emülsifikasyon Zamanı ve Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi Bulguları	123
5.1.7.3	Pellet Formülasyonlarının Miktar Tayinlerine Ait Bulgular	124
5.1.7.3.1.1	Pelletlerin Stabilitelerine Ait Bulgular	125
5.1.8	İn vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	125
5.1.8.1	İn vitro Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirmesine Ait Bulgular	128
5.1.9	İn vitro Permeabilite ve Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular	129
5.1.9.1	Hücre Kültür Sistemleri ile İlgili Bulgular	129
5.1.9.1.1	Caco-2 Hücreleriyle Yapılan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	129
5.1.9.1.1.1	Caco-2 Hücrelerinin Polikarbonat Filtre Üzerine Ekimine Ait Bulgular	129
5.1.9.1.2	Atorvastatin Kalsiyumun Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	130
5.1.9.1.3	TEER (Transepitelyal elektrik rezistans) Değerinin Ölçülmesine Ait Bulgular	137
5.1.9.1.4	Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular	142
6	TARTIŞMA VE SONUÇ	143
6.1	GENEL DEĞERLENDİRME	143
6.2	ATORVASTATİN KALSİYUMUN ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	144
6.3	ATORVASTATİN KALSİYUMUN HPLC METODU VE VALİDASYON ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ ...	144
6.4	SMEDD FORMÜLASYONU İÇİN KULLANILACAK YARDIMCI MADDELERİN SEÇİMİ VE FORMÜLASYON GELİŞTİRME ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	146

6.5	SMEDD FORMÜLASYONUNUN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	147
6.6	PELLET FORMÜLASYONU GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	150
6.7	PELLET FORMÜLASYONUNUN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .	151
6.8	GELİŞTİRİLEN FORMÜLASYONLARIN VE TİCARİ PREPARATIN İNVİTRO SALIM ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	152
6.9	GELİŞTİRİLEN FORMÜLASYONLARIN VE TİCARİ PREPARATIN İNVİTRO PERMEABİLİTE VE SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	153
KAYNAKLAR		157
ÖZGEÇMİŞ.....		180



Tablolar Listesi

Tablo 1: Lipid formülasyonları Sınıflandırma Sistemi (10, 14, 15, 16).	8
Tablo 2: SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS lerin sistem karakteristikleri (11, 12).....	9
Tablo 3: Lipid bazlı formülasyonlar ve biyoyararlanım artışı (24, 25, 26, 28)	10
Tablo 4. Seçilmiş IVIVC örneklerine dayanarak In vitro lipoliz ve In vivo farmakokinetik verileri (54, 69, 70)	21
Tablo 5: In vitro dağılım/ çökelme/dissolüsyon ve in vivo farmakokinetik verilerine göre seçilmiş IVIVC örnekleri.....	23
Tablo 6. :Ex vivo geçirgenlik ve in vivo farmakokinetik verilere göre seçilen IVIVC örnekleri (69, 75, 76)	25
Tablo 7:Farklı oranlarda DCP-Avicel PH-101-Su karışımı sonucu oluşan ekstrüdatların ortalama por çapları ve kütle dansitesi sonuçları (90, 91, 92).....	32
Tablo 8: HMG_CoA redüktaz inhibitörlerinin farmakokinetik parametreleri: (101, 106, 111, 112, 113, 114, 115)	40
Tablo 9: Uluslararası kolesterol eğitim programı tarafından önerilen koroner kalp hastalığına (KKH) ¹¹⁸ sahip olan veya olmayan yetişkinlerde plazma kolesterol seviyelerinin ^a sınıflandırılması	42
Tablo 10: Geçirgenliğin hesaplanmasında kullanılan hücre kültürleri:.....	50
Tablo 11: Çözünürlük çalışmasında kullanılan Yağ/ YEM/YYEM ve su fazları	62
Tablo 12: HLB değeri 12.5 olan F18 ve F 19 formülasyon terkibi	68
Tablo 13: HLB değeri 15.5 olan F20 ve F21 formülasyon terkibi	68
Tablo 14: YYEM içeren formülasyonların terkipleri	69
Tablo 15: Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan su yüzdeleri	70
Tablo 16: Carr index ve akış karakteristikleri değerlendirilmesi	75
Tablo 17: Spektrofotometrede kalibrasyon eğrisi çizimi için konsantrasyon ve absorban değerleri.....	85
Tablo 18: Metanol ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri.....	90
Tablo 19: Metanol ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri.....	90
Tablo 20: pH 1.2 ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri.....	90
Tablo 21: pH 1.2 ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri.....	91
Tablo 22: pH 6.8 ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri.....	91
Tablo 23: pH 6.8 ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri.....	91
Tablo 24: HBSS ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri	91
Tablo 25: HBSS ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri	92
Tablo 26: Metanol ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri	92
Tablo 27: pH 1.2 ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri	93
Tablo 28: pH 6.8 ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri	93
Tablo 29: HBSS ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri	93
Tablo 30: Metanol ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri	94

Tablo 31: pH 1.2 ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri.....	94
Tablo 32: pH 6.8 ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri.....	95
Tablo 33: HBSS ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri.....	95
Tablo 34:Metanol ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	97
Tablo 35: Metanol ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	97
Tablo 36: pH 1.2 ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	97
Tablo 37: pH 1.2 ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	98
Tablo 38: pH 6.8 ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	98
Tablo 39: pH 6.8 ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	98
Tablo 40: HBSS ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	98
Tablo 41: HBSS ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi	99
Tablo 42: AtrCa' un farklı bileşenlerdeki çözünürlük miktarları	100
Tablo 43: SMEDD formülasyonlarının üçgen faz diyagramlarına ait sonuçlar	101
Tablo 44: F 3 formülasyonun terkihi ve HLB değeri	108
Tablo 45: F 7 formülasyonun terkihi ve HLB değeri	109
Tablo 46: F10 formülasyonun terkihi ve HLB değeri	109
Tablo 47: Termodinamik stabilite sonuçları.....	110
Tablo 48: Etkin madde içermeyen SMEDDS formülasyonun zeta avarage(dnm) değerleri	113
Tablo 49: Etkin madde içermeyen SMEDD formülasyonun polidispersite indeksi değerleri	113
Tablo 50: Etkin madde içeren SMEDDS formülasyonun zeta avarage (dnm) değerleri.....	113
Tablo 51: Etkin madde içeren SMEDDS formülasyonun polidispersite indeksi değerleri....	114
Tablo 52: F3 SMEDDS formülasyonuna ait partikül boyut (dnm) ve PDI değerleri.....	115
Tablo 53: SMEDDS formülasyonunun elektrik iletkenliği, vizkozite, pH, refraktif indisi, dansite ölçümüne ait veriler (t=0 anında).....	116
Tablo 54: SMEDD formülasyonlarının % içerik miktarları	116
Tablo 55: SMEDD formülasyonunun stabilite sonuçları	117
Tablo 56: YYEM içermeyen mikroemülsiyonlarda çözünürlük çalışması	117
Tablo 57: YYEM içeren mikroemülsiyonlarda çözünürlük çalışması	118
Tablo 58: Pellet oluşturmak için sarfedilen emülsiyon miktarları.....	119
Tablo 59: Pelletlerin yoğunlukları	120
Tablo 60: Pelletlere ait Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite, Hausner Oran ve Carr İndeks değerleri.....	120
Tablo 61: Pelletlere ait % Friabilite değerleri.....	121
Tablo 62: P1 pelletlerinin boyut dağılımı	122
Tablo 63: P2 pelletlerinin boyut dağılımı	123
Tablo 64: P3 pelletlerinin boyut dağılımı	123

Tablo 65: P4 pelletlerinin boyut dağılımı	123
Tablo 66: Pellet formülasyonlarının damlacık boyutu analiz bulguları.....	124
Tablo 67: P3 pellet formülasyonunun % içerik miktarları.....	124
Tablo 68: P4 pellet formülasyonunun % içerik miktarları.....	124
Tablo 69: P3 pellet formülasyonunun stabilite sonuçları	125
Tablo 70: Formülasyonların kinetik değerlendirme bulguları.....	129
Tablo 71: Her bir kuyucuk için ekilecek olan hücrelerin sayımına ait sonuçlar	130
Tablo 72: Ekim sırasında alınacak hücre süspansiyonu ve besiyeri miktarı (mL).....	130
Tablo 73: AtrCa etkin maddesi ve tüm formülasyonlara ait permeabilite değerleri sonuçları (\pm SS)	137
Tablo 74: Effluks değerlerine ait veriler (\pm SS).....	137
Tablo 75: AtrCa etkin maddesi ve farklı formülasyonlara ait apikal kısımdan bazolateral kısıma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait veriler (n=3, \pm SS).....	137
Tablo 76: AtrCa etkin maddesi ve farklı formülasyonlara ait bazolateral kısımdan apikal kısıma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait veriler (n=3, \pm SS).....	137
Tablo 77: Apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları boyunca hücre membranlarının TEER değerindeki % değişim	141
Tablo 78: Bazolateral yönden Apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları boyunca hücre membranlarının TEER değerindeki % değişim	142

Şekiller Listesi

Şekil 1: Lipid bazlı formülasyonlar için ürün geliştirme basamakları	5
Şekil 2: Biyoyararlanımı arttıran lipid formülasyonlarının mekanizması	11
Şekil 3: In vivo verilerin tahmin edilmesinde etkili olan kritik işlem parametrelerini içeren in vitro lipid sindirim deneyi. (1) Pankreatik lipid sindirim ortamı-(safra tuzu) (2) Kalsiyum klorid ekleme pompası (hız artarsa sindirimde artar) (3) pH 5.5-7.5 arasında optimize edilmiş ortam (4) Biyolojik ortamın sıcaklığı göstergesi(5) Sodyum hidroksit büreti-(düşük sodyum hidroksit molaritesi; bitiş zamanına hızla yaklaştırır- (yüksek molarite deneyde ani yükselmeye sebep olup bozulmaya neden olur) (6) Manyetik karıştırıcı (yüksek hız bileşenlerin bütünüyle karışmasına neden olur)	13
Şekil 4 :Ekstrüsyon/Sferonizasyon prosesinde önemli adımlar.	29
Şekil 5: Ekstrüsyon/ Sferonizasyon prosesinde herbir basamak sonrası ürünler. (A) Kuru karıştırılan toz; (B) granülasyondaki granüller; (C) ekstrüsyondan sonrasındaki ekstrüdat; (D) sferonizasyon sonrası küresel partiküller.	30
Şekil 6: Ekstrüsyon-Sferonizasyon tekniğinde kullanılan ekstrüder çeşitlerinin şematik gösterimi	33
Şekil 7: Beart ve ark. ise partiküllerin silindirik halden (1a), ipsi bir yapıya (1b), sarmal yapıya (1c), oyuklu şekile (1d) ve yuvarlak yapıya (1e) dönüşümünü öngörmüştür (93). Rowe ve ark. partiküllerin silindirik halden (2a), yuvarlatılmış kenara (2b), sarmal kenara (2c), elips yapıya (2d) ve yuvarlak yapıya (2e) dönüşümünü öngörmüştür (87).	35
Şekil 8: (A) Plastik yapıya sahip kütleden elde edilmiş yuvarlak pellet örneği, (B) Yeterli neme sahip olmayan ekstrüdatların sarmal yapı örneği.....	35
Şekil 9: Aynı etkin maddenin katı faz olarak farklı Avicel çeşitleriyle oluşturulduğu formülasyonlarının dissolüsyon profili.....	37
Şekil 10: Aynı katı faza (Avisel CL-611) sahip farklı miktarda etkin madde içeren formülasyonların dissolüsyon profili.....	37
Şekil 11: Atorvastatin kalsiyum'un yapısal formülü ((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-7-[2-(4-Fluorofenil)-3-fenil-4-(fenil karbomol)-5-propan-2-ylpürol-1-yl]-3,5-dihidroksiheptanoik asit.....	38
Şekil 12: Uluslararası kolesterol eğitim programı (NCEP) tarafından geliştirilen HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile muamele sonrasında hastaların yüzde olarak hedeflerine ulaşma profilleri. Geniş klinik denemelerde atorvastatin 10-20 mg/gün, lovastatin 20-40 mg/gün, provastatin 20-40 mg/gün, simvastatin10-20 mg/gün şeklinde uygulanmıştır.....	45
Şekil 13: Atorvastatin ile ilgili yan etkiler. Hiperkolesterolemi hastalarının 1 yıl boyunca günde 10-20 mg atorvastatin (n: 789) ile günde 20-40 mg lovastatin (n:260) kullanımı ile elde edilen sonuçları içerir.....	47
Şekil 14: Geçiş çalışmaları yapılırken kullanılan hücre-kuyucuk (plate) sistemi	54
Şekil 15: Pellet yapımında kullanılan ekstrüder cihazı	72
Şekil 16: Pellet yapımında kullanılan sferonizer cihazı	73
Şekil 17: Ekstrüder cihazından sonra katı hale gelmiş formülasyon	73

Şekil 18: Sferonizer cihazından geçen ve kurumuş pellet örneği.....	74
Şekil 19: Hücrelerin pasajlanmasında kullanılan hücre kültür erlenleri (flask).....	77
Şekil 20: Mikroskop altında Caco-2 hücrelerinin sayımı	79
Şekil 21: Hücrelerin ekiminde ve büyütülmesinde kullanılan kültür kabı ve polikarbonat filtrelerin şematik gösterimi (1, 2 ve 3 no'lu oklarla gösterilen kısım kuyucukları ifade eder)	79
Şekil 22: Caco–2 hücrelerinin besiyeri ortamının değiştirilmesi	80
Şekil 23: TEER değerinin ölçülmesinde kullanılan voltmetre	82
Şekil 24: Atorvastatin kalsiyum etkin maddesinin infrared spektrum görüntüsü	84
Şekil 25: Atorvastatin kalsiyum etkin maddesinin spektrum görüntüsü	85
Şekil 26: AtrCa'un 238 nm de metanol kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi	86
Şekil 27: Mobil faza ait kromatogram	87
Şekil 28: AtrCa içeren mobil faza ait kromatogram	87
Şekil 29: Metanol için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği	88
Şekil 30: pH 1.2 için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği	88
Şekil 31: pH 6.8 için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği	89
Şekil 32: HBSS ortamı için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği	89
Şekil 33: Mobil faza ait kromatogram	96
Şekil 34: Metanollü ortamda ortamda AtrCa içeren örneğe ait kromatogram	96
Şekil 35: SMEDD formülasyonlarının üçgen faz diyagramlarından elde edilen alanlar	107
Şekil 36: Mikroemülsiyon formülasyonların üçgen faz diyagramında oluşturdukları alan değerleri	107
Şekil 37: F3 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı.....	108
Şekil 38: F7 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı.....	109
Şekil 39: F10 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı.....	109
Şekil 40: Emülsifikasyon zamanına ulaşan F3 formülasyonunun görünümü	112
Şekil 41: Disperse olabilme denemesi sonucu F3 formülasyonu görünümü	112
Şekil 42: Etkin madde içermeyen SMEDDS formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği ..	114
Şekil 43: Etkin madde içeren SMEDDS formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği	114
Şekil 44:F3 SMEDD formülasyonunun zeta potansiyel grafiği	115
Şekil 45: Mikroemülsiyonların kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği.....	118
Şekil 46:Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilite değerlerinin gözlenmesi.....	119
Şekil 47: P1 pelletine ait mikroskop görüntüsü	121
Şekil 48: P2 pelletine ait mikroskop görüntüsü	121
Şekil 49: P3 pelletine ait mikroskop görüntüsü	122
Şekil 50: P4 pelletine ait mikroskop görüntüsü	122
Şekil 51: pH 1.2 ortamında AtrCa' un kapsüllü salım değerleri.....	126
Şekil 52: pH 6.8 ortamında AtrCa' un kapsüllü salım değerleri.....	126
Şekil 53: Konvansiyonel tabletin pH 6.8 ortamında salım değerleri	127
Şekil 54: F3 SMEDD formülasyonunun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri	127
Şekil 55: P3 Pellet formülasyonunun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri	128
Şekil 56: P4 Pellet formülasyonunun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri	128
Şekil 57: 10 mg AtrCa' un apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	131

Şekil 58: 10 mg AtrCa' un bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	131
Şekil 59: 10 mg AtrCa' un F3-SMEDD formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	132
Şekil 60: 10 mg AtrCa' un F3-SMEDD formülasyonunun (F3) bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	132
Şekil 61: 10 mg AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	133
Şekil 62: 10 mg AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunun bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	133
Şekil 63: 10 mg AtrCa' un Konvansiyonel tablet formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	134
Şekil 64: 10 mg AtrCa' un Konvansiyonel tablet formülasyonunun bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik.....	134
Şekil 65: Farklı formülasyonlara ait apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	135
Şekil 66: Farklı formülasyonlara ait bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik	136
Şekil 67: Farklı formülasyonlara ait Peffluks değerlerine ait grafik.....	136
Şekil 68: 10mg/mL AtrCa etkin maddesinin apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	138
Şekil 69: 10mg/mL AtrCa etkin maddesinin bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	138
Şekil 70: 10mg/mL AtrCa' un F3-SMEDDS formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	139
Şekil 71: 10mg/mL AtrCa' un F3-SMEDDS formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	139
Şekil 72: 10mg/mL AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	140
Şekil 73: 10mg/mL AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	140
Şekil 74: 10mg/mL AtrCa' un konvansiyonel tablet formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	141
Şekil 75: 10mg/mL AtrCa' un konvansiyonel tablet formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği	141
Şekil 76: Hazırlanan AtrCa içermeyen ve içeren formülasyonlarına ait % canlılık grafiği	142



Kısaltmalar Listesi

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
AtrCa	Atorvastatin Kalsiyum	Atorvastatin Calcium
SEDDS	Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler	Self Emulsifying Drug Delivery Dystem
SMEDDS	Kendiliğinden Mikroemülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler	Self Microemulsifying Drug Delivery System
SNEDDS	Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System
YEM	Yüzey Etkin Madde	
YYEM	Yardımcı Yüzey Etkin Madde	
FDA		Food and Drug Administration
BSS	Biyofarmasötik İlaç Sınıflandırma Sistemi	
GI	Gastrointestinal	
PEG 400	Polietilenglikol 400	
HPMC	Hidroksipropil Metil Selüloz	
NaCMC	Sodyum Karboksi Metil Selüloz	
PVC	Polivinil Klorür	
MC	Metil Selüloz	
MCC	Mikrokristalin Selüloz	
DDT	Dikloro Difenil TrikoloroEtan	
SCTs	Kısa zincirli yağ asidi	Short Chain Triglicerid
MCTs	Orta zincirli yağ asidi	Medium Chain Triglicerid
LCTs	Uzun zincirli yağ asidi	Long Chain Triglicerid
IVIVC	İn vitro İn Vivo Korelasyon	
SIF	Yapay Bağırsak Sıvısı	
FaSSIF	Açlık Durumunda Yapay Bağırsak Sıvısı	Fasted-state simulated intestinal fluid

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
FeSSIF	Tokluk Durumunda Yapay Bağırsak Sıvısı	Fed-state simulated intestinal fluid
LFSS	Lipid Formülasyon Sınıflandırma Sistemi	Lipid formulation classification system
HBSS	Hank's tuzlu tampon çözeltisi	
ATCC	American Tıp Hücre Kültürü	
Pba	Bazolateral yönden apikal yöne doğru permeabilite	
Pab	Apikal yönden bazolateral yöne doğru permeabilite	
TEER	Trans Epitelyal Elektrik Rezistansı	
P-gp	P-glikoprotein	
HLB	Hidrofilik Lipofilik Balans	
EAA	Eğri altı alan	
Cmax	Maksimum derişim seviyesi	
tmax	Maksimum derişime ulaşma zamanı	
HPLC (YBSK)	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	
IR	Infrared	
LOD	Dedeksiyon Limiti	Limit of Detection
LOQ	Tanımlama Limiti	Limit of Quantification
Caco-2	Kolonik adenokarsinoma hücreleri	
B→A	Apikal yönden bazolateral yöne doğru	
A→B	Bazolateral yönden apikal yöne doğru	
A ₁₂₀	Donor kompartmanda kalan miktar	

Kısaltma	Türkçe	İngilizce
RSS	Relatif standart sapma	
SS	Standart sapma	
Au	Alan Değeri	
Ort	Ortalama	
Am	Membrandaki miktar	
A _{OH}	Hücre içindeki miktar	
A ₀	T=0. zamanda ilaçlı kısmından alınan örnek	
A _F	T=120. zamanda ilaçlı kısmından alınan örnek	
KKH	Kroner Kalp Hastalığı	
HMG_CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril- KoA reduktaz	
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein	Low Density Lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein	Very Low Density Lipoprotein
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein	High Density Lipoprotein

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Tez kapsamında primer hiperkolesterolemi, heterozigot hiperkolesterolemi veya kombine (karma) hiperlipidemili yetişkinlerde toplam kolesterol, LDL kolesterol, apolipoprotein B ve trigliseridin düşürülmesi tedavisinde oral yolla kullanılan atorvastatin kalsiyumun (AtrCa) klasik tablet şekillerine alternatif, yeni dozaj şeklinin önerilmesidir. Bu amaçla oral yol ile kullanılacak, biyolojik etkinliği en yüksek düzeyde oluşturacak atorvastatin kalsiyum içeren kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen (Self Microemulsion/Nanoemulsion Drug Delivery Systems; SMEDDS/SNEDDS/SEDDS) ilaç taşıyıcı sistemlerinin ve mikroemülsifiye sistemlerin katılaştırılması yöntemi ile hazırlanan pellet formülasyonlarının geliştirmesi planlanmıştır. Geliştirilen bu formülasyonların kalite kontrolü ve ticari formülasyon ile karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

Düşük hidrofilik yapısı ve karaciğerde ilk geçiş eliminasyonunun yüksek oluşu oral AtrCa kullanımında biyoyararalanımının düşük olmasına yol açmaktadır. Bu bağlamda ilaç emilimini arttıracak ve karaciğerde ilk geçiş eliminasyonunu azaltacak yeni formülasyonların geliştirilmesi daha düşük dozlarda klinik etkinliğin elde edilmesini ve yan etki insidansının azaltılmasını sağlayacaktır. SMEDDS/SNEDDS/SEDDS, kolaylıkla hazırlanabilen ilaç, lipid, yüzey etkin ve yardımcı yüzey etkin maddeden oluşan; genellikle bir veya birden fazla yardımcı yüzey etkin madde içeren biyoyumlu sistemlerdir. Kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler, çözünürlük ve biyoyararlanım sorunu olan etkin maddelerin, çözünürlüğünün ve absorpsiyonunun iyileştirilmesinde etkili sistemlerdir. Katılaştırılmış mikroemülsiyon sistemi olan pellet formülasyonları ile ise iyi akış, düşük tozlanma, tekdüze dağılım, düşük friabilite, yüksek sertlik, kolay kaplama ve tekrar üretilebilen sistemler elde etmesi başarılmıştır. Ayrıca eşit dağılımlı çoklu partiküler sistemlerde elde edilebilir ve bu partiküler sistemler, gastrointestinal yolu ve gastrointestinalden geçiş süresini uzatır veya bazı bileşiklere toleransı arttırır. Genellikle küre veya granül özelliği bulunan formülasyonlara uygulanması yüksek verimli sonuçlar elde etmeyi sağlamaktadır.

Çalışmamız, formülasyon geliştirme ve karakterizasyonu, in vitro salım çalışmaları, hücre kültürü geçiş çalışmaları olmak üzere üç aşamada planlanmıştır. Öncelikle formülasyon çalışmaları sırasında, farklı yüzey etkin maddeler ve lipidler kullanılarak AtrCa içeren kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler ve mikroemülsiyonların katılaştırılarak pellet formülsyonları geliştirilecek ve bu formülasyonların fizikokimyasal stabiliteleri araştırılacaktır. Ayrıca geliştirilen formülasyonların in vitro salım hızı profilleri karşılaştırılacaktır. Yine geliştirilen formülasyonların hücre kültürlerinden (Caco-2) geçişleri incelenerek etkin maddenin absorpsiyonu üzerine formülasyonun etkisi araştırılacaktır ve ticari preparatın sonuçları ile karşılaştırılacaktır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Lipid Bazlı Sistemlerin Tanımı ve Genel Özellikleri (1, 2, 3, 4, 5)

Lipit bazlı formülasyonlar düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanım gösteren etkin maddelerin mide bağırsak sistemlerinde çözünürlüğünü arttırdığı için son yıllarda ilgi çeken ilaç taşıyıcı sistemleri arasındadır. Bu formülasyonlar gıda etkisini azaltmak, kişiler arası varyasyonu azaltmak, kolay hazırlanmak gibi birçok avantaja sahiptir. Fakat bu formülasyonların oral kullanımdan sonra farmakokinetik ve biyofarmasötik mekanizmalarının anlaşılabilirliğinin kısıtlı olması ve in vitro testlerin yetersiz olması nedeniyle ilaç pazarında sınırlı sayıda lipid bazlı formülasyon karşımıza çıkmaktadır (6, 7, 8).

Hali hazırda ilaç pazarında bulunan farmasötik formülasyonlarda yer alan etkin maddelerin yaklaşık % 40'ı, ilaç pazarına girecek farmasötik formülasyonların terkininde yer alan etkin maddelerin ise %70 den fazlası düşük çözünürlüğe sahiptir. Lipid bazlı sistemler genellikle suda düşük çözünürlük gösteren etkin maddelerin formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılır. Pouton ve Porter (9, 10) lipid bazlı sistemler konusunda yoğun araştırmalar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda hem farmasötik endüstride, hem de akademik alanda lipid formülasyonlar hakkında farkındalık ve anlaşılabilirlik artmıştır.

İlaç salım sistemlerinde lipid bazlı formülasyonların;

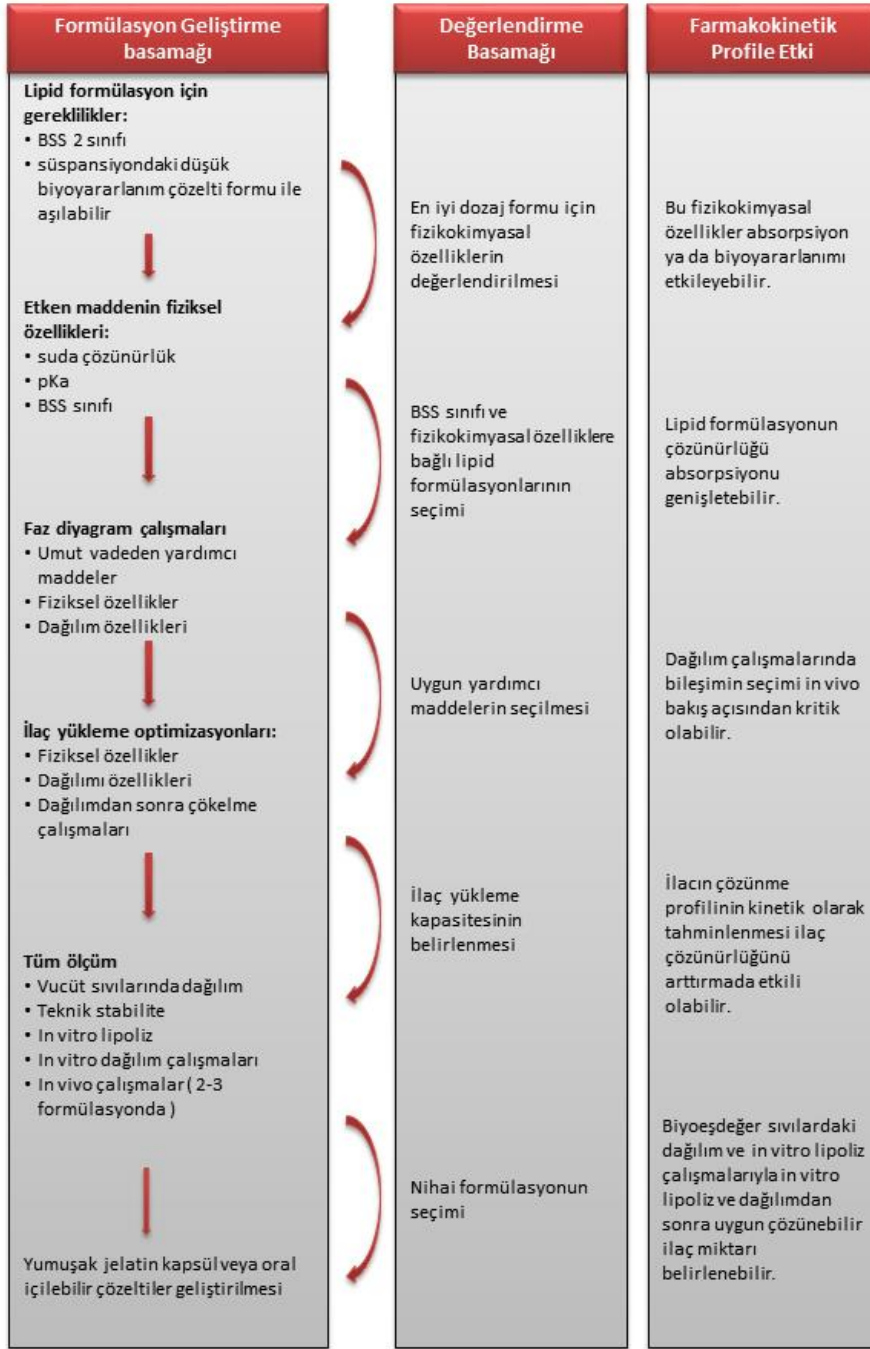
- lipid çözeltileri,
- lipid süspansiyonları,
- çoklu ve kuru emülsiyonları,
- kendiliğinden emülsifiye olabilen lipid bazlı formülasyonları,

en önemli formülasyon çeşitlerini oluşturmaktadır.

Lipid bazlı sistem formülasyonlarının hazırlanması, tablet ve kapsül gibi katı dozaj şekillerinin hazırlanmasından daha basit bir sürece sahiptir. Lipid bazlı formülasyonların terkininde kullanılan yardımcı maddeler; lipidler/yağlar (doğal

veya sentetik kaynaklı), yüzey etkin maddeler (hidrofilik veya hidrofobik), hidrofilik çözeltiler veya yardımcı yüzey etkin maddeler şeklindedir. Hazırlanmalarından sonra uygun meyve özlü veya diyet sıvılar içeren çözeltilerde dağıtılarak ya da yumuşak jelatin kapsül, sıvı kaplı sert jelatin kapsüllerde de kullanıma sunulabilirler. Ayrıca inert bir yardımcı toz maddeye (Avisel, Aerosil, vb) sıvı kendiliğinden emülsifiye sistemin emdirilmesi ile katı farmasötik dozaj şekilleri hazırlanabilir. Lipid bazlı formülasyonların geliştirilmesinde uygulanan genel işlemlerin herbir adımı ve bu adımların farmakokinetik profile etkisi Şekil 1’de tanımlanmıştır.





Şekil 1: Lipid bazlı formülasyonlar için ürün geliştirme basamakları

2.1.1 Lipid Bazlı Sistemlerin Avantajları ve Dezavantajları (7, 11, 12, 13)

Lipid bazlı sistemler hazırlanış, in vitro karakterizasyon, in vivo davranış ve üretim yönleri açısından değerlendirildiğinde birçok avantaj ve dezavantaja sahiptir.

2.1.1.1 Lipid Bazlı Sistemlerin Avantajları

Lipid bazlı sistemlerin sağladığı avantajlar sıralanmak istenirse;

- Biyoyararlanımı arttırırlar.

- p-glikoproteinleri inhibe ederek etkin maddeye olan effluks etkisi ve sitokrom enzimlerinin bağırsak membranına bağlanması ile ön absorpsiyon metabolizmasını azaltırlar.
- Lipofilik özellikte etkin maddenin ilaç taşınımını arttırlar.
- Mide bağırsak sisteminde absorpsiyonu arttırlar.
- Hassas bileşime sahip etkin maddeleri enkapsüle yaptıkları için çevre etkisine karşı korurlar.
- Yüksek etkin madde yüklemesine olanak sağlarlar.
- Sıvı-katı dozaj şeklinde üretilebilirler.
- Üretimleri kolaydır.

2.1.1.2 ***Lipid Bazlı Sistemlerin Dezavantajları***

Lipid bazlı sistemlerin sağladığı dezavantajlar sıralanmak istenirse;

- İn vitro modeller formülasyonların değerlendirilmesi için yeterli değildir.
- Yüksek konsantrasyonda yüzey etkin madde (YEM) (yaklaşık olarak %30-60) içeren formülasyonlar mide-bağırsak sisteminde iritasyona neden olabilirler.
- Kullanılan yardımcı yüzey etkin maddeler (YYEM) yumuşak veya sert jelatin kapsülden sızabilir. Bu durum lipofilik özelliğe sahip etkin maddenin formülasyonda çökmesine neden olabilir.

2.2 **Lipid Bazlı Sistemlerin Sınıflandırılması (10, 14, 15, 16)**

Lipid bazlı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddeler geniş özellik aralığında bulunmasından dolayı bu formülasyonların anlaşılabilirliğini arttırmak için Pouton ve arkadaşları (17) lipid formülasyon sınıflandırma sistemini (LFSS) tanımlamışlardır (Tablo 1). LFSS tablosuna göre lipid bazlı formülasyonlar Tip I, Tip II, Tip III (A, B) ve Tip IV olmak üzere dört kategoriye ayrılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre araştırmacılar formülasyonları çökelmeyen, hızlı çökelen ve yavaş çökelen sistemler olarak sınıflandırmışlardır. Bir başka çalışmada ise araştırmacılar

çeşitli lipid bazlı formülasyonların geliştirilmesinde etkin madde olarak fenofibrat kullanmış ve sulu ortamda bu sistemlerin önce dağılımını, daha sonra etkin madde çözünürlüğünü incelemişlerdir (18). Araştırmacılar fenofibrat içeren Tip II sistemin sulu ortamda önce dağılıp, daha sonra bulanık bir emülsiyon oluşturmasına karşın bir süre sonra çözünmüş ilacın yavaş çökelti oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Tip III A formülasyonunda ise fenofibratı içeren sistemin sulu bir ortamda dağılımında birkaç saat metastabil halde olduğunu, Tip III B formülasyonunda ise sistemin yüksek derecede yüzey etkin madde içermesinden dolayı etkin maddenin hızla çökmesine yol açtığını gözlemişlerdir. Tip IV sisteminde ise fenofibratın çözünme görünümünün ardından belirli bir sonra çökme eğiliminde olduğu gözlemişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar, çözünmüş haldeki bir etkin madde için uygun bir lipid bazlı sistemin seçiminin önemini göstermektedir. Tip II sistemleri ilacın çökmesinin önlenmesi için uygun seçenek gibi görünse de, aşırı doygunluk durumunda in vivo ortamda çökmenin önüne geçmek adına da çalışmalar yapılmalıdır. Bu amaçla viskozite arttırıcı ajan olarak hidrofilik polimerik maddeler formülasyonlara dahil edilmektedir (15). Özellikle lipid yardımcı maddelerinde düşük çözünürlük gösteren ve yüksek terapötik doz gerektiren etkin maddelerin formülasyonu için viskoz arttırıcı maddelerin kullanılması doğru bir yaklaşımdır. Çökelmeyi önleyici ajanlar önemli ölçüde çökme zamanını azaltırlar. Eğer etkin maddenin çökmesi için geçen zaman, absorpsiyon için gerekli olan zamandan daha uzun ise suda çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin absorpsiyonunu genişletirler ve dolayısıyla biyoyararlanımı arttırırlar. Bu kategoride en çok kullanılan polimer yardımcı maddeleri; hidroksipropilmetilselüloz (HPMC), metilselüloz (MC), sodyumkarboksimetilselüloz (NaCMC), polivinilprolidon (PVP) dir. Yapılan bir çalışmada paklitaksel içeren kendiliğinden mikroemülsifiye olabile sistem (SMDES=self microemulsifying drug delivery system) formülasyonunda etkin maddenin hızla çökmesine engel olmak amacıyla HPMC kullanılmış ve sıçanlarla yapılan in vivo çalışma sonucunda biyoyararlanımın 9 kat arttığı gözlenmiştir (19). Aynı şekilde karbomezopin etkin maddesinin SMEDDS formülasyonunda çok hızlı çökme gösterdiği gözlenmiş ve çökme önleyici ajan olarak PVP kullanılmıştır. Köpeklerle yapılan in vivo çalışma sonucu ticari formülasyon ile karşılaştırıldığında biyoyararlanımın 5 kat arttığı gözlemlenmiştir (20, 21).

Tablo 1: Lipid formülasyonları Sınıflandırma Sistemi (10, 13, 15, 16).

	Tip I	Tip II	Tip III a	Tip III b	Tip IV
Trigliserid ve gliserid karışımları	%100	%40-80	%40-80	<%20	-
HLB<12 YEM	-	%20-60	-	-	-
HLB>12 YEM	-	-	%20-40	%20-50	%30-80
Hidrofilik yardımcı çözücüler	-	-	%60-40	%20-50	%0-50
Dağılımın partikül boyutu (nm)	Kaba	100-500	100-250	50-100	-
Sulu dispersiyon un önemi	Sınırlı	Çözücü kapasitesi yüksek	Çözücü kapasitesi bir miktar azalır	Çözücü kapasitesi kaybı	Miseller dağılım
Özellikleri	Dağılmaz, sindirim gereklidir	Suda çözünebilir bileşenler olmaksızın SEDDS formülasyonu	Suda çözünür bileşenler ile SEDDS/SMEDDS/SNEDDS formülasyonları	Suda çözünen ve düşük yağ bileşenli SMEDDS formülasyonları	YEM ve yardımcı çözücülerle oluşturulmuş yağsız çözelti formülasyonları
Avantajları	Kapsülle geçimli	Dispersiyon da çözücü kaybı imkansız	Neredeyse berrak bir dağılım, sindirim olmaksızın etkin madde absorpsiyonu	Sindirim olmaksızın berrak bir dağılım	Bir çok etkin madde için iyi çözücü kapasitesi,
Zorlukları	Etkin madde yüksek lipofilik değilse formülasyonun zayıf çözücü kapasitesine sahip	Bulanık yağ/su dağılımı	Dispersiyonda muhtamel çözücü kapasite azalması, sindirim zorlaşır	Dispersiyonda muhtamel çözücü kapasitesi kaybı	Dispersiyonda çözücü kapasitesi kaybı, sindirim olmayabilir

2.2.1 Lipid Bazlı SEDD, SMEDD, SNEDD Sistemleri (11, 12, 22)

Lipid bazlı sistemlerden Tip II ve Tip III sınıfında bulunan kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri (SEDDS), kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri (SMEDDS) ve kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri (SNEDDS) günümüzde önem kazanmaktadır. Bu sistemlerin partikül boyutları nanometreler ile mikrometreler arasında değişmektedir. Susuz olan bu sistemler genelde mide-bağırsak ortamında kendiliğinden emülsifiye

(mikro/nano) olmaları ve etkin maddelerin stabilitelerini arttırmalarını sağladıkları için oral formülasyonlarda tercih edilirler. SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS lerin sistem karakteristikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: SEDDS, SMEDDS ve SNEDDS lerin sistem karakteristikleri (11, 12)

Sistem Karakteristikleri	SEDDS	SMEDDS	SNEDDS
Dağılımdaki damlacık boyutu	200 nm-5µm Dağılım bulanık bir görünüme sahiptir.	<100 nm Dağılım berraktır.	<250 nm Dağılım berrak veya yarısaydam görünüme sahiptir.
Dağılımın stabilitesi	Termodinamik olarak stabil değildir.	Termodinamik olarak stabildir.	Kinetik olarak stabildir.
Çözücü kapasitesi	SEDDS, SMEDDS, SNEDDS yüksek çözücü ve yüksek dağıtıcı özelliğe sahiptir.		
Sindirilebilirliğin önemi	Önemi yoktur fakat genellikle oluşur.	Gerekli değildir.	Önemi yoktur fakat engellenebilir.

2.2.1.1 *Lipid Bazlı Sistemler ile Absorpsiyon ve Biyoyararlanımın Arttırılması*

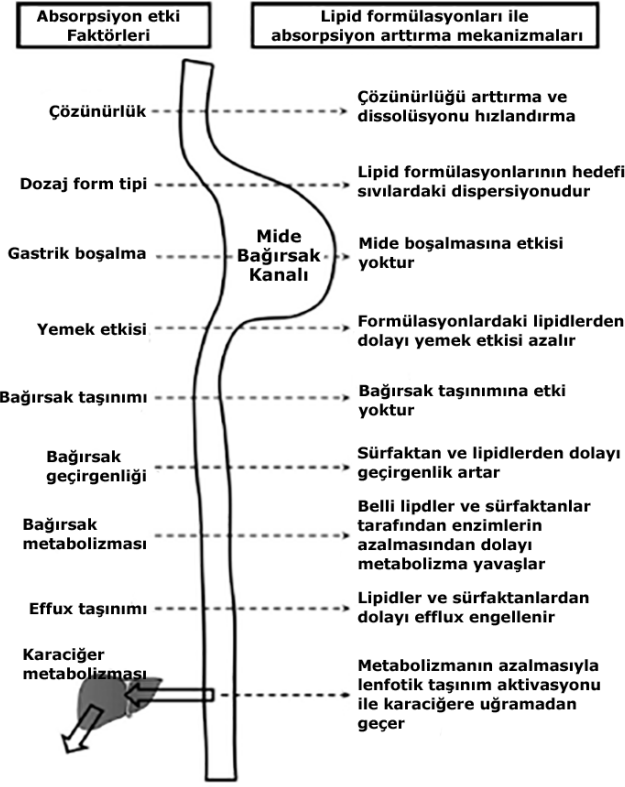
Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri (SEDDS) ve kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri (SMEDDS, SNEDDS) gibi lipid formülasyonlarının amacı gastrointestinal (GI) yol boyunca minimum çökelmeyle çözülmüş ilacın transferini sağlayarak suda az çözünen ilaçların biyoyararlanım ve absorpsiyonlarını arttırmaktır (Şekil 2). Biyoyararlanımın arttırılması için safra ve pankreas salgılarının arttırılması, absorpsiyonun gerçekleşeceği bölgeye ulaşmak için gerekli sürenin azaltılması, GI den geçiş süresinin arttırılması, ilk geçiş etkisini yok etmek için lenfatik sistemin uyarılması, membran akışkanlığı ve sıkı bağlantı noktalarının gevşetilerek bağırsak duvarının geçirgenliğinin arttırılması, ilaçların enkapsülasyon yöntemiyle intestinal metabolizmasının azaltılması gibi yöntemler literatürlerde oldukça yer almaktadır (23). Literatürlerde suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeleri içeren lipid bazlı sistemlerin bu etkin maddelerin absorpsiyon ve biyoyararlanımlarını arttırdığını gösteren birçok çalışma söz konusudur. Bu çalışmaların bazıları Tablo 3’de özet halinde bulunmaktadır (24, 25, 26) .

Lipid formülasyonlarına örnek olarak siklosporin A içeren Novartis (27) tarafından piyasada bulunan Sandimmune® ve Sandimmune Neoral® formülasyonları örnek verilebilir. Sandimmune® Labrafil M1944CS, zeytinyağı ve

etanol içeren SEDDS formülasyonu 1981 yılında Avrupa ilaç pazarına girmiştir. Bu formülasyon suda dağıtıldığı zaman büyük partikül boyutuna sahip su içinde yağ formülasyonu oluşturmuş ve yüksek polidispersite değerine sahip olmuştur. 1994 yılında bu formülasyon Kremofor RH40, mısır yağı gliseridleri, propilen glikol ve etanolden oluşan SMEDDS formülasyonu ile Sandimmune Neorals® markası altında tekrar piyasaya sürülmüştür. Kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen bu sistemin damlacık boyutu 100 nm den daha küçük yapıda bulunmuştur. Sandimmune® ve Sandimmune Neoral® karşılaştırıldığında Sandimmune Neoral® in daha geniş biyoyararlanım ve absorpsiyona sahip olduğu gözlenmiştir (28, 29, 30, 31, 32).

Tablo 3: Lipid bazlı formülasyonlar ve biyoyararlanım artışı (24, 25, 26, 28)

İlaç / BSS sınıfı	Formülasyon (yardımcı maddeler)	İn vivo	Biyoyararlanıma etkisi	Mekanizma
Acyclovir/ BSS III	Mikroemülsiyon (Labrafak, Labrasol, Plurol, oleik asit, su)	Sıçan	Tabletle karşılaştırıldığında biyoyararlanım 12.78 kat artmıştır	etkin maddenin çözünürlük artışı
Atorvastatin / BSS II	SMEDDS (Labrafil, Kremofor RH40, Propilen glikol)	Köpek	Tabletle karşılaştırıldığında biyoyararlanım 1.5 kat artmıştır	Etkin maddenin çözünürlük ve. mukozal geçirgenlik artışı
Carvedilol / BSS II	SEDDS (Labrafil M1944CS, Tween 80, Transkutol)	Köpek	Tabletle karşılaştırıldığında biyoyararlanım 4.1 kat artmıştır.	Çözünürlük ve dissolüsyon hızı artışı
Koenzim / Q10 BSS II	SEDDS (Myvacet 9-45, Labrafak CM-10, Lauroglükol)	Köpekler	Tozu ile karşılaştırıldığında biyoyararlanım 2 kat artmıştır.	Suda çözünürlük artışı
Siklosporin/ BSS II	SEDDS-Sandimmune (mısır yağı, etanol) SMEDDS-Neoral(mısır yağı gliseridleri, kremofor RH40,etanol)	İnsan	Biyoyararlanım arttırmıştır. Neoral Sandimmune ye göre üstün olmakla birlikte gıda etkisini azaltmış, dozlama homojenliği sağlamış, bireyler arası farklılığı azaltmıştır.	Sandimmune ile karşılaştırıldığında Neoral formülasyon yapısından dolayı suda artan dilüsyon kapasitesi
Danazol / BSS III	LCT çözeltisi (Soya yağı) LCT-SMEDDS (Soya yağı, Maisine 35-1, Kremopor EL, Etanol) MCT-SMEDDS (Kapteks 355, Kapmul MCM, Kremofor EL)	Köpek	Biyoyararlanım LCT çözeltisi> LCT-SMEDDS> MCT-SMEDDS >mikronize toz sırasıyla artmıştır.	Çözünürlük sağladıkları için biyoyararlanım artışı
Griseofluvin / BSS II	Mısır yağı emülsiyonu, mısır yağı süspansiyonu	Sıçan	Biyoyararlanım Mısır yağı emülsiyonu> mısır yağı süspansiyonu>sulu süspansiyon sırasıyla artmıştır.	Emülsiyonda çözünürlük arttığından dolayı biyoyararlanım artışı
Halofantrine / (II)	MCT-SEDDS (Kapteks 355, Kapmul MCM, Kremofor EL, etanol)	Köpek	Tablet formülasyonuna kıyasla biyoyararlanım 6-8 kat arttırmıştır.	Çözünürlük artışı ve biyoyararlanım artışı



Şekil 2: Biyoyararlanımı arttıran lipid formülasyonlarının mekanizması (14)

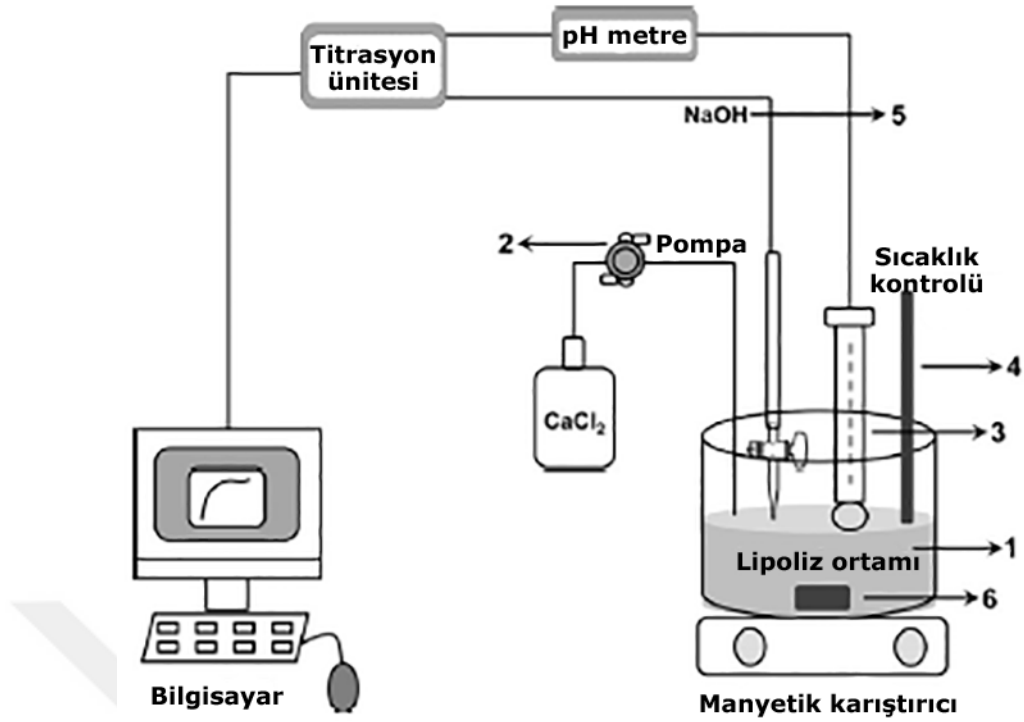
2.2.2 Lipid Bazlı Sistemlerin Formülasyonunda Yardımcı Madde Seçiminin Rolü (11, 15)

Genellikle suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların lipid formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin seçimindeki seçenekler oldukça fazladır. Lipid bazlı formülasyonlarda genelde kullanılan yardımcı maddeler: lipidler (sentetik veya doğal lipidler), yüzey etkin maddeler (noniyonik, lipofilik veya hidrofilik yüzey etkin maddeler), hidrofilik çözücüler ve yardımcı çözücüler şeklindedir (4). Hidrofilik çözücüler çözücü kapasitesini arttırmak ve iyi dağılım sağlamak için formülasyon terkbine girerken yardımcı çözücüler dağılımı kolaylaştırmak ve formülasyonun viskozitesini azaltmak için kullanılırlar. Formülasyon açısından bakıldığında yardımcı madde seçimi; etkin madde yüklemesi, dağılım karakteristiği, etkin madde çözünürlüğü ve daha da önemlisi stabilite üzerine etkilidir. Bununla birlikte formülasyonlarda kullanılacak yardımcı maddelerin seçiminde, herbirinin nihai olarak biyoyararlanıma olan etkisinin, biyoyararlanım çalışmaları yapılarak kanıtlanmış maddelerin olmasına dikkat edilmelidir (12).

2.2.2.1 *Lipidler*

Lipidlerin en önemli özelliği etkin maddeyi çözebilme kapasitesi ve etkin maddenin gastrointestinal yol boyunca çözülmüş durumunu koruyabilmesidir. Lipid sindirimi ilacın çökmesine neden olmamalıdır. Bu durum özellikle çözünlüklerinde sınırlama bulunan biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BSS) sınıf 2 ve BSS 4 sınıfı ilaçlar için önemlidir (34). İn vitro ortamlarda, in vivo ortamı taklit edebilir bir lipoliz sistemi geliştirilebilir. Bunun için pH titrasyon cihazı kullanarak biyoeşdeğer çözeltiler (açlık tokluk koşulları) içerisine lipid formülasyonunun ve daha sonrasında da sindirim için lipazın eklenmesi ile bir sistem oluşturulabilir (35). İn vitro deneylerin sonucu in vivo sonuçları tahmin etmekte önemlidir. İn vitro ortam Şekil 3'de şematik olarak gösterilmiştir (36, 37). Bu sistemlerin çalışmalarında in vitro sonuçları etkileyecek faktörler oldukça fazladır.

Lipid bazlı formülasyonlarda lipid yardımcı maddeleri olarak; kısa zincirli trigliseridler (SCTs= short chain trigliseride), orta zincirli trigliseridler (MCTs= medium chain trigliserid) ve uzun zincirli trigliseridler (LCTs= long chain triglyceride) kullanılabilir (10). Genellikle LCT ler ile MCT ler karşılaştırıldığında LCT lerin sindirimi çok yavaştır ve sindirim prosesi sonunda MCT ler tamamen sindirilir. Ayrıca MCT ler yüksek çözelti oluşturma kapasitesine sahip olduğu için ilaçlar MCT ler içerisinde daha iyi derecede çözümler ve çözülmüş durumları uzun süre korurlar. Düşük çözelti oluşturma özelliklerinden dolayı SCT ler ilacın yüksek derecede çökmesine neden olmaktadır. Çeşitli trigliseridler ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada, progesteronun in vitro lipoliz çalışmaları ile in vivo verilerinin karşılaştırılması sonucunda korelasyon MCT>LCT>SCT şeklinde bulunmuştur (38). Griseofulvin ve penklamedin etkin maddeleri ile yapılan bir diğer çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur (39). Fakat vitamin D3, halofontrine (6) gibi etkin maddelerle ile yapılan çalışmalar da tartışmalı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Ayrıca lipid sindirim kapasitesi için yukarıda bahsedilen yöntemlerin dışında, ilacın adsorpsiyon profili de seçilen lipidin tipine göre değişmektedir.



Şekil 3: In vivo verilerin tahmin edilmesinde etkili olan kritik işlem parametrelerini içeren in vitro lipid sindirim deneyi. (1) Pankreatik lipid sindirim ortamı-(safra tuzu) (2) Kalsiyum klorid ekleme pompası (hız artarsa sindirimde artar) (3) pH 5.5-7.5 arasında optimize edilmiş ortam (4) Biyolojik ortamın sıcaklığı göstergesi(5) Sodyum hidroksit büreti-(düşük sodyum hidroksit molaritesi; bitiş zamanına hızla yaklaştırır- (yüksek molarite deneyde ani yükselmeye sebep olup bozulmaya neden olur) (6) Manyetik karıştırıcı (yüksek hız bileşenlerin bütünüyle karışmasına neden olur) (14).

2.2.2.2 *Yüzey Etkin Maddeler*

Lipid bazlı sistemlerin formülasyonlarında çoğunlukla non iyonik yüzey etkin maddeler kullanılmaktadır (10). Kremofor EL ve kremofor RH40 non iyonik yüzey etkin madde kategorisinde en çok çalışılan yardımcı madde çeşitlerine örnektir. Kremofor EL ve kremofor RH40 yüzey etkin maddeleri aynı sınıfta olmalarına rağmen kremofor EL daha düşük etoksilasyon (etilen oksitleme) derecesine sahiptir ve çökelme yaratmaz. Bu iki yüzey etkin maddenin en önemli farklılıkları formülasyonda kullanıldıklarında in vivo ortamdaki sindirim noktalarıdır. Kremofor RH40, kremofor EL ile karşılaştırıldığında daha zor sindirilir (40). Bu farklılık çok net olmamakla birlikte reaktivite dereceleri farkından kaynaklanabilmektedir. Düşük sindirim özelliğinden dolayı kremfor RH40, kremofor EL ile karşılaştırıldığında çözünmüş olan etkin maddeyi uzun süre çözünmüş halde tutabilmektedir. Örnek çalışma olarak danazol etkin maddesinin SMEDDS formülasyonunun kremofor EL ve kremofor RH40 ile ayrı ayrı formüle edilip, etkilerinin gözlemlendiği sistemler verilebilir

(19). Kremofor RH40 sulu fazda sindirim boyunca daha fazla miktarda etkin madde içermiştir ve kremfor RH40 ile biyoyararlanım 3 kat artmıştır (41). Bir başka çalışmada ise danazol içeren formülasyonda kremofor EL nin miktarının arttırılmasıyla köpeklerde yapılan çalışmalar sonucu biyoyararlanımın azaldığı gözlenmiştir (42). Bu durumun temel nedeni in vivo koşullar altında kremofor EL nin derişiminin değişmesi ile birlikte azalmış lipid miktarından dolayı ilacın çökeltme şansının artmasıdır. Bu nedenle biyoyararlanımın arttırılması için lipid-yüzey etkin madde oranının optimize edilmesi çok önemlidir. Ayrıca çok miktarda yüzey etkin madde kullanımı misel yapısının oluşmasına ve molekül ağırlığının dinamik bir şekilde artmasına neden olup, biyoyararlanım artışına engel olmaktadır. Bu durum in vitro koşullarda (Caco-2, MDCK hücre hatları ile gerçekleştirilen permeabilite çalışmaları) ön bir bakış açısı oluşturmada önemli iken, in vivo çalışmalarda yüzey etkin maddelerin yüksek miktarlardaki bağırsak sıvılarında seyrelmesinden dolayı önemli farklanma oluşturmayabilir (43).

Diğer taraftan yüzey etkin maddelerin; uzun süre kullanımlarında hücre zarlarını bozucu etkide bulunması, toksik ve istenmeyen etkilerinin var olmasından dolayı fazla kullanımları önerilmemektedirler. Ritonovir gibi antiviral proteaz inhibitörü içeren oral çözeltiler ve yumuşak kapsüllerin yüksek miktarda yüzey etkin madde içeren örnekleri ilaç pazarında bulunmaktadır (44). Bu formülasyonlar doz rejiminden dolayı gün içerisinde fazla sayıda kullanılmaktadır. Dolayısı ile bu yardımcı maddelerin yüksek miktarda kullanılması sonrası, uzun süreli etkilerinin hesaplanmasının gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu maddeler için hem yetişkinlerde hemde çocuklarda izin verilen günlük alım miktarına yönelik hiçbir resmi kural olmamasına rağmen istenmeyen toksik etkilerinden korunmak için düzenleyici sınırlar gelene kadar olabildiğince az miktarda kullanılmaları önerilmektedir (45).

2.2.2.3 **Hidrofilik Çözeltiler**

Trietilsitrat, polietilen glikol 400 (PEG 400) ve propilen glikol gibi hidrofilik çözeltiler, kendiliğinden emülsifiye olabilen Tip III sistemlerde düşük miktarlarda kullanılırlar (46). Hidrofilik çözücülerin biyoyararlanıma etkisi incelenirken bu çözücülerin sadece birkaç tanesi önemli düzeyde endişe yaratır. Örneğin PEG 400 yüksek miktarlarda alındığında (≥ 2.5 g) su tutma özelliğinden dolayı osmatik

aktiviteyi tetikleyip mide-bağırsak motilitesini ve mide-bağırsak geçişini uyarır. Sonuç olarak PEG 400'ün bağırsakta emilimi zayıf olduğu için bağırsaktan geçiş süresi azalır. Bu alandan geçiş süresinin azalması ranitidin gibi az ve yavaş çözünen ilaçların absorpsiyonu için gerekli zamanı azaltacağından etkin maddenin biyoyararlanımının düşmesine neden olacaktır (47). Fakat bir gram gibi düşük konsantrasyonlarda PEG 400 ün kullanımında ise bağırsak permeabilitesini arttırmadan dolayı ranitidinin absorpsiyonunu önemli ölçüde arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (48). Lipid bazlı formülasyonlarda kullanılan hidrofilik çözücü miktarları çok az olsa bile, bahsedilen nedenlerden dolayı dikkatli seçilmelidir.

2.2.2.4 Yardımcı Çözücüler (11)

Etanol gibi kısa zincirli alkoller genellikle viskoziteyi azaltan, dağılmayı hedefleyen yardımcı maddelerdir ve formülasyonlarda az miktarda kullanılırlar. Düşük miktarda kullanımlarından dolayı farmakokinetik anlamda büyük farklılık yaratmazlar.

2.2.3 Lipid Bazlı Sistemlerde Lenfatik Taşınma

Lenfatik taşınma lipofilik ilaçların biyoyararlanımını arttırmada dikkat çekici bir absorpsiyon yoludur. Lenfatik taşınmanın ana avantajı, hepatik metabolizmayı atlayıp, kan konsantrasyonunun artması yolu ile büyük ölçüde metabolize olan ilaçların terapötik etkinliğini arttırmaktır. Küçük moleküllerin lenfatik taşınması çalışmalarında çok çeşitli hayvan modelleri kullanılmaktadır (49, 50).

Lenfatik taşınım direkt olarak lipofiliklikle alakalıdır. İlaç molekülünün partiyon katsayısı 5'ten büyük ($\log P > 5$) ve trigliseridlerde çözünürlüğü 150 mg/ mL den büyük ise portal ven ve karaciğer yolunu değil, lipid bazlı formülasyonlarla lenfatik taşınma yolunu tercih ederler. MCT ve SCT içerisinde ilaçlar karaciğer enzimleriyle karşılaşılır ($C < 12$) ve portal kan içerisinde absorbe olurlar, LCT içerisinde çözünen ilaçlar bağırsak lenfatik sistemi yoluyla taşınırlar ve daha sonra sistemik dolaşım ile emilirler (51).

Gastrointestinal yolda lipoliz süresince yağ asitleri ve oniki karbondan daha uzun zincire sahip monogliseridler bir sindirim ürünü olarak trigliseridler şeklinde

entrositlerde varolan kolestreol ve fosfolipidler ile biraraya gelir. Trigliseridler içerisinde hapsolmuş ilaçlar şilomikronlar tarafından incebağırsaktan kana geçmek üzere ekzositoz yoluyla entrositlerden ince bağırsaktaki viluslar boyunca lenf kanalına salınırlar. Böylece etkin madde lenf sistemine girip buradan kan dolaşımına geçer ve ilacın karaciğer ilk geçiş etkisinden korunması söz konusu olur. Ancak oniki karbondan daha kısa zincire sahip monogliseridler şilomikronların yapısına dahil olmazlar ve portal venden absorbe olurlar (52).

Charman ve Stella (53) dikoloro difenil trikloroetan (DDT) (log P= 6.19) ve heksaklorobenzen (log P= 6.53) ile lenfatik taşınma çalışmalarını sıçanlarda in situ ortamda gerçekleştirmiştir. DDT ve heksaklorobenzenin oleik asitle olan formülasyonu in situ ortamda sıçanlara lenfatik olarak uygulandığında taşınma, sırası ile % 33.5 ve % 2.3 olmuştur. Her iki bileşik için log P değeri yaklaşık olmasına rağmen trigliserid kombinasyonunun çözünürlük değerinden dolayı lenfatik taşımada değer yaklaşık 14 kat kadar bir farkı ortaya çıkarmıştır. Dahan ve Hoffman (54) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise in vivo ortamda LCT, MCT, SCT içeren D3 vitamini formülasyonları geliştirilerek, formülasyonların etkinlikleri incelenmiştir. İn vitro ortamda lipoliz deneme sonuçları MCT>LCT>SCT olarak tahmin edilmesine rağmen, lipolizden sonra sulu bölümde tutulan ilaca göre sıralama ise LCT>MCT>SCT şeklinde olmuştur. D3 vitaminin lenfatik taşınmayı LCT ile arttırması, dolayısı ile LCT ile in vivo ortamda D3 vitamininin absorpsiyonunun artması söz konusudur.

Ex vivo ortamda sıçan bağırsağı kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise şilomikronlarla taşınan lipofilik ilaçlar ile mide-bağırsak lenfatik biyoyararlanımın doğrusal bir ilişkisinin olduğu gözlenmiştir (55). Bu sonuçlar dikkate alınarak, bağırsaklarda lenfatik taşınmayı tahmin etmek için kullanılabilir izole şilomikronlarla lipofilik ilaçların ilişkisi dikkate alınarak basit bir tarama modeli geliştirilmiştir. Fakat Gershkovich ve Hoffman (55) log P ve trigliserid çözünürlük değerlerinin lenfatik taşınmayı garanti etmek için yeterli olmadığını gözlemiştir. Benzer tartışmalı sonuçlar penklomedin için de gözlenmiştir. Log P değeri 5.43, trigliseridlerde çözünürlüğü 175 mg/ml olan penklomedin düşük lenfatik taşınma derecesine sahiptir (% 3 oranında bağırsak lenfi ile taşınıyor) (56). Tüm çelişkili sonuçlara

rağmen bağırsak lenfatik taşınma hala lipofilik ilaçların biyoyararlanımını arttırmak için mükemmel bir fırsattır.

2.2.4 Lipid Bazlı Sistemlerde Gıda Etkisini Azaltma (50, 57, 58)

Gıda alınmış veya alınmamış olması durumu ilacın absorpsiyon miktarını ve hızını arttırıcı veya azaltıcı etkiye sahiptir. Gıda etkisi son yıllarda üzerine en çok çalışılan etkidir ve birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler; fizyolojik farklılık, dozaj formu farklılığı ve en önemlisi fizikokimyasal özellik farklılığından kaynaklanır. Yağ bileşenlerini içeren gıdalar;

- çözünürlüğü arttırır,
- safra salgılarını uyarır,
- midenin boşalması için geçen zamanı uzatır,
- absorpsiyon zamanını arttırır,
- efflux taşınmasını inhibe eder,

sonuç olarak çözünürlüğü düşük olan ilaçların biyoyararlanımını arttırır.

Yemeklerdeki besin yağları, ilaçlar için tanımlanan lipid bazlı formülasyon prosesine benzer şekilde mide ve pankreatik lipazlar tarafından lipid sindirimine maruz kalır. Bu nedenle alınan gıdadaki lipid bileşenleri lipid bazlı formülasyonlar içindeki mevcut yağ bileşenleri ile aynı işlevi görebilir. Ayrıca gıdalardaki bazı lipid bileşenleri şilomikron ile lenfatik taşınmayı uyarıp biyoyararlanımı arttırır. Dolayısıyla suda düşük çözünürlük gösteren ilaçların formülasyonlarında uygun lipid ve yüzey aktif maddeler kullanılarak, bu maddelerin gıda bileşenlerindeki yağın yerine geçmesi ile yemek etkisi ortadan kaldırılarak hasta uyumu arttırılabilir.

İtrakonazolun SMEDDS formülasyonunda, gıda etkisinin azaltıldığı sağlıklı gönüllülerle yapılan çalışmayla kanıtlanmıştır (59). SMEDDS formülasyonunda C_{maks} ve eğri altı alan değerleri (EAA) açlık ve tokluk durumlarında konvensiyonel tabletlerle karşılaştırılmıştır ve SMEDDS formülasyonunda C_{maks} ve eğri altı alan değerlerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Açlık ve tokluk durumlarında benzer konsantrasyon profilleri gözlenerek, yemek etkisinin bu formülasyon için önemsiz olduğu sergilenmiştir. Benzer şekilde yüksek oranda lipofilik bir etkin madde olan torsetrapibinin (90 mg) optimum lipid bazlı formülasyonu ile köpeklerde yapılan çalışmalarda yemek etkisinin 5 kattan 3 kata kadar azaldığı gözlemlenmiştir (60).

2.2.5 Lipid Bazlı Sistemler ve Effluks Proteinleri ile Taşınma

P-glikoprotein gibi effluks taşıyıcılar etkin maddenin organlar içine taşınmasında önemli rol oynarlar. Bağırsak sistemi içindeki p-glikoprotein pompaları bağırsak lümeninden etkin madde bileşiklerini geri iterler ve absorpsiyonunun azalmasına neden olurlar. P-glikoprotein inhibitörlerini içeren ilaç formülasyonları biyoyararlanımı arttırıcı etkiye sahiptir (61, 62).

Bağırsaklardaki effluks pompa sisteminin biyoyararlanımı azalttığı bilinmektedir. Biyofarmasötik ilaç salınım sınıflandırma sistemi (biyofarmasotical BDDCS) düşük çözünürlük gösteren ilaçların (BSS II) P-glikoprotein (P-gp) gibi effluks proteinlerini inhibe edemeyeceğini ve bu yüzden de biyoyararlanımlarının sınırlı olduğunu göstermiştir (58). Hücre membranında bulunana P-glikoprotein gibi effluks taşıyıcılardan dolayı pek çok antikanser ilacında biyoyararlanım ve farmakolojik aktivitesinde büyük ölçüde azalma olmaktadır (63). Literatürlerle de rapor edildiği üzere; etkin maddelerin lipidler (LCT, MCT) ve yüzey etkin maddelerle (Kremofor EL, Kremofor RH40, Tween 20, D- α -tokoferol polietilen glikol 400, suksinat, P-gp inhibitörleri) oluşturulan formülasyonları effluks taşıyıcıları inhibe ederek biyoyararlanımı arttırırlar (64, 65). Effluks taşıyıcıların inhibasyonu ilacın entrosit içerisindeki konsantrasyonunu ve kalma süresini arttırır. Bu taşıyıcıların etkisinin azaltılmasının gözlenmesi amacı ile birçok yardımcı maddeyle çalışmalar yapılmıştır. Fakat taşıyıcı etkisinin azaltılması esas olarak membran akışkanlığı yapısının değişmesi veya kolesterolün ortamdan uzaklaşması ile gerçekleştirilebilmiştir. PEG 400 gibi bazı hidrofilik çözeltiler, efflux taşıyıcıları belirgin oranda inhibe ederler ve böylece biyoyararlanımı arttırırlar. Yukarıda belirtilen yardımcı maddelerden lipidler, yüzey etkin maddelar ve hidrofilik çözeltiler lipid bazlı formülasyonlarda yalnızca efflux taşıyıcılarını inhibe etmekle kalmayıp aynı zamanda çözünürlük kapasitesinden dolayı biyoyararlanımı arttırırlar (66).

Paklitaksel en önemli kemoterapötik ajanlardan biridir. P-gp ve sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) gibi enzimler için substrattır. Paklitaksel 1:1 oranında Kremofor EL ve dehidratize etanol içerisinde intravenöz olarak uygulandığında biyoyararlanımı çok kısıtlı olduğu gözlenmiştir. Paklitakselin (Taxol®) oral biyoyararlanımını arttırmak amacıyla D- α -tokofenil polietilen glikol 1000 süksinat (vitamin E TPGS) ve Kremofor

EL gibi P-gp inhibitörüyle, viskozite arttırıcı olarak HPMC içeren, aşırı doymuş SEDDS ve nanopartiküler sistemleri içeren formülasyonları oluşturulmuştur (67, 59). Bu formülasyonlar geleneksel Taxol® ile karşılaştırıldığında 5 kat yüksek biyoyararlanım göstermiştir. CYP3A4 metabolizma yapısından ve P-gp etkisinin azaltılamamasından dolayı bu formülasyonda biyoyararlanım artmış olsa bile gerekli terapötik seviyeye ulaşamamıştır. Bu olasılığı değerlendirmek için paklitaksel siklosporinle SEDDS sistem içinde formüle edilmiş ve biyoyararlanımı Taxol'e kıyasla artmıştır.

2.2.6 Lipid Bazlı Formülasyonlarda İn vitro- İn vivo Korelasyon (68)

Farklı biyofarmasötik sınıflandırma sistemleri için birçok çalışmada in vitro-in vivo korelasyon (IVIVC) tanımlanmıştır. Bir IVIVC korelasyon için öncelikle in vitro testlerin yapılması ve bu testler ile in vivo sonuçların korelasyonunun kurulması gerekmektedir.

2.2.6.1 Lipid Bazlı Formülasyonlarda İn vitro Dağılım/Çökme Testi ve İn vivo Veriler (54, 30, 69)

İn vitro ortamda dağılım veya çökme testi, lipid formülasyonun su içeren sıvılar içerisinde dağılmasından sonra çözünen ilaç miktarının belirlenmesi için yapılan basit bir testtir. Çözünmemiş ilaç, absorpsiyona uygun olmadığı için in vivo performansı belirlemek tamamen çözünmüş ilacın absorbe edilmesi gerçeğine dayanır. Bu nedenle farklı lipid formülasyonlarında in vitro ortamlarda biyolojik sıvılarda çözünen ilaç miktarının, in vivo olarak absorbe edilen miktarla veya eğri altı alan değeri ile uyumlu olması gerekir. Böylece IVIVC a ulaşmak daha olası hale gelmektedir. Zayıf çözünen etkin maddelerin lipid bazlı formülasyonunun dağılımı ve çökme davranışını incelemek adına SIF (yapay bağırsak sıvısı), FaSSIF (açlık durumunda yapay bağırsak sıvısı), FeSSIF (tokluk durumunda yapay bağırsak sıvısı) gibi farklı biyolojik sıvılarda incelemişlerdir (70). Aynı çalışmada araştırmacılar köpeklerde yaptıkları in vivo çalışmalarının çökme kriterlerini hızlı çökelen, yavaş çökelen ve çökemeyen olmak üzere üç farklı formülasyon olarak listelemişlerdir. Biyolojik sıvılarda çökme kinetikleri, eğri altı alan değerleri ile hızlı çökelen <yavaş çökelen <çökemeyen formülasyonlar şeklinde iyi bir korelasyon sağlamıştır. Ayrıca lipid yardımcı maddeleri gıda bileşenlerinin yerine geçerek in vitro ortamda FeSSIF ler içerisinde çökme göstererek in vivo ortamdaki çalışmalar ile pozitif korelasyon

sağlamıştır. BSS II sınıfı ilaç olan siklosporinin SMEDDS formülasyonunun IVIVC nu rapor edilmiştir (68). Bu çalışmada siklosporin için yeni jenerik SMEDDS formülasyonu geliştirilmiş ve iki referans SMEDDS formülasyonu ile karşılaştırılmıştır. Bu üç formülasyonun in vitro dissolüsyon (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) çalışmaları ve köpeklerde in vivo çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar BSS II sınıfı ilaçların SMEDDS formülasyonları ile BSS I sınıfı ilaçlar gibi davranabileceği sonucuna varmışlardır. Benzer IVIVC sonuçları ritonavir, liopinavir gibi ilaçların lipid formülasyonlarının yumuşak jelatin kapsüllü formlarında da elde edilmiştir (52, 71). Çeşitli IVIVC örneklerinin, in vitro dağılım/dissolüsyon/çökme ve in vivo verileri Tablo 4’de verilmektedir.

Bu denemede başarılı bir korelasyon basit görünmesine rağmen bir çok sınırlamaları da bünyesinde barındırmaktadır. Eğer ilacın katı faz değişimi ve pH değişiminden dolayı bağırsakta tekrar çözünmesi söz konusu olursa, gözlenen IVIVC korelasyonu veya sıralaması valide edilemez duruma gelmektedir. İkinci ve en önemli durum ise gastrik veya pankreatik lipazın yalnızca dağılmada değil aynı zamanda lipid sindiriminde önemli rol oynadığıdır. Bu yüzden dispersiyondan sonra ilaç çözünmüş fazda kalsa bile, lipid sindiriminden dolayı çok kolay çökebilir.

Tablo 4. Seçilmiş IVIVC örneklerine dayanarak In vitro lipoliz ve In vivo farmakokinetik verileri (54, 69, 70)

İlaç	In vitro lipoliz verileri	In vivo veriler	IVIVC
Halofantrin	In vitro lipid sindirim ve çözünürlük verilerine göre LCT çözeltisi > LCT/MCT çözeltisi>MCT çözeltisi şeklindedir.	Köpeklerdeki biyoyararlanım çalışmalarına göre LCT çözeltisi > LCT/MCT çözeltisi > MCT çözeltisi şeklindedir.	IVIVC yayını yoktur fakat aralarındaki korelasyon benzer sırayı izlemektedir.
Griseofulvin	In vitro lipid sindirimi MCT>LCT>SCT> Su formülasyonu şeklindedir.	Köpeklerde yapılan çalışma sonucuna göre in vivo sonuçlar MCT>LCT>SCT> Su şeklindedir	Orta zincirli yağ formülasyonun In vitro lipoliz ve in vivo eğri altı alan verilerinde yüksek oranda regresyon sağlanmıştır ($r^2>0.98$) .
Deksametason	In vitro lipoliz de MCT=LCT=SCT şeklindedir.	Siçanlarda yapılan sonuçlarda MCT=LCT=SCT şeklindedir.	IVIVC yayını yoktur fakat aralarındaki korelasyon benzer sıra ileidir.
Danazol	In vitro lipoliz sonuçları LCT-SMEDDS>MCT-SMEDDS sırası ileidir.	Köpeklerde yapılan in vivo sonuçlara göre sıralama LCT çözeltisi> LC- SMEDDS> MC-SMEDDS	IVIVC yayını yoktur fakat aralarındaki korelasyon benzer sıra ileidir.
Probukol	Sulu miseller fazdaki probukolun salım hızı SMEDDS>SNEDDS>saf yağ formülasyonu şeklindedir.	Domuzlarda yapılan in vivo sonuçlarına göre biyoyararlanım SMEDDS>SNEDDS>saf yağ çözeltisi şeklindedir.	IVIVC yayını yoktur fakat aralarındaki korelasyon benzer sıra ileidir.
Vitamin D 3	Dinamik lipoliz modeline göre MCT>LCT>SCT	Siçanlardaki in vivo verilere göre LCT>MCT>SCT şeklindedir fakat safra kanüllü siçanlarda MCT>LCT>SCT şeklindedir.	IVIVC yayını yoktur fakat in vitro lipoliz verileri ile safra kanüllü siçanlar arasındaki korelasyon benzer sıra ileidir.

2.2.6.2 Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gerçekleştirilen In vitro Lipoliz Testleri ve In vivo Veriler (52, 70, 71)

In vitro ortamdaki lipoliz ile in vivo ortamdaki dağılma/çökelme sınırları tahmin edilebilir duruma gelmektedir. In vitro lipolizde formülasyonlar safra tuzları gibi bileşenler içeren tampon çözeltisine eklenir böylece lipid bazlı formülasyonların sindirimden sonra açlık/tokluk ortamları taklit edilir. Ardından hızlıca pankreatik lipaz enzimleri ilave edilir ve lipoliz prosesi başlar. Çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınır ve santrifüj edilir, ilaç içeren sulu faz analiz edilir. Lipid bazlı formülasyonlar için belirli zamanlarda alınan örnekler, in vivo plazma konsantrasyon-zaman profilleri, sindirim sonunda ilaç miktarı yüzdesinin eğri altı alan veya C_{maks} değerleri IVIVC'un kurulmasında kullanılır.

Birçok çalışma in vitro lipoliz sonucu ile in vivo verilerin tahmin edilebileceğini göstermiştir. Halofantrin formülasyonlarında MCT ve LCT bazlı formülasyonlarının biyoyararlanım ilişkisi rapor edilmiştir (52). Bu çalışmada araştırmacılar in vitro ilaç çözünürlüğü ile in vivo sindirim verilerinin yakınlığı arasındaki korelasyonu

araştırmışlardır. Araştırmacılar yalnızca düşük molekül ağırlıklı lipid kullanıldığında yüksek korelasyon sonuçları elde etmişlerdir. Yine bu çalışmada araştırmacılar formülasyonun çözünürlük kapasitesinin yüksek oranda doğal lipidlerin kullanımına bağlı olduğunu ve in vivo lipolizin tahmin edilebilirliğinin denemelerde kullanılan lipid miktarına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu çalışmalar in vivo biyoyararlanımda iyi tahminler yapmak için lipoliz parametrelerinin optimize edilmesinin çok önemli olduğunu göstermektedir. In vitro lipolizde MCT ile LCT karşılaştırıldığında, MCT'nin sulu fazında yüksek miktarda siklosporin olduğu gösterilmiştir. Fakat in vivo çalışmalarda ise LCT ile MCT karşılaştırıldığında LCT nin yüksek biyoyararlanım gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmalar sonucunda LCT'de sindirimin daha yavaş olduğu lipolizden 12 dakika sonra MCT içerisinde daha fazla miktarda siklosporin bulunarak ispatlanmıştır. Bu durum in vivo ortamda siklosporinin trigliserid içeren yağ fazına ilgisinden kaynaklanmıştır. Ayrıca siklosporinin LCT'ye olan ilgisi MCT'ye oranla daha yüksektir. Bu çalışma, IVIVC geliştirilirken yalnızca in vitro lipolizin değil aynı zamanda ilacın içsel özelliklerinin de dikkate alınmasının önemli olduğunu açıkça göstermektedir.

Bir diğer çalışmada ise suda az çözünen bir ilaç olan danazolün üç farklı formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar LCT-çözültisi, LCT-SMEDDS ve MCT-SMEDDS formülasyonlarıdır (72). Danazolün in vitro lipolizinde formülasyonlar karşılaştırıldığında danazol LCT-SMEDDS formülasyonunda yüksek çözünürlük göstermiştir. In vitro çalışma sonuçları da in vivo çalışmalar ile desteklemiş ve LCT-SMEDDS lerde yüksek biyoyararlanım gözlenmiştir.

In vitro lipoliz denemeleri lipid bazlı formülasyonlarda gıda etkisinin tahmin edilmesi için kullanılabilir. Gastrointestinal sistemde lipolize, açlık-tokluk etkisinin incelenmesinde sinnarizinin SNEDDS formülasyonu, katılaştırılmış SNEDDS formülasyonu ve konvensiyonel tableti olmak üzere üç farklı formülasyonu ile çalışılmıştır (30). Tokluk durumunu taklit etmek için lipoliz denemelerine %3.5 oranında yağlı süt ilave edilmiştir. Açlık durumu lipoliz denemelerinde, sulu fazdaki çözülmüş sinnarizinin miktarı sırası ile SNEDDS>katı SNEDDS> tablet şeklinde gerçekleşmiştir. Sonuçlar köpeklerle yapılan in vivo sonuçlarla da benzer korelasyonlar sağlamıştır. Tokluk durumu lipoliz denemelerinde sinnarizin miktarı

tüm formülasyonlarda eşit bulunmuştur. Köpeklerde yapılan in vivo deneme sonucu SNEDDS ve katılaştırılmış SNEDDS formülasyonlarında benzer sonuç elde edilirken, konvansiyonel tabletler sinnazirinin performansını arttırmıştır. Bu çalışma, konvansiyonel tabletin açlık-tokluk durumlarından etkilendiği SNEDDS ve katı SNEDDS formülasyonlarının ise gıda etkisini yok sayan sonuçlar elde etmeyi başardığı sonucunu göstermektedir. Bu örnek ayrıca in vitro lipoliz denemelerinin gıda etkisinin tahmin edilmesinin lipid bazlı formülasyonlarda önemli bir basamak olduğunu göstermektedir. In vitro ve in vivo lipoliz verileri kullanılarak yapılan literatür çalışmalarının IVIVC örnekleri Tablo 5’de gösterilmektedir.

Tablo 5: In vitro dağılım/ çökelme/dissolüsyon ve in vivo farmakokinetik verilerine göre seçilmiş IVIVC örnekleri (14).

İlaç / formülasyon	In vitro dağılım / çökelme / dissolüsyon verileri	İn vivo verileri	IVIVC
Siklosporin (yumuşak jelatin kapsül)	Bir jenerik ve iki referans formülasyonunda pH: 1.2, pH: 4.5, pH: 6.8 de in vitro dissolüsyon verileri	Köpeklerde in vivo biyoyararlanım çalışmaları	Test ve referans örneklerinin in vitro ve in vivo sonuçları arasında yüksek derecede korelasyon gözlenmiştir. ($R^2= 0.992$)
Ritonavir (yumuşak jelatin kapsül)	in vitro dissolüsyon ortamları ile dissolüsyon verileri	İnsanlarda in vivo farmakokinetik verileri	Yüksek korelasyon gözlenmiştir.
Lopinavir (yumuşak jelatin kapsül)	pH: 6 ortamında in vitro dissolüsyon verileri	İnsanlarda in vivo farmakokinetik veriler	Yüksek korelasyon gözlenmiştir. ($R^2=0.97$)
Arundik asit (yumuşak jelatin kapsül)	pH: 8.0 ortamında veya %2 sodyum dodesil sülfat içeren pH: 6.8 dissolüsyon ortamı verileri	İnsanlarda in vivo farmakokinetik verileri	In vitro dissolüsyon ve in vivo absorpsiyonun IVIVC verileri yayınlanmıştır. pH:6.8 ortamı daha yüksek korelasyon göstermiştir.
Fenofibrat	in vitro dissolüsyon verileri	Gönüllü insanlarda in vivo verileri	In vitro dissolüsyon verileri ve in silico uyum kullanılarak in vivo insan plazma profilleri tahmin edilmiştir. C_{maks} ve eğri altı alan değerleri hesaplanmıştır. 0.8- 1.25 oranı arasında in vitro verilerden in vivo profillerin hesaplanabileceği sonucuna varılmıştır.

2.2.6.3 *Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Ex vivo Bağırsak Geçirgenliği Testleri ve In vivo verileri (73, 74, 75, 76)*

Ex vivo bağırsak geçirgenlik çalışması, serosal bariyerden mukozaya ilacın taşınmasını incelemek için bir hayvan bağırsağı kullanımını içerir. Bu çalışmada etkin maddenin (ya da formülasyonun) geçirgenlik özellikleri deneysel olarak “kapalı sistem kullanma” şeklinde gerçekleştirilir. Bu sistem akademide ve farmasötik endüstride yeni kimyasal maddelerin geçirgenlik özelliklerini (Papp) belirlemek ve lipid bazlı formülasyonların in vivo performanslarını hesaplamak için kullanılır. Ex vivo geçiş çalışması kullanılarak “adefovir dipivoksil” etkin maddesinin katı SNEDDS formülasyonundan geçiş özelliği, ilacın süspansiyon formülasyonu ile karşılaştırıldığında SNEDDS formülasyonunun biyoyararlanımı arttırdığı gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise, suda az çözünen etkin maddelerden talinololün SNEDDS formülasyonu ile domuzun ince bağırsağından yapılan ex vivo çalışma sonucu, etkin maddenin süspansiyon formülasyonu ile kıyaslanıldığında, geçiş karakterlerini arttırdığı gözlenmiştir. Wistar sıçanları kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise in vivo sonuçlar ile ex vivo çalışma sonuçları arasında çok iyi korelasyonlar elde edilmiştir. Feksofenadinin, Gelucire 44/14 (Lauroyl macrogol-32 glycerides EP) ve Vit E TPGS (d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) yüzey etkin maddeleriyle oluşturulan formülasyonlarının ex vivo sıçan bağırsağı geçişleri ile in vivo biyoyararlanımları arasında iyi bir korelasyon rapor edilmiştir. Çalışmalarda etkin maddeler ile lipid formülasyonlarının apikalden bazolaterale (A→B) ex vivo geçiş özellikleri kıyasladıklarında, lipid formülasyonlarının geçirgenliği arttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar efflux taşıyıcıların lipid formülasyonlarda inhibe edildiğini ve bazolateralden apikale (B→A) geçişin azaldığını rapor etmişlerdir. Erkek Wistar sıçanlarla yapılan ex vivo geçiş çalışmaları ile in vivo biyoyararlanım sonuçlarının çok benzer korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Deksetazon ve griseofulvinin LCT, MCT ve SCT ile geliştirilen lipid formülasyonlarının ex vivo geçiş karakterleri incelenmiştir (76). Bu formülasyonlar arasında en yüksek geçişin SCT ile oluşturulan formülasyonda gerçekleştiği gözlenmiştir ve in vivo biyoyararlanım sonuçlarının in vitro lipoliz sonuçları ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Biyoyararlanım sonuçları griseofulvin için sırasıyla MCT>LCT>SCT, deksetazon için

ise sırasıyla LCT=MCT=SCT şeklindedir. Ex vivo geçirgenlik in vivo veriler ve IVIVC lar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. :Ex vivo geçirgenlik ve in vivo farmakokinetik verilere göre seçilen IVIVC örnekleri (69, 75, 76)

Etkin madde	Ex vivo geçirgenlik verileri	İn vivo verileri	IVIVC
Feksofenadin	Wistar sıçanları kullanılarak yapılan ex vivo çalışmalarda; lipid formülasyonları, e.m. ye göre geçirgenliği arttırmıştır. Bu geçirgenlik çalışmalarında formülasyonlar arasında sırasıyla Vit E TPGS formülasyonu > Glucire 44/14 formülasyonu > e. m. şeklindedir.	Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalarda eğri altı alan değerleri Vit E TPGS formülasyonu> Glucire 44/14 formülasyonu > e.m. şeklindedir.	IVIVC ile ilgili herhangi bir yayın yoktur fakat ex vivo geçirgenlik ve in vivo veriler arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir.
Ginger oleoresin	E. m. ile karşılaştırıldığında seçilen SMEDDS formülasyonu ile bağırsaktaki geçirgenlik 2 kat artmıştır.	In vivo çalışmalar e. m. ile SMEDDS karşılaştırıldığında biyoyararlanımın 1.6 kat arttığını göstermiştir.	-
Talinolol	E. m. ile karşılaştırıldığında seçilen SMEDDS formülasyonu ile bağırsaktaki geçirgenlik artmıştır.	In vivo çalışmalar e. m. ile SMEDDS karşılaştırıldığında biyoyararlanımın arttığını göstermiştir.	-

2.2.7 Lipid Bazlı Formülasyonlarda Gelecek Beklentiler

Bugün lipid bazlı formülasyonlar üzerine birçok uygulanabilir formülasyon teknolojileri olmasına rağmen; Amerika, Japonya gibi ülkelerde ticarileştirilen formülasyonlar yalnızca %2-%4 arasındadır (77). İlaç pazarında bu denli az oranda bulunmalarının birçok nedeni vardır fakat en önemli olanları:

- Uygulanabilir standardize edilmiş in vitro testlerin azlığı,
- Lipid bazlı formülasyonların oral sindirimden sonra farmakokinetik profillerinin tam olarak açıklanamaması olarak sayılabilmektedir.

Lipoliz gibi in vitro araçların standardizasyonu ve uyumu lipid formülasyon sınıflandırma sistemi (LFCS=lipid formulation classifying system) nin bir parçası olarak başlatılmış olsada lipid formülasyonlarının sindiriminden sonraki davranışları tam olarak açıklanamamaktadır (11, 78).

Lipid formülasyonlarının in vitro değerlendirilmesi dışında, in vitro lipoliz ile in vivo verilerin değerlendirilmesi daha uygun bulunmaktadır. Fakat in vivo ortamda ilacın lenfatik yol ile taşınması ve efflux taşıyıcıların rol oynaması, in vivo olarak ilacın son durumunun tahmin edilmesini sınırlamaktadırlar. Bu sınırlamalara ve engellere rağmen lipid bazlı formülasyonlar suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların biyoyararlanımını arttırmaları. Bu formülasyonların yanısıra

- kurutulmuş emülsiyonlar (spray-dry emülsiyonlar),
- katı SMEDDS ler,
- kendiliğinden emülsifiye olabilen katı dispersiyonlar gibi yeni formülasyonlarda suda az çözünür ilaçların biyoyararlanımdan ödün vermeden hazırlanabilir.

2.3 Ekstrüzyon-Sferonizasyon Granülasyon Tekniği (79, 80)

Lipid bazlı sistemler Ekstrüzyon-Sferonizasyon tekniği kullanılarak katı hale dönüştürülebilirler. Ekstrüzyon-Sferonizasyon işleminde; benzer, küresel partikül eldesi çoklu aşama prosesine sahiptir ve kontrollü salım uygulamasında temel nitelikte kullanılır. Yüksek miktarda etkin madde bileşenlerini aşırı büyük partikül haline gelmeden birleştirmesi büyük avantajdır. Bu teknik diğer granülasyon tekniklerinden daha etkili olsada daha fazla emek ve zaman isteyen bir tekniktir.

Sferonizasyon tekniği Nakahore tarafından “Method and Apparatus for Making Spherical Granules from wet powder mixture” adı altında 1964 yılında patentlenmiştir. 1970 yılında Eli Lilly & Co Conine ve Hadley adındaki iki araştırmacı prosesi içeren adımları sıralamışlardır. Fuji Denki Kagyo Co. tarafından sferonizer

cihazı “Marumizer” ticari adı altında isimlendirilmiştir. Eli Lilly & Co Conine ve Hadley yöntem adımlarını:

- kuru karıştırma
- ıslak granülasyon
- ekstrüzyon
- sferonizasyon
- kurutma
- gözlemeleme (isteğe bağlı aşama) şeklinde sıralamıştır.

Adımlarını belirtmeden önce ilaç endüstrisinde fazla göze çarpmamıştır. Fakat ilerleyen süreçte birçok araştırmacı bu yöntem adımlarını takip ederek formülasyonlarda iyi akış, düşük tozlanma, tekdüze dağılım, düşük friabilite, yüksek sertlik, kolay kaplama ve tekrar üretilebilen sistemler elde etmeyi başarmışlardır. Yapılan çalışmalardan anlaşıldığı üzere ekstrüzyon-sferonizasyon sistemlerine olan ilgi günümüzde de büyümeye devam etmektedir.

2.3.1 Ekstrüzyon- Sferonizasyon Tekniğinde Uygulama (81, 82, 83)

Ekstrüzyon ve sferonizasyon tekniğinin potansiyel uygulama alanları hemen ve kontrollü salım yapan dozaj formlarıdır. İki veya daha fazla aktif bileşen aynı birim içinde kombine edilebilmektedir. Bu kombinasyon ürünleri geçimsiz etkin maddeleri birarada içerebildiği gibi farklı salım profillerini de içerebilmektedirler. Sferonizasyon (küreselleştirme) ilaç göçünü sınırlandırabilen yöntem olarak kullanılabilirler. Etkin madde ve yardımcı maddelerin fiziksel karakteristikleri modifiye edilerek prosesin akış yönü ve fiziksel özellikleri geliştirilebilirler. Örnek olarak düşük yoğunluklu, ince ve bölünmüş olarak bulunan etkin madde pellet haline getirilerek yoğunluğu arttırılabilir, akışı geliştirilebilir, tozlaşması azaltılabilir. Ayrıca eşit dağılımlı çoklu partiküler sistemler elde edilir ve bu partiküler sistemler, gastrointestinal yolu ve gastrointestinalden geçiş süresini uzatır veya bazı bileşiklere toleransı arttırır. Genellikle küre veya granül özelliği bulunan formülasyonlara uygulanması yüksek verimli sonuçlar elde etmeyi sağlamaktadır.

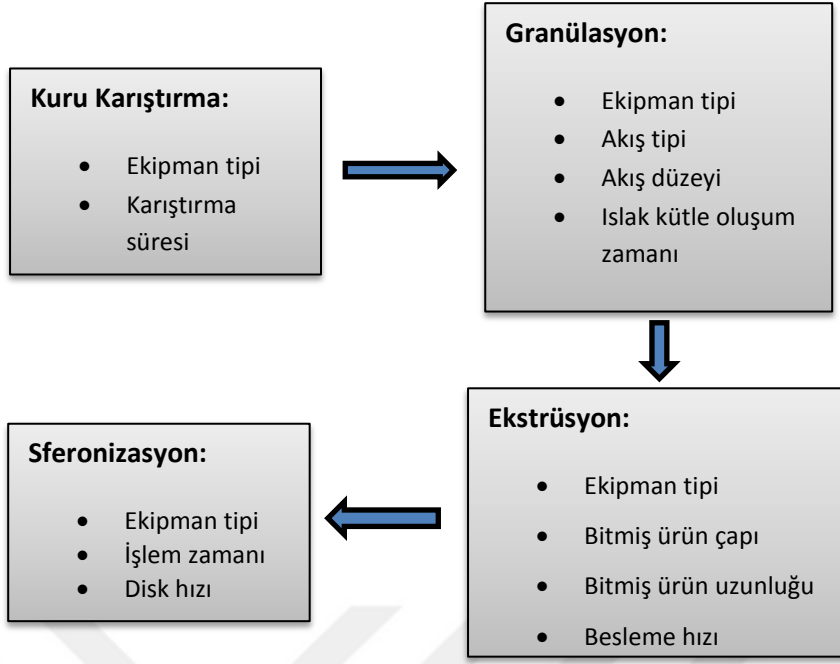
Kontrollü salım sistemleri için kaplanmış ürün; eşit boyutta, iyi küreselleşmiş ve iyi ara yüzey karakteristiğinin yanısıra düşük friabiliteye sahip olmalıdır. Ek olarak kaplanan küreler eğer tablet haline getirecekse basınç için yeterli sağlamlığa gereksinim duyar ve tablet dağılımından sonra küreler orijinal salım profillerini sürdürmelidir. Tüm bu parametreler göz önüne alındığında akış, yoğunluk, friabilite, porozite ve ara yüzey alanı gibi fiziksel özellikler amaçlanan granüllerin tablet için baskılanmasında önemli hale gelmiştir. İstenen fiziksel özellikli tablet üretimi için granüllerin iyi bir şekil değişimine sahip olmaları gerekmektedir. Bitmiş ürün formülasyonunun ilaç salımı hedeflenen spesifikasyonlarla örtüşmelidir.

2.3.2 Ekstrüsyon- Sferonizasyon Tekniğinde Yöntem Tanımlama (84)

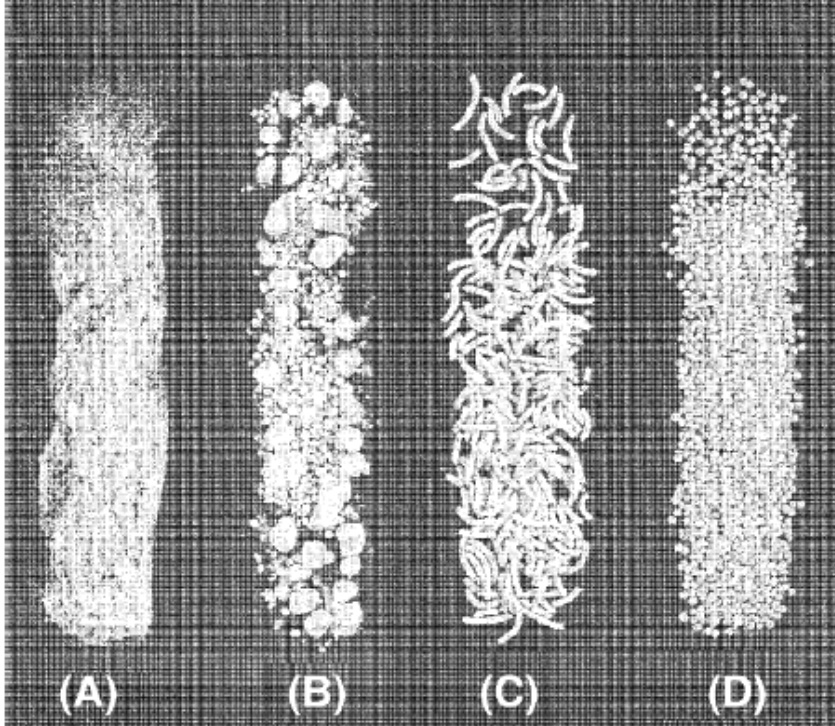
Ekstrüsyon-Sferonizasyon tekniğinde proses beş bölümden oluşmaktadır. Altıncı adım ise isteğe bağlı olmakla beraber gözlemlene basamağıdır.

- Birinci adım kuru karıştırma(a); homojen toz dağılımı elde etmek için,
- İkinci adım ıslak granülasyon(b); yeterince plastik kıymında kütle elde etmek için,
- Üçüncü adım ıslak kütlenin preslenmesi (ekstrüsyon)(c); sferonizer cihazı için aynı boyutta çubuk şeklinde partiküller elde etmek için,
- Dördüncü adım yuvarlak hale getirme (sferonizasyon) (d); küre şeklinde partiküller elde etmek için,
- beşincisi adım kurutma (e); istenilen nem düzeyine sahip partiküller elde etmek için, şeklinde sıralanabilir.

Hedeflenmiş boyut dağılımı sağlamak için prosesin akış şeması diyagramı Şekil 4'de verilmiştir. Bu şemada gösterilen her bir aşama bitmiş ürün için kritik aşamaları içermektedir. Her bir basamaktan çıkan ürünlerin görselleri ise Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 4 :Ekstrüsyon/Sferonizasyon prosesinde önemli adımlar.



Şekil 5: Ekstrüsyon/ Sferonizasyon prosesinde herbir basamak sonrası ürünler. (A) Kuru karıştırılan toz; (B) granülasyondaki granüller; (C) ekstrüsyondan sonrasındaki ekstrüdat; (D) sferonizasyon sonrası küresel partiküller (82).

2.3.3 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Ekipman Dizaynı ve Proses Parametreleri

2.3.3.1 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Kuru Karıştırma Basamağı (84, 79)

Birinci kısım olan kuru karıştırmanın yapılmasının sebebi ıslak granülasyon öncesi homojen bir dağılım elde etmek içindir. Granülasyon genellikle aynı karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirilir. Tek düze kuru karışım, kaliteli granülasyon ve küresel partikül üretimi için önemlidir. Karıştırmanın etkili yapılmaması ve dolayısı ile formülasyonun düzensiz dağılımı boyut ve çözünürlük gibi özelliklerde büyük farklılıklar yaratır. Granülasyon sıvısı olarak adlandırılan sıvı, bileşenler için çok çözünür bir yapıya sahiptir ve ıslak kütleyi oluşturur

Eşit boyut dağılımındaki küreler (şekil ve büyüklük açısından) büyük oranda homojen karıştırmaya ve granülasyon sıvısı bileşenlerine bağlıdır. Bu granülasyon sıvısı sadece çözücü içermeyen aynı zamanda çözünmüş bileşenleri de içeren sistemlerdir.

2.3.3.2 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Granülasyon Basamağı (85, 86)

İkinci adım olan granülasyon, plastik yapıyı ve karakteristik değişiklikleri içeren sistemdir. Küçük istisnalar dışında bu adım basım için kullanılacak ürünün geleneksel granülasyon tekniklerine benzemektedir. Bu proste; planet karıştırıcı, vertikal veya horizontal yüksek kesme karıştırıcısı, sigma ağızlı karıştırıcılar kullanılabilir.

Yüksek kaymalı karıştırıcıları gibi yüksek enerjili karıştırıcılar ısı yükselmesine neden olur. Yüksek ısı bazı katıların çözünmesine, sıvının buharlaşmasından dolayı sıvı miktarının azalmasına ve dolayısıyla granülasyonun plastik özelliğinin düşmesine neden olabilir.

2.3.3.3 Ekstrüsyon-Sferonizasyon Tekniğinde Ekstrüsyon Basamağı (87, 88, 89, 90, 91, 92)

Üçüncü adım olan ekstrüsyon, ıslak kütleye çubuk şeklinde form verir. Islak kütle kalıp boyunca baskıdan geçer, küçük silindirik ve eşit boyutta partiküller haline gelir. Ekstrüsyondan çıkan maddeler kendi ağırlıklarıyla beraber kesime uğrarlar. Çıkan maddeler yeterli plastik değişimine sahip olmalı, fakat toplanırken diğer partiküllere veya sferonizer silindirine yapışmamalıdır.

Ekstrüderler besleme mekanizması yönünden; döner (screw), doğal akışlı (gravity), piston beslemeli olmak üzere üç tipe ayrılır. Döner (screw feed) ekstrüder; aksiyal veya endplate, kubbeli (dome) ve radyal tip olarak çeşitlere sahiptir. Doğal akışlı (gravity) beslemeli ekstrüder; silindir, dişli veya radyal tiplere sahiptir. Döner veya doğal akışlı ekstrüderlerin radyal tipleri farmasötik endüstride çok kullanılır. Ekstrüder tipleri Şekil 6'da gösterilmektedir.

Döner ekstrüderler ıslak kütleyi ekstrüder bölgesine transfer etmek için tek veya çift vidalı olabilir. Taşınma süresince ıslak kütleyi sıkıştırırken tutulmuş havayı uzaklaştırırlar. İki vidalı döner ekstrüder tek vidalıya göre yüksek verimlilik sağlarken tek vidalı olan ekstrüder baskı ve yoğunluğu arttırmaktadır. Döner ekstrüder tipleri arasındaki en belirgin fark ekstrüzyon bölgesindeki farklılıklardır. Aksiyal ekstrüderde ıslak kütle düz zemin üzerinden geçer, delikli levha üzerine gelir ve yuvarlak bölmelerin olduğu yerde delinir. Kubbeli ekstrüderde kubbeli veya yarı küresel şekilli plakaya sahiptir. Uzunluk/yarıçap oranı (R/L) 2'ye yakın olan ürünler elde edilebilir. Aksiyal veya kubbeli ekstrüderden farklı olarak radyal ekstrüder dikey taşıma plakasına sahiptir. Materyal ekstrüder bölgesine ekstrüksiyon ağızıyla transfer edilir. Düşük kalıp uzunluğu ve delik veya kalıp sayısı arttığından dolayı kubbe veya radyal tip ekstrüderden daha avantajlıdır.

Ekstrüzyon ve sferonizasyonun her basamağı kaydadeğer bir ısı artışına neden olmaktadır. Bu durum özellikle döner beslemeli ekstrüder için geçerlidir.

Doğal akış beslemeli ekstrüder silindirik, dişli ve radyal tiplere sahiptir. Silindirik ekstrüderde ıslak kütle doğal akışla kesme bölgesine iki silindir arasına gelir ve baskı ile silindirdeki oyuklara ilerler. Dişli tip ekstrüder dişli oyuk silindirlere sahiptir. ıslak kütle deliklerden bir güç sarf ederek ilerler ve dişli oyuklardan geçerek taban kısmında birleşir. Radyal tipte doğal akışla beslenen besleme bir veya daha fazla dönen kol tarafından karıştırılır. Ekstrüzyon öncesinde hiçbir sıkıştırma içermemesi radyal ekstrüderin döner ve doğal akışlı ekstrüderden en büyük farkıdır.

Ekstrüzyon prosesinde besleme hızı, kalıp çapı ve kalıp uzunluğu farklılığı vardır. Ekstrüdatın özelliği, sonuç şeklin plastikiği ve ıslak kütle kohezifliği açısından granülasyonun sıvı içeriği çok kritiktir. Sıvı içeriği farklılığının prosese olan

etkisine Harrison ve arkadaşlarının yaptığı gibi birçok çalışmada odaklanılmıştır (88, 89).

Yüksek sıvı miktarı sabit çalışmada akış gücünü azaltırken süreyi arttıran bir parametredir. Yüksek çarpma hızı (ekstrüzyon hızı) ise hem harcanan zamanı arttırırken hemde akış gücünü yükselten bir parametredir.

Pinto ve ark. yaptığı çalışmada (90) düşük çarpma hızının ekstrüzyon gücünü azalttığı, yüksek hızda ise suyun kütle üzerinden yer değiştirmeye gücü yetmeyeceği için harcanan gücün arttığını belirtmiştir. Bu çalışmada su içeriği ve dağılımın partikül boyutunda ve şeklinde kritik olduğunu belirlemişlerdir. Düşük su içeriğinin ve yüksek hızın boyutu küçültüğü; istenilen etkinin elde edilmesi için ekstrüzyon hızının ve su içeriğinin çok iyi ayarlanmasının gerektiğini belirtmişlerdir.

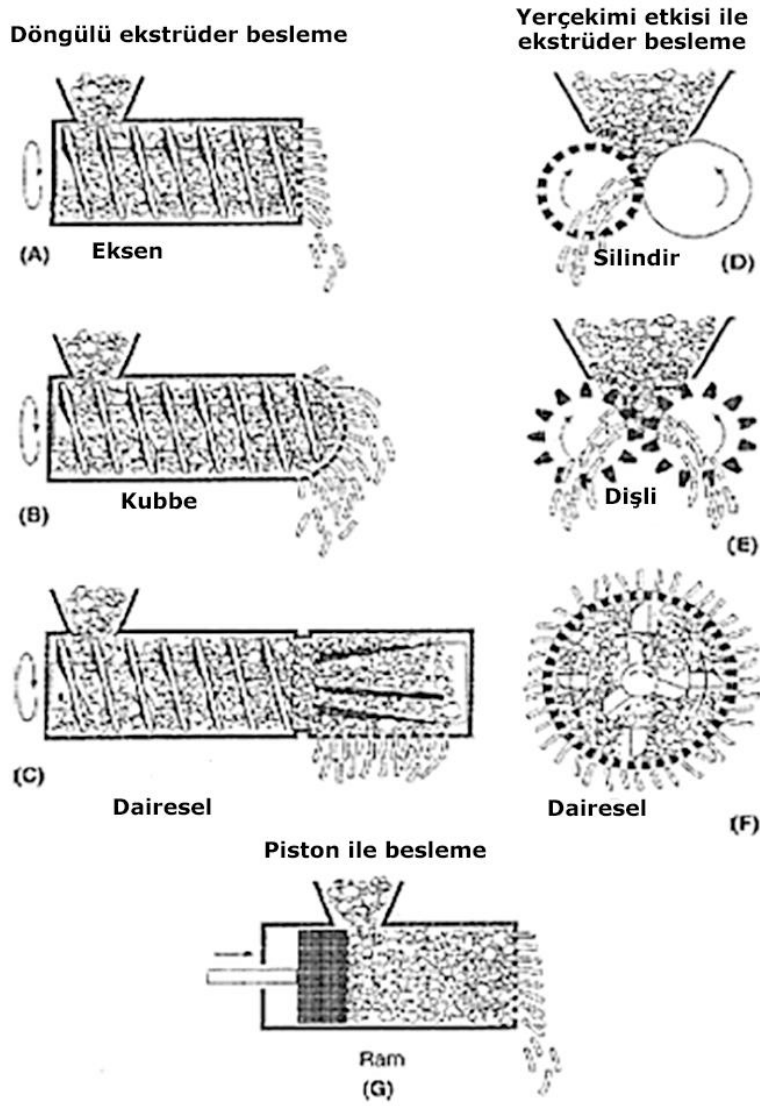
İki farklı R/L oranına sahip elek kullanılarak hazırlanan MCC (mikrokristal selüloz)/DCP (dikalsiyum fosfat)/su karışımı ekstrüdatların por çapları ve yığın dansiteleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

Hasznos ve ark. (91) ise yaptıkları çalışmada benzer şekilde ekstrüder hızının final ürünün boyut farklılığına veya prostedeki nem değişimine etkisinin sferonizasyon basamağındaki farklılıkların etkisinden daha az olduğunu gözlemlemişlerdir.

DeneySEL tasarım çalışmaları da proses ve formülasyon farklılıklarının ekstrüksiyona etkisini araştırmış ve nihai ürün için granülasyon sıvısı miktarının veya sferonizasyon basamağı farklılığının, ekstrüzyon basamağındaki farklılıklardan çok daha önemli etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Tablo 7:Farklı oranlarda DCP-Avicel PH-101-Su karışımı sonucu oluşan ekstrüdatların ortalama por çapları ve kütle dansitesi sonuçları (90, 91, 92)

DCP- Avicel- Su karışımı (a/a)	Eleğin Boy/ çap oranı	Ortalama por çapı (um)	Kütle dansitesi (g/mL)
150:380:470	4	0.982	1.132
150:400:450	4	0.992	1.211
150:380:470	2	1.249	0.949
150:400:450	2	1.292	0.947



Şekil 6: Ekstrüzyon-Sferonizasyon tekniğinde kullanılan ekstrüder çeşitlerinin şematik gösterimi (82).

2.3.3.4 Ekstrüzyon-Sferonizasyon Tekniğinde Sferonizasyon Basamağı (88, 93, 94, 96)

Ekstrüzyon- Sferonizasyon prosesinin dördüncü basamağı Sferonizasyon basamağıdır. Sferonizer sabit yan duvarları bulunan kase şeklinde bir parça ve süratle dönen bir plakaya sahiptir. Ekstrüdatların yuvarlaklaştırılması sürtünme gücüne bağlı olarak sağlanır. Güç genellikle partikül-partikül ve partikül-ekipman tarafından sağlanır. Disk, partiküllerin yüzeyleri boyunca taşınarak gücü arttıran oluklu bir yüzeye sahiptir. Kullanılan diskler iki farklı geometrik yapıya sahip olabilir. Bunlar; çapraz hatlarla oluşturulmuş yapı ve radyal (merkezden çevreye doğru) yapıdır. Bazı çalışmalar sferonizasyon hızının radyal yapıda daha fazla olduğunu gösterir fakat her iki yapı ile de kabul edilebilir partikül sistemler elde edilir.

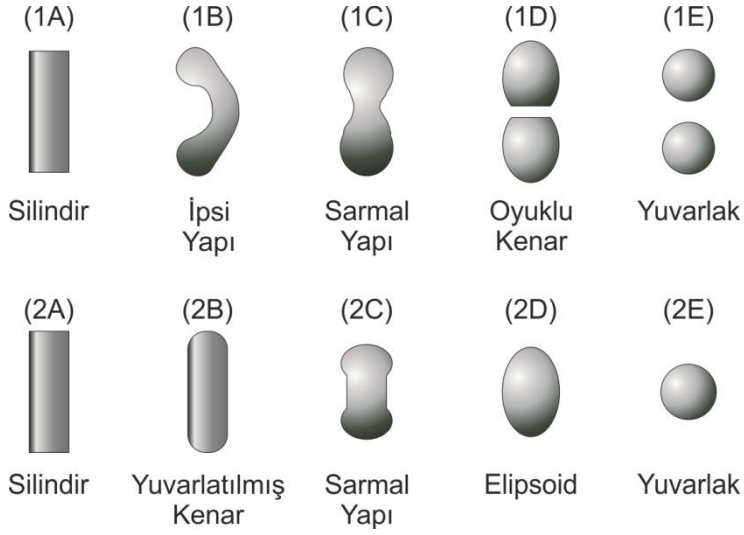
Sferonizasyon basamağında ekstrüsyonda elde edilen çubuk şeklindeki pelletler küreselleştirilir. Bu kısımda ekstrüdatın özellikleri önemlidir. İdeal koşullar altında ekstrüdat küçük ve aynı yapıli parçalara bölünmelidir. Bölünme işleminde kısa süre içerisinde alt plakanın ani yer değiştirmesi ve aşınmanın oluşması nedeniyle her bir uzunluk parçasını eş çaplı yapılarla dönüştürmektedir. Bu safhadaki kritik gösterge granülasyonun veya ekstrüdatın kalitesidir.

Rowe ve Baert (93) tarafından tasarlanan ve sferonizasyonu tanımlayan iki model bulunmaktadır. Bu modeller Şekil 7’de gösterilmiştir.

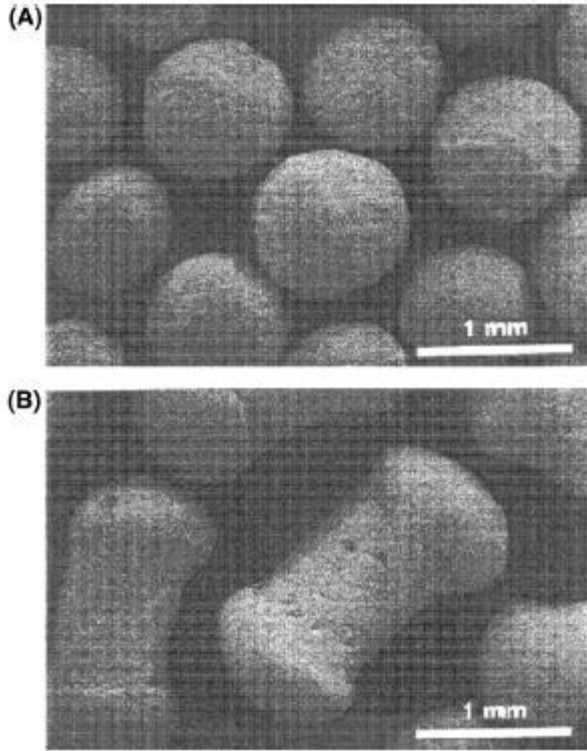
Sferonizasyon safhasına gelmiş yapılarda ekstrüdatın su içeriği önemli rol oynar. Ekstrüdatın neminin fazla olduğu durumlarda partikül çaplarında büyüme ve geniş ölçüde boyut dağılımı gözlemlenir. Düşük nem durumunda ise ekstrüdat yuvarlak hale gelebilmek için yeterli neme sahip değildir. Yeterince plastik kütleden elde edilmiş partiküller ile yeterli neme sahip olmayan kütleden elde edilmiş partiküllerin görüntüleri Şekil 8’de gösterilmiştir.

Sferonizasyon basamağındaki farklılıklar; sferonizer boyutu, yükleme kapasitesi, disk hızı ve sferonizasyon cihazında kalış süresi şeklindedir. Farklılıklardan her biri sonuç ürünün fiziksel karakteristiğine etki eder. Hasznos ve ark. (91) yüksek disk hızı ve uzun kalış süresinin kalın fraksiyonu ve ortalama çapı arttırırken uygun fraksiyonu azalttığını belirtmişlerdir. Yüksek hız ve fazla kalış süresi prostedeki nem kaybını arttırır. Hellen ve ark. (94) yüksek hız ve fazla kalış süresinin daha küresel partiküller elde edilmesine neden olduğunu savunmuştur. Wan ve ark. (86) da yüksek kalış süresi ve yüksek hızın partikül boyutunu küçülttüğü, elde edilen partiküllerin yuvarlak ve düzgün olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Malinoski ve Smith (95) ise yaptıkları çalışmalarda yüksek disk hızı ve artan kalış süresine maruz kalan ekstrüdatların partikül yoğunluğunu arttırdığını gözlemlenmişlerdir.



Şekil 7: Partiküllerin silindirik halden (1a), ipsi bir yapıya (1b), sarmal yapıya (1c), oyuklu şekile (1d) ve yuvarlak yapıya (1e) dönüşümü Beart ve ark. öngörmüştür (93). Partiküllerin silindirik halden (2a), yuvarlatılmış kenara (2b), sarmal kenara (2c), elips yapıya (2d) ve yuvarlak yapıya (2e) dönüşümü Rowe ve ark. öngörmüştür (87).



Şekil 8: (A) Plastik yapıya sahip kütleden elde edilmiş yuvarlak pellet örneği, (B) Yeterli neme sahip olmayan ekstrüdatların sarmal yapı örneği (82).

2.3.3.5 Ekstrüzyon-Sferonizasyon Tekniğinde Kurutma Basamağı (97)

Kurutma bu prosesin son adımıdır. Tepsili kurutma, kolon tipi akışkan yataklı kurutma, titreşim yataklı kurutma gibi çeşitleri vardır. Tüm bu çeşitlerde en büyük

farklılık suyu uzaklaştırma hızlarıdır. Tepsili kurutma içlerinde en yavaş kurutma hızına sahiptir. Akışkan yataklı kurutucular ise yüksek hava derecesi ve yüksek iç sıcaklığa sahip olduğu için daha hızlı kurutma kapasitesine sahiptir. Kolon tip ve titreşimli tipler ise devam eden proseslerde tercih edilmektedirler.

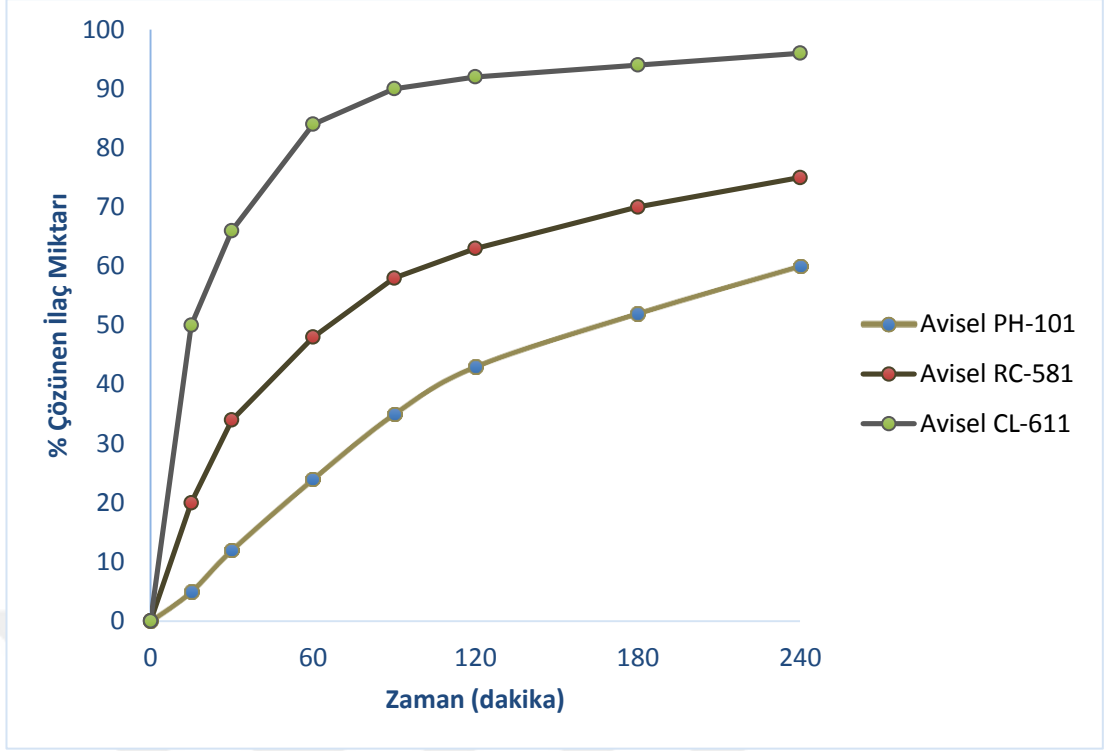
Tepsili kurutma sabit yataktan yavaş bir prosestir. Bu nedenle yüzeye karşı ilaç göçüne neden olabilen ve rekristalize durumu yaratabilen bir prosestir. Akışkan yataktaki hızlı dönme göç etkilerini azaltır ve bu durum partikülün birçok özelliğini etkiler. Partikülün yüzeydeki etkin madde konsantrasyonu ve dissolüsyonu artırır.

2.3.4 Ekstrüzyon- Sferonizasyon Tekniğinde Formülasyon Değişkenlerinin Ürüne Etkisi (80, 98, 99)

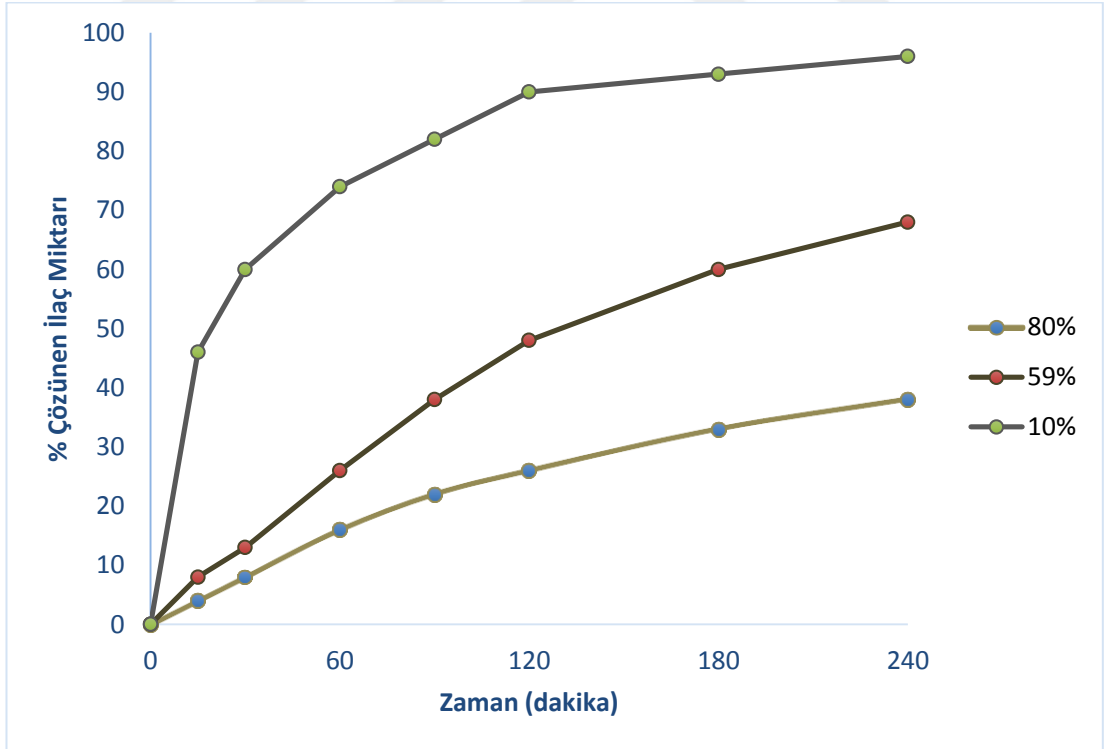
Formülasyonlarda granül eldesi için kullanılacak olan katı fazın seçimi önem taşımaktadır. Düşük dozlu uygulamalarda MCC küresel şekilli partiküller eldesi sağladığı için daha uygun yardımcı madde olarak kabul edilir. Yüksek dozlu uygulamalarda ise MCC'un kabul edilebilir ve tekrar üretilebilir küresel partiküller eldesinde kullanılması tercih edilmez.

Aynı etkin maddenin katı faz olarak farklı Avicel çeşitleriyle oluşturulduğu formülasyonlarının dissolüsyon profili

Şekil 9'da, aynı katı faza sahip farklı miktarda etkin madde içeren formülasyonların dissolüsyon profili ise Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9: Aynı etkin maddenin katı faz olarak farklı Avisel çeşitleriyle oluşturulduğu formülasyonlarının dissolüsyon profili



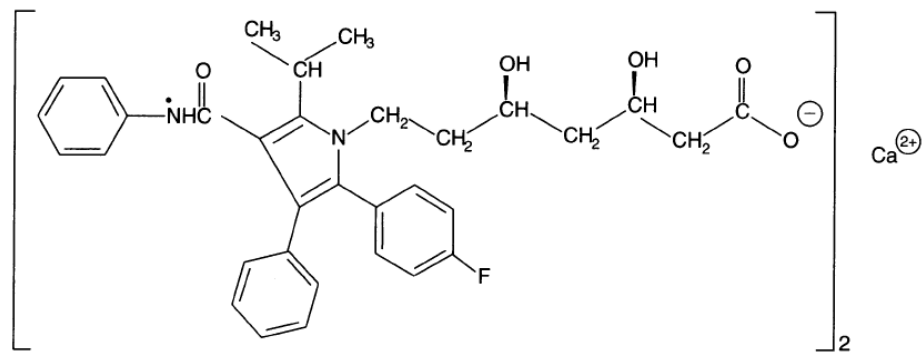
Şekil 10: Aynı katı faza (Avisel CL-611) sahip farklı miktarda etkin madde içeren formülasyonların dissolüsyon profili

2.4 Atorvastatin Kalsiyum Hakkında Genel Bilgiler

2.4.1 Atorvastatin Kalsiyumun Farmakodinamik Özellikleri(100, 101102, 103)

Atorvastatin, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA redüktaz (HMG_CoA)'ın mevalonata dönüştürülmesinden sorumlu hız sınırlandırıcı bir enzim olan HMG_CoA redüktazın selektif kompetitif inhibitörüdür. Atorvastatinin yapısal formülü Şekil 11'de gösterilmiştir. Mevalonat ise kolesterol dahil sterollerin öncül bir maddesidir. Trigliseritler ve kolesterol karaciğerde çok düşük dansiteli lipoproteine katılır (VLDL) ve dış dokulara iletilmek üzere plazmaya salınır. Düşük dansiteli lipoprotein (LDL), VLDL den oluşur ve temel olarak yüksek afiniteli LDL reseptörleri ile katabolize olurlar.

Atorvastatin, HMG_CoA redüktazıdır ve karaciğerde kolesterol sentezini inhibe ederek plazma kolesterol ve lipoprotein düzeyini düşürür. Çeşitli HMG_CoA redüktaz inhibitörlerinin farmakokinetik parametreleri Tablo 8'de verilmektedir. Hücre yüzeylerindeki hepatik (karaciğere ait) LDL reseptörlerinin sayısını artırarak LDL'nin hücre içine geçişini ve katabolizmasını hızlandırır. Atorvastatin LDL yapımını ve LDL partikül sayısını azaltır. Atorvastatinin LDL reseptör aktivitesini belirgin ve uzun süreli arttırmasının yanında, dolaşımdaki LDL miktarında da değişiklikler sağlamaktadır.



Şekil 11: Atorvastatin kalsiyum'un yapısal formülü ((3R,5R)-7-[2-(4-Fluorofenil)-3-fenil-4-(fenil karbomol)-5-propan-2-ylpürol-1-yl]-3,5-dihidroksiheptanoik asit

2.4.2 Atorvastatin Kalsiyumun Farmakokinetik Özellikleri (104, 105, 106)

Atorvastatinin farmakokinetik özellikleri sağlıklı gönüllülerde ve hiperkolesterol hastalarında gözlenmiştir ve sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. Bu

çalışmalarda atorvastatinin oral olarak 2.5 - 80 mg arasında tekli veya çoklu dozları kullanılmıştır. Atorvastatinin plazmadaki konsantrasyonu; HMG_CoA redüktazın inhibe olma miktarı veya metabolize olmayan atorvastatin miktarının gaz kromatografisi/ kütle spektrofotometresi ile miktarının tayinine dayalı çalışmalar gerçekteşirilmıştir.

Atorvastatinin 2.5 -80 mg kapsüllerinin plazma konsantrasyonunda (C_{maks}) deşişimi 1.95-252 $\mu\text{g/L}$ dir. Günlük çoklu dozaj alımında 2-4 saat içerisinde plazmada eğri altı alan (EAA) konsantrasyonları 25.2 - 1293 $\mu\text{g/L.saat}$ e ulaşmaktadır. Atorvastatin ilaç etkin maddesinin salt biyoyararlanımı %12 dir ve plazmada protein bağlama kapasitesi > %98 şeklindedir. Atorvastatinin tek dozlu farmakokinetik özelliklerinden yola çıkılarak çok dozlu farmakokinetik özellikleri tahmin edilebilir.

Atorvastatinin metabolizmasının son basamağındaki metabolitler orto ve para hidroksilatlardan türemiş ve β oksidasyon ürünü olan sitokrom P450 3A4 tür (105). İn vitro ortamda karaciğer mikrozomları incelendiğinde atorvastatinin PD 152873 ve PD 142542 olmak üzere iki adet hidroksilat türevi gözlenmiştir fakat aktivitelerinin detayları tanımlanamamıştır. HMG_CoA redüktazının in vitro inhibisyonunda atorvastatin eşit oranda orto ve para hidroksilat metabolitlerini üretir (105).

Atorvastatinin yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) yaklaşık 14 saattir fakat HMG_CoA redüktaz inhibisyonu 20-30 saat arasındadır (101).

Atorvastatin yemekten sonra alındığında C_{maks} %48, eğri altı alan (EAA) %13 azalır fakat C_{maks} a ulaşmak için geçen zaman ve yarılanma ömrü değişmez. HMG_CoA redüktaz inhibitörü ise plazma konsantrasyonundan çok alınan doz ile ilgilidir (107). Bu nedenle atorvastatinin yemeklerle alınıp alınmamasının klinik etkisi çok düşüktür.

20 mg atorvastatin kalsiyum yaşlı hastalarda (>75 yaş) , genç hastalara göre (28 yaş) %43 yüksek C_{maks} , %27 yüksek eğri altı alan ve %36 uzun yarılanma ömrü gözlemlenmektedir. Ek olarak kadınlarda erkeklere göre %18 yüksek C_{maks} , %11 düşük eğri altı alan ve %20 düşük yarılanma ömrü gözlenmektedir (105, 108).

10 mg atorvastatinin karaciğer ve renal bozukluklara olan etkisi çalışılmıştır (116). Sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmalara göre “pugh class B” karaciğer

bozukluğunda 11-16 kat iyi sonuçlar alınmıştır. Renal bozukluklara atorvastatinin farmakokinetik etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Atorvastatin doku yapısına olan etkisi birçok in vitro, ex vivo ve in vivo model ile bağlantılı gerçekleştirilmektedir. HMG_CoA redüktaz inhibitörü farklı dokulara seçici olmasına rağmen, metot ve modellerin seçimine göre farklı sonuçlar gözlenmektedir (104, 109, 110). Atorvastatin (log P: 4.10); pravastatin (log P: 0.57), ve lovastatine (log P: 3.11) kıyasla yüksek lipofilik değere sahip olmasına rağmen, yüksek hepatik seçiciliğine sahiptir ve karaciğerden ilk geçiş etkisinde yüksek derecede metabolize olmaktadır.

Tablo 8: HMG_CoA redüktaz inhibitörlerinin farmakokinetik parametreleri: (101, 106, 111, 112, 113, 114, 115)

Parametreler	Atorvastatin	Fluvastatin	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin
Absorpsiyon (%)	12	98	30	60-85	35
Biyoyararlanıma yemek etkisi (eğri altı alan daki değişim)	13	15-25	50	-	30
Plazma proteini bağlama (%)	≥98	≥99	≥95 ^a	95-98 ^a	45
Hepatik ekstraksiyon (% absorplanan doz)	?	≥70	≥70	≥80	45
Kan beyin bariyeri	?	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Yarılanma süresi (t)	14 ^b	1.2	3	1.9 ^c	3
Renal boşaltım (%) ^d	<2	6	30	13	60

- a- Herbir ilaç etkin maddesi için ve β-hidroksiasit metaboliti ile uyumlu olan sonuç
- b- Metabolize olmayan atorvastatin için geçerlidir. Aktif metabolitlerin HMG_CoA redüktaz inhibitörlerinin yarılanma zamanı 20-30 saattir .
- c- Ana aktif metabolitler için geçerlidir.
- d- İntravenöz dozda işaretlenmiş ilaç metabolitlerinin renal boşaltımdaki % sonuçları.

2.4.3 Atorvastatin Kalsiyumun İlaç Etkileşimleri (116)

Atorvastatin; etil estrodiol ve eritromisin sitokrom P450, 3A4 substratlarıdır ve beraber alımlarında etkileşimler beklenmektedir. Günde 40 mg atorvastatinin, günde 35 mg etil estrodiol ve 1 mg noretisteron içeren doğum kontrol hapi ile birlikte kullanıldığında 16 sağlıklı bayanda yapılan araştırma sonucunda etil estrodiol C_{maks} miktarının etil estrodiolun yalnız alımına kıyasla %19 arttığı gözlenmiştir. Etil

estrodolun yarılanma zamanı değişmemiş fakat noretisteronun C_{maks} ve eğri altı alan değerleri %24 ve %28 kadar artmıştır.

Eritromisin günde 4 kez 500 mg olarak alındığında atorvastatin ve eşdeğerlerinin C_{maks} ve eğri altı alan değerleri %38 ve %33 kadar artmıştır .

10 mg atorvastatinin oldukça yaygın kullanılan reçetesiz asit gidericiler ile kullanımında atorvastatin ve eşdeğerlerinin t_{maks} değerleri 2.9 -5.7 saate uzamakta, C_{maks} ve eğri altı alan değerleri ise %34 kadar azalmaktadır.

Atorvastatinin kolestipol ile kullanımında ise plazma konsantrasyonu %25 kadar azalmaktadır.

2.4.4 Atorvastatin Kalsiyumun Terapötik Etkisi (117, 118, 119, 120)

Kolesterol ve trigliseridlerce zengin plazmadaki lipoprotein miktarının artışında gıdalar ve/veya genetik faktörler birincil olarak etkilidir. İkincil etkiler ise diyabet (insüline bağlı olan diyabet ve insüline bağlı olmayan diyabet), hipotiroidizm, nefrotik sendromu ve diğer karaciğer bozuklukları şeklindedir (119, 121).

Artan LDL-kolesterol seviyesi, koroner kalp hastalıklarının birincil risk faktörüdür fakat düşük HDL-kolesterol ve yükselen trigliserid seviyesinin etkiside yadsınamaz derecede yüksektir. Diğer risk faktörleri hasta yaşına, cinsiyetine, sigara kullanımına, şeker hastalığına, obeziteye, fiziksel egzersiz azlığına, hipertansiyona ve koroner kalp rahatsızlıklarına bağlıdır.

Dislipidemi hastalarının iyileşmesinde amaç lipoprotein seviyesinin normalize edilmesidir. Başlangıç olarak, farmakolojik yaklaşım olmaksızın uygulamaların (diyet/kilo kontrolü, egzersiz, diğer yaşam değişimleri gibi) başlatılması önerilmektedir. Farmakolojik uygulamalar yalnızca hastaların bu ölçümleri sonucu başarısızlıkla sonuçlanmışsa başlatılmalıdır. Ulusal kolesterol eğitim programı (NCEP), koroner kalp hastalığı ile ilgili olsun veya olmasın dislipidemi hastalığının tanınması ve bu hastalara uygulanacak olan programın anlaşılması için ayrıntılı bir klavuz yayınlamıştır ve bu klavuz Tablo 9'da verilmiştir (118).

HMG_CoA redüktaz inhibitörü içeren lipid düşürücü ilaçlarla yapılan çalışmalar, düşük LDL-kolesterol seviyesinin kronik kalp hastalığının ölüm oranını ve tehlikesini azalttığını göstermektedir (122, 123).

Tablo 9: Uluslararası kolesterol eğitim programı tarafından önerilen koroner kalp hastalığına (KKH) ¹¹⁸ sahip olan veya olmayan yetişkinlerde plazma kolesterol seviyelerinin^a sınıflandırılması

Kategori	Tokluk seviyesi		Takip süreci	Açlık LDL kolesterol		
	Toplam kolesterol plazma seviyesi (mmol/L)	HDL kolesterol plazma seviyesi (mmol/L)		Plazma seviyesi (mmol/L)	Takip süreci	Tedavi hedefi (mmol/L)
KKH ye sahip olmayan hastalar						
Kabul edilebilir değer	<5.2	≥0.9	5 yıl boyunca tekrar edilmeli.	<3.4	-	<3.4
	<5.2	<0.9	LDL kolesterol analizi yapılmalı.	<3.4	-	<3.4
Yüksek sınır değeri	5.2-6.2	≥0.9 ve <2 risk faktörlerini içerir	Diyet ve yaşam biçimi önerileri 1-2 yıl boyunca uygulanmalı	3.4- 4.1 ve <2 risk faktörlerini içerir	Diyet ve yaşam biçimi önerileri her yıl tekrarlanmalı	<3.4
	5.2-6.2	<0.9 ve ≥2 risk faktörlerini içerir	LDL kolesterol analizi yapılmalı	3.4-4.1 ve ≥2 risk faktörlerini içerir	Diyet ve yaşam biçimi önerileri 1-8 hafta boyunca uygulanmalı	<4.1
Yüksek değeri	≥6.2		LDL kolesterol analizi yapılmalı	≥4.1 ve <2 risk faktörleri	Diyet ve yaşam biçimi önerileri	<4.1
				≥4.1 ve ≥2 risk faktörleri	Diyet ve yaşam biçimi, ilaç tedavisi önerisi	<3.4
				≥4.9	Diyet ve yaşam biçimi, ilaç tedavisi önerisi	<4.1
KKH ye sahip hastalar						
				≤2.6	Diyet ve yaşam biçimi önerileri her yıl tekrarlanmalı	
				2.6-3.3	Diyet ve yaşam biçimi önerileri	≤2.6
				≥3.4	Diyet ve yaşam biçimi önerisi, ilaç tedavisi	≤2.6

2.4.5 Hiperkolesterolemi

Kanda yüksek miktarda kolesterol bulunmasından dolayı meydana gelen bir hastalıktır. Kolesterol bir steroldür ve ayrıca steroid hormonlarının ve safra asitlerinin öncüsü bir maddedir. Kolesterol suda çözünmediği için kan plazmasında protein partikülleri (lipoproteinler) ile taşınırlar. Lipoproteinler; çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), ortayyoğunluklu lipoprotein (IDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) olmak üzere yoğunluklarına göre sınıflandırılabilir. Tüm lipoproteinler kolesterolün taşınmasında görev alır fakat HDL dışındaki lipoproteinlerin (özellikle LDL) kanda seviyesinin yükselmesi damar tıkanıklığı ve koroner kalp hastalıkları riskini artırır. HDL lipoproteini ise aksine sistemi koruyucu görev yapar.

Hiperkolesterolemia çevresel faktörler (yemek alışkanlığı, stres) ve genetik faktörlerin (çoklu gen etkileri, ailesel hiperkolesterolemia) tek tek etkisi veya birleşim etkisi ile oluşur.

2.4.5.1 *Hiperkolesterolemi Tedavisinde Plasebo ile Karşılaştırma Verileri (124, 125, 126, 127, 128)*

Doz cevap çalışmalarında atorvastatin plasebo ile karşılaştırıldığında toplam kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid seviyesinde önemli azalma göstermiştir. HMG-CoA redüktaz inhibitörü LDL kolesterol seviyesini lineer olmayan bir doz cevap aralığında azaltır. LDL kolesterol seviyesini 2.5 mg atorvastatin %25, 5 mg atorvastatin %29, 10 mg atorvastatin %35-%42, 20 mg atorvastatin %42-%44, 40 mg atorvastatin %50, 80 mg atorvastatin ise %59- %61 oranında azaltır. 2.5 ila 80 mg atorvastatinin günde bir alınması durumu plasebo ile karşılaştırıldığında apolipoprotein B seviyesini %17-%50 arasında azaltır. Bu durumda trigliserid seviyesi %10-%45 arasında azalır (125, 129) .

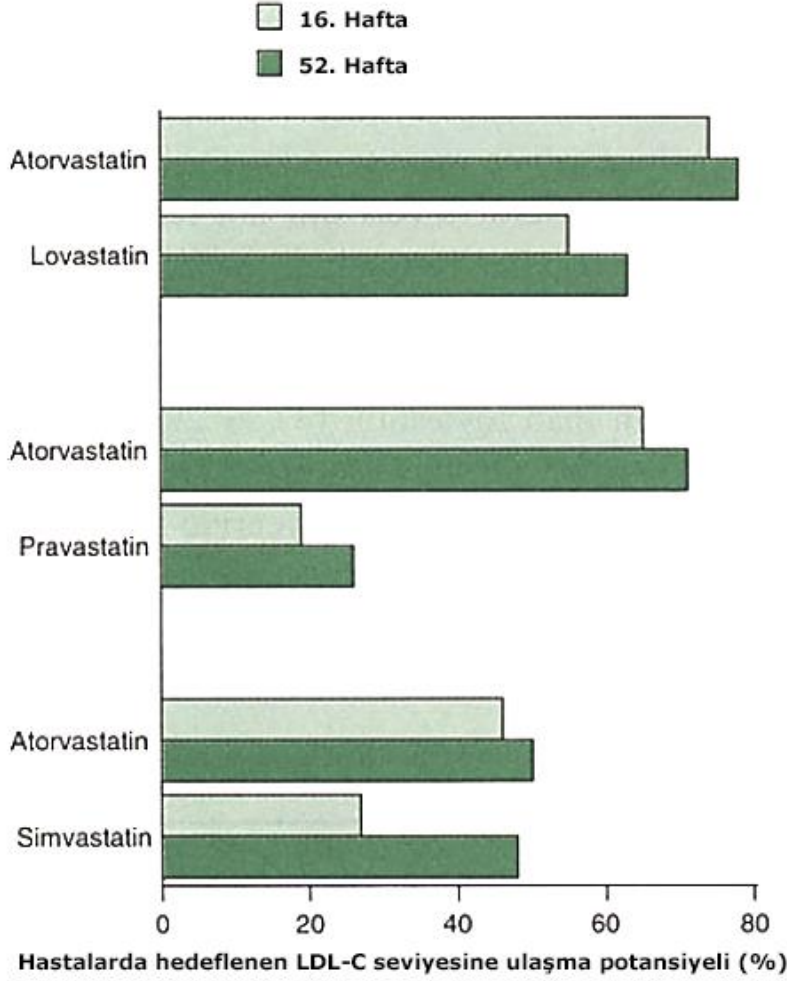
İki hafta boyunca günde 2.5-80 mg atorvastatin kullanımında LDL kolesterol seviyesinde maksimum %90 oranında azalma gözlenmiştir.

Menapoz döneminin sonunda bulunan kadınlarda (n=20) günde 10 mg atorvastatin toplam kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid seviyesini sırası ile %31, %43, %7 oranında azalmıştır ve 12 haftalık bu uygulama süresince plasebonun etkisi çok az derecede olmuştur.

2.4.5.2 *Hiperkolesterolemi Tedavisinde Diğer HMG-CoA redüktaz İnhibitörleri ile Karşılaştırma Verileri (120, 129, 130, 131, 132)*

Günde 10-20 mg atorvastatin, günde 20-40 mg lovastatin, günde 20- 40 mg provastatin ve günde 10-20 mg simvastatin 1 yıl boyunca plasebo ile birlikte gönüllüler ile çalışılmıştır. Hastalar başlangıçta her bir ilaç çeşidi için düşük doz kullanmışlardır. 16 hafta sonunda Uluslararası kolesterol eğitim programı (NCEP=US National Cholesterol Education Program) tarafından LDL kolesterol seviyesine ulaşamazlarsa yüksek dozlu ilaç kullanımına devam etmişlerdir. 52 haftalık bu uygulamadan sonra atorvastatin (%37); lovastatin (%29), provastatin (%23) veya simvastatin (%33) e göre LDL-kolesterol seviyesini daha çok düşürmüştür. Toplam kolesterol ve trigliserid seviyesini, apolipoprotein B seviyesini ve VLDL kolesterol seviyesini atorvastatin grupları lovastatin, simvastatin veya provastatin gruplarına göre oldukça fazla derecede azaltmıştır (105, 130, 131).

Birçok hasta 16 hafta ve 52 hafta sonrasında NCEP nin belirlediği Tablo 9'deki hedeflerine atorvastatin, kullanımı ile provastatin kullanımına göre daha çok yaklaşmıştır (Şekil 12). Ayrıca atorvastatin NCEP'nin geliştirdiği hedeflere lovastatin den 1-3 kat daha çok yakın cevaplar vermiştir (105).



Şekil 12: Uluslararası kolesterol eğitim programı (NCEP) tarafından geliştirilen HMG-CoA redüktaz inhibitörleri ile muamele sonrasında hastaların yüzde olarak hedeflerine ulaşma profilleri. Geniş klinik denemelerde atorvastatin 10-20 mg/gün, lovastatin 20-40 mg/gün, pravastatin 20-40 mg/gün, simvastatin 10-20 mg/gün şeklinde uygulanmıştır.

2.4.5.3 Homozigot Ailesel Hiperkolesterol Tedavisi Verileri (133)

Homozigot ailesel hiperkolesterol hastalığına sahip 13 hastada günde 80 mg atorvastatin, LDL kolesterol miktarını plasebosu ile karşılaştırıldığında %30 a kadar düşürmüştür. Homozigot ailesel hiperkolesterol hastalığına sahip 29 hastadan 14 ünde günde 20-80 mg atorvastatin kullanımı LDL kolesterol seviyesini %7-%53 kadar düşürmüştür, kalan 5 hastada ise LDL kolesterol seviyesi %7-%24 oranında artmıştır.

2.4.5.4 Hipertrigliseridemi ve Hiperlipidemi Tedavisi Verileri (134, 135, 136)

Plasebo ile karşılaştırıldığında günde 5, 20 veya 80 mg atorvastatin kullanımı trigliserid seviyesini (%24-%46), LDL kolesterol seviyesini (%17-%41) , ve toplam kolesterol seviyesini önemli derecede azaltıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Ayrıca günde 5-80 mg atorvastatin kullanımı VLDL kolesterol seviyesini %34- %58 ve apolipoprotein seviyesini %17- %42 oranında azaltmıştır.

Yüksek trigliserid seviyesine sahip hastalarda günde 10-20 mg atorvastatin kullanımı, günde 300 mg fenofibrat ve günde 300-3000 mg nikotinik asit (niacin) alımına göre toplam kolesterol ve LDL kolesterol seviyesini çok daha anlamlı derecede düşürmüştür.

Apolipoprotein B nin HDL kolesterol seviyesi oranını atorvastatin %30, nikotinik asit %26 düşürmüştür. Atorvastatinin günde 10-20 mg alımı ile bu oran %34- %40 azalırken, günde 300 mg fenofibrat alımı ile bu oran %31-%32 oranında azaltılabilmıştır.

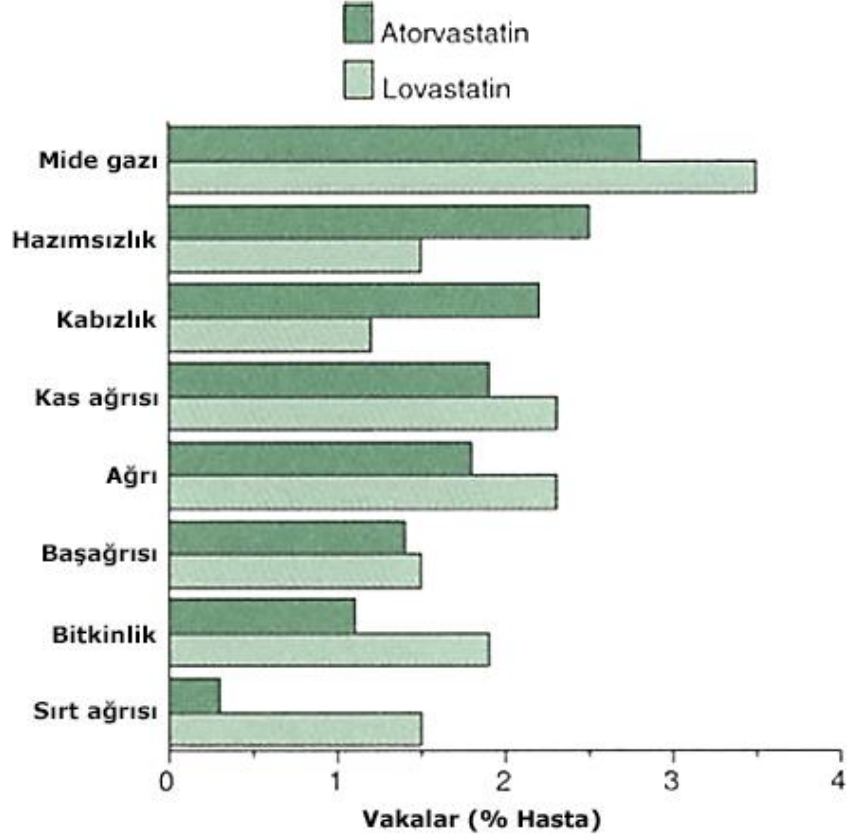
2.4.6 Atorvastatin Kalsiyumun Tolere edilebilirlik Verileri (105, 111, 112, 113, 114, 130, 131, 137)

Diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörleri gibi atorvastatinin 52 haftalık kullanımındaki klinik çalışmalarda tolere edilebilmiştir. Geniş çalışmalar sonucu çok sık rastlanan istenmeyen etki durumları Şekil 13'de özetlenmiştir. En sık gözlenen yan etkiler mide bağırsak sisteminde gözlenen etkilerdir (kabızlık, mide gazı, hazımsızlık, karın ağrısı vb.).

HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin tolere edilebilirlik ilişkisi artan serum aspartat (AST) veya alanin aminotransferaz seviyeleri veya miyalji ve keratin fosfokinaz seviyesinin normal limitten 10 kat daha yüksek olmasıyla ilişkilidir (118). Çok seyrek olmakla birlikte (<%2) bazı hastalarda HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinden dolayı kas hastalıklarına rastlanmıştır. Yapılan araştırmada atorvastatin kullanımında hiçbir hastada kas hastalığı (miyopati) durumu gözlenmemiştir. Atorvastatin kullanan grubun (n=132) %3 ünde kas ağrısı rapor edilmiş fakat hiçbir hastada sürekli artan keratin fosfokinaz seviyesinde normal seviyeden 10 kat yüksek bir seviye elde edilmemiştir.

Serum transfer seviyesi; atorvastatini günde 10 mg alımla % 0.2, 20 mg alımında % 0.6, 40 mg alımda % 0.6 ve 80 mg alımında % 2.3 oranında artmıştır. 1049 hastada yapılan normal olmayan transaminaz seviyesi 52 haftalık uygulamada atorvastatin ve lovastatin ile benzer seviyededir.

Gönüllüler karşılaştırıldığında atorvastatindeki istenmeyen etkiler lovastatin, provastatin ve simvastatindeki ile çok benzerdir (Şekil 13).



Şekil 13: Atorvastatin ile ilgili yan etkiler. Hiperkolesterolemi hastalarının 1 yıl boyunca günde 10-20 mg atorvastatin (n: 789) ile günde 20-40 mg lovastatin (n:260) kullanımı ile elde edilen sonuçları içerir.

2.4.7 Atorvastatin Kalsiyum Kullanımında Doz ve Miktar (101, 138, 139)

Atorvastatin oral olarak günde 10-80 mg olarak primer hiperkolesterolemi (heterozigot ailesel, ailesel olmayan veya kombine dislipidemi) hastalığı bulunan ve diyet ile kolesterol seviyelerini düşüremeyen kişiler tarafından kullanılır.

Atorvastatin kullanımında lipid seviyeleri 2-4 haftalık uygulamada analiz edilmeli ve cevaplarına göre uygun hale getirilmelidir (Tablo 9). Atorvastatinin 6 ve 12 haftalık uygulamalarından sonra karaciğer fonksiyon testleri yapılmalıdır.

Gün içerisinde herhangi bir saatte alınabilmesine rağmen (gün içerisinde hep aynı saatte alınması önerilir) klinik uygulamalarda genellikle akşamları uygulanmıştır. Atorvastatin yemekle veya yemeksiz alınabilir.

Dozaj değişimi renal boşaltımda önemli bir parametre değildir, bu durum renal bozukluğu olan hastalarda bile önem arz etmemektedir. Fakat hepatik eksikliği olan hastalarda dozaj azaltılması gerekli olabilmektedir.

Aktif hepatik hasta veya açıklanamayan sürekli serum transaminaz seviyesinin artışına sahip hamile veya emziren bayanlarda atorvastatin kullanımının tedaviye uygun olmadığı gözlenmiştir.

Diğer HMG_CoA redüktaz inhibitörleri gibi atorvastatinin siklosporin, nikotinic asit, fibrik asit türevleri, eritromisin veya azol antifungallarla kullanımı kas hastalıkları veya rabdomiyoliz gibi istenmeyen yan etkilerinin oluşma riskini arttırmaktadır. Bu nedenle beraber kullanımlarından mümkün olduğunca kaçınılmalıdır.

2.5 Oral Formülasyonlarda Hücre Kültürü Çalışmaları (140, 141).

Biyoyarlanım açısından başarılı olarak tasarlanmış oral ilaç formülasyonlarından beklentiler şunlardır:

- 1) Kimyasallara ve enzimatik bozunmaya karşı tüm dolaşım içerisinde (örnek olarak; bağırsak lümeninde, bağırsak duvarında) dayanıklı olmalı
- 2) Karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrayıp sistemik dolaşıma katıldıktan sonra önemli derecede farmasötik beklentiye cevap veriyor durumda olmalıdır.

Bağırsak geçirgenliğinin ve ilaç emilimin hesaplanmasında çeşitli metotlar kullanılabilir. Bu metotlar birçok avantaj ve dezavantaja sahiptir. İlaç aday maddelerinin formülasyonlarının insan vücudunda absorpsiyonu arttırıcı özelliklerinin bulunup bulunmadığı bu metotlar sayesinde anlaşılmaktadır.

İlaç aday maddelerinin bağırsak absorpsiyonuna olan seçiciliğinin belirlenmesinde in vitro metotlar kullanılmaktadır. İn vitro absorpsiyon çalışmaları ile in vivo bağırsak geçirgenlik çalışmaları kıyaslandığında in vitro çalışmalarda;

-Az miktarda bileşiğe ihtiyaç duyulur.

-Oldukça kolaydır ve bölümsel emilim çalışmaları dolayısıyla hayvanların cerrahi işleme hazırlık aşamaları kısımlarını içermezler.

-Hızlı sonuç verirler ve çalışmalarda hayvan kullanımları azaltılmış olunur.

-Taşınma türünün belirlenmesi (transselüler veya parasellüler) ve transepiteryal taşımada bölümsel farklılıkların belirlenmesi (ince bağırsak veya kalın bağırsak etkisi) gibi mekanizmanın kolaylıkla aydınlatılması sağlanır.

-Bileşenlerin sulu tampon çözeltilerde analiz edilmesi plazma veya kana göre daha kolay olduğu için analitik açıdan analizi oldukça basite indirgemeyi sağlar.

Fakat in vitro sistemlerde ilaç; mide boşalma hızı, mide-bağırsak geçiş hızı, mide-bağırsak pH sı gibi fiziksel faktörlere maruz kalmadığından in vivo ortam sonuçları ile in vitro sonuçlar yüksek korelasyon göstermeyebilir.

Hücre kültür modellerinin, klasik ilaç absorpsiyon modelleri ile kıyaslandığında birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar :

1) İlaçların ve özellikle peptitlerin permeabilitesinin ve metabolizmasının hızlı değerlendirilmesine olanak sağlaması,

2) Kontrollü koşullar altında ilaç absorpsiyon mekanizmasının çalışılabilmesi,

3) Önilaç, absorpsiyon arttırıcı veya diğer farmasötik maddeler kullanarak ilaç absorpsiyonunu arttırma metotların hızlıca değerlendirilebilmesi,

4) Farmasötik maddelerin epitelyum bütünlük üzerindeki etkilerinin çalışılabilmesine imkân sağlaması,

5) Yardımcı çözücülerin hücresel etkilerinin önformülasyon çalışmaları ile gözlenebilmesi,

6) Bağırsak epitelyumunun bariyer özelliklerinin incelenmesi,

7) İnsan hücreleri üzerinde çalışma yapabilme imkânı sağlaması,

8) Zaman sınırlaması, maliyet ve bazen de hayvan çalışmalarını azaltabilme imkanı sağlaması,

9) İlaç hedefleme stratejilerini hızlı değerlendirme imkânıdır.

Her bir in vitro metot belirgin avantaj ve dezavantaja sahiptir. Amaca bağlı olarak ilaç geliştirme aşamalarında yardımcı madde seçimi bu metotlardan bir ya da birkaçı kullanılarak gözlemlenebilir. Başarılı bir in vitro modelinin seçiminin yapılıp

yapılmadığı in vivo ortamda bağırsak epitellerinin karakteristiğinin in vitro ortamda modelin karakteristiğine yakın olmasıyla bağlantılıdır. İnsan bağırsağındaki tüm koşulları en iyi şekilde taklit eden bir in vitro sistem geliştirmek oldukça zor olmasına rağmen, çeşitli in vitro sistemler ön formülasyon geliştirme aşamasında karar vermede oldukça sık kullanılırlar.

İn vivo ortamda insan bağırsak epitel hücrelerine benzer, oldukça çeşitli tek tabakalı hücre modelleri günümüzde geliştirilmiştir. Bu hücre model ve hatları tek tabakalı olarak transepitellerde ilaç taşınma çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır. Seçilen bazı hücre kültürlerinin özeti Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Geçirgenliğin hesaplanmasında kullanılan hücre kültürleri:

Hücre Tipi:	Türün kaynağı:	Özel karakteristikleri:
Caco-2	İnsan kolon adenokarsinoma hücresi	-oldukça kolay oluşturulan ve çalışmalarda çok sık kullanılan hücre modeli -effluks taşıyıcıların benzerliklerin veya farklılıklarının belirlenebilmesi -laboratuvardan laboratuvara influx taşıyıcıların belirlenmesinde farklılık gösterebilmektedir.
MDCK	Madin-Darby köpeklerinin böbrek epiteryal hücreleri	-Taşımada ATP bağlama kapasitesinde düşük intrinsic gösteren polarize hücrelerdir. -Transefeksiyonda idealdirler.
LLC-PK1	Domuz böbrek epitel hücreleri	-Düşük intrinsic taşıyıcı gösteren polarize hücrelerdir. -Transefeksiyonda idealdirler.
2/4/A1	Fetal sıçanın bağırsak epitel hücresi	-Sıcaklığa duyarlıdırlar. -Paraselüler absorpsiyonu olan bileşikler için idealdirler.
TC-7	Caco-2 subkolon	Caco-2 ile benzerdir.
HT-29	İnsan kolonu	Mukus üreten goblet hücrelerini içerirler.
IEC-18	Sıçanın ince bağırsak hücre hattı	Paraselüler taşıma yapan bileşiklerde boyut duyarlı bariyer özelliği sağlar.

2.5.1 Caco-2 Hücreleri

Caco-2 hücre dizini, heterojen hücre topluluğudur. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (American Type Cell Cultures, ATCC) veya Hücre Kültürlerinin Avrupa Koleksiyonundan (European Collection of Cell Cultures, ECACC) elde edilebilen sistemlerdir. Hücrelerin özellikleri farklı hücre kültürü laboratuvarında veya aynı hücre kültürü laboratuvarında pasaj sayısı, kültür içindeki süre, ekstraselüler destekleyici ile ve hücre kültür ortamı gibi faktörlerden dolayı zamanla değişebilmektedir (142, 143, 144, 145, 146, 147).

Caco-2 hücresi kendiliğinden tek tabakalı polarize enterositlere farklılaşır ve ince bağırsak epitelyumunun karakteristiklerini geliştirir. Bundan dolayı aynı orjindeki diğer hücre dizinlerinden farklıdır. Hücrelerin genellikle bazal kısmında yerleşmiş çekirdek ile polarize olurlar ve iyi gelişmiş apikal sıralı fırçalar ile homojen tek tabaka oluştururlar (148, 149, 150). Filtre üzerinde kültürleri yapıldığında, polarize Caco-2 hücreleri, desmozomlar, ara bağlantı noktaları ve sıkı bağlantı noktaları oluşan ve ekstraselüler kalsiyum derişimi ile düzenlenerek birleşmişlerdir (140, 148).

Caco-2 hücrelerinin kullanımı in vitro absorpsiyon çalışmaları için son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Geçirgen filtreler için büyütülen Caco-2 hücrelerinin özellikleri normal intestinal (bağırsak) epitelyumuna benzerdir. Bu hücreler sıkı bağları, mikrovili ve sıralı fırçaları içermektedir. Hücreler 21 gün boyunca Şekil 14 de gösterilmiş olan porlu membran filtreleri üzerinde farklılaştırılan tabakalarda büyütülür (151, 152, 153, 154, 155).

Organik anyon olan etkili maddeler için Caco-2 hücrelerinden permeabilite, taşıyıcılar aracılığı ile gerçekleşir. Taşıyıcıların oral absorpsiyon üzerine etkisini belirlemek için organik anyon olan glipizid ve estron-3 sülfatın Caco-2 hücrelerinden permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Caco-2 hücreleri Amerikan tip kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Hücreler, L-glutamine (788 µg/mL), , 10% fetal bovin serum, streptomycin (90 µg/mL), penicillin (90 U/mL) ve 1% non-essansiyel amino asit içeren DMEM içinde kültür edilmiştir. Daha sonra 105 yoğunlukta hücre içerecek şekilde membran üzerine ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan 25 gün sonra apikal yönden bazolateral yöne ve bazolateral yönden

apikal yöne doğru permeabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deney başladıktan sonra belli aralıklarla örnekler alınıp, miktarları analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre glipizidin bazolateral yönden apikal yönde doğru geçişinden elde edilen permeabilite (Pba) değeri, Pab'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Estron-3 sülfat için ise tam tersi durum bulunmuştur (156).

Caco-2 hücreleri, selüloz ve kollojen kaplı polikarbonat filtreler üzerinde yetişirler. Nitroselüloz filtreler üzerinde yetişen Caco-2 hücreleri, ölçülebilir trans epitelyal elektrik rezistansına (TEER) sahip polarize tek tabaka oluşturur (156, 157, 158, 159, 160). Hücrelerin bulunduğu tabakanın olgunluğu ve epitelyum bütünlük TEER ile ölçülerek test edilir. TEER değeri voltmetre ile değerlendirilir. Elektrotlarla insertlerin üst ve alt kısımlarından örnek alınır. TEER değeri, hücrelerin gelişmesi için tutulan zaman arttıkça artar ve 10-15 günde ideal değere ulaşır. Bazı verilere göre 20-21 günde maksimuma ulaşır. Caco-2 hücrelerinin TEER değeri transwell insertlerin (hücre kuyucuk sistemi) yüzey alanına, filtre desteğine, ekilen hücre sayısına kültür durumuna ve pasaj numarasına bağlıdır (154, 161, 162, 163, 164, 165). Hücre bütünlüğünün saptanmasında diğer bir yol ise; H3 – Mannitol, C14 – Mannitol, polietilen glikol, floresans bileşikler (fluressein, lusifer sarısı, inulin ve fluressein-izotiosinat işaretli dekstran), propranolol gibi hidrofilik ve hidrofobik moleküllerin permeabilitesinin ölçülmesiyle analiz edilir. Bu yöntem maddelerin paraselüler ve transelüler yol ile hücre tabakasından pasif difüzyonla geçmesi esasına dayanır (149, 153, 161, 162, 163, 165).

Caco-2 hücrelerinin düzgün gelişimi için ekstraselüler matrikse gerek yoktur. Birleşmeleri kollojen kaplı veya kaplı olmayan polikarbonat membranlarda olmasın rağmen, kollojen kaplı polikarbonatta daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. Geniş porlar, hücrenin, membranın iki yanında yetişmesi ile sonuçlanır ve bu da depolarize hücrelere neden olmaktadır (144, 166, 167).

Caco-2 modeli, bağırsak mukozasının in vitro modeli olarak tanıtıldıktan sonra oral ilaç verilmiş sistemlerinin geliştirilmesi sırasında ilaçların seçimi için 90 lı yıllarda kullanılabilir duruma gelmiştir. Bu hücre dizini, ilaçların in vitro bağırsaktan taşınmaları (158, 159, 166, 168, 169, 170) ve sitotoksik karakteristiklerini modellemek için (158, 171, 172), transepitelyal geçiş işlemlerinin incelenmesinde, ilaç geçişinin hızlı

değerlendirilmesinde absorpsiyon problemi olan ilaçları aydınlatmada ve en uygun pasif absorpsiyon karakteristikleri olan ilaçların seçiminde kullanılabilir. Örneğin adrenerjik agonist olan adrenalin; fenasetin, antipirin ve mannitol gibi küçük moleküllerin geçişini etkilememektedir; ama büyük moleküllerin geçişini TEER değerini değiştirmeden etkilemektedir (143). Caco-2 hücreleri lipoprotein parçacıklarını üretir (143, 157, 159, 160, 173). Bu nedenle lenfatik sisteme ilaç verilmesi için uygun olabilmektedir. Ayrıca yüzey etkin maddelerin ve diğer farmasötik maddelerin epitelyum bütünlük ve ilaç absorpsiyonu üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılabilir (169, 174).

Tamamiyle absorbe olan ilaçlar Caco-2 hücrelerinde yüksek permeabilite katsayılarına (P_{app}) sahipken ($P_{app} > 10^{-6}$ cm/s), bunun dışındakiler düşük geçirgendirler (143). Ayrıca Caco-2 hücrelerindeki sıkı bağların permeabilitesi, in vivo permeabiliteden düşüktür. Caco-2 hücrelerinin elektriksel direnci, ince bağırsak membranından yüksektir (166, 175) ve Caco-2 hücreleri, birbirlerine ince bağırsak epitelyumundan daha sıkı bağlanmaktadır. Bu durumda hidrofilik ilaçların sıkı bağlardan geçişindeki düşük permeabilitenin nedenini açıklamaktadır (166).

Yardımcı maddeler, farmasötik formülasyonlarda dissolüsyonu düzeltmek ve çözünürlüğü zayıf ilaçların absorpsiyonunu arttırdığı için ıslatıcı ajan olarak kullanılırlar. Düşük molekül ağırlıklı iyonik yüzey etkin maddeler (Sodyum dodesil sülfat, SDS gibi), kritik misel derişiminin altında intestinal mukozada nontoksik halde bulunurlar (176, 177).

Birçok noniyonik yüzey etkin madde, taşıyıcıları inhibe eder. Membran taşıyıcılarını inhibe eden yüzey etkin maddelerin çoğu P-gp (P-glikoprotein) üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok noniyonik yüzey etkin madde etkili bir şekilde P-gp inhibe eder. Bu noniyonik yüzey etkin maddeler P-gp substratlarının oral absorpsiyonunu arttırmada potansiyele sahiptir. Noniyonik yüzey etkin maddelere tweenler, spanlar, kremofor EL ve kremofor RH40, pluronik blok kopolimerleri ve D-alpha-tokoferol polietilen glikol 1000 süksinat (Vitamin E TPGS) örnek verilebilir (176, 178, 179, 180, 181, 182).

Yüzey etkin maddeler, membran akıcılığını ve membran düzenini değiştirerek etki gösterirler. Düzendeki bu değişim AdenozinTriFosfat enzimi (ATPaz)

aktivitesinin inhibisyonu ile olur. Ayrıca bazı yüzey etkin maddelerin, protein kinaz C (P-gp gibi birçok membran taşıyıcının işleviyle ilgili enzim) enzimini inhibe eder. Bu yüzey etkin maddelerden bazıları sitokrom P 450 gibi metabolize enzimlerini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Yüzey etkin madde monomerleri kritik misel derişiminin üzerinde taşıyıcıların inhibisyonunu aktive eder (182, 183, 184, 185, 186).



Şekil 14: Geçiş çalışmaları yapılırken kullanılan hücre-kuyucuk (plate) sistemi

3 DENEYSEL BÖLÜM

3.1 ÇALIŞMANIN GENEL PLANI

Çalışmaya başlarken amacımız giriş bölümünde de belirttiğimiz gibi, model etkin madde olarak seçilen atorvastatin kalsiyumun oral yolla kullanılabilen kendiliğinden mikroemülsifeye olabilen formülasyonlarını, mikroemülsiyon şeklinde tasarlanmış formülasyonların pellet formunu hazırlamak, hazırlanan bu formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, in-vitro olarak salım ve geçiş özelliklerini incelemek, ayrıca geliştirilen bu formülasyonların in vitro salım ve hücre kültürü geçiş çalışmalarını ticari formülasyon ile karşılaştırmaktır.

Bu amaçla ilk önce etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bunun ardından formülasyon çalışmalarına başlanmıştır. Formülasyon çalışmaları sırasında geliştireceğimiz SMEDDS formülasyonları için ideal YEM: YYEM oranlarını belirlemek için ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çözünürlük çalışması sonrası, geliştirilen SMEDDS formülasyonlarında yağ fazı olarak oleik asit, YEM olarak Span 80 ve Tween 20, YYEM olarak etanol ve su fazı olarak distile su kullanılmıştır. Geliştirilen her bir formülasyonun YEM: YYEM oranı için ayrı ayrı üçgen faz diyagramı çizilmiş ve optimum mikroemülsiyon formülasyonu belirlenmiştir. Bu formülasyonların mL sinde 10 mg olacak şekilde Atorvastatin Kalsiyum (AtrCa) yüklenmiştir. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra bunların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Mikroemülsiyonların katılaştırılıp pellet haline getirilmesi amacı ile yeni bir mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Bu formülasyon için yağ fazı olarak oleik asit, YEM olarak Span 80 ve Tween 20, YYEM olarak 1-metil prolidon (MP) ve su fazı olarak distile su kullanılmıştır. Mikroemülsiyon formülasyonun mL sine 50 mg olacak şekilde AtrCa yüklenmiş ve %60 oranında distile su eklenmiştir. Daha sonra avisel ve aerosil karışımına bu formülasyon emdirilmiş, Ekstrüsyon-sferonizasyon işlemleri uygulanarak pellet haline getirilmiştir. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Daha sonraki aşamada, tüm formülasyonların ve ticari preparatın pH 1.2, pH 6.8 ortamlarında in vitro salım çalışmaları yapılmış ve kinetik olarak değerlendirilmiştir. Tüm formülasyonların ve ticari preparatın Caco-2 hücreleri kullanılarak geçiş çalışmaları yapılmış ve geçiş karşılaştırmaları yapılmıştır. Ayrıca sitotoksosite çalışmalarında formülasyonların Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi 0., 1., 2., ve 3. günlerde incelenmiştir.



4 GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

4.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tween 20.....	Sigma-Aldrich- Almanya
Span 80.....	Sigma-Aldrich- Almanya
Oleik asit.....	Fluka
1-Metil N-prolidon	Merk-Almanya
Etanol	Merck-Almanya
Trifloroasetik asit.....	Merck-Almanya
Sodyum hidroksit	Merck-Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat.....	Merck - Almanya
Asetonitril.....	Sigma-Aldrich- Almanya
Metanol.....	Merck-Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat.....	Merck - Almanya
Atorvastatin kalsiyum.....	Zentiva - Türkiye
Avicel (pH 101)	Sigma-Aldrich - Almanya
Aerosil.....	Fumed Silika
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Gibco- İngiltere
Tripsin-EDTA.....	Gibco- İngiltere
Dulbecco's Modified Eagle's Ortamı (DMEM) .	Gibco- İngiltere
Glutamax (4.5 g/L).....	Gibco-İngiltere
Tripsin-EDTA.....	Gibco- İngiltere
Fosfat tampon çözeltisi (PBS).....	Gibco- İngiltere
Penisilin içeren antibiyotik solüsyonu.....	Gibco- İngiltere
L- Alanin.....	Sigma-Aldrich, İspanya
Fetal siğir serumu (FBS).....	Gibco- İngiltere
Caco-2	Amerikan Type Culture Collection

4.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Manyetik karıştırıcı su banyosu.....	Variomag - Almanya
Hassas terazi.....	Mettlet Toledo – (Columbus, Ohio, ABD)
UV spektrofotometre	Schmadzu 160-A - Japonya
pH metre	Mettler Toledo – (Columbus, Ohio, ABD)
Etüv.....	Nüve EN 500 - Türkiye
Buzdolabı.....	Arçelik - Türkiye
Su banyosu	Buchi 461 – Türkiye
Karıştırıcı.....	Yellow line - Almanya
Nitro selüloz membran	Sartorius - Almanya
Selüloz membran	Sigma Diagnostics - Amerika
Partikül boyutu ölçüm aleti.....	Malvern zeta sizer, Nano ZS - İngiltere
HPLC	HP Agilent 1100 Series - Almanya

Mikro enjektör	Hamilton - İsviçre
Ultrasonik banyo	Jeio Tech- Güney kore
Viskozimetre.....	Brookfield - USA
Refraktometre.....	Atago RX-7000 CX- Japonya
FTIR spektrometre.....	Schmadzu IR Tracer 100 - Japonya
UV spektrometre.....	Schmadzu UV 1208 - Japonya
Elektrik iletkenlik ölçüm aleti	Jenway 4071 - İngiltere
Santrifüj aleti.....	Eppendorf 3414 - Almanya
Hot plate.....	MAY-AHP 0603 – Türkiye
Homojenizatör.....	Yellow line - Almanya
Titreşimli elek.....	Retsch – Almanya
Dissolüsyon cihazı	Sotax- İsviçre
Stabilite kabini (25 °C %60 nem)	Nüve İD501- Türkiye
Stabilite kabini (40 °C %70 nem)	Nüve İD501- Türkiye
Tap dansite.....	Erweka Amerika
Friabilite	Copley FRV 2000
Ekstrüder	Caleva- İngiltere
Sferonizer	Caleva- İngiltere
HPLC kolon	ACE C18-İskoçya
Ultrapycnometer 1000.....	Almanya
Mikroskop	Olympus SPJ- Japonya
Elisa reader.....	PolarstarOmegaBMG Glabtech-Almanya
Elektrik iletkenliği	Jenway 4071- İngiltere
Refraktif İndeks.....	Atago Refraktometer - Türkiye
Hücre kültür erleni (flask)	Orange Scientific, Amerika
Hücre kültür kabı (plate)	Orange Scientific, Amerika

4.2 Yöntem

4.2.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Atorvastatin Kalsiyumun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1.1 *Atorvastatin Kalsiyumun Infrared (IR) Spektrumu*

AtrCa % 1 oranında potasyum bromür ile havan içinde karıştırarak homojenize edildi. IR spektrofometrede 750-4000 cm⁻¹ arasında taranıp pik verdiği dalga boyları tespit edildi.

4.2.1.2 *Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre (UV) Spektrumu*

10 mg AtrCa, 10 mL metanolde çözüldürüldükten sonra bu stok çözeltisinin 200-400 nm dalga boyları arasında taramalı UV spektrofometrede maksimum absorbans verdiği dalga boyu saptandı.

4.2.2 Atorvastatin Kalsiyumun Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi

4.2.2.1 Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre ile Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

10 mg AtrCa tartılıp 100 mL metanol de çözündürüldü (100 µg/mL). Daha sonra sırası ile 0.4, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6, 2, 2.4, 2.8 'er mL bu stoktan alınıp her biri 10 mL ye metanol ile tamamlandı ve absorbansları okundu. Aynı şartlarda hazırlanan kör kullanılarak, UV spektrofotometrede 238 nm'de bu konsantrasyonlara karşı gelen absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri derişime karşı grafiğe konularak, en küçük kareler yöntemi ile regresyon analizi uygulandı. Buradan absorbans (x) ile derişim (y) arasındaki ilişkiyi veren kalibrasyon eğrileri oluşturuldu.

4.2.2.2 Atorvastatin Kalsiyumun HPLC ile Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

AtrCa'un kalibrasyon eğrisi için UV dedektörlü HPLC sistemi ve ACE C18 kolon kullanıldı. Mobil faz olarak, asetronitril ve 0.1 M sodyum dihidrojen fosfat karışımı 55 /45 oranında hazırlanıp trifloroasetik asit (1 mL) ile pH 3'e ayarlandı. Mobil faz ultrasonik banyoda degaze edildi ve sonra sisteme verildi. Salım hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon miktarı 20 µL ve UV dedektörü 238 nm'ye ayarlandı.

4.2.2.2.1 Metanollü Ortamda Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

Standart eğrinin çizimi için 5 mg AtrCa 100 mL metanol de çözündürüldü ve böylece stok çözeltisi hazırlandı. Bu stoktan 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde örnekler mobil fazla tamamlanarak hazırlandı. Her bir örnek için üç paralel numune ile çalışıldı. Her enjeksiyondan sonra bulunan alan değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Doğrunun denklemi ve r^2 değeri hesaplandı.

Kromatografik şartlar:

Dedektör: UV

Mobil faz: 0.1 M Sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (NaH₂PO₄): Asetonitril (45:55)

Kolon: ACE 5 µm, 3×100 mm C18

Akış hızı: 1 mL/dk

Kolon sıcaklığı: 25°C

4.2.2.2.2 pH 1.2 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

pH 1.2 çözeltisinde AtrCa çözünmediği için önce yaklaşık 5 mL metanolde AtrCa çözüldürülüp 100 mL ye pH 1.2 ortamı ile tamamlandı. pH 1.2 ortamı ile gerekli seyreltmeler yapıp 0,125, 0,25, 0,5, 2, 5, 10, 12, 15, 20 µg/mL derişimlerde dokuz seri çözelti hazırlandı ve HPLC'de analiz edildi.

4.2.2.2.3 pH 6.8 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

pH 6.8 için AtrCa ile 100 µg/mL derişimde stok çözelti hazırlandı. pH 6.8 ortamı ile gerekli seyreltmeler yapıp 0,125, 0,25, 0,5, 2, 5, 10, 12, 15, 20 µg/mL derişimlerde dokuz seri çözelti hazırlandı ve HPLC'de analiz edildi.

4.2.2.2.4 HBSS Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

AtrCa'un HBSS (Hank'ın tuzlu tampon çözeltisi) ortamı ile 50 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlandı ve gerekli seyreltmeler yapılarak; 0,125, 0,25, 0,5, 2, 5, 10, 12, 15, 20 µg/mL derişimlerde dokuz seri çözelti hazırlandı. HPLC'de analiz edildi.

4.2.3 Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.3.1 Doğrusallık

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında, bilinen derişimlerde AtrCa miktarından (8, 10 ve 12 µg/mL) hareketle, HPLC analizi sonucunda bulunan değerler ile gerçek değerler karşılaştırılıp doğruluk değeri % olarak belirlenmiştir.

4.2.3.2 Kesinlik

4.2.3.2.1 Deney İçi Kesinlik

AtrCa'un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında ayrı ayrı düşük, orta, yüksek olacak şekilde seçilen 8, 10, 12 µg/mL'lik derişimlerdeki çözeltisi hazırlanarak ardarda 6 defa enjeksiyonlar yapıp, elde edilen alan değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapma ve relatif standart sapması hesaplandı.

4.2.3.2.2 Deneyler Arası Kesinlik

AtrCa'un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında ayrı ayrı düşük, orta, yüksek olacak şekilde seçilen 8, 10, 12 µg/mL'lik derişimlerdeki çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler birbirini takip eden gün içinde 6 kez ölçüldü. Elde edilen alan

değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve relatif standart sapması hesaplandı.

4.2.3.3 *Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik*

Elde edilen deneysel değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

AtrCa'un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında ayrı ayrı üç farklı konsantrasyonda (8, 10, 12 µg/mL) altı paralel örneğin verdiği absorbans değerleri ölçüldü. Bu absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarları bulundu. Bu değerlerden ortalama ve yüzde geri kazanım hesaplandı.

4.2.3.4 *Özgünlük ve Seçicilik*

Özgünlük ve seçicilikte; yöntemin sadece analiz edilmek istenen maddeye özgün olması ya da numune içerisindeki safsızlıklar, yardımcı maddeler ya da bozunma ürünleri varlığında analiz edilmek istenen maddenin doğru bir şekilde saptanmasıdır. Bu amaçla AtrCa içeren mobil faz ve içermeyen mobil faz enjeksiyonu yapıldı ve elde edilen HPLC kromatogramları incelendi. Benzer şekilde metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında HPLC kromatogramları incelendi.

4.2.3.5 *Duyarlılık ve Saptama Sınırı*

AtrCa'un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında ayrı ayrı miktar tayini, beklenen derişimleri kolaylıkla ve doğrulukla analiz edebilmelidir. Bu yöntemin saptayabildiği en düşük derişime saptama derişimi (Limit of Detection, LOD) denir (Denklem 1). Bu derişim çok güvenli olmayıp, gürültü içerebilir. Gürültünün daha üzerinde olup da, güvenilebilecek durumda olan derişime de duyarlılık veya analiz sınırı (Limit of Quantification, LOQ) denir (Denklem 2). Bunlar arasında istenilen doğruluğu sağlayan derişim saptandı ve analitik yöntemin kantitatif tayin sınırı (duyarlılık sınırı) bulundu.

$$LOD = \left(\frac{3,3 \times \sigma}{S} \right) \dots \dots \dots \text{Denklem 1}$$

$$LOQ = \left(\frac{10 \times \sigma}{S} \right) \dots \dots \dots \text{Denklem 2}$$

σ , verilen örneğin standart sapmasını; S, kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade eder.

4.2.3.6 Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı

Düşük derişim için 8 µg/mL'lik ile yüksek derişim için 12 µg/mL'lik AtrCa'un 3'er paralel standart örnekleri hazırlandı ve oda sıcaklığında HPLC'ye enjekte edilip, başlangıç anında, 12. ve 24. saatlerde enjeksiyonlar tekrarlandı. Benzer şekilde pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında da HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.4 Formülasyon Çalışmaları

4.2.4.1 Kendiliğinden Mikroemülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistem (SMEDDS) Formülasyonu Çalışmaları

4.2.4.1.1 Formülasyonunun Terkibinde Yeralacak Maddelerin Seçimi

Formülasyonda kullanılacak olan yağ, YEM, YYEM lerin seçimi için varolan her bir yardımcı madde ile etkin maddenin çözünürlük çalışması yapıldı (screening). Çözünürlük çalışmasında 2 mL YEM, yağ, YYEM içerisine aşırı doymuş dozda AtrCa ilave edildi. 200 rpm de oda koşullarında 72 saat boyunca karanlık ortamda çalkalayıcıda bırakıldı. 24., 48. ve 72. saat sonunda karışım 25 °C'de 3000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üstlerindeki berrak çözeltiden alınan örnekler mobil faz ile seyreltilerek HPLC cihazına verilip miktar tayinleri gerçekleştirildi (n=3). Çözünürlük çalışmasında kullanılan bileşenler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: Çözünürlük çalışmasında kullanılan Yağ/ YEM/YYEM ve su fazları

Yağlar	Yüzey Etkin Maddeler	Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler	Su
Mısır yağı	Labrafil M 2125	Etanol	Distile su
Oleik asit	Labrafil 1944	İzopropil alkol	pH: 1.2 ortamı
Rafine Kastrol yağı	Tween 20		pH: 4.6 ortamı
	Tween 80		pH: 6.8 ortamı
	Span 80		
	PEG 200		
	PEG 400		
	Transkutol		
	Labrasol		
	Brij 30 V		
	Brij 92 V		
	Brij 96 V		

Bu çözünürlük çalışması sonucunda etkin maddeyi en çok çözen yağ, YEM ve YYEM lere karar verildi.

4.2.4.1.2 SMEDD Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramları

SMEDD sistemlerinin terkinbinde yer alacak olan YEM, YYEM ve yağlar yapılan çözünürlük çalışması sonrası belirlendi. Üçgen faz diyagramlarının çizilmesinde titrasyon yöntemi kullanıldı. Formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında, YEM'lerle, YYEM'ler belli oranda karıştırıldı. YEM: YYEM (a/a) oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 olmak üzere 17 farklı formülasyon geliştirildi. Yağ, YEM ve YYEM karışımı bir beher içerisinde manyetik karıştırıcıda 50 devir/dk dönme hızıyla karıştırılırken, formülasyonlar bulanma noktalarına kadar su ile titre edildi ve bulanma noktaları tespit edildi. Tüm formülasyon çalışmaları $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Formülasyon geliştirme çalışması sırasında elde edilen veriler kullanarak, bilgisayar programı yardımıyla her bir YEM/YYEM oranı için üçgen faz diyagramları çizildi ve en yüksek mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranı ideal olarak kabul edildi. Faz diyagramında belirlenen mikroemülsiyon oluşum bölgesinin ağırlık merkezi kullanılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonları hesaplanarak geliştirildi.

4.2.4.1.3 Atorvastatin Kalsiyum ile Formülasyon Çalışmaları

Üçgen faz diyagramından en büyük alanı veren ve alanın ağırlık merkezinden hesaplanan optimum formülasyonlar belirlendikten sonra formülasyonlardaki tüm bileşenleri (yağ/YEM/YYEM) su fazı içermeden karıştırılarak mL sinde 10 mg olacak şekilde AtrCa bu formülasyona eklendi. Etkin maddenin mikroemülsiyonda çözünmesini sağlamak amacıyla manyetik karıştırıcı ile 50 rpm'de berrak bir çözelti elde edilene dek karıştırıldı. Hazırlanan formülasyondaki AtrCa miktarı tayini HPLC de tayin edildi.

4.2.5 Termodinamik Stabilite (197)

SMEDD formülasyonlarına faz ayrışması ve sıcaklık farkının etkisinin gözlenmesi için santrifüj, ısıtma- soğutma, dondurma-çözme döngüsü çalışmaları yapıldı.

4.2.5.1 *Santrifüj Çalışmaları*

SMEDD formülasyonları 5000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Sonrasında faz ayrışması, çökelme gibi stabilizasyon problemlerinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

4.2.5.1.1.1 *Isıtma-Soğutma Çalışmaları*

SMEDD formülasyonlarında üç döngü şeklinde soğutma 4⁰C de 24 saat bekletilme ve ısıtma ise 40⁰C de 24 saat boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirildi. Herbir sıcaklık muamelesi sonrasında faz ayrışması, çökelme gibi stabilizasyon problemlerinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

4.2.5.1.1.2 *Dondurma-Çözme Çalışmaları*

-4⁰C de 24 saat donmaya bırakılan SMEDD formülasyonları ardından 40⁰C de 24 saat bekletildi. 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilen formülasyonlarda faz ayrışması olup olmadığı gözlemlendi.

Yapılan termodinamik stabilite çalışmaları sonucunda optimal SMEDDS formülasyonun fizikokimyasal özellikleri belirlendi.

4.2.6 **Optimal SMEDD Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun termodinamik stabilite çalışmaları sonrası ideal olarak belirlenen formülasyon fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, mikroemülsiyon hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları ve etkin madde ile taşıyıcılar arasındaki etkileşim ve geçimsizlikleri tespit etmek amacıyla bir seri analiz yapılmıştır. Bunlar mikroemülsiyonun fiziksel görüntüsü, pH'sı, elektrik iletkenliği, dansitesi, refraktif indisi, viskozitesi, emülsifikasyon zamanı, disperse olabilme testi, dağılım dayanıklılığı, damlacık boyutu dağılımı, partikül boyutu analizi, zeta potansiyel analizi, % geçirgenlik analizi, bulanıklık noktası, stabilitesi ve etkin madde miktarının belirlenmesidir. Tüm parametreler için üç paralel ölçüm yapılmıştır.

4.2.6.1 *SMEDD Formülasyonunun Fiziksel Görünüşü*

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) fiziksel görünüşleri incelenerek değerlendirildi.

4.2.6.2 **SMEDD Formülasyonunun pH Ölçümleri**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonu üçgen faz diyagramında belirlenen su miktarı ile seyreltildi. Bu sistemin pH'sı oda sıcaklığında Mettler Toledo marka pH metre ile ölçüldü.

4.2.6.3 **SMEDD Formülasyonunun Elektrik İletkenliği**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunu üçgen faz diyagramında belirlenen su miktarı ile seyreltildi ve elektrik iletkenliği, WTW kondüktametre iletkenlik ölçer aleti ile belirlendi.

4.2.6.4 **SMEDD Formülasyonunun Dansite Ölçümleri**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun dansitesi piknometre kullanılarak, oda sıcaklığında ölçüldü. Dansite ölçümleri Denklem 3'deki formüle göre yapıldı. Piknometre ile dansite ölçümünde solvan dansitesi ölçülecek sıvı ile reaksiyona girmemeli, uçucu olmamalı ve bu maddeyi çözmemelidir. Solvan olarak distile su seçildi. İlk önce piknometrenin boş iken darası alındı. Daha sonra piknometre distile su ile doldurulup tartıldı. Ardından etanol ile çalkalanıp etüvde kurutulmaya bırakıldı. Tartıldı ve bulunan kütleden boş piknometre kütlesi çıkarılarak sıvı kütlesi bulundu (m_1). Daha sonra piknometrenin tıpası açılarak tam tartıldı. 1 g dansitesi tayin edilecek SMEDD formülasyonu piknometreye konuldu ve tıpası kapatıldı. Taşan solvan kurulandı, tartılıp kaydedildi. Bu kütleden boş piknometre kütlesi çıkarılarak SMEDD formülasyonunu içeren sıvı kütlesi bulundu (m_2).

$$Dansite = \frac{(d_{sivi} \times m)}{m + (m_1 - m_2)} \dots \dots \dots \text{Denklem 3}$$

d_{sivi} : suyun özkütlesi, m : SMEDD formülasyonunun kütlesi, m_1 : Suyun kütlesi, m_2 : SMEDD formülasyonunu içeren sıvı kütlenin ağırlığı

4.2.6.5 **SMEDD Formülasyonunun Refraktif İndisi Ölçümleri**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun refraktif indisi ölçümü Atago refraktometer RX-7000 CX marka refraktometre cihazı ile yapıldı. Damlacık büyüklüğü tayininde bu değerlerden yararlandı.

4.2.6.6 **SMEDD Formülasyonunun Viskozitesinin Ölçümleri**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun viskozitesi Brookfield DVII+ Pro cihazında Ula spindle kullanılarak 37 ± 1 °C de ölçüldü.

4.2.6.7 **SMEDD Formülasyonunun Emülsifikasyon Zamanı (197)**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonu, 100 rpm de USP XXII dissolüsyon aparatı kullanılarak karıştırılan 37 ± 0.5 °C lik 900 mL lik distile suya damla damla eklendi. SMEDD formülasyonu gözlenmeyene kadar geçen süre hesaplandı.

4.2.6.8 **SMEDD Formülasyonunun Disperse Olabilme Özelliği (197)**

Kendiliğinden emülsifiye olabilen nano veya mikro sistemlerin etkinliği USP II dissolüsyon aparatı ile gözlemlenir. Formülasyonların in vitro performansları aşağıda açıklanan beş aşama ile tanımlanır.

Aşama A: Hızla (yaklaşık olarak bir dakika içerisinde) oluşan emülsifiye sistem berrak ve mavimsi bir görünüme sahiptir.

Aşama B: Hızla oluşan emülsifiye sistem az berrak ve mavimsi görünüme sahiptir.

Aşama C: Yaklaşık iki dakika içerisinde oluşan sistem ince bir süt görünümündedir.

Aşama D: Yavaş emülsifiye olan sistem (iki dakikadan uzun bir süre) hafif yağlı ve grimsi-beyaz bir görünüme sahiptir.

Aşama E: Oluşan sistem zayıf ve minimal emülsifikasyon derecesine sahiptir ve yüzeyinde yağ partikülleri barındırır.

Aşama A ve Aşama B görünümüne sahip formülasyonlar mide bağırsak sisteminde dağıldıklarında nano/mikro emülsifiye hallerini korurlar (197).

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun bir mL si 37 ± 1 °C lik 500 mL suda dissolüsyon II aparatı ile dağıtıldı. İn vitro disperse olabilme özelliği yukarıda belirtilen aşamalara göre belirlendi.

4.2.6.9 **SMEDD Formülasyonunun Dağılım Dayanıklılığı**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonun pH 1.2, pH 6.8 ve distile su ortamlarında 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 ve 1:1000 oranında seyreltilerek 0.

dakika, 2. saat ve 24. saat sonunda damlacık büyüklüğü, polidispersite indeks, zeta değerleri oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

4.2.6.10 **SMEDD Formülasyonunun Damlacık (partikül) Büyüklüğünün Saptanması**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun damlacık büyüklüğü Malvern zetasizer cihazı kullanılarak ölçüldü. SMEDD formülasyonun etkin madde içeren ve içermeyen halleri optimum mikroemülsiyon bölgesindeki su miktarı ile seyreltilerek, damlacık büyüklüğü polidispersite indeks, zeta değerleri oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

4.2.6.11 **SMEDD Formülasyonunun Zetapotansiyel değeri (197)**

SMEDD formülasyonunun stabilitesi direkt olarak yüzey yükünün büyüklüğü ile ilişkilidir. Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun zeta potansiyeli lazer kırınım analiz teorisi ile partikül boyutu analiz cihazı (Malvern zeta sizer) ile yapıldı. 1 mL SMEDD formülasyonu 100 mL distile su ile literatürlere uygun olarak seyreltildi. Ölçümler altı paralel gerçekleştirildi.

4.2.6.12 **SMEDD Formülasyonunun % Geçirgenlik Değeri (197)**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun distile su ile herhangi bir bulanıklılığa sahip olup olmadığının gözlenmesi için % geçirgenlik testi yapılır. Bu çalışmada SMEDD formülasyonunun % geçirgenlik değeri Lavibond türbidimetre cihazı kör olarak distile su kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.6.13 **SMEDD Formülasyonunun Bulanıklık Tayini (197)**

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonu 1:250 oranında distile suda dağıtıldı. Dağıtılmış formülasyon su banyosuna alındı ve sistemin sıcaklığı kademeli olarak arttırıldı. Bulanıklık noktası spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

4.2.6.14 **SMEDD Formülasyonunun İçerik Miktar Tayini**

Geliştirilen AtrCa içeren sistemleri metanolde çözülüp, açığa çıkan AtrCa miktarı HPLC ile değerlendirilmiştir.

Denklem 1:

$$\% \text{ Miktar} = (M_{\text{AtrCa}} / M_{\text{madde}}) \times 100 \dots\dots\dots \text{Denklem 4}$$

M_{atrca} : Deneysel olarak elde edilen AtrCa miktarı

M_{madde} : Formülasyondaki teorik madde miktarı

4.2.6.15 SMEDD Formülasyonunun Stabilite Çalışmaları

SMEDD formülasyonunun stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan SMEDD formülasyonları, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ %60±5 bağıl nemde ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ % 75±5 bağıl nemde altı ay boyunca saklandı. Formülasyonların fiziksel görünüm, pH, iletkenlik, bulanıklık, faz ayrışması ve damlacık büyüklüğü, etkin madde miktar tayini gibi özellikleri başlangıçta (t=0 anında), üçüncü ve altıncı aylarda incelendi. Ayrıca etkin maddenin sistem içerisindeki kimyasal stabilitesi de etkin madde içeriği belirlenerek araştırılmıştır.

4.2.7 Pellet Formülasyonu Geliştirme

4.2.7.1 Pellet Formülasyonu Oluşturmak için Mikroemülsiyon Formülasyonu Terkibinin Belirlenmesi

Geliştirilen SMEDD formülasyonu YYEM olarak etanol içermektedir. Fakat pellet formülasyonu oluştururken kurutma aşamasında etanol buharlaşarak terkihi değiştireceği için farklı bir formülasyon oluşturuldu.

4.2.7.2 YYEM İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonun Yağ/YEM Oranı

Öncelikle YYEM bulunmayan, HLB değerleri 12.5 ve 15.5 olan, yağ/yüzey etkin madde oranları 6/4 ve 5/5 olmak üzere toplamda 4 formülasyon için çözünürlük çalışması yapıldı. Bu formülasyonların terkipleri Tablo 12 ve Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 12: HLB değeri 12.5 olan F18 ve F 19 formülasyon terkihi

F18: (yağ/YEM: 6/4)			F19: (yağ/YEM: 5/5)		
Oleik asit: 6 g	YEM:4 g		Oleik asit: 5g	YEM:5 g	
	Tween 20: 2.66 g	Span 80: 1.33 g		Tween 20: 3.33 g	Span 80: 1.66 g

Tablo 13: HLB değeri 15.5 olan F20 ve F21 formülasyon terkihi

F20: (yağ/YEM: 6/4)			F21: (YEM: 5/5)		
Oleik asit: 6g	YEM: 4 g		Oleik asit: 5g	YEM: 5 g	
	Tween 20: 3.63g	Span 80: 0.363g		Tween 20: 4.545g	Span 80: 0.454g

4.2.7.3 YYEM İçermeyen Formülasyonlarda Çözünürlük Tayini

Pellet formülasyonu oluşturmak için F18, F19, F20, F21 formülasyonlarında çözünürlüğü değerlendirmek için bu formülasyonlardan 10 mL olacak şekilde hazırlandı ve herbir formülasyondan 2 mL alınarak üzerine çözünmeyen miktar

gözlemlenene kadar AtrCa ilave edildi. Herbir çalışma 3 kez tekrarlandı. Yaklaşık olarak 2 saat beklendi ve daha sonra 25 °C de 3500 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra bu formülasyonlardan 0.5 mL alınıp 5 mL metanol de çözündürüldü ve uv spektrofotometrede 238 nm dalga boyunda absorbanlarını okundu.

4.2.7.4 *YYEM İçeren Formülasyonun Yağ/YEM Oranı*

Yapılan çözünürlük çalışması sonrası F18 ve F19 formülasyonlarındaki etkin madde çözünürlüğü daha fazla olduğu için bu formülasyonların YYEM içeren terkiplerinin çözünürlükleri değerlendirildi. Bunun için formülasyon oluştururken toplam YEM ve YYEM oranının %10 u kadar YYEM eklendi. YYEM olarak transkutol ve 1- metil-2 piroolidon (MP) maddelerini kullanıldı. 10 g lık formülasyonlar için terkipler Tablo 14’da verilmiştir.

Tablo 14: YYEM içeren formülasyonların terkipleri

F22-T (yağ/YEM+YYEM: 6/4)				F23 – MP (yağ/YEM+YYEM: 6/4)			
Oleik asit: 6g	Tween 20: 2.4 g	Span 80: 1.2 g	Transkutol: 0.4 g	Oleik asit: 6g	Tween 20: 2,4 g	Span 80: 1.2 g	MP: 0.4 g
F24-T (yağ/YEM+YYEM: 5/5)				F25-MP (yağ/YEM+YYEM: 5/5)			
Oleik asit: 5 g	Tween 20: 3 g	Span 80: 1.5 g	Transkutol: 0.5 g	Oleik asit: 5 g	Tween 20: 3 g	Span 80: 1.5 g	MP: 0.5 g

4.2.7.5 *YYEM İçeren Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesi*

F22-T, F23-MP, F24-T, F25-MP olmak üzere 4 formülasyondan 10 g olacak şekilde hazırlandı ve içlerinden 2 mL alınarak üzerlerine çözünmeyecek kadar AtrCa eklendi. Yaklaşık 2 saat beklendi ve daha sonra 25 °C de 3500 rpm 15 dakika santrifüj edildi. Formülasyonların her birinden 0.1 mL alınıp 100 mL ye seyreltildi. 238 nm dalga boyunda uv spektrofotometrede absorbanları okundu. Bulunan absorban, konsantrasyon değerlerinden çözünürlük değerleri hesaplandı.

4.2.7.6 *Farklı Yüzdelerde Su İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması*

Çözünürlük çalışmaları sonrası en iyi sonucu veren formülasyon F23-MP seçildi ve mikroemülsiyon formülasyonu oluşturmak için gerekli optimum su miktarları belirlendi. Beş farklı su miktarı ile oluşturulan mikroemülsiyon formülasyonları E1, E2,

E3, E4, E5 olarak isimlendirildi. Kullanılan su miktarları ve isimlendirmeler Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15: Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılan su yüzdeleri

Formülasyon ismi	Yağ + YEM + YYEM (%)	Su yüzdesi (%)
E1	40	60
E2	50	50
E3	60	40
E4	70	30
E5	80	20

4.2.7.7 ***Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi***

4.2.7.7.1 **Mikroemülsiyon Formülasyonların Tipi**

E1, E2, E3, E4 ve E5 mikroemülsiyon formülasyonlarının su/yağ mikroemülsiyonu mu yoksa yağ/su mikroemülsiyonu mu olduğunun belirlenmesi için iletkenlik testi yapıldı.

4.2.7.7.2 **Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Viskotize Ölçümü**

Geliştirilen E1, E2, E3 ve E4 formülasyonlarının viskozite ölçümleri oda koşullarında HAKE WT-24 Viskozimetre cihazı ile gerçekleştirildi. 32, 16, 8, 4 ve 2 rpm skala ölçümlerinde verdikleri değerler kaydedilip; kayma hızı, kayma gerilimi ve viskozite değerleri hesaplandı.

4.2.7.7.3 **Mikroemülsiyon Formülasyonlarında Bulanıklık Ölçümü**

Mikroemülsiyonların bulanıklık ölçümleri Turbiscan Classic MA 2000 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu cihazda herbir formülasyon cihazın kuvvetlerine 6.5 cm olacak şekilde dolduruldu ve her bir mikroemülsiyon için cihazda grafik oluşturuldu.

4.2.7.8 ***Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesi***

4.2.7.8.1 **%60 Oranında Yağ/YEM/YYEM İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesi**

Yapılan stabilite çalışması sonrası belirlenen formülasyon ile etkin madde içermeyen ve etkin madde içeren pelletlerin elde edilmesinde %60 oranında Yağ/YEM/YYEM fazı, %40 oranında su fazı içeren E3 mikroemülsiyonu ve katı faz olarakta 14 gram Aerosil (%70) ve 6 gram Avicel (%30) (MCC- Aerosil) kullanılmasına

karar verildi. 100 mL etkin madde içermeyen mikroemülsiyon ($E3_{(inert)}$) ve 100 mL etkin madde içeren mikroemülsiyon (E3) formülasyonu hazırlandı. E3 formülasyonun karışması için homojenizatör ve ultrasonik cihazlarından yararlanıldı ve katı faza emdirilen bu formülasyonlar ile oluşturulan pelletler fiziksel parametreler yönünden karşılaştırıldı.

4.2.7.8.1.1 *P1 ve P2 Pellet Formülasyonlarının Hazırlanışı*

YEM, YYEM ve yağ ile hazırlanan 60 gramlık faza 40 gram su fazı eklenerek 100 gram mikroemülsiyon elde edildi. 50 mL etkin madde içermeyen mikroemülsiyon homojenizatörden geçirildi (P1), 50 mL etkin madde içermeyen mikroemülsiyon ultrasonikten geçirildi (P2) ve iki farklı mikroemülsiyon karışımı elde edildi. Hem P1 pellet formülasyonunun hemde P2 pellet formülasyonunun oluşturulması için ayrı ayrı; 14 gram Aerosil ve 6 gram Avicel (MCC- Aerosil) hassas terazide tartıldı ve karıştırıcı da 50 rpm de karıştırılırken mikroemülsiyon formülasyonları damla damla eklenerek granüle noktasına ulaştırıldı. Ara ara karıştırıcı durdurularak karışımların granüleye hazır olup olmadığı kontrol edildi. Granülasyon noktasına ulaşıncaya sarf edilen mikroemülsiyon miktarları kaydedildi. Karıştırıcıdan alınan pelletler ekstrüder cihazına (ekstüder 20, 35 rpm) konulup ince uzun partiküller sistemler elde edildi. Elde edilen ip şeklindeki ekstrüdatlar sferonizasyon cihazında (sferonizer120) yaklaşık 6 dakika bekletilerek yuvarlaklaşan pelletler elde edildi.

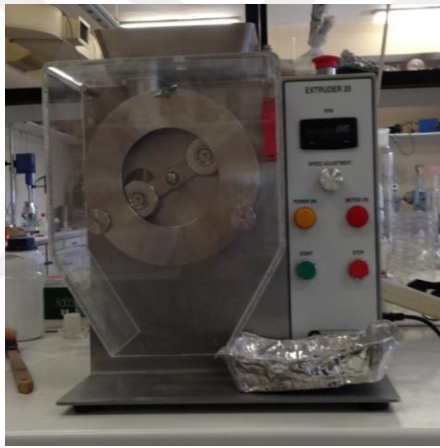
4.2.7.8.1.2 *P3 ve P4 Pellet Formülasyonlarının Hazırlanışı*

YEM, YYEM ve yağ ile hazırlanan 60 gramlık faza mL de 50 mg olacak şekilde AtrCa etkin madde yüklemesi yapıldı (3g/ 60 mL). Daha sonra 40 gram su fazı eklenerek 100 gram mikroemülsiyon elde edildi. 50 mL mikroemülsiyon formülasyonu homojenizatörden geçirilirken (P3), 50 mL mikroemülsiyon formülasyonu ise ultrasonikten geçirildi (P4). Hem P3 pellet formülasyonunun hemde P4 pellet formülasyonunun oluşturulması için ayrı ayrı 14 gram Aerosil ve 6 gram Avicel (MCC- Aerosil) hassas terazide tartıldı ve karıştırıcı da 50 rpm de karıştırılırken mikroemülsiyon formülasyonları damla damla eklenerek granüle noktasına ulaştırıldı. Ara ara karıştırıcı durdurularak karışımların granüleye hazır olup olmadığı kontrol edildi. Granülasyon noktasına ulaşıncaya sarf edilen

mikroemülsiyon miktarları kaydedildi. Karıştırıcıdan alınan pelletler ekstrüder cihazına (ekstüder 20, 35 rpm) konulup ince uzun partiküller sistemler elde edildi. Elde edilen ip şeklindeki ekstrüdatlar sferonizasyon cihazında (sferonizer 120) yaklaşık 6 dakika bekletilerek yuvarlaklaşan pelletler elde edildi.

P1, P2, P3 ve P4 pelletleri 40 °C lik etüvde 48 saat boyunca kurutulmaya bırakıldı.

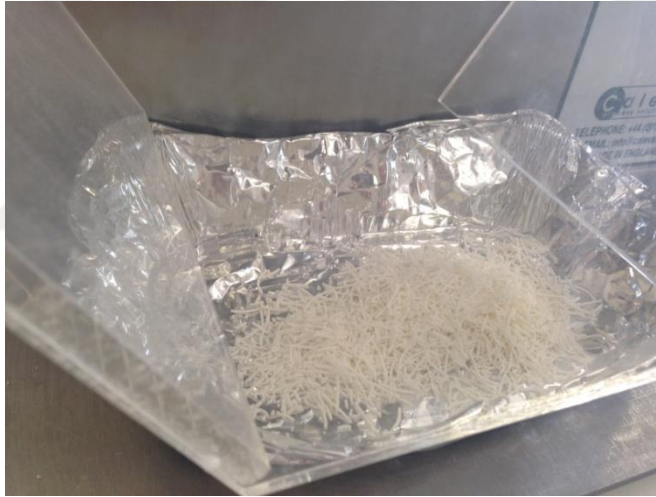
Pellet yapımında ekstrüzyon için kullanılan ekstrüder Şekil 15, sferonizasyon için kullanılan sferonizer Şekil 16, ekstrüderden çıkmış partiküller Şekil 17 ve sferonizerdan geçmiş ve kurumuş pellet partikülleri Şekil 18’de gösterilmiştir. Etkin madde içeren P3, P4 pelletlerinin miktar tayinleri HPLC ile tayin edildi (n=3).



Şekil 15: Pellet yapımında kullanılan ekstrüder cihazı



Şekil 16: Pellet yapımında kullanılan sferonizer cihazı



Şekil 17: Ekstrüder cihazından sonra katı hale gelmiş formülasyon



Şekil 18: Sferonizer cihazından geçen ve kurumuş pellet örneği

4.2.7.9 **Pelletlerde Yapılan Fizikokimyasal Analizler**

4.2.7.9.1 **Pelletlerin Yoğunluklarının Ölçülmesi**

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin yoğunluklarının ölçülmesi için katı ve toz haldeki örneklerin yoğunluğunu (gerçek özgül ağırlığını/ özkütlesini) ölçmeye elverişli bir cihaz olan (ultrapycnometer 1000) gaz piknometresi kullanıldı. Cihazın kabına koyulan pellet miktarı tartılarak kaydedildi ve Helyum gazı geçişi yardımıyla yoğunluk ölçümü gerçekleştirildi.

4.2.7.9.2 **Pelletlerin Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite Ölçümleri**

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin sıkıştırılmış dansitelerinin ölçülmesinde Erweka Tap dansite cihazı kullanıldı. Her bir pellet için yaklaşık olarak 50 gram tartılarak mezüre koyulup başlangıç hacmi kaydedildi. Sıkıştırılmış dansite cihazına mezür yerleştirilip her 10 vuruşta mezür üzerindeki hacim değişmesi gözlemlenip hacimde değişiminin olmadığı gözlemlenince son hacim kaydedildi. Denklem 5a, 5b, 5c ve 5d'de verilen hesaplamalar yapılarak her bir pellet için Küme dansite, Sıkıştırılmış dansite, Hausner oranları ve Carr İndex değerleri hesaplandı. Carr İndex değerlerinin akış karakteristiklerine etkisi Tablo 16'da verilmiştir

$$\text{Küme dansitesi: } \frac{\text{Tozun ağırlığı (g)}}{\text{Başlangıç hacim (ml)}} \dots\dots\dots \text{Denklem 5a}$$

$$\text{Sıkıştırılmış dansitesi: } \frac{\text{Tozun ağırlığı (g)}}{\text{Sıkıştırılmış hacim (ml)}} \dots\dots\dots \text{Denklem 5b}$$

Hausner oranı: $\frac{\text{Sıkıştırılmış dansite}}{\text{Küme dansite}}$ Denklem 5c

Carr indeksi (%) : $\frac{\text{Sıkıştırılmış dansite}-\text{Küme dansite}}{\text{Sıkıştırılmış dansite}} \times 100$ Denklem 5d

Tablo 16: Carr index ve akış karakteristikleri değerlendirilmesi

Carr indeksi (%)	Akış Şekli
5-15	Mükemmel
12-16	İyi
18-21	Orta dereceli
23-35	Zayıf
33-38	Çok zayıf
>40	Aşırı zayıf

4.2.7.9.3 Pelletlerin Friabilitesinin Ölçülmesi

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin friabilitesinin ölçülmesinde Copley FRV 2000 cihazı kullanıldı. Her bir pellet çeşidinden yaklaşık olarak 3 gram tartılarak friabilite cihazına konuldu ve üzerlerine 6 gram ağırlığında cam boncuk eklendi 10 dakika 25 rpm de çalıştırıldı. Friabilite cihazından alınan pelletler tekrar tartılarak ağırlık kayıpları belirlendi.

4.2.7.9.4 Pelletlerin Mikroskop Görüntüsü Analizi

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin Olympus U-SPJ Japon (SZX9) cihazı ile partikül görüntüsü alındı.

4.2.7.9.5 Pelletlerin Titreşimli Elek Testi ile Boyut Analizi

P1, P2, P3, P4 pelletlerinin boyut analizi Retsch marka titreşimli elek ile gerçekleştirildi. Herbir pelletten ayrı ayrı 20 gram alınıp elek boyutları: 1.18 µm, 850 µm, 600 µm, 425 µm, 300 µm, 212 µm şeklinde azalan elek sistemine koyuldu. 10 dakika 20 Hz titreşim genliğinde titreşim uygulandı.

4.2.7.9.6 Pellet Formülasyonlarının Emülsifikasyon Zamanı ve Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin emülsifikasyon zamanları 100 rpm de USP XXII dissolüsyon aparatı kullanılarak karıştırılan $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ lik 900 mL lik distile suya eklendi. Formülasyonlar gözlenmeyene kadar geçen süre hesaplandı. Aynı ortamda

formülasyonların damlacık büyüklüğü Malvern zetasizer cihazı kullanılarak ölçüldü. damlacık büyüklüğü oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

4.2.7.9.7 Pellet Formülasyonlarında İçerik Miktar Tayini

Geliştirilen AtrCa içeren pellet sistemleri metanolde çözündürülüp, açığa çıkan AtrCa miktarı HPLC ile değerlendirildi. % yüklenen AtrCa miktarı bulundu.

4.2.7.9.8 Pellet Stabilitesi

Pellet formülasyonunun stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan formülasyonlar, 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C %60±5 bağıl nemde ve 40 ± 2 °C % 75±5 bağıl nemde altı ay boyunca saklandı. Formülasyonların, fizikokimyasal parametreleri etkin madde miktar tayini gibi özellikleri başlangıçta (t=0 anında), üçüncü ve altıncı aylarda incelendi. Ayrıca etkin maddenin sistem içerisindeki kimyasal stabilitesi de etkin madde içeriği belirlenerek araştırılmıştır.

4.2.8 İn vitro Salım Çalışmaları

Geliştirilen AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun, pellet formülasyonunun, AtrCa etkin maddesinin ve ticari formülasyonun döner palet yöntemindeki in vitro salım çalışmaları 900 mL pH 1.2 ve 900 mL pH 6.8 ortamlarında (USP tampon çözeltisi) 37 ± 1 °C 75 rpm de yapıldı. Çalışmalar hem sert jelatin kapsül (00 numara) içine konarak hem de direk çözünme ortamına ilave edilerek gerçekleştirildi. 10 mg AtrCa etkin maddesi, 10 mg AtrCa etkin maddesine eşdeğer miktarda AtrCa içeren SMEDDS formülasyonu (içerik miktar tayininde bulunan miktardan hareketle), 10 mg AtrCa etkin maddesine eşdeğer miktarda AtrCa içeren P3 ve P4 pelletleri (içerik miktar tayininde bulunan miktardan hareketle) ve ticari tablet preparatının in vitro salım çalışmaları yapıldı.

Ortamdan örnekler (5. dk, 10. dk, 15. dk, 30. dk, 45. dk, 60. dk, 90. dk, 120. dk, 150. dk, 180. Dk, 240. dk larda) alındı (n=3). Çözünme ortamından belirli zaman aralıklarında alınan numuneler 0.45 µm por boyutundaki membran filtreden süzüldü. Alınan örneklerin HPLC ile miktar tayini yapıldı sonuçlar pH 1.2 ve pH 6.8 ortamlarında AtrCa ile çizilmiş kalibrasyon eğrileri ile değerlendirildi.

4.2.8.1 *İn vitro* Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirilmesi

Salım mekanizmasını belirlemek için etkin madde, SMEDD formülasyonu ve pellet formülasyonlarının sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi, Langenbucher eşitliklerine uyum analizi yapılmıştır (210).

4.2.9 *İn vitro* Permabilite ve Sitotoksisite Çalışmaları

4.2.9.1 *Hücre Kültür Sistemleri ile İlgili Çalışmalar*

4.2.9.1.1 Caco-2 Hücrelerinin Pasajlanması

1 mL'lik tüpte -80 °C'de dondurularak saklanmış olan Caco-2 (kolonik adenokarsinoma hücreleri) hücre grubu kullanıldı. Dondurularak saklanmış hücreler 37 ± 0.5 °C'lik su banyosunda çözündürüldü. Hücre grubu 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım atıldı. Kalan kısım, 20 mL besiyeri ortamı ile yıkanarak 75 cm^2 'lik hücre kültür erlenine aktarıldı.

Besiyeri ortamı olarak; 50 mL fetal siğir serumu, 5 mL penisilin çözeltisi, 5 mL Alanin ve 5 mL HBSS ile 450 mL 4.5 g/L L-glutamin içeren DMEM birleşimi kullanıldı. Hücre kültür erleni (flask), hücrelerin üremesi için 37 ± 0.5 °C'de % 95 hava-% 5 karbondioksit içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 48 saatte bir besiyeri ortamı değiştirildi ve mikroskopik olarak hücreler incelendi. Çalışmada kullanılan hücre kültür flask'ı (erleni) Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19: Hücrelerin pasajlanmasında kullanılan hücre kültür erlenleri (flask)

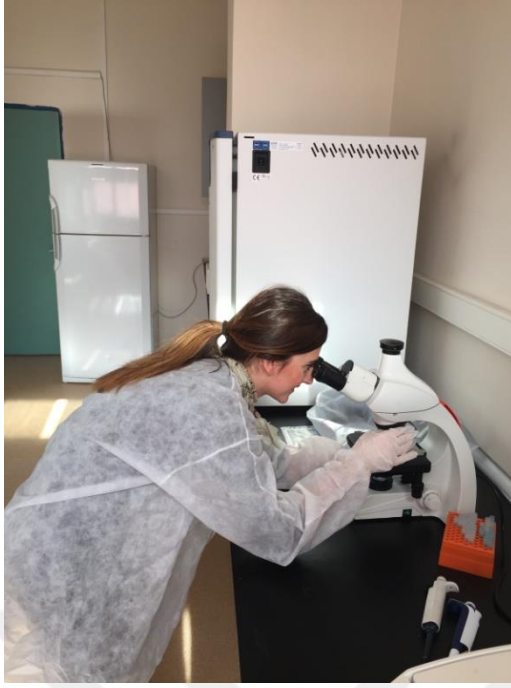
Kültür erleninde bulunan Caco-2 hücrelerinin pasajlama işlemine başlamadan önce laminar hava akımlı kabin hazır duruma getirildi. Kullanılacak tüm malzemeler ve laminar hava akımlı kabin %70'lik alkolle temizlendi. Buzdolabından alınan fosfat tampon çözeltisi, tripsin çözeltisi ve hücre kültürü besiyeri 37 ± 0.5 °C'ye ulaşana

kadar su banyosunda bekletildi. Kültür erleni inkübatörden alınıp, hazır duruma getirilmiş laminar hava akımlı kabine kondu.

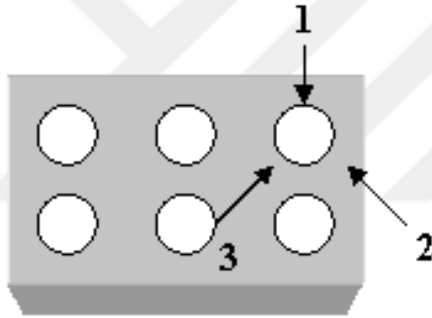
Kültür erlenlerinin kapağı açılıp içindeki ortam, tek kullanımlık (disposable) 20 mL'lik pipetler ile uzaklaştırıldı. 10 mL pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile hücrelerin bulunduğu tüm kısımları alacak şekilde kültür erleni yıkanıp, kapağı kapatıldı. Sonra inkübatörde 10 dk bekletilip, fosfat tamponu kültür erleninden tek kullanımlık 20 mL'lik pipetler ile uzaklaştırıldı. Bu flask'a 2.5 mL tripsin-EDTA çözeltisi konup, 10 dakika inkübatörde bekletildi. Aynı şekilde 2.5 mL'lik tek kullanımlık pipetler ile tripsin-EDTA çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. 10 mL besiyeri ortamı konup, ilk pasaj oluşturulmuş oldu. 24 saat sonra besiyeri ortamı yukarıdaki işlem sırasına göre değiştirildi. Daha sonra 48 saatte bir besiyeri yenilendi.

4.2.9.1.2 Caco-2 Hücrelerinin Polikarbonat Filtre Üzerine Ekimi

Buzdolabından alınan fosfat tampon çözeltisi, tripsin-EDTA çözeltisi ve hücre kültürü besiyeri 37°C'ye ulaşana kadar su banyosunda bekletildi. Laminar hava akımlı kabin altında açılan erlenden hücre kültürü süspansiyonu erlen tabanına değmeden dikkatlice tek kullanımlık pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Erlenin içi 2 defa 10 mL PBS ile yıkandı ve 2 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. Erlen inkübatörde 10 dakika bekletilerek flask yüzeyine tutunmuş haldeki hücrelerin flask tabakasından ayrılması sağlandı. Her hücre kültür kabı için 10 mL besiyeri ilave edildi. Sonra bu hücre süspansiyonunun hepsi alınıp santrifüj tüpüne aktarıldı ve 3000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenip, çalışma kabini altında üstteki toplanan sıvı atılıp, 10 mL besiyeri ortamı ile tekrar süspande edildi. Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç tutularak üzerlerindeki hücreler sayıldı (Şekil 20). Hücre sayısı hesabı yapıldıktan sonra, hücre süspansiyonu, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere polikarbonat filtreler üzerine ekildi (Şekil 21).

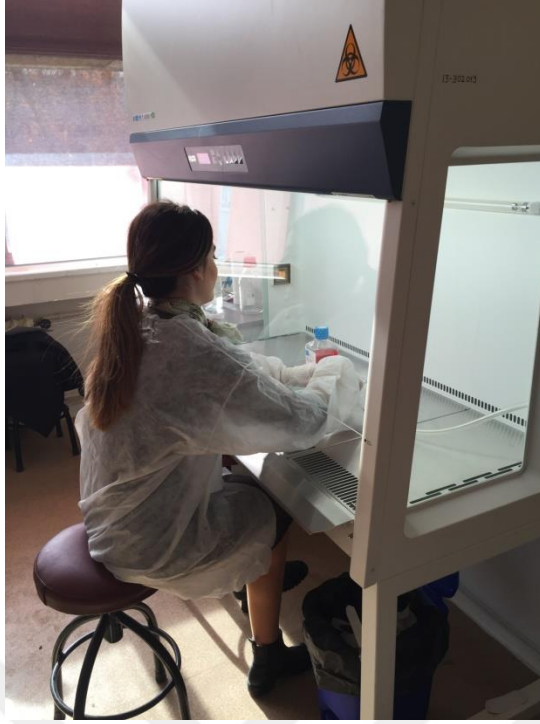


Şekil 20: Mikroskop altında Caco-2 hücrelerinin sayımı



Şekil 21: Hücrelerin ekiminde ve büyütülmesinde kullanılan kültür kabı ve polikarbonat filtrelerin şematik gösterimi (1, 2 ve 3 no'lu oklarla gösterilen kısım kuyucukları ifade eder)

Bir kültür kabı için 15 mL ortam gerekir. Bu ortamın mL'sinde 25 hücre bulunmalıdır. Çalışmamızda 2 kültür kabı kullanıldı. Kültür kaplarının hazırlanması için, 4.5 mL hücre alınıp 30 mL'ye hücre kültürü çalışma besiyeri ile tamamlandı. Daha sonra her bir kuyucuk içine (apikal kısma) 2 mL besiyeri ilave edildi. İlave ederken besiyerinin tam ortaya damlatılmasına dikkat edildi. Kuyucukların dışına (bazolateral kısma) da 3 mL besiyeri ortamı eklendi. Ekimin yapıldığı 1. ve 2. günlerde ortam değiştirildi. Daha sonra 48 saatte bir besiyeri ortamı değiştirildi (Şekil 22). Caco-2 hücrelerinin polikarbonat filtre üzerinde yetiştirme işlemine 21 gün boyunca devam edildi.



Şekil 22: Caco-2 hücrelerinin besiyeri ortamının değiştirilmesi

4.2.9.1.3 Atorvastatin Kalsiyumun Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmaları

AtrCa'un geçiş çalışmaları yapılırken apikal ve bazolateral kısımdaki besiyeri ortamları boşaltılıp, yeni besiyeri ortamı ile değiştirildi ve $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 50 rpm'deki yatay çalkalayıcıya, kültür kapları konuldu. Geçiş çalışmaları apikal yönden bazolateral yöne (A-B) ve bazolateral yönden apikal yöne (B-A) doğru yapıldı. Yapılacak olan geçiş çalışmaları için mL sinde 10 mg AtrCa içerecek şekilde SMEDDS mikroemülsiyonu, P3 pellet formülasyonu ve ticari tablet formülasyonu kullanıldı. Herbir formülasyon türü 27 mL HBSS çözeltisi ile seyreltildi. Apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları için 3.2 mL AtrCa içeren formülasyon HBSS içindeki çözeltisi apikal kısma konuldu. Bazolateral kısma 2.2 mL HBSS solüsyonu ilave edildi. Bazolateral yönden apikal yöne doğru olan çalışmalar için 3.2 mL AtrCa' un HBSS içindeki çözeltisi bazolateral kısma; 2.2 mL HBSS çözeltisi apikal kısma ilave edildi. Geçiş çalışmaları boyunca 0, 30, 60, 90 ve 120. dakika zamanlarında 200 μL örnek alındı. İlk alınan örnekten sonra alınan diğer örneklerde ortam hacmini sabit tutmak için her bir örnek zamanında örnek alındıktan sonra ortama 200 μL HBSS ilave edildi. 120 dakika sonra final örneği alındı. Alınan tüm örnekler 5 dakika boyunca 1300 rpm'de (devir/dakika) santrifüj edildi. Final örneği

0. dakikada olduğu gibi ilaçlı kısımdan alındı. Daha sonra membranlar bir pens yardımıyla zedelenmeden çıkartılıp, serum fizyolojik ile 2 ayrı beherde 3 defa yıkandı ve ependorfların içine 500 µL HBSS konuldu. Bu ependorflar 3 defa sıvı azot tankında 1 dakika boyunca tutuldu. Sıvı azot ile muamele işleminden sonra, 5 dakika boyunca 1300 rpm hızında santrifüj edildi. Bu ependorflardan 500 µL örnek alındı ve alınan bu örnek membrandaki miktarı (A_m) oluşturdu. Membran bulunan HBSS'li ependorfa 500 µL metanol eklendi ve 5 dakika 1300 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Sonra 500 µL örnek alınıp, A_{OH} (hücre içindeki miktar) yazan ependorfa konuldu. Örnekler HPLC'de analiz edilene kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Geçiş çalışmaları 3 kez tekrarlandı ve 3 çalışmanın ortalaması alındı. Deneylerin sonunda zamana karşı kümülatif AtrCa miktarları grafiğe geçirildi ve etkili permeabilite değeri Denklem 6 ile hesaplandı.

$$Permeabilite = \frac{\text{İlacın geçiş hızı}}{\text{Toplam molarite} \times \text{Yüzey alanı} \times \text{Zaman}} \dots\dots\dots \text{Denklem 6}$$

Etkili permeabilite her iki taraf içinde hesaplandı. (180, 123)

4.2.9.1.4 Transepitelyal Elektrik Rezistans (TEER) Değerinin Ölçülmesi

Caco-2 hücrelerinin bütünlüğünün tespitinde kullanılan yöntemlerden biri de elektriksel direncin ölçülmesidir. Bu amaçla, çalışmada voltmetre aleti kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce kültür kaplarının içindeki ortam boşaltıldı ve içine 2 mL, dışına 3 mL HBSS eklendi. Bu işlem 3 defa yapıldı.

Geçiş çalışması için 1mL 1 M HEPES içeren HBSS karışımı kullanıldı (1mL HEPES+99 mL HBSS). Önce TEER değeri boş kuyucuklarda 3 farklı yönde voltmetre ile ölçüldü (Şekil 23). Deneyde kullanılacak kültür kaplarının TEER değerleri yine bu üç yönde ölçüldü ve en son deney bitiminde TEER değerleri ölçülüp iki ölçüm arasındaki fark değerlendirildi. Böylece hücrelerin bütünlüğü kontrol edilmiş oldu.



Şekil 23: TEER değerinin ölçülmesinde kullanılan voltmetre

4.2.9.2 *Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Testi*

Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine formülasyonların etkisi ve sitotoksitesini incelemek ve ticari formülasyonla karşılaştırmak amacıyla 1×10^4 hücre/mL konsantrasyondaki Caco-2 hücrelerinden 96 gözlü hücre kültürü kaplarına 100'er μL ekildi. Bu hücreler 24 saat 37°C 'de % 5 CO_2 'li ve rutubetli ortamda inkübe edildi. 24 saat sonunda 96 gözlü hücre kültürü kaplarındaki ortamlar uzaklaştırılarak sitotoksisite çalışmalarına başlandı. HBSS içinde çözündürülmüş hazırlanan formülasyonlar (10 mg AtrCa içeren) ile 24, 48 ve 72 saat hücreler bir arada tutuldu. Bu sürenin sonunda hücre kültürü kaplarındaki her bir göze 100 μL MTT (5 mg/mL stok MTT/PBS çözeltisinden alınarak) ilave edilip 4 saat inkübasyona bırakıldı. Sitotoksisite testi yapılan örnekleri içeren ortamlar uzaklaştırılıp 100 μL DMSO 96 gözlü hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna ilave edildi. Hücre canlılığını test etmek için absorbans değerleri 238 nm'de ELISA mikroploka okuyuculu UV spektrofotometre (Thermo vario scan-FHA multiplate reader) ile okutulup değerlendirildi. Hücre canlılığı Denklem 7'deki formül ile hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \left(\frac{T}{R} \right) \times 100 \dots\dots\dots \text{Denklem 7}$$

T: Test edilen örneklerinden okunan absorbans değeri, R: Kontrol grubundan okunan absorbans değeri

4.2.10 İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen in vitro sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Sonuçlar arasındaki farklılık ya da benzerlikleri yorumlanacaktır. Parametrik testler için Student t test veya ANOVA varyans analizi, non parametrik testler için Krusger Wallis analizi tercih edilecektir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilecektir.

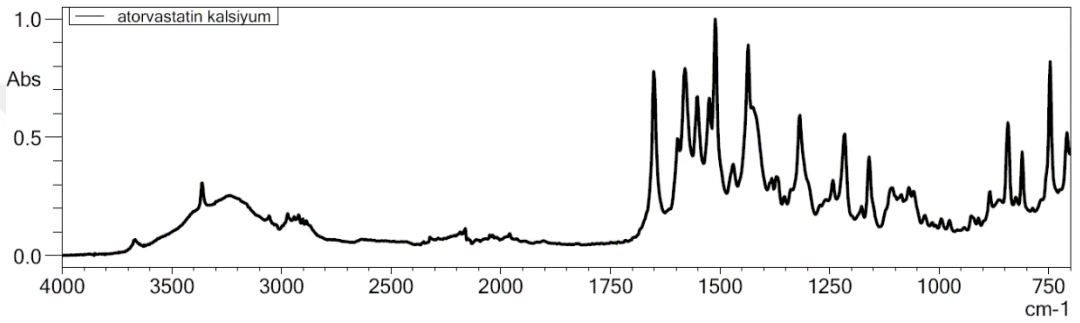


5 BULGULAR

5.1.1 Model Etkin Madde Olarak Kullanılan Atorvastatin Kalsiyumun Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

5.1.1.1 *Atorvastatin Kalsiyumun Infrared (IR) Spektrum Analiz Bulguları*

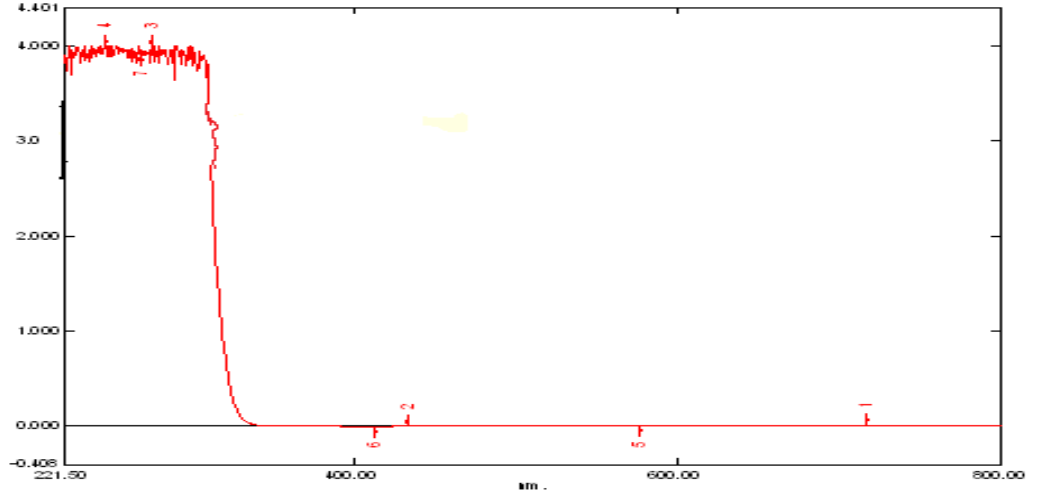
Yöntem 4.2.1.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa'un infrared analizi gerçekleştirilmiştir ve bulunan görüntü Şekil 24'de verilmiştir.



Şekil 24: Atorvastatin kalsiyum etkin maddesinin infrared spektrum görüntüsü

5.1.1.2 *Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometrik Spektrum Analizi Bulguları*

Yöntem 4.2.1.2'de anlatıldığı üzere AtrCa'un spektrofotometrik spektrum analizinin bulunan tarama sonucu Şekil 25'de gösterilmiştir.



Şekil 25: Atorvastatin kalsiyum etkin maddesinin spektrum görüntüsü

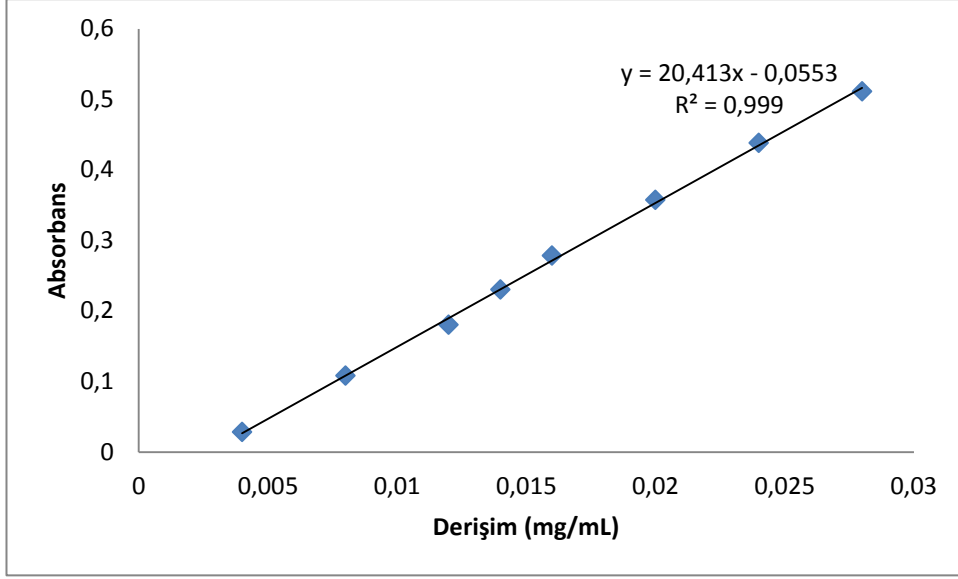
5.1.2 Atorvastatin Kalsiyumun Miktar Tayini için Kalibrasyon Eğrisinin Çizimine Ait Bulgular

5.1.2.1 *Atorvastatin Kalsiyumun Spektrofotometre ile Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular*

Model etkin madde AtrCa'un in vitro dissolüsyon ve çözünürlük çalışmaları için metanol ortamındaki kalibrasyon eğrisi yöntem 4.2.2.1 'de anlatıldığı gibi çalışılarak çizildi. Konsantrasyon değerlerine karşılık bulunan absorptans değerleri Tablo 17'de, kalibrasyon eğrisi grafiği ise Şekil 26'da gösterilmiştir.

Tablo 17: Spektrofotometrede kalibrasyon eğrisi çizimi için konsantrasyon ve absorptans değerleri

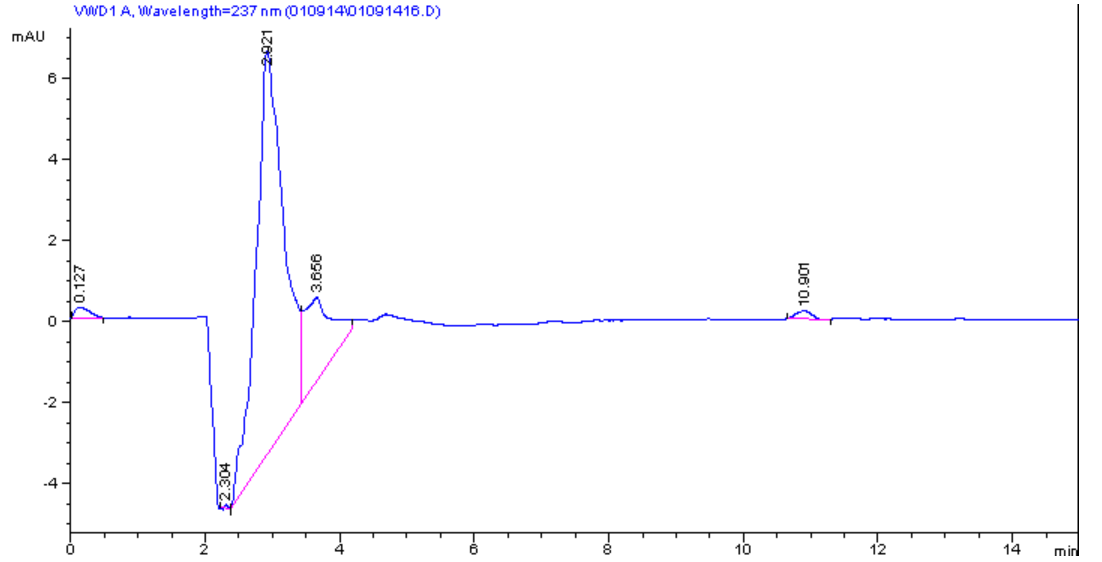
Madde konsantrasyonu (µg/mL)	Madde konsantrasyonu (mg/mL)	Absorptans(238 nm)
4	0.004	0.028
8	0.008	0.108
12	0.012	0.18
14	0.014	0.23
16	0.016	0.278
20	0.02	0.357
24	0.024	0.438
28	0.028	0.511



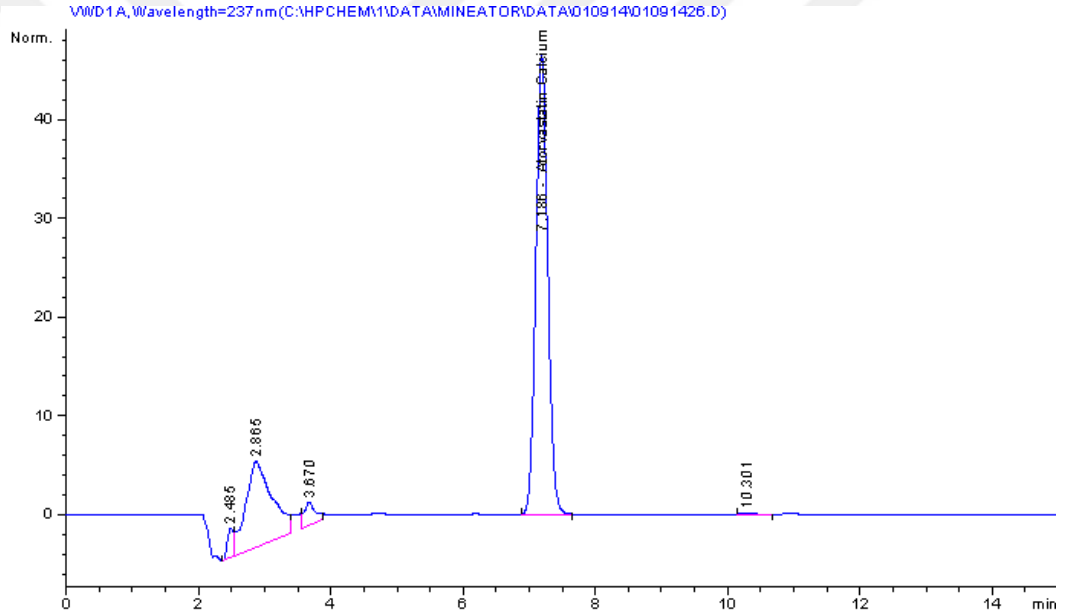
Şekil 26: AtrCa'un 238 nm de metanol kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi

5.1.2.2 *Atorvastatin Kalsiyumun HPLC ile Miktar Tayini İçin Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular*

AtrCa için alıkonma zamanı 7.1 dakika olarak belirlenmiştir. Toplam analiz süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Boş yapılan mobil faz enjeksiyonunda AtrCa'un alıkonması için gereken sürede, herhangi bir pik gözlenmemiştir. Çalışılan dalga boyu 238 nm'dir. Mobil faza ve AtrCa'a ait kromotogramlar Şekil 27 ve Şekil 28'de gösterilmiştir.



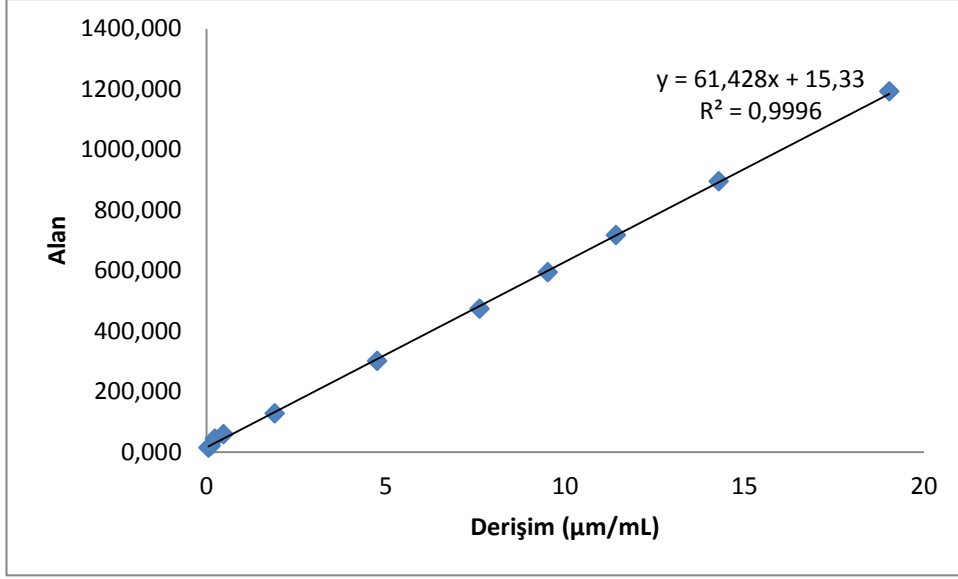
Şekil 27: Mobil faza ait kromatogram



Şekil 28: AtrCa içeren mobil faza ait kromatogram

5.1.2.2.1 Metanollü Ortamda Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular

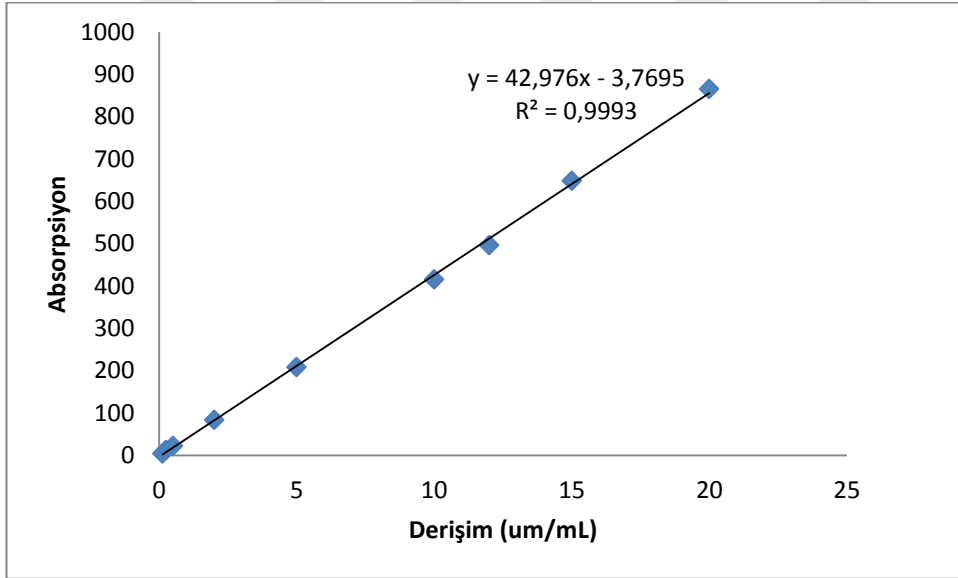
Bölüm 4.2.2.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan AtrCa çözeltilerinin analizleri HPLC yöntemi ile yapılmıştır. AtrCa için yapılan HPLC çalışması sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 29’da verilmiştir.



Şekil 29: Metanol için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği

5.1.2.2.2 pH 1.2 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular

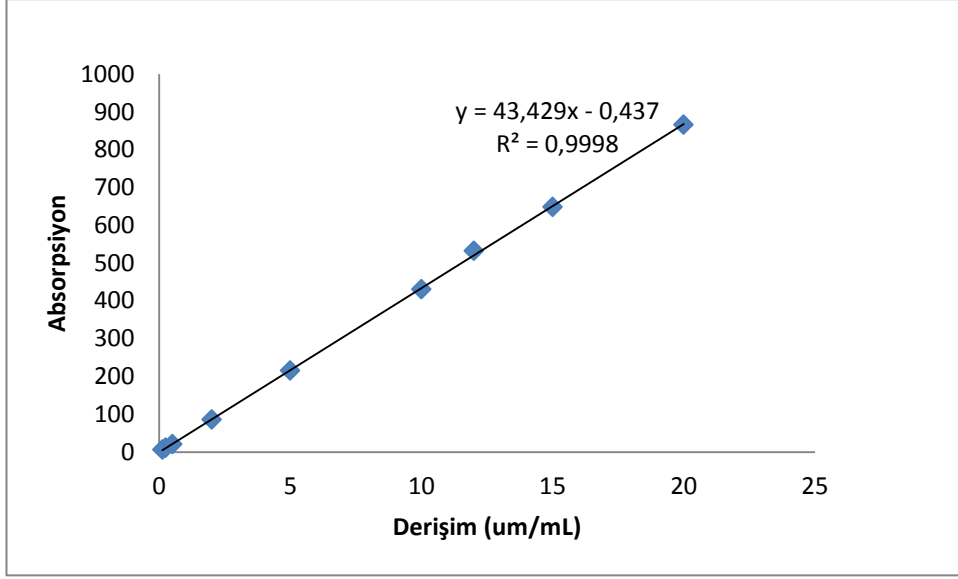
Bölüm 4.2.2.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan AtrCa çözeltilerinin analizleri HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pH 1.2 için belirlenen kalibrasyon eğrisi Şekil 30'da gösterilmiştir.



Şekil 30: pH 1.2 için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği

5.1.2.2.3 pH 6.8 Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular

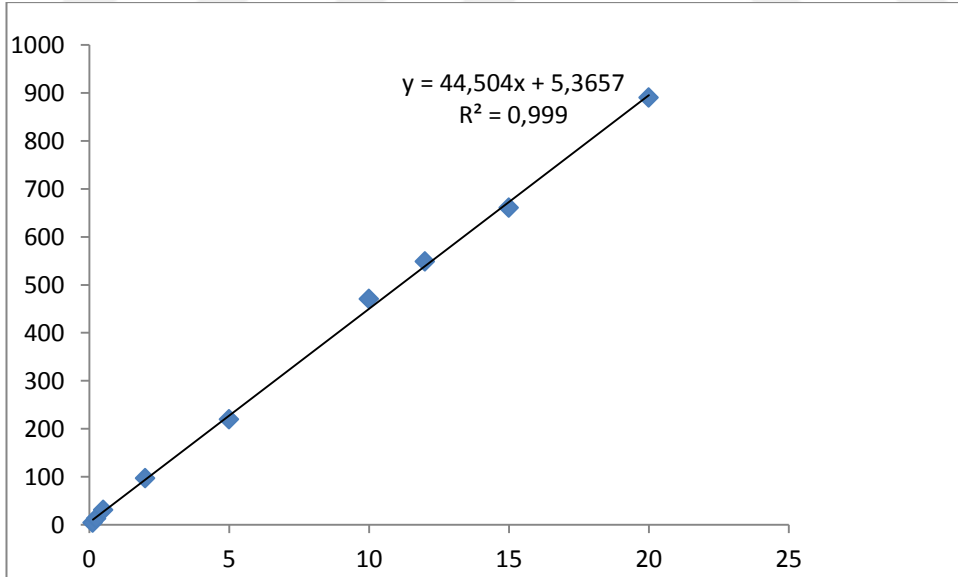
Bölüm 4.2.2.2.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan AtrCa çözeltilerinin analizleri HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pH 6.8 için belirlenen kalibrasyon eğrisi Şekil 31'de gösterilmiştir.



Şekil 31: pH 6.8 için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği

5.1.2.2.4 HBSS Ortamında Kalibrasyon Eğrisi Çizimine Ait Bulgular

Bölüm 4.2.2.2.4' de anlatıldığı gibi hazırlanan AtrCa çözeltilerinin analizleri HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre HBSS için belirlenen kalibrasyon eğrisi grafiği Şekil 32' de verilmiştir.



Şekil 32: HBSS ortamı için AtrCa ile çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği

5.1.3 Atorvastatin Kalsiyumun Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

5.1.3.1 Doğruluk Sonuçları

Yöntem 4.2.3.1' de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki alan değerleri Tablo 18, Tablo 20, Tablo 22 ve Tablo 24' de, % doğruluk bulguları ise Tablo 19, Tablo 21, Tablo 23, Tablo 25' de verilmiştir.

Tablo 18: Metanol ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri

Örnek No	Alan Değerleri (Au)		
	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	507.2	630.1	754.1
2	512.1	631.3	751.7
3	505.3	628.2	751.1
Ort	508.2	629.8	752.3
% RSS	0.69	0.2	0.2

Tablo 19: Metanol ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri

Örnek No	Derişim Değerleri(µg/mL)		
	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	8.01	10.03	12.03
2	8.09	9.98	11.99
3	7.98	10.0	11.98
Ort	8.02	10.00	12
% doğruluk	% 100.25	% 100.00	% 100.00

Tablo 20: pH 1.2 ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri

Örnek No	Alan Değerleri (Au)		
	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	341,8	438,3	510,2
2	342,4	428,3	514,8
3	347,9	430,5	511,7
Ort	344,03	432,37	512,23
% RSS	3,36	5,25	2,35

Tablo 21: pH 1.2 ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri

Örnek No	Derişim Değerleri($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	8.04	10.29	11.96
2	8.05	10.05	12.07
3	8.18	10.10	11.99
Ort	8.09	10.15	12.01
% doğruluk	%101.16	%101.48	%100.06

Tablo 22: pH 6.8 ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri

Örnek No	Alan Değerleri (Au)		
	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	346.87	438.3	520.7
2	350.3	427.6	528.3
3	340.3	430.3	522.7
Ort	342.49	432.07	523.90
% RSS	10.70	5.56	3.94

Tablo 23: pH 6.8 ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri

Örnek No	Derişim Değerleri($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	8.00	10.10	12.00
2	8.08	9.86	12.17
3	7.84	9.92	12.05
Ort	7.97	9.96	12.07
% doğruluk	%99.62	%99.59	%100.61

Tablo 24: HBSS ortamında farklı derişimlere ait alan değerleri

Örnek No	Alan Değerleri (Au)		
	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	367.8	450.4	539.42
2	358.3	450.3	538.7
3	362.3	452.2	542.7
Ort	362.80	450.97	540.27
% RSS	4.77	1.07	2.13

Tablo 25: HBSS ortamında AtrCa için hesaplanan % doğruluk değerleri

Örnek No	Derişim Değerleri($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	8.14	10.00	12.00
2	7.93	10.00	11.98
3	8.02	10.04	12.07
Ort	8.03	10.01	12.02
% doğruluk	%101.80	%100.13	%100.16

5.1.3.1.1 Kesinlik Sonuçları

5.1.3.1.1.1 Deney İçi Kesinlik Sonuçları

Yöntem 4.2.3.2.1' de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki kesinlik sonuçlarına yönelik olarak AtrCa' un metanolde düşük, orta, yüksek olacak şekilde seçilen 8, 10, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik derişimdeki çözeltisi hazırlanarak ardarda altı paralel enjeksiyonlar yapılmış, elde edilen derişimlerin ortalaması, standart sapma ve relatif standart sapması hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 26, Tablo 27, Tablo 28 ve Tablo 29' da gösterilmiştir.

Tablo 26: Metanol ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	7.99	10.01	12.01
2	7.98	10.09	12.03
3	8.01	9.98	11.99
4	8.02	9.99	11.98
5	7.99	10.2	12.03
6	8.02	10.03	11.97
Ort	8.00	10.05	12.00
SS	0.017	0.083	0.025
% RSS	0.2	0.827	0.21

Tablo 27: pH 1.2 ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	7.98	10.03	11.91
2	7.88	10.02	12
3	8.02	9.88	12.09
4	8	10.3	12.08
5	7.97	9.2	12.03
6	8.01	9.93	11.97
Ort	7.98	9.89	12.01
SS	0.05	0.37	0.07
% RSS	7.98	10.03	11.91

Tablo 28: pH 6.8 ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	7.88	10.03	11.81
2	7.93	10.12	12
3	8.02	9.98	12.09
4	7.98	10.3	12.03
5	7.97	9.2	12.03
6	8.01	9.98	11.99
Ort	7.97	9.94	12.04
SS	0.05	0.38	0.10
% RSS	7.88	10.03	11.81

Tablo 29: HBSS ortamında deney içi kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	7.88	9.93	11.81
2	7.93	10.12	12
3	8.12	9.98	12.08
4	7.99	10.3	12.03
5	7.97	10.3	12.03
6	8.03	9.98	12
Ort	7.99	10.10	12.04
SS	0.08	0.17	0.09
% RSS	7.88	9.93	11.81

5.1.3.1.1.2 *Deneyler Arası Kesinlik Sonuçları*

Yöntem 4.2.3.2.2' de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki doğrusallık bulguları AtrCa'un metanollü ortamdaki 8, 10, 12 µg/mL'lik derişimdeki çözeltisi HPLC'ye enjekte edilmiştir. Bu çözeltiler deneylerin yapıldığı, birbirini takip eden gün (1. gün ve 2. gün) içinde altı kez ölçülmüştür. Elde edilen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve relatif standart sapması hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 30, Tablo 31, Tablo 32 ve Tablo 33'de gösterilmiştir.

Tablo 30: Metanol ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 µg/mL		10 µg/mL		12 µg/mL	
	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün
1	7.98	7.99	10.03	10.09	12.02	12.06
2	7.96	7.99	10.05	10.05	12.06	11.97
3	7.97	8.01	9.98	9.99	12.09	11.93
4	8.02	8.03	9.99	9.97	11.98	12.03
5	8.06	8.07	9.96	10.06	11.95	12.08
6	7.99	7.98	9.97	10.05	11.97	12.05
Ort	7.99	8.01	9.99	10.03	12.01	12.02
SS	0.03	0.33	0.03	0.04	0.05	0.05
% RSS	0.46	0.42	0.35	0.45	0.45	0.48

Tablo 31: pH 1.2 ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

Örnek No	8 µg/mL		10 µg/mL		12 µg/mL	
	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün
1	7.88	8.02	10.13	10.02	12.05	12.03
2	7.96	7.98	10.15	10.05	12.06	11.93
3	8.01	8.05	9.98	9.98	12.06	11.93
4	8.02	8.03	9.99	9.97	11.97	11.93
5	8.16	8.07	9.97	10.04	11.93	12.08
6	7.98	7.99	9.98	10.03	11.97	12.03
Ort	8.00	8.02	10.03	10.02	12.01	11.99
SS	0.09	0.03	0.08	0.03	0.06	0.07
% RSS	1.15	0.43	0.83	0.33	0.47	0.55

Tablo 32: pH 6.8 ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

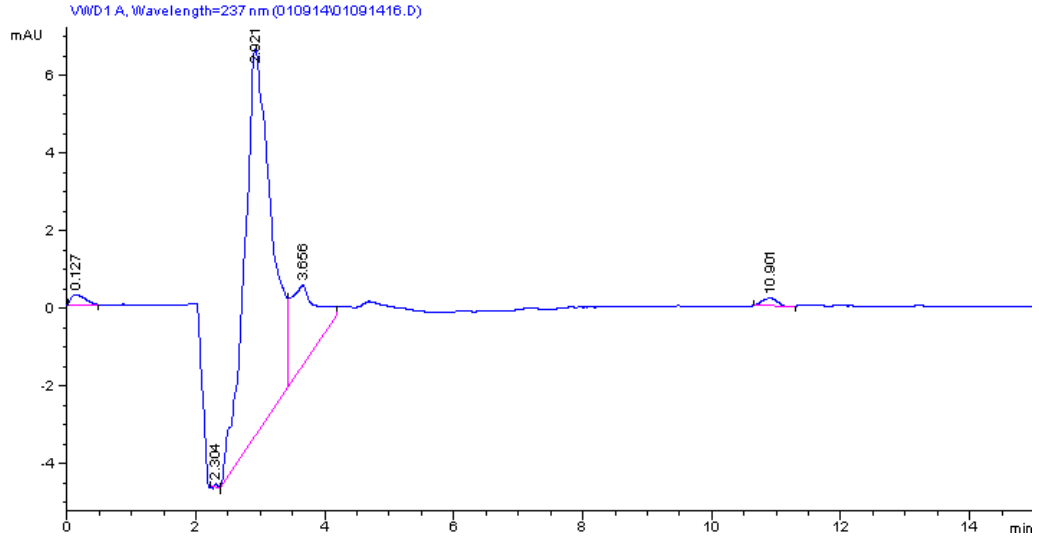
Örnek No	8 µg/mL		10 µg/mL		12 µg/mL	
	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün
1	7.98	8.02	10.13	10.02	12.05	12.07
2	7.96	7.98	10.16	10.03	12.06	11.89
3	8.04	8.15	9.98	9.97	12.06	11.93
4	8.02	8.03	9.99	9.97	11.97	11.93
5	8.18	8.007	9.97	10.01	11.93	12.07
6	7.99	8.09	9.98	10.03	11.98	12.03
Ort	8.03	8.05	10.04	10.01	12.01	11.99
SS	0.08	0.06	0.09	0.03	0.06	0.08
% RSS	0.99	0.78	0.86	0.28	0.46	0.66

Tablo 33: HBSS ortamında deneyler arası kesinlik çalışmasına ait derişim değerleri

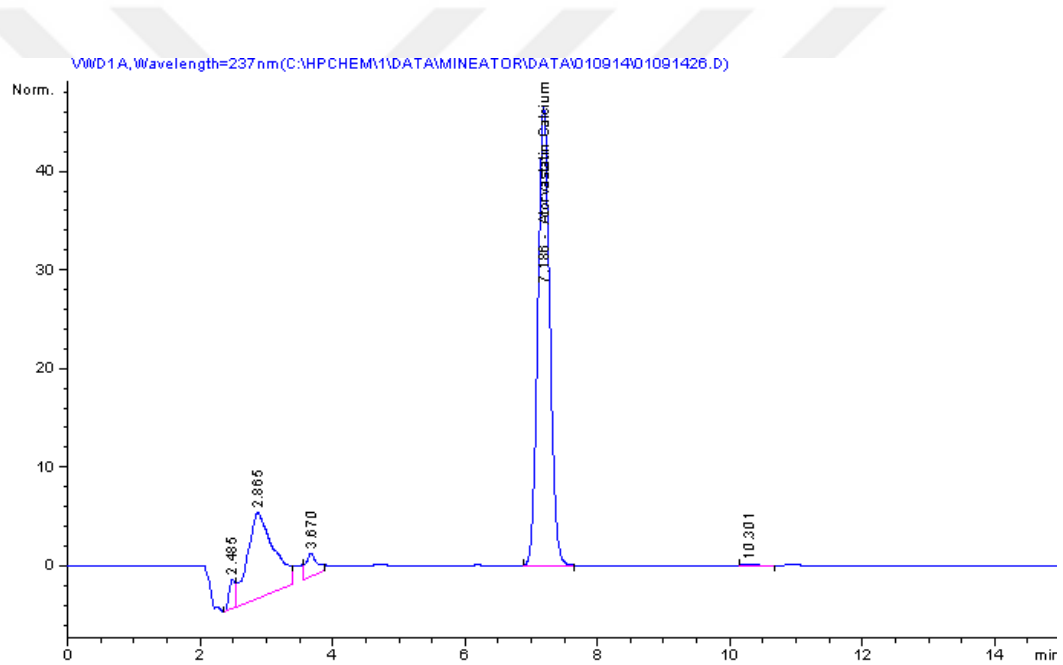
Örnek No	8 µg/mL		10 µg/mL		12 µg/mL	
	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün	1.gün	2. gün
1	7.98	8.02	10.13	10.12	12.05	11.03
2	7.96	8.18	10.13	10.15	12.06	12.08
3	8.04	8.15	9.98	9.87	12.03	11.93
4	8.09	8.03	9.99	9.87	11.87	12.07
5	7.98	8.03	9.97	10.01	11.93	12.07
6	7.99	8.09	9.88	10.03	11.98	12.13
Ort	7.93	8.08	10.01	10.01	11.99	11.89
SS	0.05	0.07	0.10	0.12	0.08	0.42
% RSS	0.62	0.85	0.98	1.19	0.63	3.57

5.1.3.1.2 Özgünlük ve Seçicilik

Yöntem 4.2.3.4' de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki doğrusallık bulguları Özgünlük ve seçicilik ölçüsünün tayini için çözücü, AtrCa içermeyen mobil faz karışımı ve AtrCa içeren örnek enjekte edilip alıkonma zamanında mobil faza ait herhangi bir pik verip vermediği incelenmiştir. Metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki bu kromatogramlar çok benzer olup grafikleri Şekil 33, Şekil 34' de gösterilmiştir.



Şekil 33: Mobil faza ait kromatogram



Şekil 34: Metanollü ortamda ortamda AtrCa içeren örneğe ait kromatogram

5.1.3.1.3 Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Yöntem 4.2.3.5' de anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki doğrusallık bulguları ile AtrCa için LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Kullanılan yöntemde AtrCa'un 0.625 µg/mL derişimine kadar analiz edilmiştir. Buna göre hesaplanan LOD'si ve LOQ'su sırasıyla 0.429 µg /mL ve 1.30 µg/mL bulunmuştur.

5.1.3.1.4 Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı

Yöntem 4.2.3.6' da anlatıldığı şekilde çalışılarak AtrCa' un metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarındaki düşük derişim (8 µg/mL) ve yüksek derişimlerde (12 µg/mL) hazırlanan 3'er paralel standart örneğinin enjeksiyonundan sonra örneklerin başlangıç, 12 ve 24. saat zamanlarında oda sıcaklığında bekletilip aynı sıra ile tekrar enjekte edilmesi sonucu ve Tablo 34-Tablo 41' da gösterilen değerler elde edilmiştir.

Tablo 34:Metanol ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	7.88	7.89	7.99
2	7.99	8.01	7.96
3	7.95	8.02	8.01
Ort	7.99	7.99	7.99
SS	0.05	0.05	0.02
% RSS	0.65	0.74	0.25

Tablo 35: Metanol ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	12.02	11.96	11.99
2	11.99	11.89	11.89
3	11.96	11.95	11.96
Ort	11.99	11.93	11.94
SS	0.03	0.04	0.05
% RSS	0.25	0.31	0.42

Tablo 36: pH 1.2 ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	7.98	7.88	7.98
2	7.98	8.03	7.96
3	7.96	8.02	8.03
Ort	7.97	7.98	7.99
SS	0.01	0.08	0.04
% RSS	0.14	1.05	0.45

Tablo 37: pH 1.2 ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	12.05	11.86	11.87
2	12.09	11.99	11.99
3	11.96	11.98	11.95
Ort	11.99	11.93	11.94
SS	0.07	0.07	0.06
% RSS	0.56	0.61	0.51

Tablo 38: pH 6.8 ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	7.88	8.88	7.97
2	7.96	8.03	7.86
3	7.95	7.92	8.03
Ort	7.93	8.28	7.95
SS	0.04	0.53	0.09
% RSS	0.55	6.35	1.08

Tablo 39: pH 6.8 ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	12.15	11.86	11.77
2	12.03	11.98	11.98
3	11.96	11.98	11.96
Ort	11.99	11.93	11.94
SS	0.10	0.07	0.12
% RSS	0.80	0.58	0.97

Tablo 40: HBSS ortamında düşük derişimde (8 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	7.87	8.98	7.93
2	7.95	7.93	7.76
3	7.96	7.98	8.04
Ort	7.93	8.30	7.91
SS	0.05	0.59	0.14
% RSS	0.62	7.14	1.78

Tablo 41: HBSS ortamında yüksek derişimde (12 µg/mL) kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi

Örnek No	0. saat	12. saat	24. saat
1	12.35	12.03	11.89
2	12.23	11.98	11.98
3	11.96	11.87	11.86
Ort	11.99	11.93	11.94
SS	0.20	0.08	0.06
% RSS	1.67	0.69	0.52

5.1.4 Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

5.1.4.1 *Kendiliğinden Mikroemülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistem (SMEDDS) Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular*

5.1.4.1.1 Formülasyon Terkibinde Yer Alacak Bileşenlerin Seçimine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.4.1'de anlatıldığı şekilde AtrCa' un farklı bileşenlerdeki çözünürlüğü belirlenmiştir. HPLC ile miktar tayini yapılırken alınan örnekler mobil faz ile seyreltilip analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her bir bileşendeki çözünen AtrCa miktarı Tablo 42' de verilmiştir.

Tablo 42: AtrCa' un farklı bileşenlerdeki çözünürlük miktarları

Kullanılan bileşenler	HPLC ile bulunan AtrCa miktarı (mg/mL)
Mısır yağı	27.7
Oleik asit	110.55
Rafine Kastrol yağı	1.53
Labrofil M 2125	4.47
Labrafil 1944	1.005
Tween 20	40.82
Tween 80	13.5
Span 80	37.1
PEG 200	45.98
PEG 400	47.475
Transkutol	6.74
Labrasol	17.3
Brij 30 v	44.73
Brij 92v	30.185
Brij 96v	3.3805
Etanol	0.043
İzopropil alkol	4.705
Distile su	0.011
pH: 1.2	0.0037
pH: 4.6	0.002
pH: 6.8	0.602

5.1.4.1.2 SMEDD Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramlarına Ait Sonuçlar

Yöntem 4.2.4.1.2' de anlatıldığı şekilde ideal SMEDD formülasyonunun belirlenmesi için üçgen faz diyagramları oluşturulmuştur. İdeal SMEDD formülasyonunu elde etmek için farklı YEM/YYEM oranları ile çalışılmış ve oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 olarak seçilmiştir. Tablo 43' de hazırlanan tüm SMEDD formülasyon denemelerine ait alan değerleri gösterilmiştir. Üçgen faz diyagramlarından elde edilen alanlar şekilsel olarak Şekil 35' de ve alanların grafiksel hali Şekil 36' da gösterilmiştir.

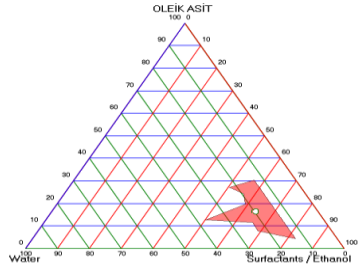
Tablo 43: SMEDD formülasyonlarının üçgen faz diyagramlarına ait sonuçlar

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		Oleik asit	Tween 20 – Span 80/Etanol	Distile Su	
F1	1:1	0.5	9.5	0.00 – 1.5	234.53
		1	9	0.00 – 3	
		1.5	8.5	0.00 – 3	
		2	8	0.00 – 5.9	
		2.5	7.5	0.00 – 2.7	
		3	7	0.00 – 2.4	
		3.5	6.5	0.00 – 2.9	
F2	1:2	0.5	9.5	0.00 – 0.9	224.53
		1	9	0.00 – 1.1	
		1.5	8.5	0.00 – 4.3	
		2	8	0.00 – 3.8	
		2.5	7.5	0.00 – 4	
		3	7	0.00 – 3	
		3.5	6.5	0.00 – 3.1	
F3	1:3	0.5	9.5	0.00 – 0.9	320.59
		1	9	0.00 – 1.8	
		1.5	8.5	0.00 – 4.2	
		2	8	0.00 – 3.7	
		2.5	7.5	0.00 – 3.6	
		3	7	0.00 – 3.2	
		3.5	6.5	0.00 – 2.9	
F4	1:4	0.5	9.5	0.00 – 1.1	224.53
		1	9	0.00 – 1.7	
		1.5	8.5	0.00 – 3.5	
		2	8	0.00 – 4.1	
		2.5	7.5	0.00 – 4.2	
		3	7	0.00 – 3.5	
		3.5	6.5	0.00 – 3.1	

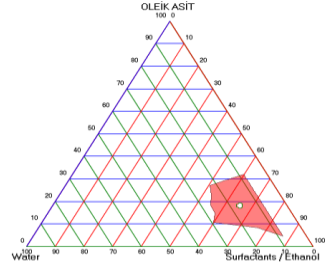
Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		Oleik asit	Tween 20 – Span 80/Etanol	Distile Su	
F5	1:5	0.5	9.5	0.00 – 4.2	224.53
		1	9	0.00 – 2.1	
		1.5	8.5	0.00 – 1.8	
		2	8	0.00 – 4.1	
		2.5	7.5	0.00 – 4	
		3	7	0.00 – 3.6	
		3.5	6.5	0.00 – 3.2	
F6	1:6	0.5	9.5	0.00 – 1.2	224.63
		1	9	0.00 – 1.9	
		1.5	8.5	0.00 – 3.9	
		2	8	0.00 – 4.1	
		2.5	7.5	0.00 – 4	
		3	7	0.00 – 3.8	
		3.5	6.5	0.00 – 3.2	
F7	1:7	0.5	9.5	0.00 – 1.3	256.05
		1	9	0.00 – 2.0	
		1.5	8.5	0.00 – 4	
		2	8	0.00 – 4.3	
		2.5	7.5	0.00 – 3.4	
		3	7	0.00 – 3.9	
		3.5	6.5	0.00 – 3.5	
F8	1:8	0.5	9.5	0.00 – 1.9	206.83
		1	9	0.00 – 2.4	
		1.5	8.5	0.00 – 4.4	
		2	8	0.00 – 4.5	
		2.5	7.5	0.00 – 4.3	
		3	7	0.00 – 3.3	
		3.5	6.5	0.00 – 3.5	
F9	1:9	0.5	9.5	0.00 – 1.5	206.83
		1	9	0.00 – 2.5	
		1.5	8.5	0.00 – 4.2	
		2	8	0.00 – 4.4	
		2.5	7.5	0.00 – 4.1	
		3	7	0.00 – 3.7	
		3.5	6.5	0.00 – 3.4	

Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		Oleik asit	Tween 20 – Span 80/Etanol	Distile Su	
F10	2:1	0.5	9.5	0.00 – 5.6	238.54
		1	9	0.00 – 6.1	
		1.5	8.5	0.00 – 7	
		2	8	0.00 – 3.8	
		2.5	7.5	0.00 – 2	
		3	7	0.00 – 1.8	
		3.5	6.5	0.00 – 1.3	
F11	3:1	0.5	9.5	0.00 – 3.4	206.83
		1	9	0.00 – 3.5	
		1.5	8.5	0.00 – 2.7	
		2	8	0.00 – 1.8	
		2.5	7.5	0.00 – 1.6	
		3	7	0.00 – 1.4	
		3.5	6.5	0.00 – 1.3	
F12	4:1	0.5	9.5	0.00 – 2.9	206.83
		1	9	0.00 – 3	
		1.5	8.5	0.00 – 1.5	
		2	8	0.00 – 1.2	
		2.5	7.5	0.00 – 2.8	
		3	7	0.00 – 1.2	
		3.5	6.5	0.00 – 1.1	
F13	5:1	0.5	9.5	0.00 – 1.3	206.83
		1	9	0.00 – 1.4	
		1.5	8.5	0.00 – 1.1	
		2	8	0.00 – 1.3	
		2.5	7.5	0.00 – 1.2	
		3	7	0.00 – 0.7	
		3.5	6.5	0.00 – 1.1	
F14	6:1	0.5	9.5	0.00 – 2	206.83
		1	9	0.00 – 2.4	
		1.5	8.5	0.00 – 2.8	
		2	8	0.00 – 1.2	
		2.5	7.5	0.00 – 1.1	
		3	7	0.00 – 0.9	
		3.5	6.5	0.00 – 0.8	

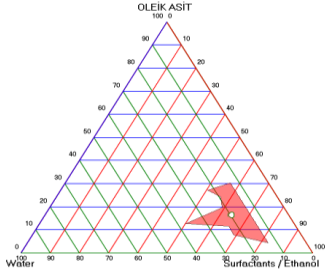
Formül Kodu	YEM:YYEM ORANI	Yağ	YEM/YYEM	Su	Alan Değeri
		Oleik asit	Tween 20 – Span 80/Etanol	Distile Su	
F15	7:1	0.5	9.5	0.00 – 3.5	206.83
		1	9	0.00 – 2.2	
		1.5	8.5	0.00 – 3.5	
		2	8	0.00 – 1.6	
		2.5	7.5	0.00 – 0.8	
		3	7	0.00 – 0.7	
		3.5	6.5	0.00 – 1.7	
F16	8:1	0.5	9.5	0.00 – 2.2	206.83
		1	9	0.00 – 3.4	
		1.5	8.5	0.00 – 1.2	
		2	8	0.00 – 1.0	
		2.5	7.5	0.00 – 0.6	
		3	7	0.00 – 0.8	
		3.5	6.5	0.00 – 0.6	
F17	9:1	0.5	9.5	0.00 – 1.9	206.83
		1	9	0.00 – 1.2	
		1.5	8.5	0.00 – 1.3	
		2	8	0.00 – 1.1	
		2.5	7.5	0.00 – 0.9	
		3	7	0.00 – 0.8	
		3.5	6.5	0.00 – 0.7	



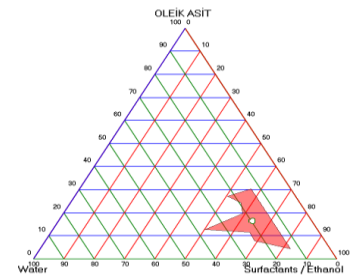
F1 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



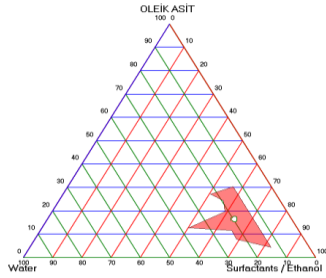
F2 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



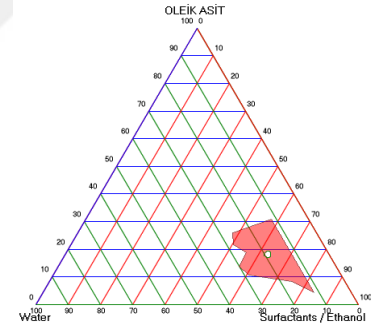
F3 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



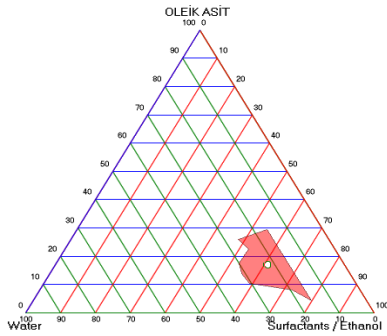
F4 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



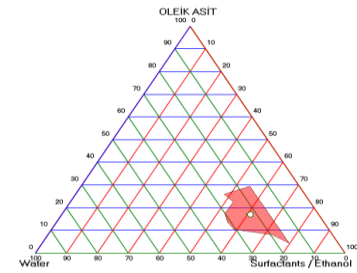
F5 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



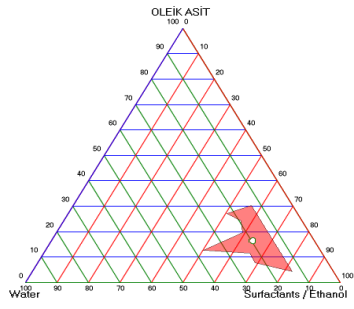
F6 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



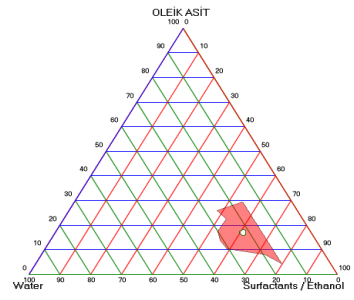
F7 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



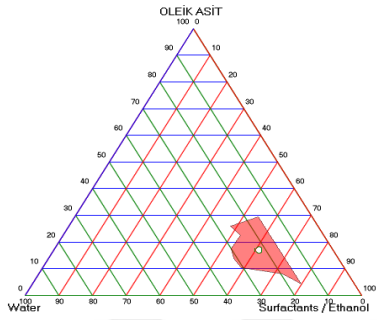
F8 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



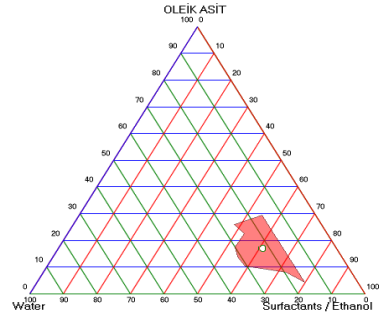
F9 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



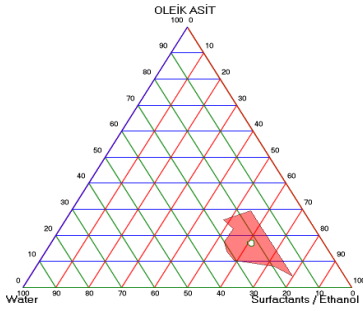
F10 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



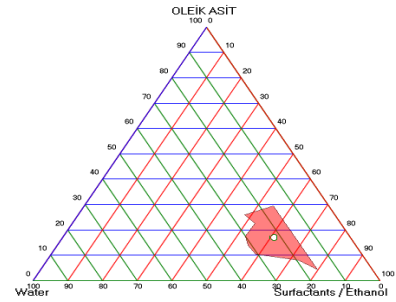
F11 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



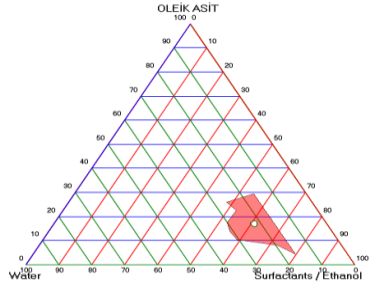
F12 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



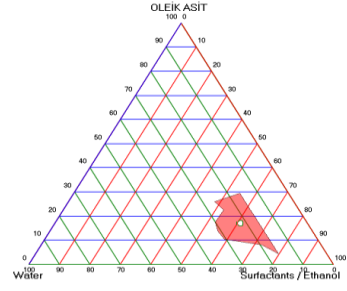
F13 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



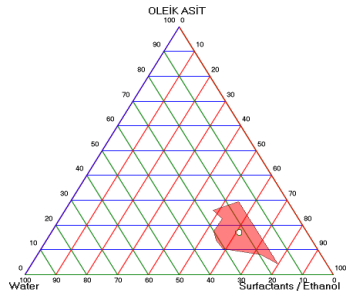
F14 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



F15 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

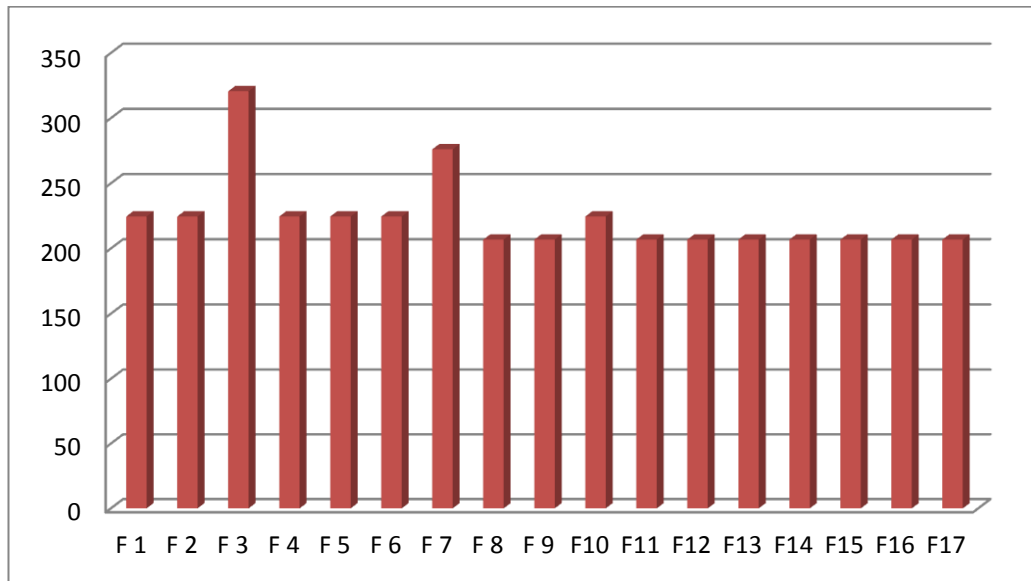


F16 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı



F17 formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

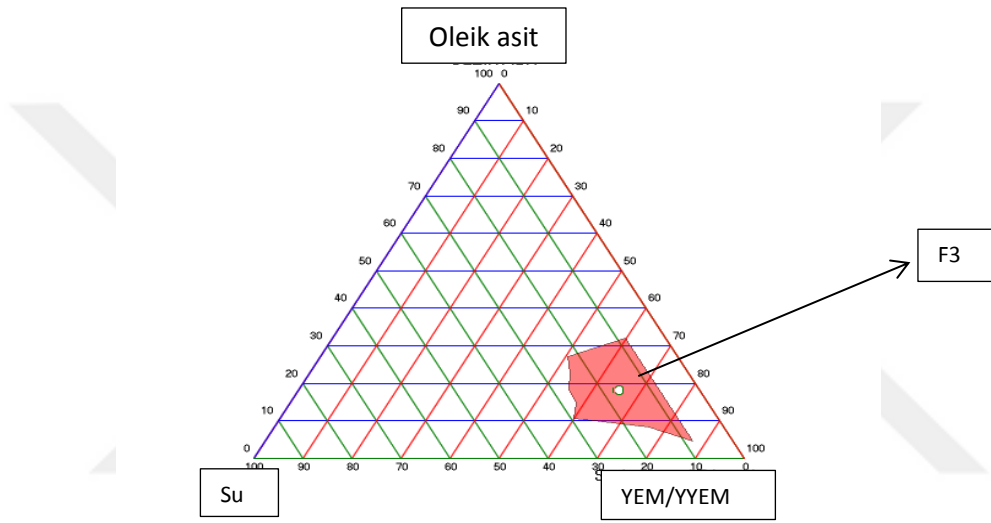
Şekil 35: SMEDD formülasyonlarının üçgen faz diyagramlarından elde edilen alanlar



Şekil 36: Mikroemülsiyon formülasyonların üçgen faz diyagramında oluşturdukları alan değerleri

5.1.4.1.3 Atorvastatin Kalsiyum ile Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

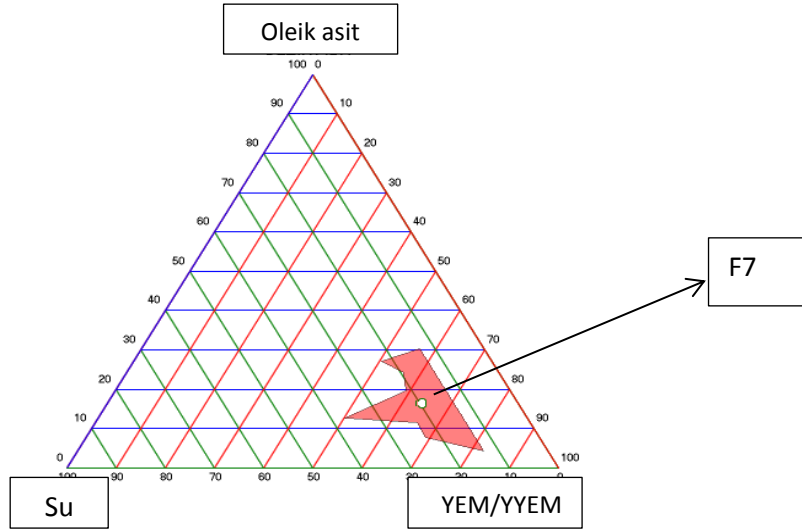
Tablo 43' de belirtilen formülasyonlar arasında, Şekil 36' da görüldüğü üzere yüksek mikroemülsiyon bölgelerini veren formülasyonlar F3, F7 ve F10 formülasyonları olarak bulundu. Şekil 37' de F3 formülasyonuna ait, Şekil 38' de F7 formülasyonuna ait, Şekil 39' da F10 formülasyonuna ait mikroemülsiyon alanını gösteren üçgen faz diyagramı ve bu alanların ağırlık merkezleri (M3, M7, M10) gösterilmiştir. F3 formülasyonunun terkibi Tablo 44' de, F7 formülasyonunun Tablo 45' de, F10 formülasyonunun terkibi Tablo 46' da verilmiştir.



Şekil 37: F3 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

Tablo 44: F 3 formülasyonun terkibi ve HLB değeri

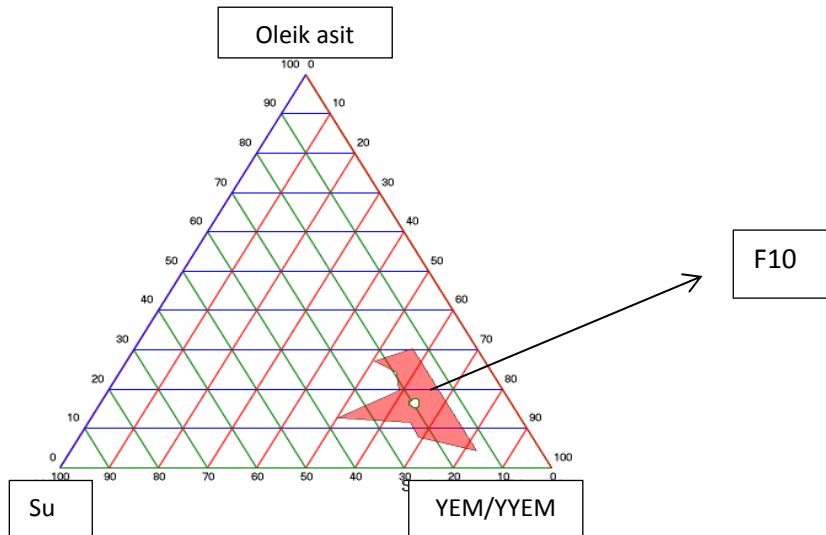
Mikroemülsiyon Kodu	Mikroemülsiyon Tipi	HLB Değeri	YEM/YYEM Oranı	Yağ Miktarı (g)	YEM/YYEM Miktarı (g)
F3	Y/S	12.5	1:3	1.642	6.534
				%16.42	%65.34



Şekil 38: F7 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

Tablo 45: F 7 formülasyonun terkibi ve HLB değeri

Mikroemülsiyon Kodu	Mikroemülsiyon Tipi	HLB Değeri	YEM/YYEM Oranı	Yağ Miktarı (g)	YEM/YYEM Miktarı (g)
F7	Y/S	12.5	1:7	1.888	6.3
				%18.88	%63



Şekil 39: F10 mikroemülsiyon formülasyonuna ait üçgen faz diyagramı

Tablo 46: F10 formülasyonun terkibi ve HLB değeri

Mikroemülsiyon Kodu	Mikroemülsiyon Tipi	HLB Değeri	YEM/YYEM Oranı	Yağ Miktarı (g)	YEM/YYEM Miktarı (g)
F10	Y/S	12.5	2:1	1.949	6.419
				%19.49	%64.19

5.1.5 Termodinamik Stabilite Sonuçlarına Ait Bulgular

En yüksek alan değerlerine sahip olan F3, F7 ve F10 formülasyonlarında yöntem 4.2.5' de anlatıldığı şekilde santrifüj, ısıtma-soğutma, dondurma-çözme çalışmaları yapılmıştır. Termodinamik stabilite sonuçları Tablo 47' de gösterilmiştir.

Tablo 47: Termodinamik stabilite sonuçları

	F3	F7	F10
Santrifüj	✓	✓	✓
Isıtma-soğutma	✓	Faz ayrışması	Faz ayrışması
Dondurma-çözme	✓	Faz ayrışması	Faz ayrışması

5.1.6 Optimal SMEDD Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Termodinamik stabilite çalışması sonrası daha stabil olarak belirlenen F3 formülasyonuna ait fizikokimyasal özellikler incelenmiş ve 6 ay süreyle 25 ± 2 °C %60 ± 5 nem, 40 ± 2 °C %75 ± 5 nem ortamında stabilite çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

5.1.6.1 SMEDD Formülasyonunun Fiziksel Görünümü

Yöntem 4.2.6.1' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDD formülasyonunun dış görünüşü incelendiğinde ve mikroemülsiyon sisteminin saydam ve homojen olduğu gözlenmiştir. Fiziksel görüntüsünde bir bulanıklık, faz ayrışması görülmemiştir.

5.1.6.2 SMEDD Formülasyonunun pH Ölçüm Bulgusu

Yöntem 4.2.6.2' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun pH'sı oda sıcaklığında ölçülmüş ve ölçüm sonuçları Tablo 53' da verilmiştir.

5.1.6.3 SMEDD Formülasyonunun Elektrik İletkenliği Ölçüm Bulgusu

Yöntem 4.2.6.3' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun formülasyonunun elektrik iletkenliği, iletkenlik ölçer kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Tablo 53' da verilmiştir.

5.1.6.4 ***SMEDD Formülasyonunun Dansite Ölçüm Bulgusu***

Yöntem 4.2.6.4' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun dansite ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 53' da verilmiştir.

5.1.6.5 ***SMEDD Formülasyonunun Refraktif İndisi Ölçüm Bulgusu***

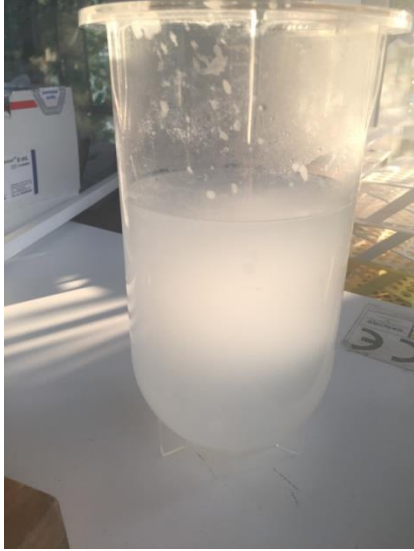
Yöntem 4.2.6.5' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun refraktif indisi ölçümü Atago Illuminator marka refraktometre ile yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 53' da verilmiştir.

5.1.6.6 ***SMEDD Formülasyonunun Viskozite Ölçüm Bulgusu***

Yöntem 4.2.6.6' da anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun viskozitesi 37 ±1 °C'de Brookfield viskozimetresi ve ULA isimli spindle kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite değeri Centipoise (cP) olarak bulunmuş ve ölçüm sonuçları Tablo 53' da verilmiştir.

5.1.6.7 ***SMEDD Formülasyonunun Emülsifikasyon Zamanı Bulgusu***

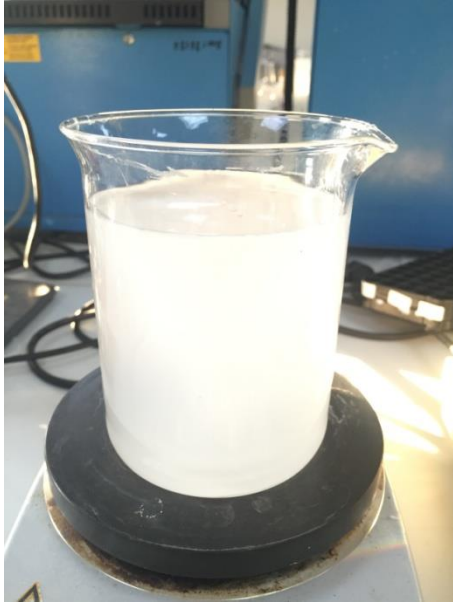
Yöntem 4.2.6.7' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun emülsifikasyon zamanı denemesi yapılmış ve F3 formülasyonunun 10 saniyede tamamen dağıldı gözlenmiştir. Formülasyonun 10 saniye içindeki görünümü Şekil 40' da gösterilmiştir.



Şekil 40: Emülsifikasyon zamanına ulaşan F3 formülasyonunun görünümü

5.1.6.8 ***SMEDD Formülasyonunun Disperse Olabilme Bulgusu***

Yöntem 4.2.6.8' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun disperse olabilme denemesi yapılmıştır. Formülasyonun Aşama A özellikte olduğu gözlemiştir ve görünümü Şekil 41' de gösterilmiştir.



Şekil 41: Disperse olabilme denemesi sonucu F3 formülasyonu görünümü

5.1.6.9 ***SMEDD Formülasyonunun Dağılım Dayanıklılığı Bulguları***

Yöntem 4.2.6.9' da anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun dağılım dayanıklılığı denemesi gerçekleştirilmiştir. Etkin madde içermeyen F3 SMEDD formülasyonun zeta average değerleri Tablo 48'de polidispersite indeksleri Tablo 49'

da, etkin madde içeren F3 SMEDD formülasyonuna ait zeta-average değerleri Tablo 50’de ve polidispersite indeks değerleri ise Tablo 51’de verilmiştir.

Tablo 48: Etkin madde içermeyen SMEDDS formülasyonun zeta avarage(dnm) değerleri

Dilüsyon	Zaman (saat)	Distile su± SS	pH:1.2± SS	pH:6.8± SS
1:1	0	1270 ± 1.2	1210 ± 1.0	563.9 ± 1.5
1:10	0	424.8 ± 2.5	236.5 ± 1.5	518.8 ± 1.5
1:50	0	413.5 ± 2.0	245.8 ± 1.6	368.1 ± 2.0
1:100	0	277.9 ± 1.5	229.9 ± 1.0	359.6 ± 1.3
1:250	0	223.9 ± 1.1	210.9 ± 1.8	317.36 ± 1.0
1:500	0	193.4 ± 1.5	175.7 ± 2.1	310.4 ± 1.8
1:1000	0	177.6 ± 1.6	185.6 ± 1.3	202.3 ± 1.0
	2	171.96 ± 1.6	185.6 ± 2.3	206.1 ± 1.8
	24	172.3 ± 1.8	186.9 ± 1.0	213.9 ± 1.4

Tablo 49: Etkin madde içermeyen SMEDD formülasyonun polidispersite indeksi değerleri

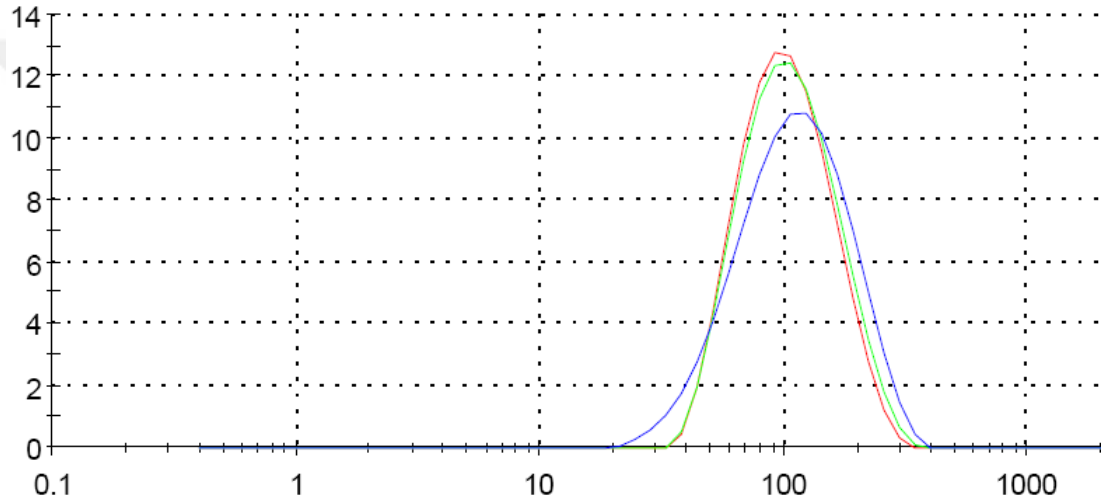
Dilüsyon	Zaman (saat)	Distile su± SS	pH:1.2± SS	pH:6.8± SS
1:1	0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	0.913 ± 0.05
1:10	0	0.742 ± 0.07	0.839 ± 0.03	0.836 ± 0.08
1:50	0	0.723 ± 0.02	0.603 ± 0.05	0.809 ± 0.08
1:100	0	0.565 ± 0.08	0.526 ± 0.15	0.732 ± 0.2
1:250	0	0.459 ± 0.03	0.456 ± 0.15	0.669 ± 0.08
1:500	0	0.465 ± 0.03	0.537 ± 0.07	0.496 ± 0.5
1:1000	0	0.393 ± 0.06	0.456 ± 0.05	0.463 ± 0.3
	2	0.470 ± 0.03	0.550 ± 0.09	0.757 ± 0.05
	24	0.503 ± 0.05	0.346 ± 0.06	0.346 ± 0.06

Tablo 50: Etkin madde içeren SMEDDS formülasyonun zeta avarage (dnm) değerleri

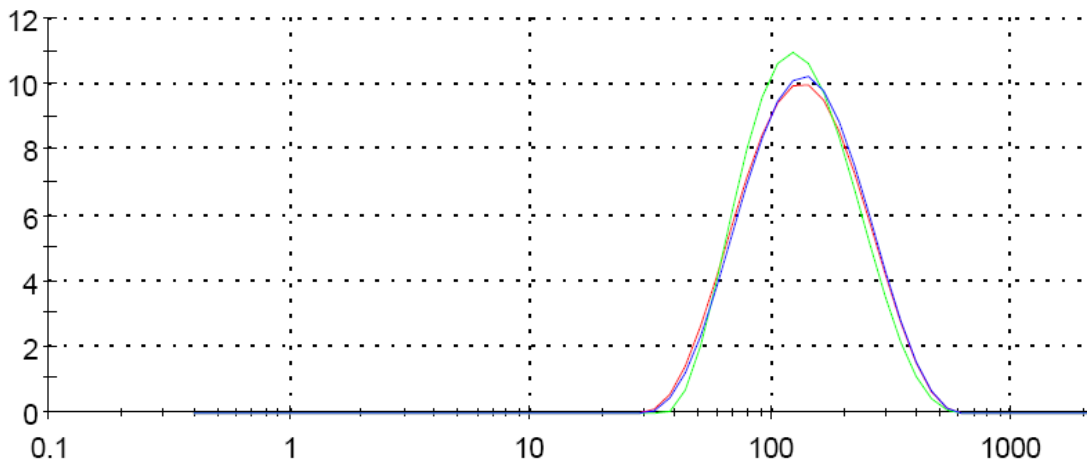
Dilüsyon	Zaman (saat)	Distile su± SS	pH:1.2± SS	pH:6.8± SS
1:1	0	900.2 ± 1.2	378.6 ± 1.05	437 ± 1.5
1:10	0	222.3 ± 1.4	230.9 ± 1.62	299.5 ± 1.46
1:50	0	178.5 ± 1.36	214.06 ± 6.65	306.9 ± 1.2
1:100	0	143.2 ± 1.8	167.36 ± 1.04	251.6 ± 1.08
1:250	0	153.3 ± 2.0	160.5 ± 1.0	250.6 ± 4.7
1:500	0	140.8 ± 1.8	160 ± 1.3	240.7 ± 1.15
1:1000	0	169.8 ± 5.6	187.1 ± 5	214.2 ± 1.9
	2	165.2 ± 0.6	185.0 ± 10	264.2 ± 2.0
	24	170.7 ± 1.3	189.9 ± 1.5	281.4 ± 1.6

Tablo 51: Etkin madde içeren SMEDDS formülasyonunun polidispersite indeksi değerleri

Dilüsyon	Zaman (saat)	Distile su± SS	pH:1.2± SS	pH:6.8± SS
1:1	0	0.650 ± 0.02	0.83 ± 0.15	0.76 ± 0.04
1:10	0	0.551 ± 0.06	0.687 ± 0.06	0.78 ± 0.24
1:50	0	0.549 ± 0.01	0.697 ± 0.13	0.65 ± 0.1
1:100	0	0.47 ± 0.148	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.05
1:250	0	0.46 ± 0.06	0.5 ± 0.12	0.567 ± 0.09
1:500	0	0.45 ± 0.1	0.479 ± 0.09	0.56 ± 0.12
1:1000	0	0.43 ± 0.01	0.371 ± 0.05	0.56 ± 0.09
	2	0.470 ± 0.01	0.766 ± 0.05	0.658 ± 0.1
	24	0.495 ± 0.13	0.712 ± 0.04	0.841 ± 0.02



Şekil 42: Etkin madde içermeyen F3-SMEDDS formülasyonunun distile su ortamında damlacık boyutu dağılımı grafiği



Şekil 43: Etkin madde içeren F3-SMEDDS formülasyonunun distile su ortamında damlacık boyutu dağılımı grafiği

5.1.6.10 *SMEDD Formülasyonunun Partikül Büyüklüğü Bulguları*

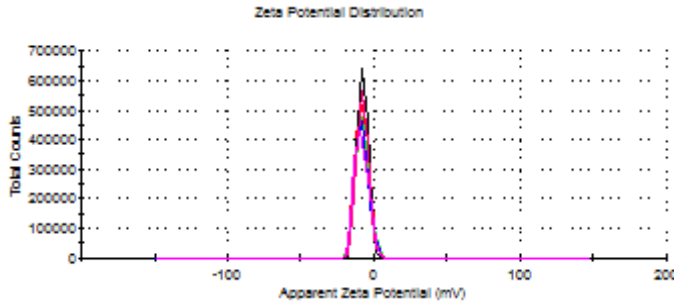
Yöntem 4.2.6.10' da anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun partikül büyüklüğü incelenmiştir. Partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksleri Tablo 52' de gösterilmiştir. Bu formülasyona etkin madde içermeyen damlacık boyutu grafiği Şekil 42, etkin madde içeren formülasyonunun damlacık boyutu grafiği Şekil 43'de gösterilmiştir.

Tablo 52: F3 SMEDDS formülasyonuna ait partikül boyut (dnm) ve PDI değerleri

Formülasyon	Partikül boyutu \pm SS	PDI \pm SS
Etkin madde içermeyen SMEDD	106.73 \pm 1.11	0.436 \pm 0.08
Etkin madde içeren SMEDD	112.36 \pm 0.58	0.426 \pm 0.05

5.1.6.11 *SMEDD Formülasyonunun Zeta Potansiyel Bulguları*

Yöntem 4.2.6.11' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun zeta potansiyel ölçümü gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel değeri “-7.83” mV olarak bulunmuştur (n=6). Zeta potansiyel bulgularına ait grafik Şekil 44' de gösterilmiştir.



Şekil 44:F3 SMEDD formülasyonunun distile su ortamında zeta potansiyel grafiği

5.1.6.12 *SMEDD Formülasyonunun % Geçirgenlik Bulgusu*

Yöntem 4.2.6.12' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun % geçirgenlik denemesi gerçekleştirilmiştir. SMEDD formülasyonlarında formülasyon 100 kat deiyonize su ile seyreltildiğinde berrak bir yapıya sahipse yaklaşık %100 geçirgenliğe ulaşmış demektir (197). Türbidimetri ile gerçekleştirilen çalışmada kör olarak kullanılan suya karşılık seyreltilen formülasyonun geçirgenliği %96.2 olarak bulunmuştur.

5.1.6.13 *SMEDD Formülasyonunun Bulanıklık Bulgusu*

Yöntem 4.2.6.13' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun bulanıklık denemesi gerçekleştirilmiştir. Bulanıklık noktası SMEDD formülasyonlarında başarılı stabil bir mikroemülsiyon elde etmede önemli bir parametredir. Bulanıklık noktasından daha yüksek sıcaklıkta dönüşümsüz faz ayrışması gözlenir ve etkin madde absorpsiyonu azalır. Bu nedenle mide bağırsak yolu boyunca faz ayrışmasının önüne geçmek için bulanıklık noktasının 37°C den yüksek olmalıdır (197). F3 SMEDD formülasyonunun bulanıklık noktası 75°C olarak bulunmuştur.

Tablo 53: SMEDDS formülasyonunun elektriksel iletkenliği, vizkozite, pH, refraktif indisi, dansite ölçümüne ait veriler (t=0 anında)

	Elektriksel iletkenlik	Vizkozite (cP)	pH	Refraktif indisi	Dansite (gr/mL)
F3	69 µs/cm	10.15	5.1	1.512	0.122

5.1.6.14 *SMEDD Formülasyonunun İçerik Miktarı Bulgusu*

Yöntem 4.2.6.14'de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun içerik miktarı HPLC ile analiz edilmiştir. Bulunan miktarlar % olarak Tablo 54'de verilmiştir.

Tablo 54: SMEDD formülasyonlarının % içerik miktarları

	Deneysel elde edilen AtrCa miktarı (mg/mL)	Formülasyonda teorik madde miktarı (mg/mL)	% AtrCa içerik miktarı
1.	0.0099	0.01	99
2.	0.0098	0.01	98
3.	0.010	0.01	100
4.	0.0103	0.01	103
5.	0.011	0.01	110
6.	0.0099	0.01	99
Ortalama	0.01015	0.01	101.5
S.S	0.0004	-	4.5
%RSS	4.43	-	4.43

5.1.6.15 *SMEDDS Formülasyonunun Stabilité Çalışmaları*

Yöntem 4.2.6.15' de anlatıldığı şekilde F3 SMEDDS formülasyonunun stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan SMEDDS formülasyonu, 25 ± 2 °C %60 ± 5 ve 40 ± 2 °C %75 ± 5'de altı ay boyunca ağız sıkı kapalı kaptaki saklandı. Formülasyonlar fiziksel görünümü, bulanıklık ve faz ayrışması, elektriksel iletkenliği, pH ve damlacık büyüklüğü gibi özellikleri başlangıçta, üçüncü ve altıncı aylarda incelendi. Başlangıçta (t=0 anında), üçüncü, altıncı aylarda iki sıcaklıkta da tüm

formülasyonlarda fiziksel görünüş, bulanıklık ve faz ayrışması gözlenmedi. 6. ayın sonunda her iki sıcaklıkta etkin madde içeriğinde anlamlı bir değişme olmamıştır (Tablo 54).

Tablo 55: SMEDD formülasyonunun stabilite sonuçları

Ölçülen parametre	25 ± 5°C %	40 ± 5°C %	25 ± 5°C %	40 ± 5°C %	25 ± 5°C %	40 ± 5°C %
	60± 5	75± 5	60± 5	75± 5	60± 5	75± 5
	0. ay		3. ay		6. ay	
pH	5.12 ±0.05	5.13±0.02	5.13±0.037	5.13±0.05	5.12±0.12	5.12±0.016
Refraktif indeks	1.512±0.003	1.512±0.002	1.513±0.0012	1.513±0.002	1.513±0.003	1.512±0.002
Elektriksel iletkenlik (µs)	69±0.01	69±0.01	68±0.027	68±0.05	69±0.03	69±0.02
Dansite (g/mL)	0.122±0.0001	0.123±0.0003	0.123±0.0002	0.122±0.0001	0.122±0.0003	0.123±0.0003
Damlacık boyutu (nm)	112.36±4.5	112.36±5.31	111.98±4.5	119.7±7.5	112.4±9.74	112.37±6.7
Viskozite (cP)	10.15±0.3	10.12±0.10	10.11±0.210	10.14±0.4	10.13±0.2	10.13±0.4

5.1.7 Pellet Formülasyonu Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular

5.1.7.1 Pellet Formülasyonları Oluşturmak için Geliştirilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarına Ait Bulgular

5.1.7.1.1 YYEM İçermeyen Mikroemülsiyon Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.7.3' de anlatıldığı şekilde YYEM içermeyen formülasyonlara ait çözünürlük değerleri Tablo 56' da verilmiştir.

Tablo 56: YYEM içermeyen mikroemülsiyonlarda çözünürlük çalışması

Formülasyon	Absorbans	Konsantrasyon	Çözünürlük(mg/mL)
F18	1.595	0.076	0.726
F19	1.849	0.088	0.88
F20	0.371	0.02	0.2
F21	0.324	0.0179	0.179

5.1.7.1.2 YYEM İçeren Formülasyonların Çözünürlüklerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.7.5' de anlatıldığı gibi YYEM olarak seçilen transkutol ve 1-metil prolidon içeren formülasyonlara ait çözünürlük değerleri Tablo 57' de verilmiştir.

Tablo 57: YYEM içeren mikroemülsiyonlarda çözünürlük çalışması

Formülasyon	Absorbans	Konsantrasyon	Çözünürlük (mg/mL)
F22-T	0.852	0.042	4.2
F23-MP	0.928	0.0459	4.59
F24-T	0.854	0.0425	4.25
F25-MP	0.875	0.043	4.3

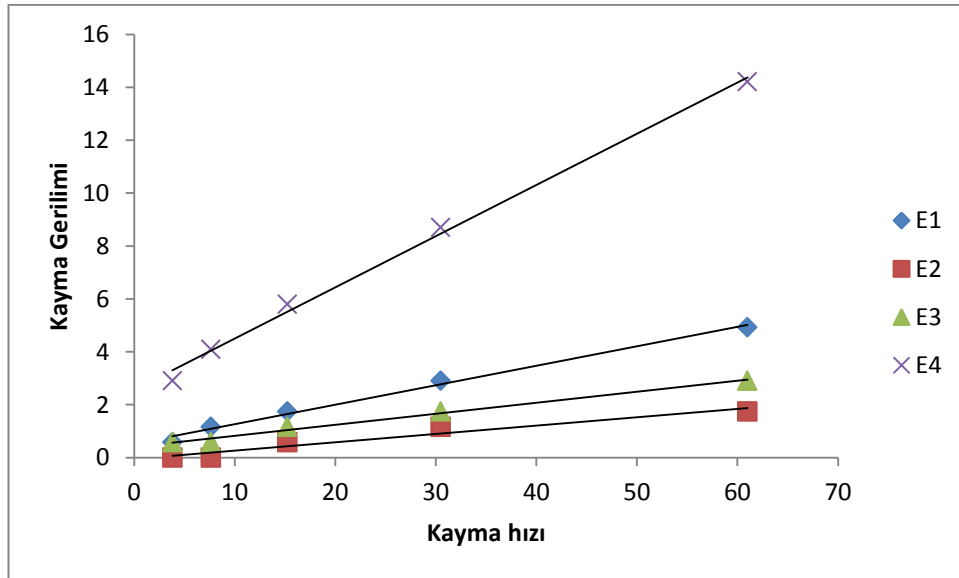
5.1.7.1.3 Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

5.1.7.1.3.1 Mikroemülsiyon Tipinin Belirlenmesi

Yöntem 4.2.7.7.1' de anlatıldığı şekilde E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının tipinin belirlenmesi adına iletkenlik testi yapılmıştır. E5 formülasyonu iletken olmayıp su/yağ tipinde bulunmuştur.

5.1.7.1.3.2 Mikroemülsiyonların Viskozite Ölçümleri

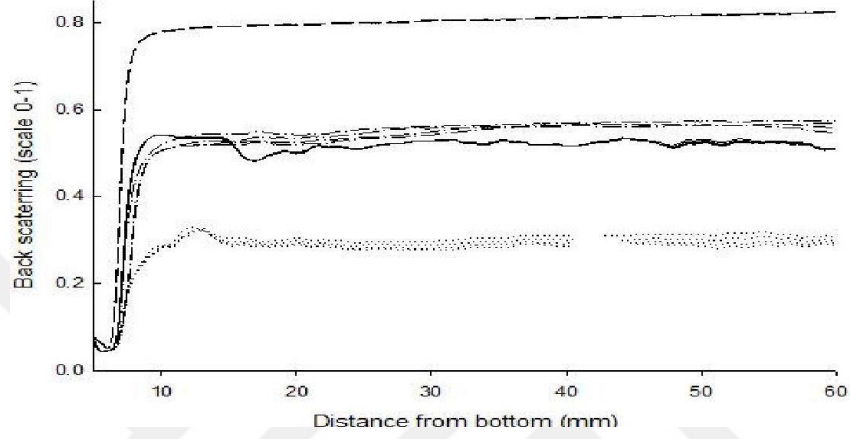
Yöntem 4.2.7.7.2' de anlatıldığı şekilde E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının viskoziteleri ölçülmüştür. Mikroemülsiyonların kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği Şekil 45' de gösterilmiştir.



Şekil 45: Mikroemülsiyonların kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

5.1.7.1.3.3 Mikroemülsiyonların Bulanıklık Ölçümü

Yöntem 4.2.7.7.3' de anlatıldığı şekilde E1, E2, E3, E4 emülsiyonlarının bulanıklık (türbidimetrik) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm emülsiyon formülasyonlarının belirtilen şartlarda stabil olduğu gözlenmiş ve grafikleri Şekil 46' da gösterilmiştir.



Şekil 46: Mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilite değerlerinin gözlenmesi

5.1.7.1.4 Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesine Ait Bulgular

5.1.7.1.4.1 %60 Oranında Yağ/ YEM/YYEM İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonundan Pellet Formülasyonu Eldesine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.7.8.1' de anlatıldığı şekilde P1, P2, P3, P4 olarak adlandırılan pellet formülasyonları oluşturulmuştur. Aynı miktarda katı faza mL sinde 50 mg AtrCa bulunan emülsiyon formülasyonları yüklenmiş ve pellet oluşturmak için sarfedilen miktarlar Tablo 58' de gösterilmiştir.

Tablo 58: Pellet oluşturmak için sarfedilen emülsiyon miktarları

Pellet ismi	P1	P2	P3	P4
Sarfedilen mikroemülsiyon miktarı	40 mL	42 mL	40 mL	40 mL

5.1.7.1.5 Pelletlerde Yapılan Fizikokimyasal Analizlere Ait Bulgular

5.1.7.1.5.1 Pelletlerin Yoğunluk Analizi Bulguları

Yöntem 4.2.7.9.1' de anlatıldığı şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu P1, P2, P3 ve P4 pelletlerine ait yoğunluk değerleri Tablo 59' de verilmiştir.

Tablo 59: Pelletlerin yoğunlukları

Pellet ismi	Ağırlık (g)	Yoğunluk (g/cc)
P 1	2.1351	1.2758
P 2	2.2488	1.4086
P 3	2.2514	1.3123
P 4	2.2500	1.3414

5.1.7.1.5.2 Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite Değerleri Sonuçları

Yöntem 4.2.7.9.2' de anlatıldığı şekilde pelletlerin her birinin Küme dansite ve sıkıştırılmış dansitesinin ölçümünden hareketle Hausner oranları ve Carr indeks değerleri Tablo 60' de verilmiştir. Bulunan Hausner oran ve Carr indeks değerlerine göre pelletlerin akışlarının mükemmelere yakın olduğu söylenebilmektedir.

Tablo 60: Pelletlere ait Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite, Hausner Oran ve Carr İndeks değerleri

Pellet İsmi	Küme dansite	Sıkıştırılmış dansite	Hausner oranı	Carr İndeks (%)
P 1	0.664	0.726	1.09	8.5
P 2	0.585	0.654	1.11	10.5
P 3	0.722	0.77	1.066	6.23
P 4	0.676	0.710	1.05	4.788

5.1.7.1.5.3 *Friabilite Analizi Sonuçları*

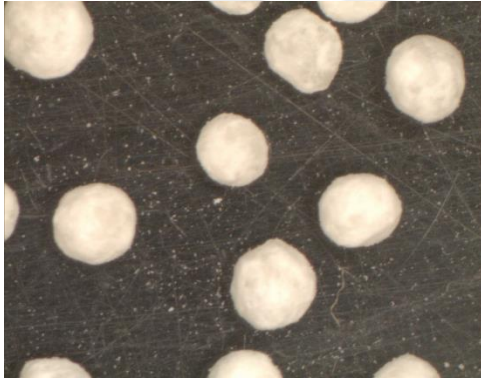
Yöntem 4.2.7.9.3' de anlatıldığı şekilde P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinde friabilite analizleri gerçekleştirilmiştir. Friabilite sonuçları Tablo 61' de verilmiştir.

Tablo 61: Pelletlere ait % Friabilite değerleri

Pellet İsmi	İlk ağırlık	Son ağırlık	% Friabilite değerleri
P 1	2.995	2.878	3.90
P 2	2.998	2.409	19.64
P 3	2.994	2.955	1.30
P 4	2.996	2.5	16.55

5.1.7.1.5.4 *Pelletlerin Mikroskop Görüntüsü Bulguları*

Yöntem 4.2.7.9.4' de anlatıldığı şekilde pelletlerin partikül şekillerinin mikroskop görüntüsü alınmıştır. Alınan görüntüler P1 pelleti için Şekil 47' de, P2 pelleti için Şekil 48' de, P3 pelleti için Şekil 49' da, P4 pelleti için Şekil 50' de gösterilmiştir.



Şekil 47: P1 pelletine ait mikroskop görüntüsü (Olympus U-SPJ 40 x 0.65)



Şekil 48: P2 pelletine ait mikroskop görüntüsü (Olympus U-SPJ 40 x 0.65)



Şekil 49: P3 pelletine ait mikroskop görüntüsü (Olympus U-SPJ 40 x 0.65)



Şekil 50: P4 pelletine ait mikroskop görüntüsü (Olympus U-SPJ 40 x 0.65)

5.1.7.1.5.5 *Pelletlerin Titreşimli Elek Testi Bulguları*

Yöntem 4.2.7.9.5' de anlatıldığı şekilde pelletlerin boyut analizleri gerçekleştirilmiştir. Verilen titreşim sonunda; 1200-1700 μm , 850-1200 μm , 600-850 μm , 425-600 μm , 300-425 μm , 121-300 μm , 150-212 μm aralığında bulunan pelletlerin ağırlık, % ağırlık ve % toplanan değerleri P1 pelleti için Tablo 62' de, P2 pelleti için Tablo 63' da, P3 pelleti için Tablo 64' de ve P4 pelleti için Tablo 65' de verilmiştir.

Tablo 62: P1 pelletlerinin boyut dağılımı

Boyut dağılımı (μm)	Ağırlık (g)	% Ağırlık	% Toplanan miktar
1200-1700	2.31	9.94	9.94
850-1200	19.52	84.02	93.96
600-850	1.27	5.467	99.427
425-600	0.09	0.387	99.814
300-425	0.01	0.043	99.857
121-300	0.01	0.043	99.9
150-212	-	-	99.9

Tablo 63: P2 pelletlerinin boyut dağılımı

Boyut dağılımı (μm)	Ağırlık (g)	% Ağırlık	% Toplanan miktar
1200-1700	2.31	9.94	9.94
850-1200	19.52	84.02	95.85
600-850	1.27	5.467	95.13
425-600	0.09	0.387	95.282
300-425	0.01	0.043	95.33
121-300	0.01	0.043	99,9
150-212	-	-	99.9

Tablo 64: P3 pelletlerinin boyut dağılımı

Boyut dağılımı (μm)	Ağırlık (g)	% Ağırlık	% Toplanan miktar
1200-1700	6.01	20.75	9.94
850-1200	21.02	72.582	93.33563
600-850	1.76	6.077	99.41
425-600	0.15	0.517	99.93
300-425	0.02	0.069	100
121-300	-	-	100
150-212	-	-	100

Tablo 65: P4 pelletlerinin boyut dağılımı

Boyut dağılımı (μm)	Ağırlık (g)	% Ağırlık	% Toplanan miktar
1200-1700	2.49	8.758	8.75
850-1200	23.67	83.25	92.01
600-850	2.11	7.421	99.43
425-600	0.15	0.527	99.96
300-425	0.01	0.035	100
121-300	-	0.043	99.9
150-212	-	-	99.9

5.1.7.2 *Pellet Formülasyonlarının Emülsifikasyon Zamanı ve Damlacık (Partikül) Büyüklüğü Analizi Bulguları*

Yöntem 4.2.9.6'da anlatıldığı gibi P3 ve P4 pellet formülasyonlarının emülsifikasyon zamanı ve damlacık büyüklüğü analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki

formülasyonunda emülsifikasyon zamanının 15 saniyeden kısa olduğu gözlenmiştir. Bu ortamdaki damlacık büyüklüğü analizler bulguları ise Tablo 66'da verilmiştir.

Tablo 66: Pellet formülasyonlarının damlacık boyutu analiz bulguları

Formülasyon	Damlacık boyutu \pm SS	Pdl \pm SS
P3 pellet	200.8 \pm 10	0.563 \pm 0.05
P4 pellet	195.8 \pm 10	0.465 \pm 0.05

5.1.7.3 Pellet Formülasyonlarının Miktar Tayinlerine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.7.9.7'de anlatıldığı şekilde P3 ve P4 pellet formülasyonlarının içerik miktarı altışar ayrı pellet formülasyonunda ölçülmüş ve sonuçları HPLC cihazı ile bulunmuştur. Bulunan miktarlar % olarak P3 pelleti için Tablo 67' de, P4 pelleti için Tablo 68' de verilmiştir.

Tablo 67: P3 pellet formülasyonunun % içerik miktarları

	Deneysel elde edilen AtrCa miktarı (mg/mL)	Formülasyonda teorik madde miktarı (mg/mL)	% AtrCa içerik miktarı
1.	0.0098	0.01	98
2.	0.0099	0.01	99
3.	0.011	0.01	110
4.	0.0123	0.01	123
5.	0.011	0.01	110
6.	0.0096	0.01	96
Ortalama	0.0106	0.01	106
S.S	0.0010	-	10,33
%RSS	9.74	-	9,74

Tablo 68: P4 pellet formülasyonunun % içerik miktarları

	Deneysel elde edilen AtrCa miktarı (mg/mL)	Formülasyonda teorik madde miktarı (mg/mL)	% AtrCa içerik miktarı
1.	0.0096	0.01	96
2.	0.0098	0.01	98
3.	0.0103	0.01	103
4.	0.0098	0.01	98
5.	0.0106	0.01	106
6.	0.0099	0.01	99
Ortalama	0.01	0.01	100
S.S	0.0003	-	3.74
%RSS	3.74	-	3.74

5.1.7.3.1.1 *Pelletlerin Stabilitelerine Ait Bulgular*

Yöntem 4.2.7.9.8'de anlatıldığı şekilde P3 pellet formülasyonunun stabilitesinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan SMEDDS formülasyonu, 25 ± 2 °C %60 \pm 5 nem ve 40 ± 2 °C %75 \pm 5 nemde altı ay boyunca saklandı. Formülasyon pellet yoğunluğu, küme dansite sıkıştırılmış dansite, boyut analizi gibi özellikleri başlangıçta, üçüncü ve altıncı aylarda incelendi. Başlangıçta (t=0 anında), üçüncü, altıncı aylarda iki sıcaklıkta da yapılan stabilite sonuçları Tablo 55' de verilmiştir. 6. ayın sonunda her iki sıcaklıkta etkin madde içeriğinde anlamlı bir değişme olmamıştır (Tablo 67).

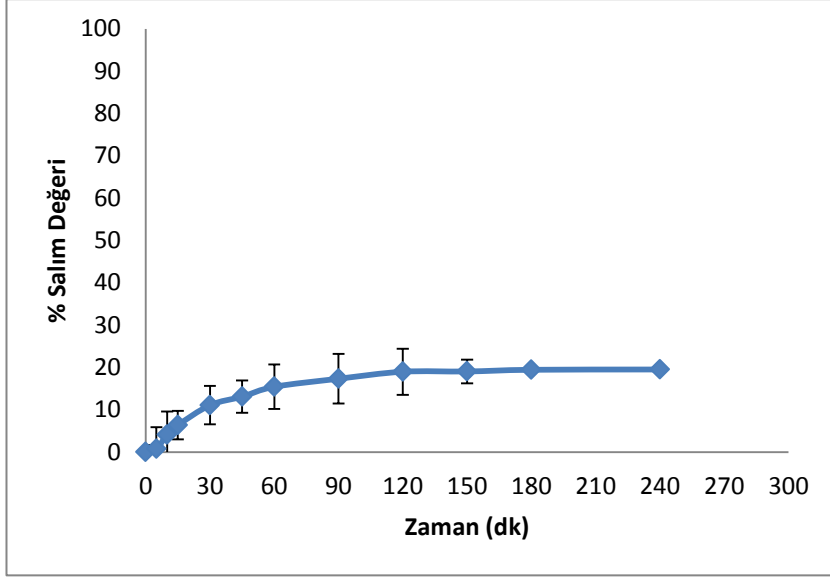
Tablo 69: P3 pellet formülasyonunun stabilite sonuçları

Ölçülen parametre	25 \pm 5°C %	40 \pm 5°C %	25 \pm 5°C %	40 \pm 5°C %	25 \pm 5°C %	40 \pm 5°C %
	60 \pm 5 (\pm SS)	75 \pm 5 (\pm SS)	60 \pm 5 (\pm SS)	75 \pm 5 (\pm SS)	60 \pm 5 (\pm SS)	75 \pm 5 (\pm SS)
	0. ay		3. ay		6. ay	
Pellet yoğunluğu	1.3123 \pm 0.05	1.3122 \pm 0.02	1.3121 \pm 0.04	1.3123 \pm 0.06	1.3122 \pm 0.14	1.3122 \pm 0.02
Küme dansite	0.722 \pm 0.001	0.722 \pm 0.002	0.721 \pm 0.001	0.723 \pm 0.002	0.724 \pm 0.003	0.722 \pm 0.002
Sıkıştırılmış dansite	0.77 \pm 0.01	0.75 \pm 0.01	0.76 \pm 0.02	0.77 \pm 0.05	0.76 \pm 0.03	0.77 \pm 0.02
Friabilite(%)	1.30 \pm 0.03	1.31 \pm 0.04	1.33 \pm 0.01	1.32 \pm 0.05	1.33 \pm 0.02	1.32 \pm 0.05
Boyut analizi(nm)	850-1200	850-1200	850-1200	850-1200	850-1200	850-1200

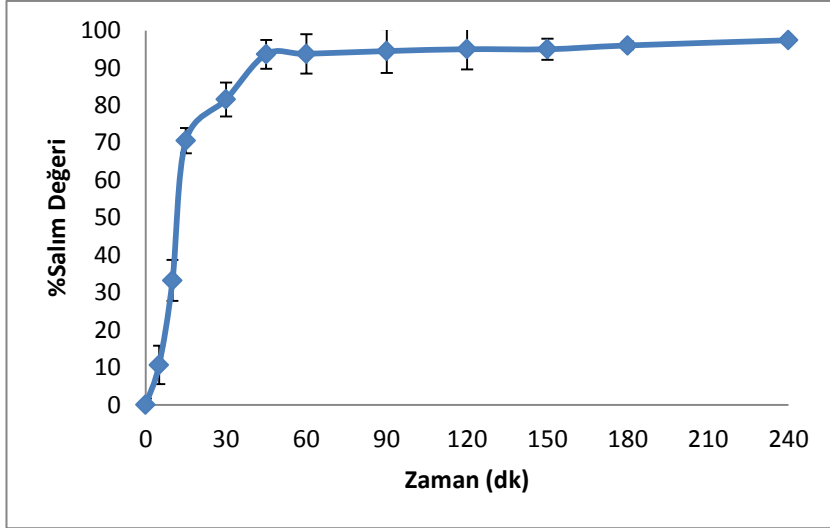
5.1.8 *İn vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular*

Yöntem 4.2.8'de anlatıldığı şekilde in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle etkin maddenin pH 1.2 ve pH 6.8 ortamlarında kapsüllü ve kapsülsüz salım çalışmaları yürütülmüştür. AtrCa' un pH:1.2 ortamında düşük çözünürlüğüne bağlı olarak, etkin olmadığı yapılan salım çalışması sonucu gözlemlenmiştir (Şekil 51).

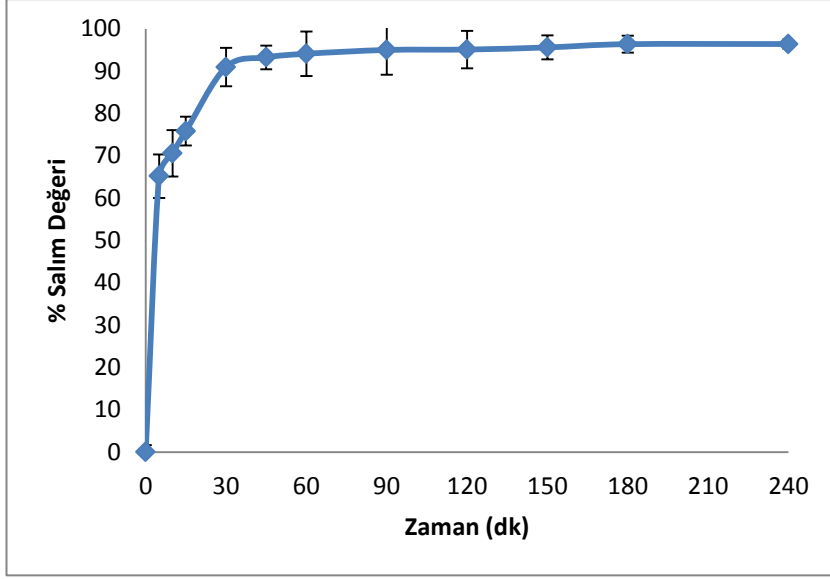
AtrCa etkin maddesinin çözünürlüğü pH 1.2 ortamında düşük olduğu ve FDA çözünürlük ortamını pH 6.8 olarak verdiği için geliştirilen formülasyonların in vitro testleri pH 6.8 ortamında yapılmıştır. Kapsüllü ve kapsülsüz sonuçlarda farklılık gözlenmediği için yalnızca kapsüllü salımlara ait sonuçlar verilmiş ve bu sonuçlar Şekil 52, Şekil 53, Şekil 55, Şekil 55 ve Şekil 56' da gösterilmiştir.



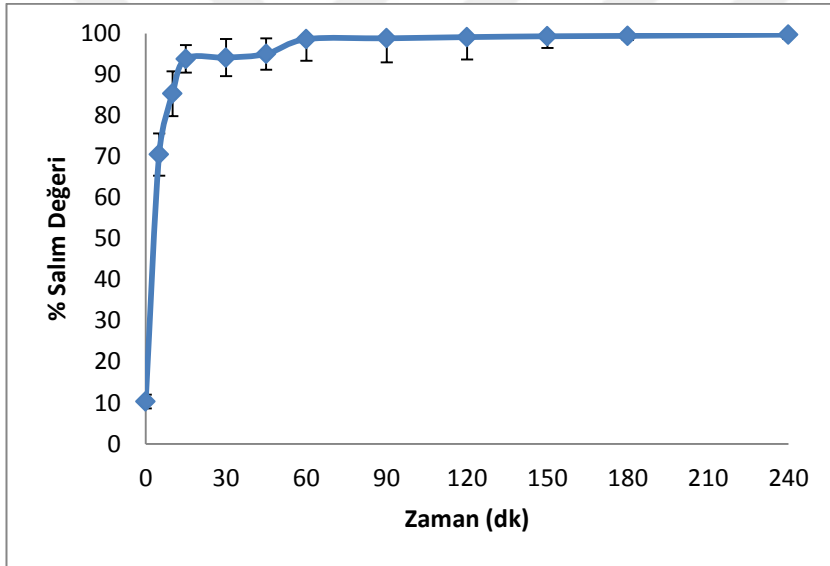
Şekil 51: pH 1.2 ortamında AtrCa' un kapsüllü salım değerleri (\pm SS)



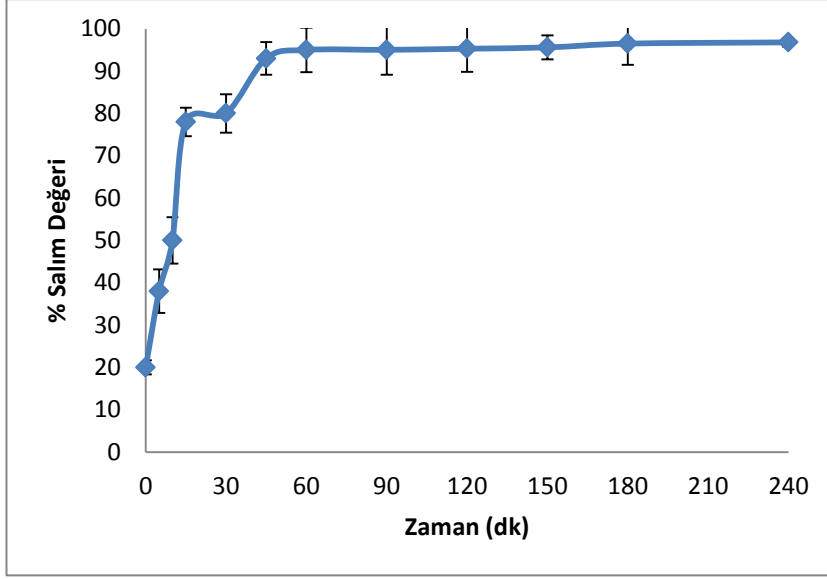
Şekil 52: pH 6.8 ortamında AtrCa' un kapsüllü salım değerleri (\pm SS)



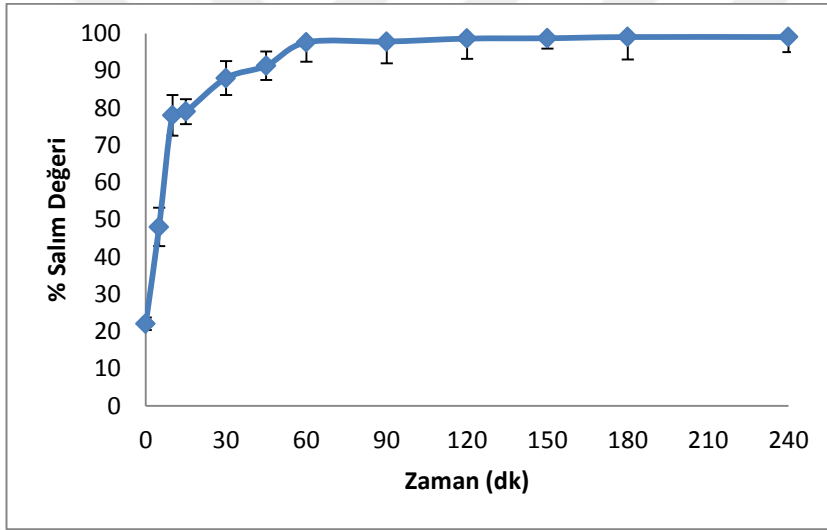
Şekil 53: Konvansiyonel tabletin pH 6.8 ortamında salım değerleri (\pm SS)



Şekil 54: F3 SMEDD formülasyonun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri (\pm SS)



Şekil 55: P3 Pellet formülasyonunun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri (\pm SS)



Şekil 56: P4 Pellet formülasyonunun pH 6.8 ortamında kapsüllü salım değerleri (\pm SS)

5.1.8.1 *In vitro* Salım Çalışmalarının Kinetik Değerlendirmesine Ait Bulgular

Konvansiyonel tablet, P3 ve P4 pelletleri ve SMEDD formülasyonunun in vitro salım çalışmalarının sonuçlarının sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi, Langenbucher eşitlikleri için yapılan uyum analizi Tablo 70'da verilmiştir.

Tablo 70: Formülasyonların kinetik değerlendirme bulguları

	Konvansiyonel Tablet	SMEDD	P3 pellet	P4 pellet
Sıracı derece	$y=0.5423x+66.73$	$y=0.9018x+56.84$	$y=1.1564x+34.43$	$y=0.9018x+56.84$
	$r^2=0.9005$	$r^2=0.4042$	$r^2=0.7772$	$r^2=0.6357$
	*26837.4	*26141.5	*10937	*18245.6
Birinci derece	$y=0.0352x+3.63$	$y=0.0546x+3.59$	$y=-0.047x+4.27$	$y=-0.05x+4.04$
	$r^2=0.9208$	$r^2=0.79989$	$r^2=0.9482$	$r^2=0.9269$
	*39.9464	*3186.05	*380.89	*807.66
Higuchi	$y=5.7217x+53.79$	$y=9.9396x+35.34$	$y=11.3285x+15.97$	$y=10.0392x+28.6$
	$r^2=0.9318$	$r^2=0.5961$	$r^2=0.9055$	$r^2=0.8092$
	*54.76	*2389.18	*477.85	*848.27
Langenbucher	$y=0.1434x-0.55$	$y=0.1664x-0.61$	$y=0.1425x-0.59$	$y=0.1463x+0.56$
	$r^2=0.9488$	$r^2=0.9592$	$r^2=0.8768$	$r^2=0.9398$
	*66.16	*105.45	*1145.13	*347.95

$$* \frac{\sum(Res)^2}{n-2}$$

5.1.9 İn vitro Permeabilite ve Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

5.1.9.1 Hücre Kültür Sistemleri ile İlgili Bulgular

5.1.9.1.1 Caco-2 Hücreleriyle Yapılan Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

5.1.9.1.1.1 Caco-2 Hücrelerinin Polikarbonat Filtre Üzerine Ekimine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.9.1.2' de anlatıldığı şekilde Caco-2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Elde edilen sayım sonuçları Tablo 71' de ve her bir kuyucukta olması gereken hücre sayısı ve besi yeri miktarı Tablo 72' de gösterilmiştir.

Tablo 71: Her bir kuyucuk için ekilecek olan hücrelerin sayımına ait sonuçlar

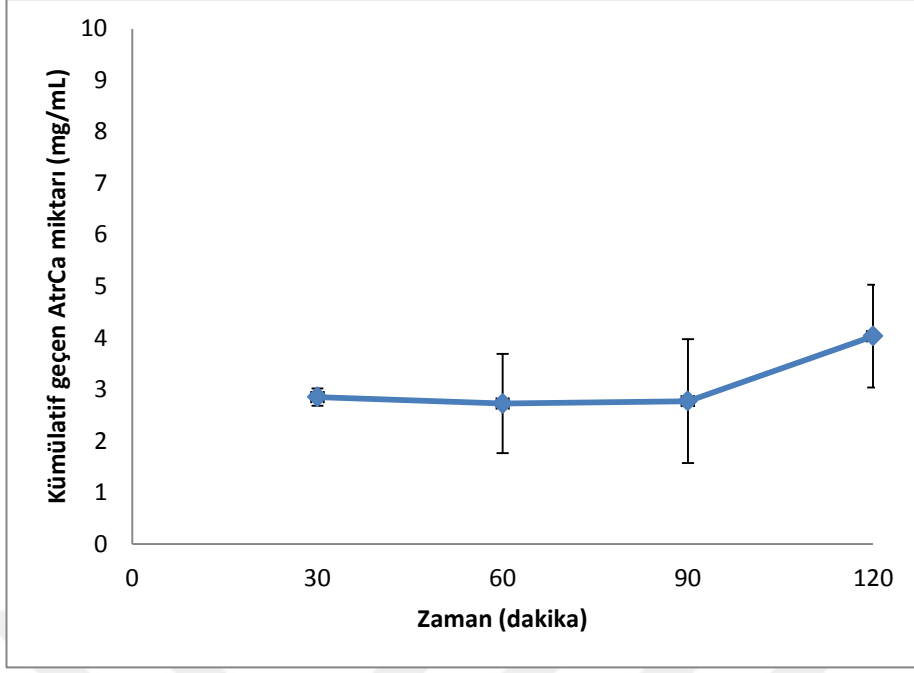
Hücre Sayımında Kullanılan Karelerdeki (1, 2, 3, 4) Hücre Sayıları				
	1. kare	2.kare	3.kare	4.kare
1. Sayım	160	193	185	189
2. Sayım	185	190	193	176
3. Sayım	168	165	190	185
4. Sayım	185	185	185	175
5. Sayım	179	180	179	182
Ort	175	183	186	181
SS	11.05	11.01	5.36	5.94

Tablo 72: Ekim sırasında alınacak hücre süspansiyonu ve besiyeri miktarı (mL)

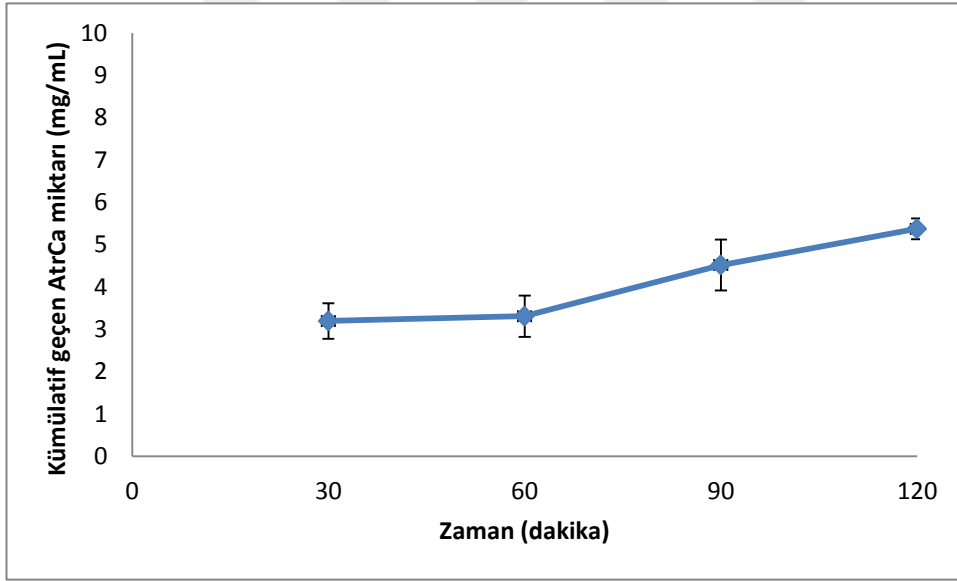
Ortalama hücre sayısı	Alınacak hücre süspansiyonu (mL)	Besiyeri miktarı (mL)
175	2.5	12.45
183	2.5	12.45
186	2.5	12.45
181	2.5	12.45

5.1.9.1.2 Atorvastatin Kalsiyumun Caco-2 Hücrelerinden Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

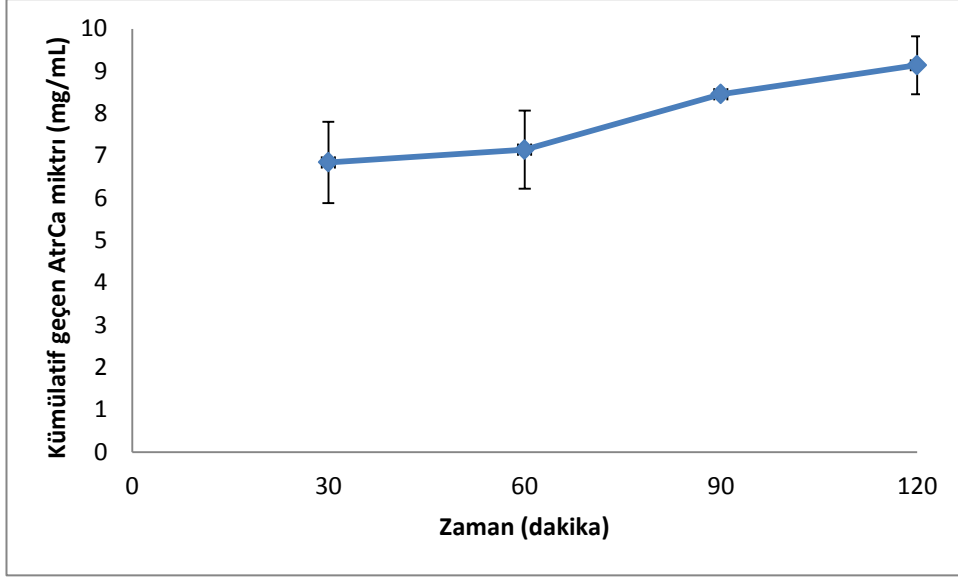
Yöntem 4.2.9.1.3'de anlatıldığı şekilde AtrCa'un geçiş çalışmaları yapılmıştır. Deneyler boyunca 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda örnekler alınıp HPLC ile analizi yapılmıştır. Caco-2 hücrelerinden AtrCa apikal yönden bazolateral yöne ve bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarının sonuçları Şekil 57-Şekil 64' de gösterilmiştir. Şekil 65 ve Şekil 66'da permeabilite değerleri her iki yön için karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu verilerin sonuçları Tablo 73'de verilmiştir. Effluks değerlerine ait grafik Şekil 67'da, verileri ise Tablo 74'de verilmiştir.



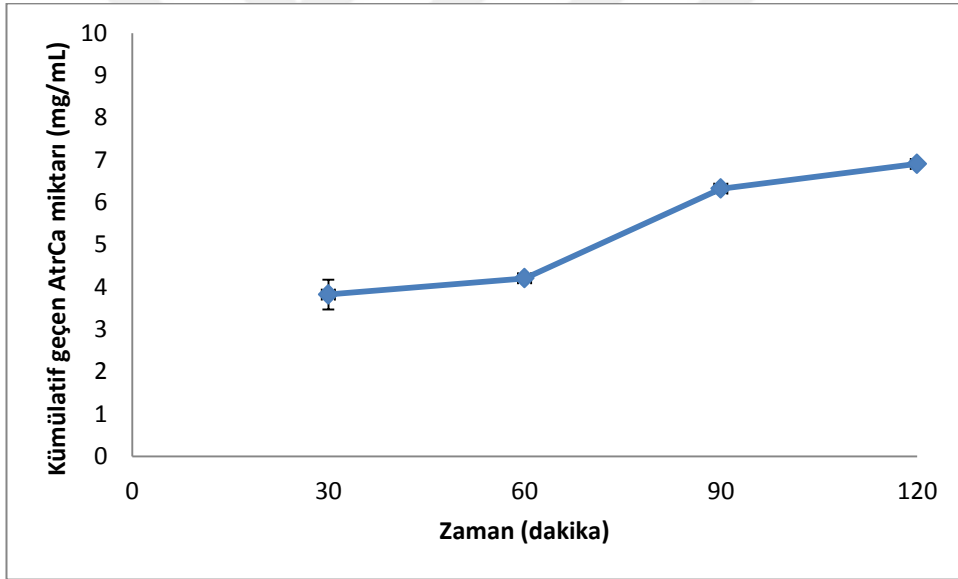
Şekil 57: 10 mg AtrCa' un apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



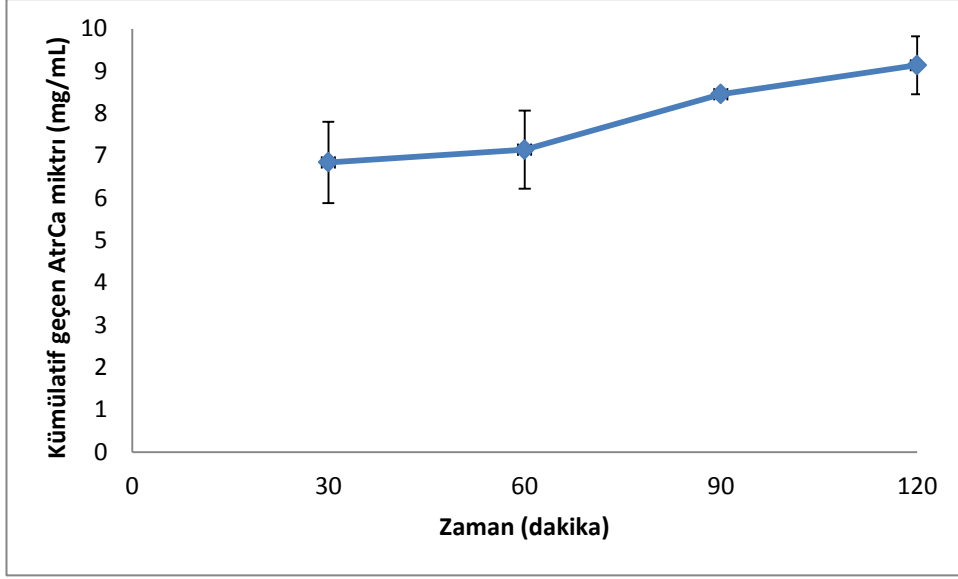
Şekil 58: 10 mg AtrCa' un bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



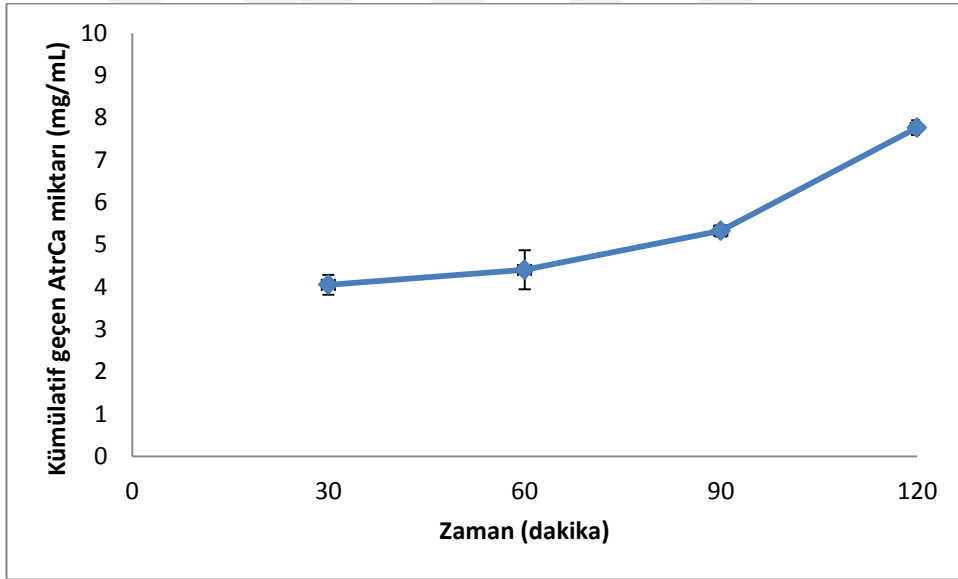
Şekil 59: 10 mg AtrCa' un F3-SMEDD formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



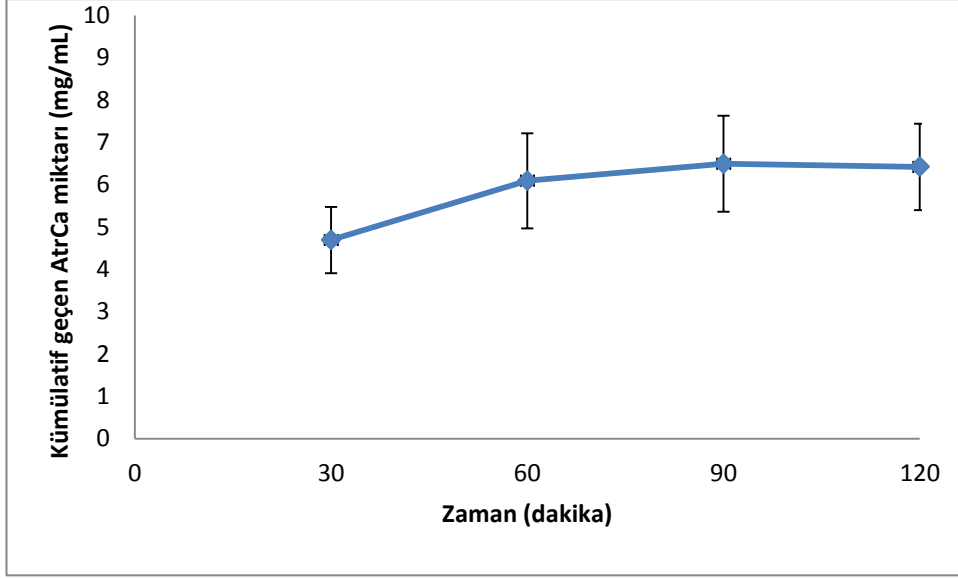
Şekil 60: 10 mg AtrCa' un F3-SMEDD formülasyonunun (F3) bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



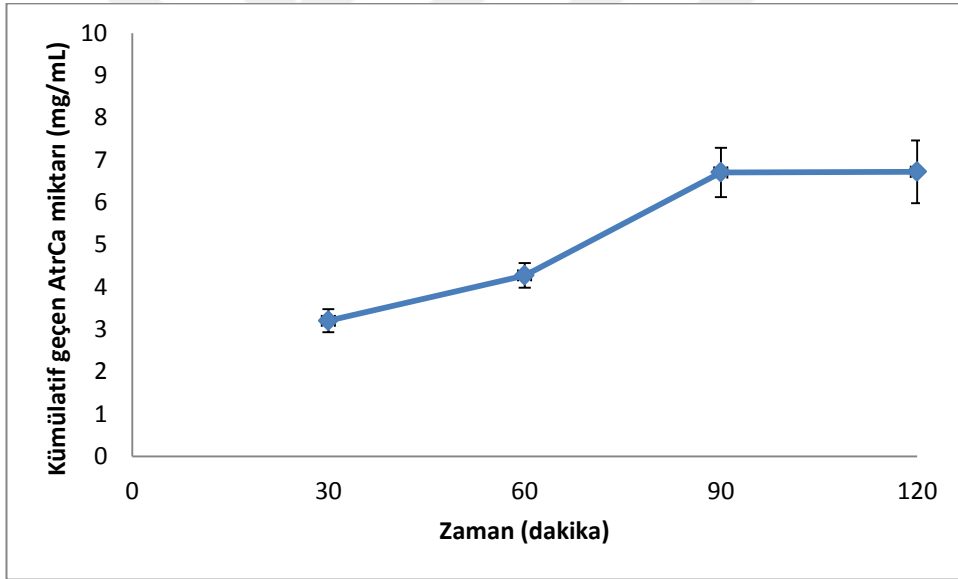
Şekil 61: 10 mg AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



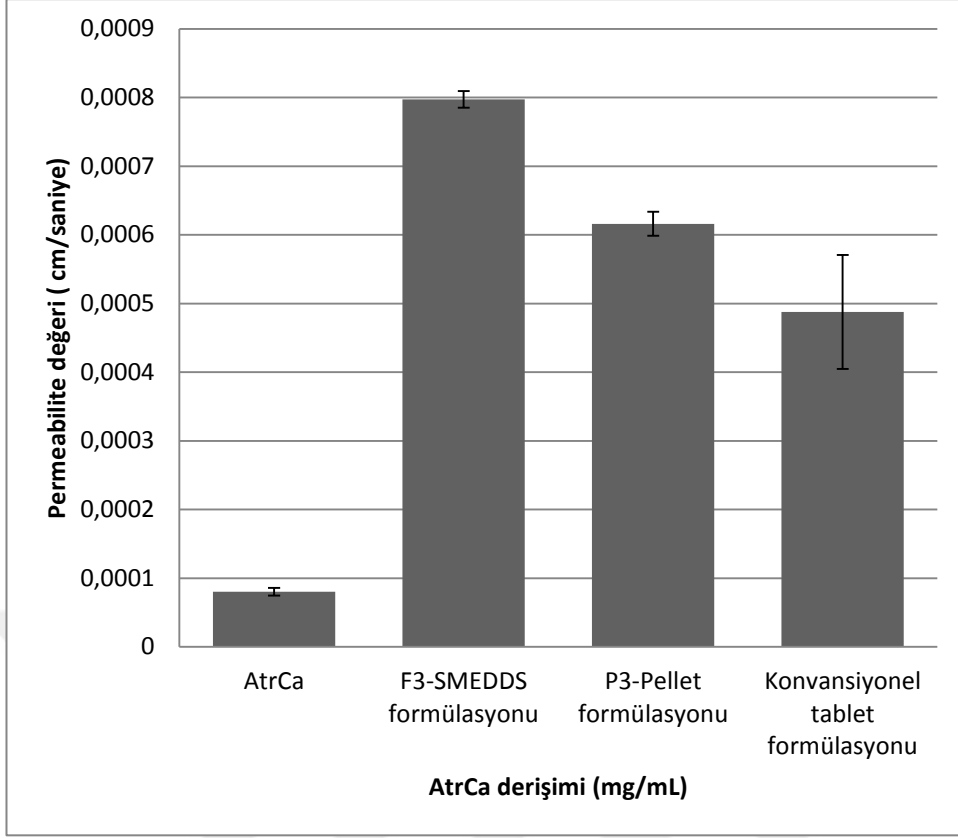
Şekil 62: 10 mg AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunun bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



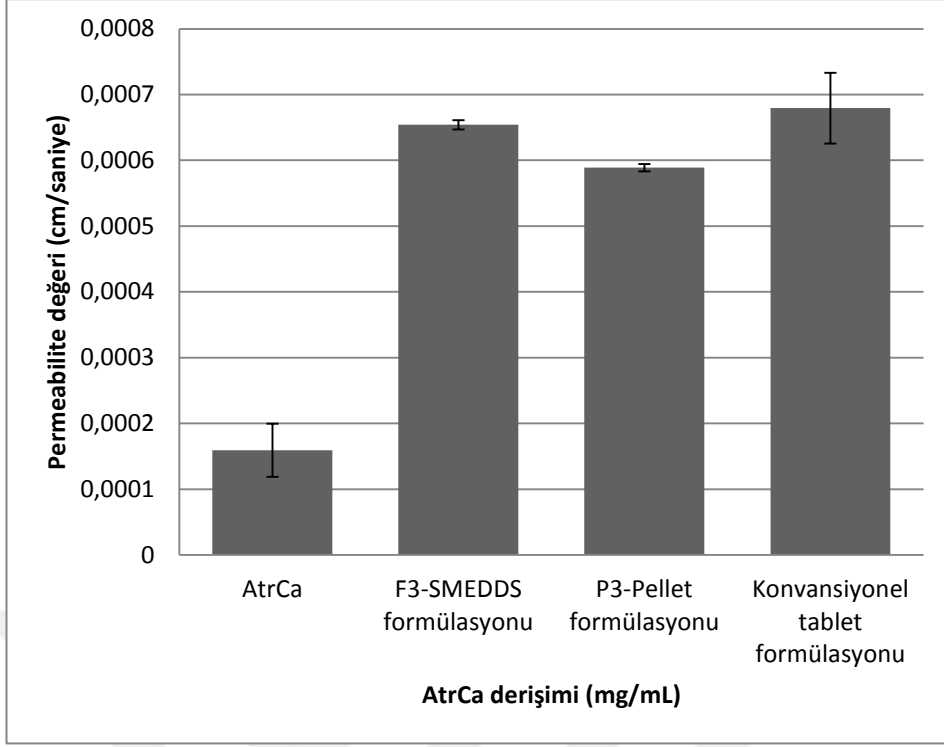
Şekil 63: 10 mg AtrCa' un Konvansiyonel tablet formülasyonunun apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



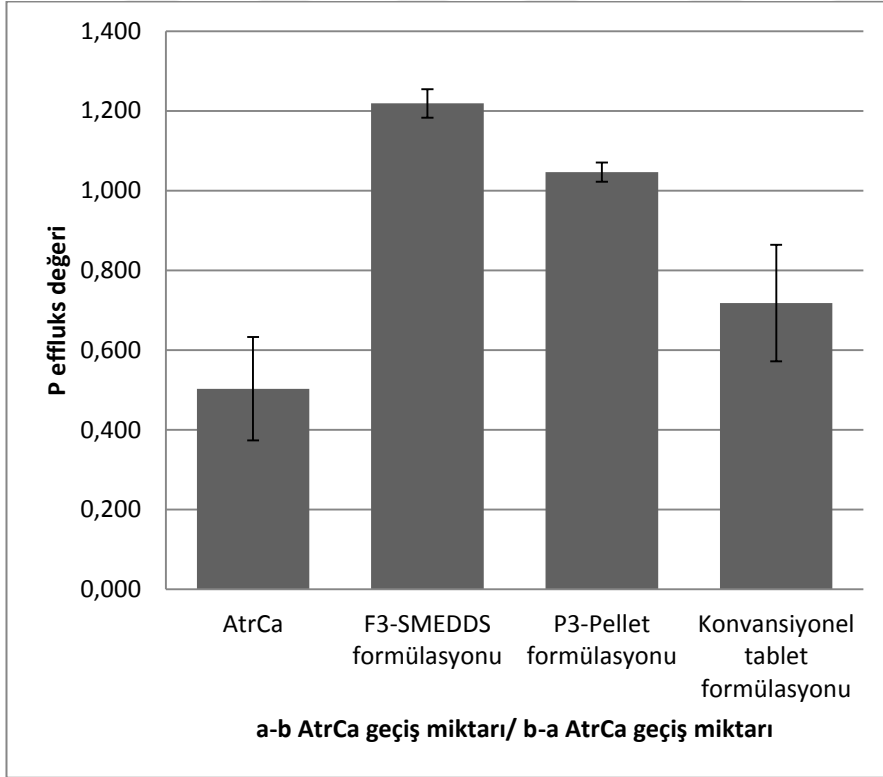
Şekil 64: 10 mg AtrCa' un Konvansiyonel tablet formülasyonunun bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



Şekil 65: Farklı formülasyonlara ait apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



Şekil 66: Farklı formülasyonlara ait bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait grafik (\pm SS)



Şekil 67: Farklı formülasyonlara ait Peffluks değerlerine ait grafik (\pm SS)

Tablo 73: AtrCa etkin maddesi ve tüm formülasyonlara ait permeabilite değerleri sonuçları (\pm SS)

	AtrCa(cm/s)	F3-SMEDD(cm/s)	P3-Pellet(cm/s)	Ticari formülasyon (cm/s)
P_{ab}	$8 \times 10^{-5} \pm 0.55 \times 10^{-5}$	$79.7 \times 10^{-5} \pm 0.12 \times 10^{-5}$	$61.60 \pm \times 10^{-5} \pm 0.172 \times 10^{-5}$	$48.78 \times 10^{-5} \pm 4.02 \times 10^{-5}$
P_{ba}	$15.93 \times 10^{-5} \pm 0.4 \times 10^{-5}$	$65.4 \times 10^{-5} \pm 0.71 \times 10^{-5}$	$58.9 \times 10^{-5} \pm 0.56 \times 10^{-5}$	$67.9 \times 10^{-5} \pm 0.537 \times 10^{-5}$

Tablo 74: Effluks değerlerine ait veriler (\pm SS)

	AtrCa	F3-SMEDD	P3-Pellet	Ticari formülasyon
Effluks	0.528 ± 0.129	1.219 ± 0.0358	1.046 ± 0.0238	0.720 ± 0.146

Tablo 75: AtrCa etkin maddesi ve farklı formülasyonlara ait apikal kısımdan bazolateral kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait veriler (n=3, \pm SS)

	A_0	A_M	A_{OH}	A_{120}
AtrCa	1.13 ± 0.05	0.56 ± 0.45	0.05 ± 0.06	3.95 ± 1.08
F3-SMEDDS Formülasyonu	1.60 ± 0.00	0.69 ± 0.37	0.04 ± 0.02	3.51 ± 0.34
P3-Pellet formülasyonu	1.52 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.58 ± 0.10	4.11 ± 0.19
Konvansiyonel Tablet Formülasyonu	1.9 ± 0.07	0.46 ± 0.88	0.52 ± 0.15	3.89 ± 1.25

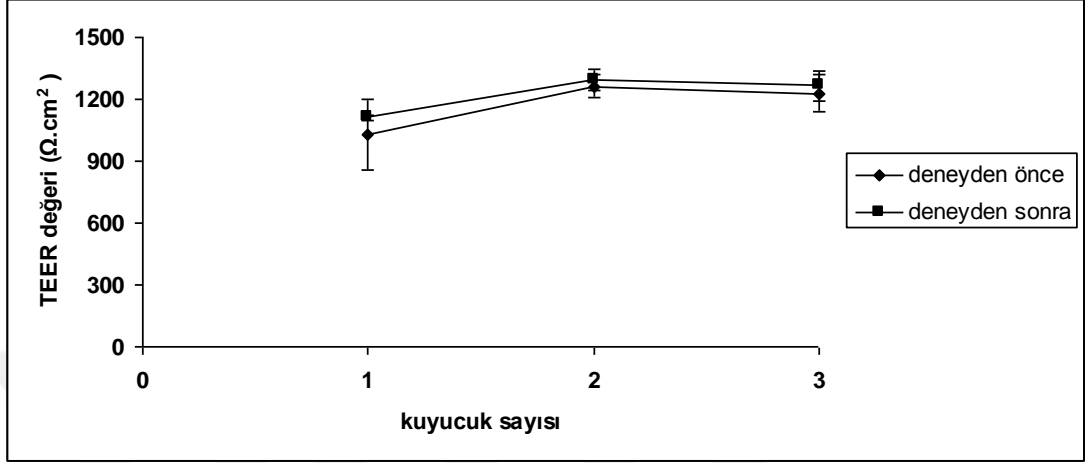
Tablo 76: AtrCa etkin maddesi ve farklı formülasyonlara ait bazolateral kısımdan apikal kısma doğru yapılan geçiş çalışmalarına ait veriler (n=3, \pm SS)

	A_0	A_M	A_{OH}	A_{120}
AtrCa	1.13 ± 0.06	1.85 ± 0.55	0.58 ± 0.15	2.85 ± 0.08
F3-SMEDDS Formülasyonu	1.55 ± 0.09	0.58 ± 0.15	0.28 ± 0.02	2.29 ± 0.34
P3-Pellet formülasyonu	1.64 ± 0.08	01.34 ± 0.08	0.45 ± 0.10	2.62 ± 0.19
Konvansiyonel Tablet Formülasyonu	1.76 ± 0.09	1.95 ± 0.73	0.61 ± 0.15	2.10 ± 1.25

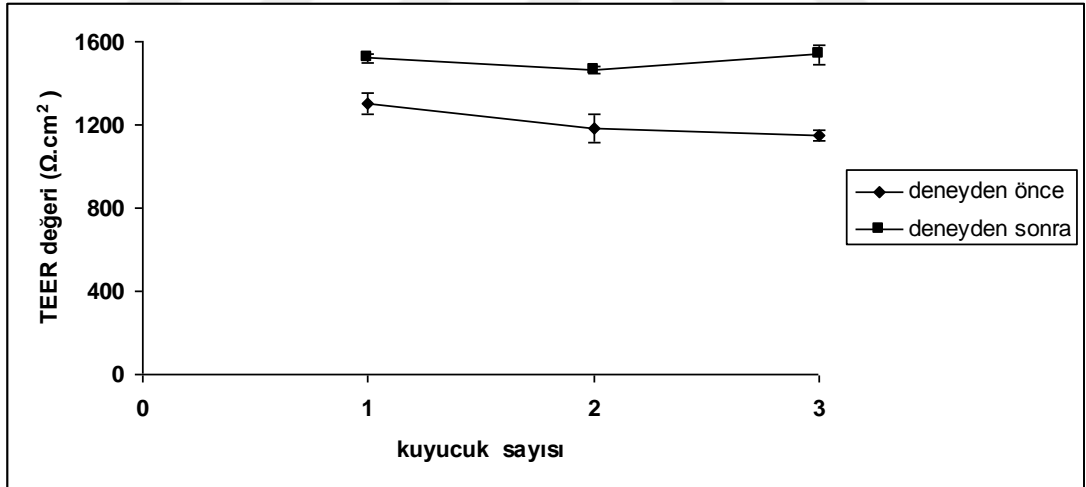
5.1.9.1.3 TEER (Transepitelyal elektrik rezistans) Değerinin Ölçülmesine Ait Bulgular

Yöntem 4.2.9.1.4' de anlatıldığı şekilde Caco-2 hücrelerinin bütünlüğünün tespitinde kullanılan TEER ölçümü yapılmıştır. Önce TEER değeri boş kuyucuklarda 3 farklı yönde voltmetre ile ölçülmüştür. Deneyde kullanılacak kültür kaplarının TEER değerleri yine bu üç yönde ölçülmüş ve en son deney bitiminde TEER değerleri ölçülüp iki ölçüm arasındaki fark grafiğe geçirilmiştir.

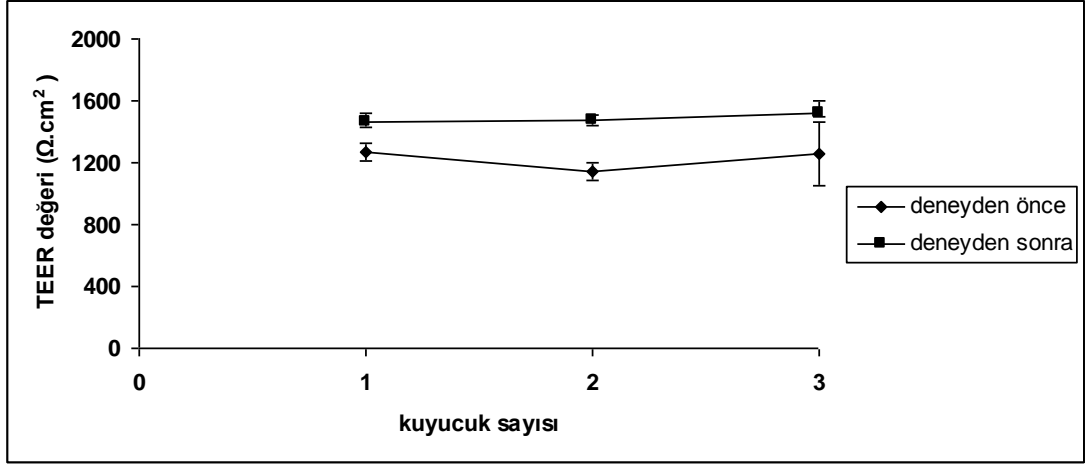
Caco-2 hücrelerinden AtrCa tek başına ve formülasyon çalışmaları varlığında yapılan geçiş çalışmaları sonucunda tüm TEER değerleri Şekil 68'den Şekil 75'e kadar gösterilmiştir. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra ölçülen TEER değerlerindeki % değişim Tablo 77 ve Tablo 78'da gösterilmiştir.



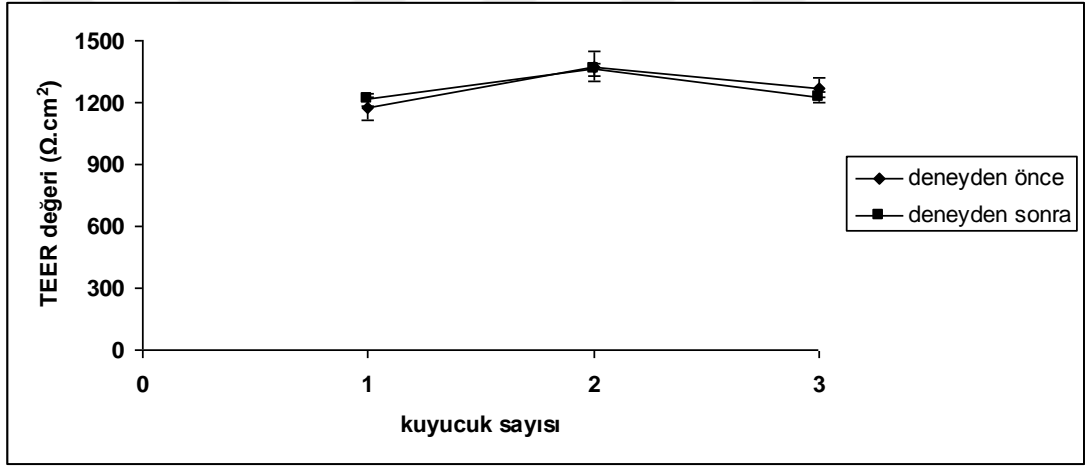
Şekil 68: 10mg/mL AtrCa etkin maddesinin apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)



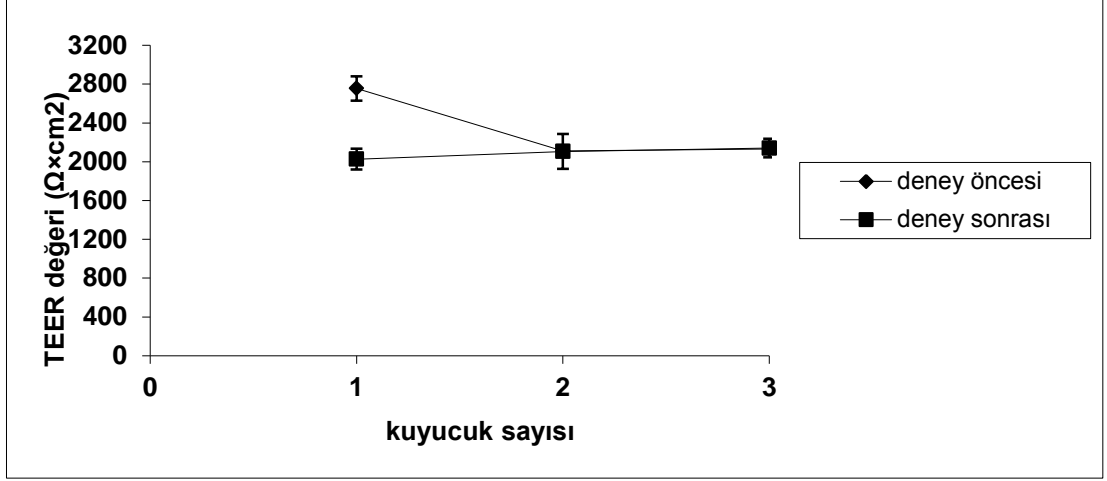
Şekil 69: 10mg/mL AtrCa etkin maddesinin bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)



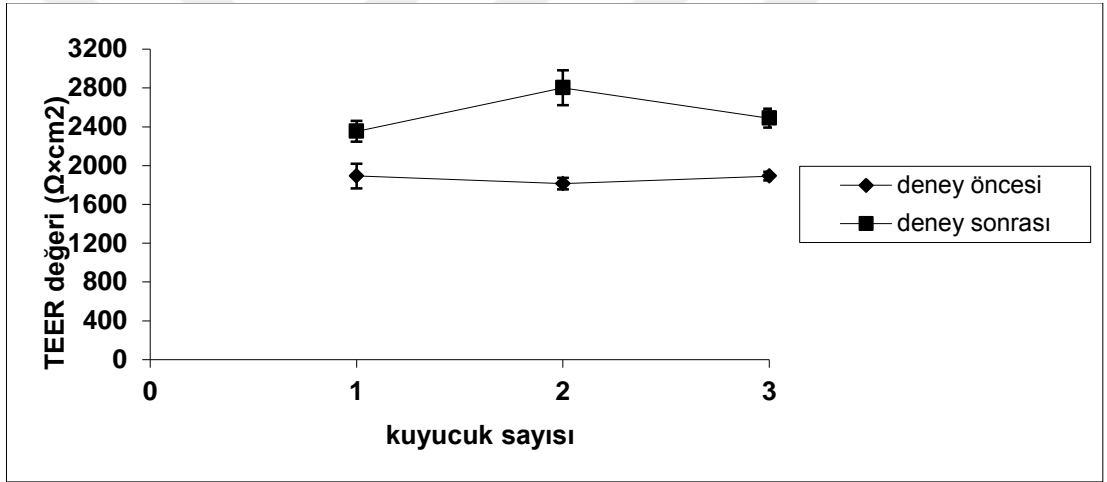
Şekil 70: 10mg/mL AtrCa' un F3-SMEDDS formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarıında deneşden önce ve deneşden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (\pm SS)



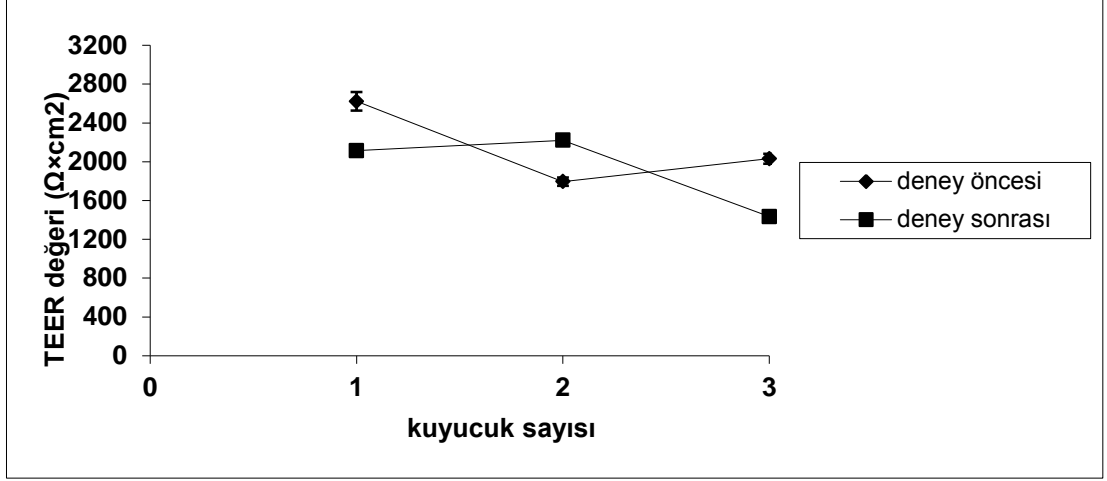
Şekil 71: 10mg/mL AtrCa' un F3-SMEDDS formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarıında deneşden önce ve deneşden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (\pm SS)



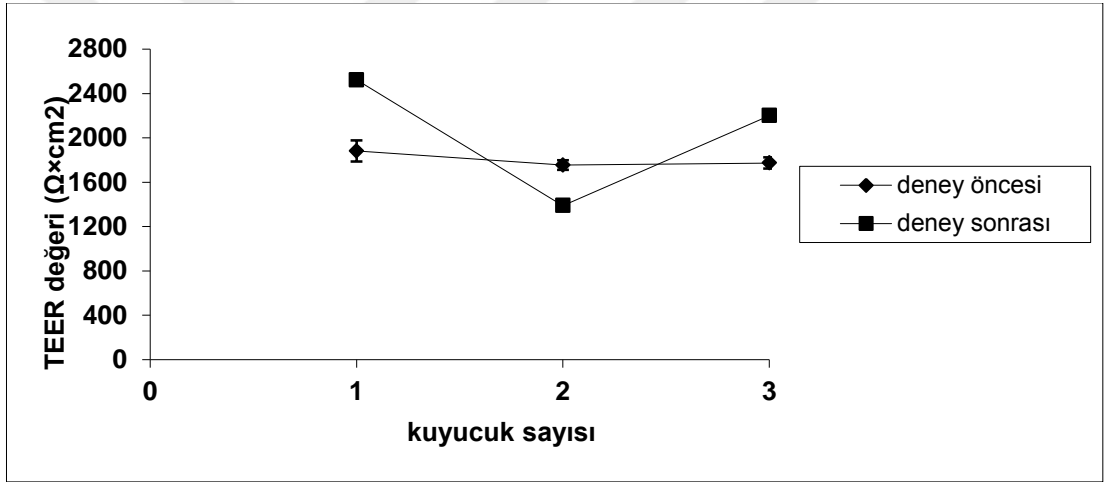
Şekil 72: 10mg/mL AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)



Şekil 73: 10mg/mL AtrCa' un P3-Pellet formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)



Şekil 74: 10mg/mL AtrCa' un konvansiyonel tablet formülasyonunda apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)



Şekil 75: 10mg/mL AtrCa' un konvansiyonel tablet formülasyonunda bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında deneyden önce ve deneyden sonra ölçülen TEER değerlerinin grafiği (±SS)

Tablo 77: Apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları boyunca hücre membranlarının TEER değerindeki % değişim

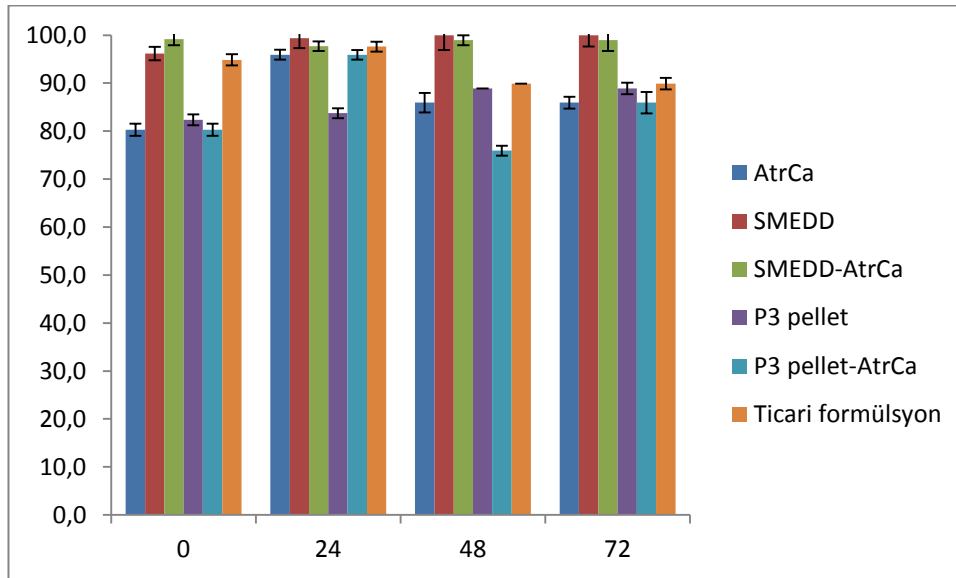
TEER değerindeki % değişim				
Kuyucuk sayısı	AtrCa	F3-SMEDDS	P3-Pellet	Konvansiyonel Tablet
1	3.828	15.92	12.58	18.05
2	1.018	16.73	1.31	17.55
3	3.744	12.78	0.67	15.78

Tablo 78: Bazolateral yönden Apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmaları boyunca hücre membranlarının TEER değerindeki % değişim

TEER değerindeki % değişim				
Kuyucuk sayısı	AtrCa	F3-SMEDDS	P3-Pellet	Konvansiyonel Tablet
1	17.3	20.49	19.43	21.27
2	28.205	19.92	23.79	18.71
3	21.047	17.04	18.80	18.84

5.1.9.1.4 Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 4.2.9.2' de anlatıldığı şekilde Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine geliştirilen formülasyon sistemlerinin etkisi ve sitotoksitesini incelemek amacıyla 1×10^4 hücre/mL konsantrasyondaki Caco-2 hücrelerinden 96 gözlü hücre kültürü kaplarına 100'er μ L ekildi. 24 saat sonunda 96 gözlü hücre kültürü kaplarındaki ortamlar uzaklaştırılarak sitotoksisite çalışmalarına başlandı. Hücre canlılığını test etmek için absorbans değerleri 238 nm'de ELISA mikroparka okuyuculu UV spektrofotometre (Thermo vario scan-FHA multiplate reader) ile okutulup değerlendirildi. Hücre canlılık % si hesaplanıp grafiğe geçirildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde Şekil 76' de gösterilmiştir.



Şekil 76: Hazırlanan AtrCa içermeyen ve içeren formülasyonlarına ait % canlılık grafiği

6 TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1 Genel Değerlendirme

Tezimizde model etkin madde olarak kullanılan AtrCa, BSS 2 sınıfı bir etkin madde olup düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite göstermektedir. Bu etkin maddenin biyoyararlanımı %14'tür (187, 188). Son yıllarda düşük çözünürlük gösteren etkin maddelerin formülasyon geliştirme çalışmalarında artış olmuştur. Bu amaçla birçok yeni ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmıştır. Fakat AtrCa etkin maddesinin çözünürlüğünü arttıracı formülasyon çalışmaları oldukça sınırlıdır (189, 193). SEDD/SMEDD/SNEDD ve SMEDD-pellet formülasyonları ile suda düşük çözünürlük gösteren etkin maddelerin oral biyoyararlanımını arttırmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir (9,13, 190, 191).

Tez çalışmasına başlarken amacımız hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan bir statin olan AtrCa' un yağ/su tipinde kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemlerini geliştirmek ayrıca bu sistemlerin katı bir faza emdirilmesi ile pellet formülasyonu elde etmek ve sistemlerin fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarını yaparak geliştirilen dozaj formlarını hiperkolesterolemi tedavisinde alternatif dozaj şekli olarak önermektir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, birçok etkin maddenin biyoyararlanımını arttırmada ve daha etkin bir tedavi sağlamada SMEDDS/SNEDDS sistemlerinin kullanıldığı bilinmektedir (16, 24, 192). Bu nedenle de çalışmamızda atorvastatin kalsiyum içeren kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilerek literatüre katkı sağlanacaktır.

Geliştirilen formülasyonların karakterizasyon, in vitro salım çalışmaları ve Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmaları yapılmıştır. AtrCa içeren, kendiliğinden oluşan mikro/nano emülsifiye olabilen sistemler ve mikroemülsifiye sistemlerin pellet haline getirilmesi ile oluşan formülasyonlar ticari farmasötik şekil ile karşılaştırmalı olarak in vitro salım ve Caco 2 hücrelerinden geçiş çalışmaları incelenmiştir. Aşağıda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular sırası ile tartışılmıştır.

6.2 Atorvastatin Kalsiyumun Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla ilk olarak AtrCa'un fizikokimyasal özellikleri belirlenmeye çalışıldı ve literatürle uyumu araştırıldı. Bu doğrultuda AtrCa'un UV ve IR spektrumları çekilmiştir. En yüksek absorptans değerini 238 nm'de verdiği görülmüştür. Bulunan bu absorptans değeri literatür ile uyumlu bulunmuştur (206). IR spektrumunda elde edilen pik değerleri AtrCa' un yapısında bulunan pirol, fenil ve hidroksil gruplarının varlığını göstermiştir. 3296 cm^{-1} O-H oksijenle hidrojen arasındaki tek bağ gerilmesini, 1313.56 cm^{-1} C-N karbon-azot gerilmesini, 3059.15 cm^{-1} C-HO alkol grupları gerilmesini, 1564.97 cm^{-1} C=O çift bağ gerilme bandını, 3403.97 cm^{-1} N-H gerilme bandını, 1656.97 cm^{-1} C=C gerilme ve eğilme bandını, 1104 cm^{-1} O-H bükülme bandını, 696.95 cm^{-1} alkol grubuna ait C-F gerilme bandını ifade etmektedir. Sonuçta elde edilen bulguların literatür kayıtlarına uygun olduğu görülmüştür (193, 207).

6.3 Atorvastatin Kalsiyumun HPLC Metodu ve Validasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

AtrCa' un yapılacak olan in vitro salım, permeabilite ve stabilite çalışmalarında kullanılmak üzere HPLC yöntemi geliştirilip; yöntem valide edilmiştir. Validasyon, FDA tarafından önerilen kriterlere göre doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve kararlılık parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Doğrusalılık yönünden incelenirken kalibrasyon eğrisinin doğrusallığını gösteren determinasyon katsayısı (R^2) metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında sırası ile 0.9996, 0.993, 0.9998, 0.999 bulunmuştur. Bu değerler eğrilerin % 99.96, % 99.3, % 99.98, % 99.9 doğrusalılık gösterdiğini belirtmektedir. Düşük, orta ve yüksek derişimlerde (8, 10 ve 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) doğruluk çalışmasında aynı derişimde yapılan üç paralel enjeksiyon sonucunda hesaplanan % doğruluk değerleri Tablo 19, Tablo 21, Tablo 23 ve Tablo 25'de verildiği gibi % 99'un üzerindedir. FDA tarafından yapılan validasyon çalışmalarında beklenen doğruluk değeri ise % 80'den büyük olmasıdır. Doğruluk çalışmamız bu kriterleri karşılamıştır. İstatiksel olarak yapılan değerlendirmede, hem her bir derişim için yapılan üç enjeksiyondan hesaplanan doğruluk değerleri arasında hem de derişimler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında deney içi kesinlik çalışmalarında yine

düşük, orta ve yüksek olacak şekilde seçilen 8, 10 ve 12 µg/mL'lik derişimlerde yapılan altı paralel enjeksiyonlarla elde edilen alan değerlerinin kalibrasyon eğri denkleminde hesaplanması ile elde edilen derişim değerleri Tablo 18, Tablo 20, Tablo 22 ve Tablo 24'de belirtilmiştir. Hesaplanan % RSS değerleri FDA tarafından (194, 195) önerilen düşük derişimler için % 20, orta ve yüksek derişimler için % 15'den küçük olması koşulu; metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında düşük derişimler için sırası ile % 0.63, % 3.36, % 10.70, % 4.77; orta derişim için sırası ile % 0.2, % 5.25, % 5.56, % 1.07; yüksek derişim için sırası ile % 0.2, % 2.35, %3.94, % 2.13 değerleri ile istenen sınırlar içinde bulunmuştur. Metanol, pH 1.2, pH 6.8 ve HBSS ortamlarında deneyler arası kesinlik ise düşük, orta ve yüksek derişimlerde (8, 10 ve 12 µg/mL) birbirini takip eden iki farklı günde altı paralel enjeksiyonla ölçülmüş ve Tablo 30, Tablo 31, Tablo 32 ve Tablo 33'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların % RSS'leri her bir derişim için hesaplanmıştır. % RSS verileri FDA'nın yukarıda da düşük, orta ve yüksek derişimler için belirtilmiş olan % RSS değerleri ile birbirine uygundur. İstatiksel analizde her bir derişimde yapılan altı enjeksiyon arasında fark gözlenmemiştir (p>0.05). Validasyonun özgünlük yönünden değerlendirilmesinde, Şekil 28' de mobil faz ve AtrCa'un birlikte enjeksiyonunda görüldüğü gibi AtrCa piki 7.1 dakikada gelmiş, bu sürenin öncesinde ve sonrasında gelen pikler ise Şekil 27' de görüldüğü üzere mobil faza aittir. Bu durumda in vitro çalışmalar için özgünlüğün sağlandığı gösterilmiştir. Yöntemin kararlılığı için düşük ve yüksek derişimde (8 ve 12 µg/mL) çalışılmış, % RSS değerleri her bir derişim için istenen sınırlarda bulunmuştur. Ayrıca 0, 12 ve 24. saatlerde yapılan 24 saatlik enjeksiyonlardan elde edilen derişimler istatiksel analize tabii tutulmuş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. % RSS değerleri her bir derişim için istenen sınırlarda bulunmuştur (% RSS < %15). Elde edilen tüm parametrelerin sonucunda, HPLC yöntemi FDA'da belirtilen kriterlere göre doğru, kesin, özgün, hassas ve kararlı bulunmuştur. Ayrıca yapılan validasyon çalışmalarında, HPLC aletinin otomatik örnekleyicisinin kullanılabilirliğini ve aynı derişim için yapılan paralel enjeksiyonlar da elde edilen % RSS değerleride aletin validasyonunu da ifade etmektedir. HPLC yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde yukarıda da belirttiğimiz metodoloji ile FDA'nın analitik yöntem validasyon kriterleri esas alınmıştır.

6.4 SMEDD Formülasyonu için Kullanılacak Yardımcı Maddelerin Seçimi ve Formülasyon Geliştirme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

SMEDD formülasyonunun geliştirilmesinde üçgen faz diyagramları kullanılmaktadır (196). Yaptığımız SMEDD geliştirme çalışmalarında ilk olarak çeşitli yağ, YEM ve YYEM içerisinde AtrCa' un çözünürlüğü değerlendirilip en yüksek çözünürlüğün elde edildiği bileşenlerle üçgen faz diyagramlarını kullanarak optimum formülasyonların geliştirilmesine çalışılmıştır. Çözünürlük çalışmalarının sonuçları Tablo 42' de gösterilmiştir. Çözünürlük çalışmalarının sonuçlarından yola çıkarak yağ fazı olarak oleik asit, YEM olarak Tween 20, Span 80, YYEM olarak Etanol ve su fazı olarak distile su kullanılmıştır. Bu yağ/YEM/YYEM ve distile su kullanılarak YEM/YYEM oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 olmak üzere on yedi formülasyon ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların üçgen faz diyagramları bilgisayar programı ile çizilmiştir (202) ve alan değerleri Tablo 43' de, üçgen faz diyagramları ise Şekil 35' de gösterilmiştir.

Çizilen üçgen faz diyagramları arasında en yüksek üç mikroemülsiyon alanını veren YEM/YYEM oranları 1:3, 1:7 ve 2:1 dir. Bu üç orana ait çizilen üçgen faz diyagramlarının (Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39) ağırlık merkezlerine karşılık gelen formülasyonlar belirlenerek optimum formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların etkin madde miktarı piyasa preparatı ile uyumlu olacak şekilde 10 mg/mL AtrCa içermektedir. Hazırlanan AtrCa (10 mg/mL) içeren SMEDD formülasyonları etkin maddenin tamamıyla çözünmesi sonrası homojen ve berrak formülasyonlar oluşturmuştur.

Yukardaki bölümde de belirtildiği gibi geliştirilen formülasyonlar için çizilen üçgen faz diyagramlarında en yüksek üç alanı veren YEM/YYEM oranları 1:3, 1:7, 2:1 olan formülasyonlardır. 1:3, 1:7, 2:1 YEM/YYEM oranları için çizilen üçgen faz diyagramlarının ağırlık merkezlerinden hesaplanan optimum formülasyonlar sırası ile F3, F7 ve F10 formülasyonlarıdır. F3 formülasyonunun terkihi Tablo 44' de, F7 formülasyonunun terkihi Tablo 45' de ve F10 formülasyonunun terkihi Tablo 46' da verilmiştir. Bu üç formülasyon ile termodinamik stabilite çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla santrifüj, dondurma-çözme, ısıtma-soğutma çalışmaları gerçekleştirilmiştir

(197). Termodinamik stabilite sonucu F7 ve F10 formülasyonunda ısıtma soğutma ve dondurma çözme çalışmaları sonunda faz ayrışması gözlenmiştir (Tablo 47). F7 ve F10 formülasyonları bu aşamada elenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara F3 formülasyonu ile devam edilmiştir. F3 SMEDD formülasyonundan AtrCa' un % miktarı HPLC de analiz edilmiş ve Tablo 54'de belirtildiği gibi % 101.5 ± 4.5 bulunmuştur (n=6). Bu değer 10 mg/mL değerini doğrulamaktadır. F3 formülasyonu ile fizikokimyasal özelliklerinin analizleri ve stabilite çalışmaları yapılmıştır.

6.5 SMEDD Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Stabilitésinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan F3 SMEDD formülasyonuna ait fizikokimyasal analizler aşağıda tartışılmıştır.

Elektrik iletkenliği ölçülerek mikroemülsiyon sistemlerinin fazları belirlenebilmektedir. Elektriksel iletkenlik, dış fazı su olan sistemlerde ölçülmesine karşın mikroemülsiyonun dış fazı hakkında bilgi vermesi ve faz dönüşümü ihtimalinin incelenmesi için s/y mikroemülsiyonlarında da ölçülebilmektedir. Elektriksel iletkenlik ölçümleri mikroemülsiyon formülasyonunun dayanıklılığının bir göstergesidir. F3 SMEDD formülasyonunun elektrik iletkenliği üçgen faz diyagramında belirtilen su miktarına karşılık gelen miktarda su kullanılarak ölçülmüştür. Bu formülasyonların elektrik iletkenliği ölçüldüğünde 69 µs/cm olarak bulunmuştur. Ayrıca elektriksel iletkenlik değerinin yüksek olması, dış fazın su olduğunun kanıtıdır. Stabilite çalışmaları 6 ay boyunca iki farklı sıcaklıkta (25°C, 40°C) yapılmıştır ve Tablo 55'de de belirtildiği gibi elektriksel iletkenlik 68 µs/cm ile 69 µs/cm değerleri arasındadır. Bu da mikroemülsiyonun, yapılan uzun süreli ve hızlandırılmış stabilite çalışmaları boyunca faz dönüşümü geçirmediğini ifade etmektedir. İstatistiksel açıdan her bir ölçüm arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05).

Bir çözeltilinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi olan pH ölçümleri stabilite çalışmaları süresince yapılmıştır. SMEDD formülasyonunun pH değeri 6 ay süresince 5.12-5.13 arasında değişmiştir ve her bir ay için ölçülen pH değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir (p>0.05) (Tablo 53).

Bir ışık demetinin yoğunlukları farklı iki ortam arasında yön değiştirmesine refraksiyon (kırılma) denir. Bir maddenin refraktif indeksi, onun karakteristiğinin bir işaretidir (209, 211). Hazırlanmış SMEDD formülasyonunun refraktif indeksi üç defa ölçülmüş ve ölçümler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmamıştır. Hazırlanan SMEDD formülasyonunun refraktif indeksi 1.512 ± 0.003 bulunmuştur. 6 ay boyunca yapılan uzun süreli ve hızlandırılmış stabilite çalışmalarında elde edilen refraktif indeks değerleri, Tablo 53'de belirtildiği gibi 0. zamanda ölçülen refraktif indeks değerleriyle benzerdir ($p>0.05$).

Kendiliğinden emülsifikasyonda emülsifiye olabilme zamanı ve hızı sistemin etkinliği hakkında bilgi vermektedir (197). SMEDD formülasyonu seyreltme ortamında hafif bir çalkalama ile tamamen ve hızlıca disperse olmalıdır (197, 205). Balakumar K. ve arkadaşlarının (197) yaptığı benzer bir çalışmada da emülsifikasyon zamanı bir dakikadan küçük olan formülasyonların stabil olacağını belirlemişlerdir. F3 SMEDD formülasyonu da literatürle uyumlu, 10 saniye gibi kısa bir sürede tamamen dağılmış ve dağılmış hali Şekil 40'da gösterilmiştir.

Farklı seyreltme oranlarında ve ortamlarında homojen SMEDD formülasyon karışımının oluşması in vivo ortamda etkin maddenin çökelmeyip absorpsiyonu etkilemeyeceğinin bir göstergesi olduğu için önemli bir parametredir (205). Karasulu H. Y. ve arkadaşlarının (208) yaptığı benzer bir çalışmada da dağılım dayanıklılığın SMEDD formülasyonun stabilitesi üzerine etkisi gözlenmiştir. SMEDD formülasyonun dağılım dayanıklılığı farklı ortamların (su, mide vasatı ve bağırsak vasatı), farklı seyreltme oranlarında (1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000) seyreltmeler yapılarak değerlendirilmiştir (192). 1:1000 seyreltme oranında yapılan çalışmalarda belirli zaman aralıklarında (0., 2., 4. ve 24. saatlerde) örnekler alınıp damlacık boyutları ölçülmüştür. Distile su ortamında 1:1000 seyreltmede 0. dakika da damlacık boyutu 169.8 ± 5.6 bulunurken 24. saat sonunda bu damlacık boyutu $170. \pm 1.3$, pH 1.2 ortamında 0. dakikada 187.1 ± 5 24. saat sonunda 189.9 ± 1.5 , pH 6.8 ortamında 0. dakikada 214.2 ± 1.9 24. saat sonunda 281.4 ± 1.6 olarak bulunmuştur. Yapılan seyreltme çalışmaları sonucu bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı gözlenmiştir (Tablo 48-51) ($p>0.05$). Bu zaman aralıklarında

ölçülen damlacık boyutlarında polidispersite değeri 0.85 değerinden küçük bulunmuştur.

Geliştirilen formülasyonunun karakterizasyonunda önemli parametrelerden bir tanesi de damlacık büyüklüğünün ölçülmesidir (192). SMEDD, SNEDDS ve SEDD sistemler damlacık boyutlarına göre üç grup altında toplanabilirler; 200 nm ile 5 µm aralığında damlacık boyutuna sahip olan sistemler kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler (SEDD), <250 nm damlacık boyutuna sahip olan sistemler kendiliğinden nano emülsifiye olabilen sistemler (SNEDDS), 100 nm ve altında şeffaf görümlü sistemlere ise kendiliğinden mikro emülsifiye olabilen sistemler (SMEDDS) denilmektedir (11, 203). Etkin madde içermeyen F3 SMEDD formülasyonunun partikül boyutu 106.73 ± 1.11 polidispersite indeksi 0.436 ± 0.08 ; etkin madde içeren F3 SMEDD formülasyonunun partikül boyutu 112.36 ± 0.58 ve polidispersite indeksi 0.426 ± 0.05 şeklinde bulunmuştur (Tablo 52).

Optimize edilmiş formülasyonlarda zeta potansiyel değerinin sabit olması durumu sistemin stabilizasyonu hakkında bilgi vermektedir. Genellikle ± 30 mV luk zeta potansiyel değerine sahip olan sistemler stabil olarak kabul edilmektedirler (205). F3 SMEDD formülasyonunun zeta potansiyeli altı paralel ölçülmüş ve sonuçlar birbiri ile uyumlu olmakla beraber “-7.83 mV” olarak bulunmuştur. Zeta potansiye değerindeki negatif değer ise sistemdeki serbest yağ asitlerini göstermektedir (12, 40).

Bulanıklık noktası SMEDD formülasyonlarında başarılı stabil bir mikroemülsiyon elde etmede önemli bir parametredir. Bulanıklık noktasından daha yüksek sıcaklıkta dönüşümsüz faz ayrışması gözlenir ve etkin madde absorpsiyonu azalır (205, 197). Mide bağırsak yolu boyunca faz ayrışmasının önüne geçmek için bulanıklık noktasının 37°C den yüksek olmalıdır, F3 SMEDD formülasyonunun bulanıklık noktası 75°C olarak bulunarak mide bağırsak yolu boyunca stabil bir formülasyon olarak ilerleyeceği söylenebilir.

6 ay süre ile yapılan uzun süreli ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ %60±5 bağıl nem) ve hızlandırılmış ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ %75±5 bağıl nem) stabilite çalışmaları sonucunda F3 SMEDD formülasyonunun fizikokimyasal analizleri ve içerik miktarı testleri yapılmıştır. Etkin madde içerik miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme olmazken

fizikokimyasal analizleri de 6. ayın sonunda yukarıda da tartışıldığı gibi başlangıç değerlerine benzerdir (Tablo 54, Tablo 55).

6.6 Pellet Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

Pellet formülasyonu geliştirme çalışmalarında öncelikli olarak yağ fazı olarak oleik asit, YEM olarak Tween 20 ve Span 80 kullanılmış ve bu HLB değerleri 12.5 ve 15.5 olan ve yağ/yüzey etkin madde oranları 6/4 ve 5/5 olmak üzere toplamda dört formülasyon için çözünürlük çalışması yapılmıştır (F18, F19, F20, F21). F18 ve F19 formülasyonlarındaki etkin madde çözünürlüğü daha yüksek olduğu için bu formülasyonların YYEM içeren terkiplerinin çözünürlükleri değerlendirilmiştir. Bunun için formülasyon oluştururken toplam YEM ve YYEM oranının %10 u kadar YYEM eklenmiştir. YYEM olarak transkutol ve 1- metil-2 piroolidon (MP) bileşenleri kullanılmıştır. Yeni formülasyonlarda yağ/YEM/YYEM oranları 6/4 ve 5/5 olacak şekilde dört formülasyonda tekrar çözünürlük değerlendirmesi yapılmıştır (F22-T, F23-MP, F24-T, F25-MP). Bu formülasyonların içerisinde çözünürlüğü en fazla olan F23-MP formülasyonu seçilerek pellet çalışmalarında kullanılacak SMEDD formülasyonu belirlenmiştir. F23-MP SMEDD formülasyonun su içeriğini belirlemek için %40 (E1), %50 (E2) , %60 (E3), %70 (E4) ve %80 (E5) yağ/YEM/YYEM içeren emülsiyon sistemleri oluşturulmuştur. Bu mikroemülsiyonların stabiliteleri turbidimetre cihazı ile ölçülmüş ve tüm mikroemülsiyonlar stabil olarak bulunmuştur (Şekil 46). E1, E2, E3, E4 ve E5 mikroemülsiyonlarının iletkenliği ölçülmüş, %80 yağ/YEM/YYEM içeren formülasyonunun iletken olmadığı gözlenmiştir. Nihai formülasyonun y/s formülasyonu olması amaçlandığı için E5 mikroemülsiyonu elenmiştir. E4 formülasyonun ise çok viskoz bir yapı oluşturduğu için pellet yapımına uygun olmadığı kararlaştırılmıştır. Bu durumda en yüksek yağ/YEM/YYEM ve dolayısı ile en yüksek miktarda AtrCa etkin maddesi içeren emülsiyon sisteminin E3 mikroemülsiyon formülasyonu olmasına karar verilmiştir. E3 mikroemülsiyonunun bir kısmı ultrasonikasyondan, diğer kısmı ise homojenizatörden geçirilerek oluşturulan pellet formülasyonları arasındaki farklanma incelenmiştir. E3 mikroemülsiyonunun emdirileceği katı faz olarak maksimum mikroemülsiyon formülasyon miktarı ile granülasyon noktasına ulaşan katı faz içeriği 14 gram aerosil ve 7 gram avisel olarak belirlenmiştir.

Granülasyon noktasına ulaşılması için homojenizatörden geçirilmiş etkin madde içermeyen E3 mikroemülsiyonundan 40 mL (P1 pellet formülasyonu), ultasonikasyondan geçirilmiş etkin madde içermeyen E3 mikroemülsiyonundan 42 mL sarfedilmiştir (P2 pellet formülasyonu). Daha sonrasında mL sinde 50 mg AtrCa bulunan homojenizatörden geçirilen E3 mikroemülsiyonundan 40 mL (P3 pellet formülasyonu), mL sinde 50 mg AtrCa bulunan ultasonikasyondan geçirilen E3 mikroemülsiyonundan da 40 mL sarfedilerek (P4 pellet formülasyonu) yaş granülasyonlar oluşturulmuştur. Yaş granüeller önce ekstrüder, sonrasında sferonizerden geçirilmiş ve en sonunda etüvde kurutularak dört ayrı pellet formülasyonu elde edilmiştir.

6.7 Pellet Formülasyonunun Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Stabilitésinin Değerlendirilmesi

Elde edilen P1, P2, P3, P4 formülasyonlarının yoğunluk, küme ve sıkıştırılmış dansite, hausner ve carr indeks, friabilite gibi fiziksel analizleri yapılmıştır. Bu pellet formülasyonlarının katı fazları aynı olduğu için yoğunluklarında büyük bir farklanma gözlenmemiştir (Tablo 59). Küme dansite, tap dansite ve buradan hareketle hausner oranı ve carr indeksleri hesaplandığında tüm pelletlerin mükemmel yakın akışlar gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 60). Friabilite sonuçları değerlendirildiğinde en az ufalanmanın %1.30 değeri ile P3 pelletinde ve daha sonrasında %3.90 değeri ile P1 pelletinde görüldüğü gözlenmiştir. Ultrasonikasyona maruz bırakılmış pelletlerde (P2 ve P4) ufalanmanın oldukça fazla gözlendiği görülmüştür (Tablo 61).

P1, P2, P3 ve P4 pelletlerinin mikroskop ile görüntüleri incelendiğinde partikül yapılarının arasında farklanma olmadığı ve titreşimli elek testinde her birinin en yoğun olduğu partikül boyutu aralığının 850-1200 µm olduğu gözlenmiştir (Şekil 47, Şekil 48, Şekil 49, Şekil 50, Tablo 62, Tablo 63, Tablo 64, Tablo 65).

P3 ve P4 pelletlerinin HPLC ile miktar tayinleri gerçekleştirildiğinde P3 pelletinin içerik miktarı 106 ± 10.33 , P4 pelletinin içerik miktarı ise 100 ± 3.74 olarak bulunmuştur (Tablo 67, Tablo 68) (n=6).

6 ay boyunca yapılan uzun süreli stabilite ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ %60±5 bağıl nem) ve hızlandırılmış stabilite ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ %75±5 bağıl nem) değerlendirmesi sonucunda P3 pellet formülasyonunun fizikokimyasal analizleri ve içerik miktarı testleri yapılmıştır.

İçerik miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişme olmazken fizikokimyasal analizlerinde de 0. ay sonuçlarına çok yakın bulunmuştur (Tablo 67, Tablo 69).

6.8 Geliştirilen Formülasyonların ve Ticari Preparatın İn vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

AtrCa etkin maddesinin, F3 SMEDD formülasyonunun, P3 ve P4 formülasyonunun pH 6.8 ortamında jelatin kapsüllü ve kapsülsüz salımlarında farklanma gözlenmemiştir. Bu nedenle yalnızca kapsüllü salımları grafiklendirilmiştir. AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun pH 1.2 ortamında 240.dk da ancak %19.5 kadar salım gösterebildiği gözlenmiştir (Şekil 51). AtrCa için FDA tarafından belirlenen in vitro salım koşulu pH 6.8 fosfat tamponu olması nedeni ile diğer tüm salım çalışmaları bu tampon ortamında yapılmıştır (198). pH 6.8 ortamında AtrCa'un 240. dk da %97.4 'ünü saldığı görülmektedir (Şekil 52). Konvansiyonel tablet formülasyonu 30. dk da %90 larda bir salım değerine ulaşabilirken, F3 SMEDD formülasyonu 15. dk da %93.8 lik ve 60. dk da %100 lük bir salım değerine ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 53, Şekil 54). P3 pellet formülasyonu ile 15. dk da %78 lik bir değere ulaşmış ve 180. dk da %100 lük bir değere ulaşabilmişken, P4 formülasyonu ise 15. dk da %79 lük bir değer ve 150. dk da %100 lük bir değer elde edilmiştir (Şekil 55, Şekil 56).

İlaç salım profillerinin kinetik olarak değerlendirilmesinde kullanılan çok sayıda tanımlanmış model bulunmaktadır. Hazırlanan formülasyonların (F3 SMEDD, P3 pellet, P4 pellet) ve ticari formülasyonun salım profilleri tanımlanan bu modellerden sıfır derece, birinci derece, Higuchi ve Langenbucher modellerine uyum yönünden incelenmiştir. Elde edilen sonuçların modele uyumunun göstergesi olan regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı (R^2) ve modele uygunluğunu belirleyen artık kareler toplamı değeri incelendiğinde (Tablo 70) F3 SMEDDS formülasyonu 0.9992 değeri ile Weibull (212) tarafından tanımlanan ve Langenbucher (213) tarafından geliştirilen modele uyum sağladığı görülmüştür. Ayrıca hem ticari hem de pellet formülasyonları da bu modele uyum sağlamaktadır. Weibull denklemi her türlü in vitro salım profiline uygulanabilir ve logaritmik bir modeldir (214). Bu model ile farklı salım süreçlerini tarif etmek mümkündür. Elde edilen salım profillerinin ışığında ve AtrCa'un sudaki çözünürlüğünün düşük olması da gözönünde

bulundurulduğunda geliştirilen formülasyonların ve ticari formülasyonun salımın temel mekanizmasının difüzyon olmadığı ve matrisin ve/veya yağ fazının erozyonu ile kontrol edildiği düşünülmektedir (215).

6.9 Geliştirilen Formülasyonların ve Ticari Preparatın İnvitro Permeabilite ve Sitotoksite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Son zamanlarda Caco-2 hücreleri kullanılarak in vitro ortamda ilacın absorpsiyonu ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (149, 159, 199). Caco-2 hücreleri sahip olduğu sıkı bağlar, mikrovili şeklindeki yapısı sayesinde bağırsak epitelyumuna benzemektedir. AtrCa'un geçirgenliği açısından ilaç sınıflandırma sisteminde sınıflandırmak için, in vitro olarak bağırsak epitelyumuna benzerliğine dayanarak Caco-2 hücreleriyle geçiş çalışmaları yapılmıştır. Caco-2 hücreleriyle yapılan geçiş çalışmaları bulguları aşağıdaki bölümlerde tartışılmıştır.

İn vitro geçiş çalışmalarında kullanılacak Caco-2 hücrelerinin yapmış olduğumuz çalışma için uygun hale getirilmesinde 37°C'de ve % 95 hava-%5 karbondioksit ortamında üretim sonrası mikroskop ile yapılan yaşayan hücre sayısı sayımı sonuçları Tablo 71'da gösterilmiştir. Elde edilen canlı hücre sayısı 175×10^5 ile 186×10^5 değeri arasındadır. Bu değerler literatürlerde hücre kültürü çalışmaları için önerilen epitelyum hücre dizinleri için ideal morfolojik özellikler gösterdiği değerler ($10^5 - 10^6$ hücre/mL yoğunluk) arasındadır (200).

Caco-2 hücrelerinin FBS (fetal sığır serum) içeren DMEM ortamında yapılan geçiş çalışmalarında, hücre kültürü çalışma besiyeri içeriğinin ve bileşimine konan serum (FBS) miktarının hücre farklılaşması üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğu gözlenmiş ve bu nedenle ortam olarak FBS içeren DMEM seçilmiştir (172).

AtrCa'un geçiş çalışmaları için hücre kültürü destek membranı olarak 3µm'lik por büyüklüğünde membran seçilmiştir Benzeri membran seçimi Gonzalez ve arkadaşlarının (201) 3µm'lik por büyüklüğüne sahip olan polikarbonat filtrelerin Caco-2 hücrelerinden yaptıkları geçiş çalışmaları içinde kullanılmıştır.

Formülasyonların permeabilite çalışmalarında besiyeri ortamında, geliştirilen F3 SMEDD formülasyonunun, P3 pellet formülasyonu için de aynı oranda seyreltme yapılıp ticari formülasyonla karşılaştırmalı olacak şekilde çalışılmıştır. Caco-2

hücrelerinden geçiş çalışmaları iki yönlü olarak tasarlanmıştır. Bunlar apikal yönden bazolateral yöne doğru olan, bağırsakta absorpsiyon olayının mukozadan (apikal membrandan) serozal tabakaya (bazolateral membran) doğru (A→B) taşınan ilaç moleküllerinin kılcal damarlar vasıtasıyla sistemik dolaşıma geçmesini taklit etmesidir. Bazolateral yönden apikal yöne doğru olan ise eksorpsiyon olarak ifade edilen ilaçların kandan bağırsak lümenine geçişi olarak tanımlanan ve bazolateral membrandan apikal membrana doğru olan geçişi taklit etmesidir (B→A) (202).

Caco-2 hücrelerinde A→B yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında AtrCa' un bazolateral kısımdaki derişim miktarını 120. dakika sonunda % $X \pm SS$ olarak değerlendirecek olursak; 10 mg/mL için apikal kısma konan AtrCa'un ortalama (3.03 mg/mL) % 30.3 ± 0.99 ' u, 10 mg/mL AtrCa içeren SMEDD formülasyonunun ortalama (9.13 mg/mL) % 91.3 ± 0.68 ' i, 10 mg/mL AtrCa içeren P3 pellet formülasyonunun ortalama (6.80 mg/mL) % 68 ± 0.305 ' i, 10 mg/mL AtrCa içeren ticari tablet formülasyonu ortalama (6.42 mg/mL) % 64.2 ± 1.02 ' si bazolateral kısma geçmiştir. Aynı hücreler ile B→A yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında ise; 10mg/mL için bazolateral kısma konan AtrCa' un yaklaşık (5.37 mg/mL) % 50.37 ± 0.247 ' si, 10 mg/mL AtrCa içeren SMEDD formülasyonu için (6.90 mg/mL) % 69.0 ± 0.07 ' si, 10 mg/mL AtrCa içeren P3 pellet formülasyonu için (7.76 mg/mL) % 77.6 ± 0.173 ' ü, 10 mg/mL AtrCa içeren ticari tablet formülasyonu için (6.72 mg/mL) % 67.2 ± 0.73 apikal kısma geçmiş olarak bulunmuştur. Caco-2 hücrelerinde yapılan geçiş çalışmalarında AtrCa'un etkin maddesinin A→B yöne doğru hesaplanan permeabilite değerleri B→A yöne doğru hesaplanan permeabilitelere göre daha düşük bulunmuştur. Apikal yönden bazolateral yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında en yüksek etkili permeabilite F3 SMEDD formülasyonunda elde edilmiştir. Daha sonra permeabilite değeri sırası pellet formülasyonları, konvansiyonel tablet formülasyonu ve AtrCa etkin maddesi ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (Şekil 67). Bazolateral yönden apikal yöne doğru yapılan geçiş çalışmalarında ise; geçiş çalışmaları sırası ile P3 pellet formülasyonu, F3 SMEDDS formülasyonu, konvansiyonel tablet formülasyonu ve AtrCa etkin maddesi olarak bulunmuştur (Şekil 66). Geliştirilen formülasyonlar ticari formülasyonla karşılaştırıldığında, apikal yönden bazolateral yöne doğru elde edilen permeabilite değerleri (Pab), bazolateral yönden apikal yöne doğru elde

edilen permeabilite değerine (Pba) göre daha yüksek bulunmuştur. F3 SMEDD, P3 pellet formülasyonları için Pab değerinin literatürlerde belirtilen 1×10^{-6} cm/s değerinden (143) büyük olduğu gözlenmiştir. Yani geliştirilen formülasyonlar AtrCa etkin maddesi ve ticari formülasyonla kıyaslandığında AtrCa permeabilitesini arttırmaktadır.

Tüm formülasyonlar için yapılan geçiş çalışmalarında kullandığımız yöntemin geçerliliğini test etmek için Tablo 75 ve Tablo 76' de göstermiş olduğumuz kontrol parametrelerinden membrandaki ilaç miktarını temsil eden A_m ve hücre içindeki ilaç miktarını temsil eden A_{OH} değerleri tayin limitlerimizin altındadır. Bu durumda tüm AtrCa derişimlerinde AtrCa' a ait kayıp olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Burada yaşanabilecek kayıplar, AtrCa' un membran üzerinde kalabileceği veya hücrelerin içine difüze olabileceğidir. Yapılan hesaplar sonucunda membran ve hücre içindeki miktar önemsenmeyecek kadar az olduğu için AtrCa' a ait herhangi bir kaybın olmadığı da gözlenmiştir.

AtrCa etkin maddesinin, geliştirilen F3 SMEDD formülasyonunun, P3 pellet formülasyonunun ve konvansiyonel tablet formülasyonunun hem AtrCa etkin maddesini içermeyen, hemde içeren hallerinin sitotoksitesi Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Hücre canlılığı değeri 72. saat sonunda Caco-2 hücreleri üzerindeki canlılık değerleri; AtrCa etkin maddesi için %72, AtrCa içermeyen F3 SMEDD formülasyonu için %85.9, F3 SMEDD-AtrCa formülasyonu için %98.9, AtrCa içermeyen P3 pellet formülasyonu için %88.9, P3- AtrCa pellet formülasyonu için %85.9, ticari formülasyon için %89.9 olarak bulunmuştur (Şekil 76). Bu sonuçlar F3 SMEDD-AtrCa formülasyonun ve diğer formülasyonların Caco-2 hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir.

Hücre çalışmaları özelinde çalışmanın bitiminde tüm deney boyunca çalışmanın doğru yapıldığını gösteren bir kalite kontrol parametresi TEER (trans epitelyal elektrik rezistansı) değerinin ölçümüdür. TEER değerinin ölçümü ile hem hücre kültürü ile üretilen dokuların gelişimi kontrol edilmekte, hem de olası permeabilite etkileşimleri hakkında bilgi edinilebilmektedir. Doğru çalışan bir sistemde çalışma başlamadan önce ve çalışma bitiminde TEER değerinin 1500–1800 ohm \times cm² aralığında olması istenir (140, 141, 159, 172). Gerek deney öncesi gerek

deney sonrası ölçülen TEER değerleri Şekil 68 ile Şekil 75 arasındaki grafiklerde gösterilmiştir. Ölçülen bu değerler 800–1300 ohm×cm² olarak bulunmuştur. Deney ncesi ve sonrası apikalden bazoretale olan değerlerindeki % değişim Tablo 77’ de, bazoretalden apikale olan değerlerindeki % değişim ise Tablo 78’ da gösterilmiştir. Bu değerler ideal değerlerin arasında olduğu için çalışmanın doğru olarak baŐlayıp yürütüldüğünü ve sonlandırıldığını göstermektedir. Sonuç olarak çalışma yaptığımız kuyucukların yüzey alanları, ekim yapılan hücre sayıları, kültür ortamı ve pasaj numarası Caco–2 hücrelerinin TEER açısından uygunluğunu belirlemişlerdir.

Sonuç olarak yapılan karakterizasyon, stabilite, in vitro salım ve permeabilite bulguları iŐıęında AtrCa içeren SMEDD sistemler hiperlipidemi tedavisinde alternatif dozaj Şekli olarak önerilebilir. Ayrıca AtrCa gibi düşük çözünürlük gösteren BSS 2 sınıfı birçok etkin maddenin hem çözünürlüğünü arttırmada hem de oral biyoyararlanımını arttırmada SMEDD ve SMEDD-pellet formülasyonlarının gelecekte umut veren farmasötik dozaj Şekilleri olacağı dŐnlebilir.

Kaynaklar

1. Basavaraj S, Betageri GV. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development-review of feasibility, benefits and challenges. *Acta Pharm Sin B* 2014;4:3–17.
2. Fahr A, Liu XL. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 2007;4:403–416.
3. Lakshman JP. Formulation, bioavailability, and manufacturing process enhancement: novel applications of melt extrusion in enabling product development. *Melt extrusion, materials, technology and drug product design* 2013;329–362.
4. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci* 2006;29:278–287.
5. Gullapalli RP. Soft gelatin capsules (softgels). *J Pharm Sci* 2010;99: 4107–4148.
6. Khoo SM, Shackelford DM, Porter CJH, Edwards GA, Charman WN. Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs. *Pharm Res* 2003;20:1460–1465.
7. Colin W. Pouton A, Christopher JH Porter B. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;60 625–637.
8. O'Driscoll CM, Griffin BT. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility—The potential impact of lipid-based formulations. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;60 617–624.
9. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000;11 Suppl 2:S93–98.

10. Pouton CW, Porter CJH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;60:625–637.
11. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar KR. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Volume* 2010; 15, 21-22.
12. Mahapatra AK, Murthy PN, Swadeep B, Swain PR. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): An Update from Formulation Development to Therapeutic Strategies. *Int J Pharm Technol Res* 2014; 6, 2, 546-568.
13. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;(60) 734–746.
14. Kollipara S, Gandhi RK. Pharmacokinetic aspects and in vitro–in vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2014;4(5):333–349.
15. Tang JL, Sun J and He ZG. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: Strategy for Improving Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Curr Drug Ther.* 2007; 2: 85-93.
16. David JH editor. Oral lipid-based formulations: Enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. In: *Drugs and the pharmaceutical sciences*. Informa; 2007 p. 170.
17. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev* 2008;60:673–691.
18. Fei Y, Kostewicz ES, Sheu MT, Dressman JB. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted human using an in vitro-in silico-in vivo approach. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85:1274–1284.

19. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang TH, BauerJM, Morozowich W, et al. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* 2003;92:2386–2398.
20. Yue Y, San-ming, L, Li-min Y, Pan D, Da-fang Z. Physicochemical Properties and Evaluation of Microemulsion Systems for Transdermal Delivery of Meloxicam, 2007;23(1); 81-86.
21. Zhang N, Zhang WD, Jin YH, Quan DQ. Studies on preparation of carbamazepine (CBZ) supersaturatable self-microemulsifying (S-SMEDDS) formulation and relative bioavailability in beagle dogs. *Pharm Dev Technol* 2011;16:415–421.
22. Bhupinder S, Shantanu B, Rishi K, Ramandeep S, Katare OP. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2009;26(5), 427–521.
23. Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:231–248.
24. Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RSR. Design and development of microemulsion drug delivery system of a cyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006;7:E172–7.
25. Shen H, Zhong M. Preparation and evaluation of self- microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing atorvastatin. *J Pharm Pharmacol* 2006;58:1183–1191.
26. Kommuru TR, Gurley B, Khan MA, Reddy IK. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm* 2001;212:233–246.
27. Gao ZG, Choi HG, Shin HJ, Park KM, Lim SJ, Hwang KJ, et al. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin A. *Int J Pharm* 1998;161:75–86.

28. Trull AK, Tan KK, Tan L, Alexander GJ, Jamieson NV. Absorption of cyclosporin from conventional and new microemulsion oral formulations in liver transplant recipients with external biliary diversion. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:627–631.
29. Bates TR, Carrigan PJ. Apparent absorption kinetics of micronized griseofulvin after its oral administration on single-and multiple-dose regimens to rats as a corn oil-in-water emulsion and aqueous suspension. *J Pharm Sci* 1975;64:1475–1481.
30. Fatouros DG, Nielsen FS, Douroumis D, Hadjileontiadis LJ, Mullertz A. In vitro–in vivo correlations of self-emulsifying drug delivery systems combining the dynamic lipolysis model and neuro-fuzzy networks. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:887–898.
31. Khoo SM, Humberstone AJ, Porter CJH, Edwards GA, Charman WN. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int J Pharm* 1998;167:155–164.
32. Araya H, Tomita M, Hayashi M. The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. *Int J Pharm* 2005;305:61–74.
33. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004;58:173–182.
34. Carlert S, Akesson P, Hanisch G, von Corswant C, Nilsson C, Lindfors L, et al. Predicting intestinal precipitation—a case example for a basic BCS class II drug. *Pharm Res* 2010;27:2119–2130.
35. Larsen AT, Sassene P, Müllertz A. In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *Int J Pharm* 2011;417:245–255.
36. Fatouros DG, Bergenstahl B, Mullertz A. Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *Eur J Pharm Sci* 2007;31:85–94.

37. Sassene PJ, Knopp MM, Hesselkilde JZ, Koradia V, Larsen A, Rades T, et al. Precipitation of a poorly soluble model drug during in vitro lipolysis: characterization and dissolution of the precipitate. *J Pharm Sci* 2010;99:4982–4991.
38. MacGregor KJ, Embleton JK, Lacey JE, Perry EA, Solomon LJ, Seager H, et al. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Adv Drug Deliver Rev* 1997;25:33–46.
39. Kaukonen AM, Boyd BJ, Charman WN, Porter CJ. Drug solubilization behavior during in vitro digestion of suspension formulations of poorly water-soluble drugs in triglyceride lipids. *Pharm Res* 2004;21:254–260.
40. Rahman MA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Iqbal Z. Role of Excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39:1–19.
41. Cui n  JF, McEvoy CL, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Benameur H, et al. Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *J Pharm Sci* 2008;97:995–1012.
42. Cui n  JF, Charman WN, Pouton CW, Edwards GA, Porter CJH. Increasing the proportional content of surfactant (CremophorEL) relative to lipid in self-emulsifying lipid-based formulations of danazol reduces oral bioavailability in beagle dogs. *Pharm Res* 2007;24:748–757.
43. Markopoulos C, Thoenen F, Preisig D, Symillides M, Vertzoni M, Parrott N, et al. Biorelevant media for transport experiments in the Caco-2 model to evaluate drug absorption in the fasted and the fed state and their usefulness. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;86:438–448.
44. Rossi RC, Dias CL, Donato EM, Martins LA, Bergold AM, Fr ehlich PE. Development and validation of dissolution test for ritonavir soft gelatin capsules based on in vivo data. *Int J Pharm* 2007;338:119–124.
45. Pawar S, Kumar A. Issues in the formulation of drugs for oral use in children. *Pediatr Drugs* 2002;4:371–379.

46. López-Montilla JC, Herrera-Morales PE, Pandey S, Shah DO. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *J Dispers Sci Technol* 2002;23:219–268.
47. Basit AW, Podczeczek F, Newton JM, Waddington WA, Eli PJ, Lacey LF. Influence of polyethyleneglycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharm Res* 2002;19: 1368–1374.
48. Schulze JD, Waddington WA, Eli PJ, Parsons GE, Coffin MD, Basit AW. Concentration-dependent effects of polyethyleneglycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharm Res* 2003;20: 1984–1988.
49. Yáñez JA, Wang SW, Knemeyer IW, Wirth MA, Alton KB. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2011;63: 923–942.
50. Edwards GA, Porter CJH, Caliph SM, Khoo SM, Charman WN. Animal models for the study of intestinal lymphatic drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50: 45–60.
51. O’Driscoll CM. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci* 2002;15: 405–415.
52. Caliph SM, Charman WN, Porter CJ. 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 noncannulated rats. *J Pharm Sci* 2002;89: 1073–1084.
53. Charman WNA, Stella VJ. Estimating the maximal potential for intestinal lymphatic transport of lipophilic drug molecules. *Int J Pharm* 1986; 34: 175–8.
54. Dahan A, Hoffman A. Evaluation of a chylomicron flow blocking approach to investigate the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Sci* 2005;24: 381–388.
55. Gershkovich P, Hoffman A. Uptake of lipophilic drugs by plasma derived isolated chylomicrons: linear correlation with intestinal lymphatic bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2005;26: 394–404.

56. Myers RA, Stella VJ. Factors affecting the lymphatic transport of penclomedine (NSC-338720), a lipophilic cytotoxic drug: comparison to DDT and hexachlorobenzene. *Int J Pharm* 1992;80: 51–62.
57. Singh BN. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinetic* 1999;37: 213–255.
58. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:717–733.
59. Woo JS, Song YK, Hong JY, Lim SJ, Kim CK. Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci* 2008;33:159–165.
60. Perlman ME, Murdande SB, Gumkowski MJ, Shah TS, Rodricks CM, Thornton-Manning J, et al. Development of a self-emulsifying formulation that reduces the food effect for torcetrapib. *Int J Pharm* 2008;351:15–22.
61. Peter Pillans. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions 2014; 37:4.
62. Kim JY, Ku YS. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin torats. *Int J Pharm* 2000;194: 81–89.
63. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multi drug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 48–58.
64. Constantinides PP, Wasan KM. Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *J Pharm Sci* 2007; 96: 235–248.
65. Rege BD, Kao JPY, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2002;16: 237–246.
66. Johnson BM, Charman WN, Porter CJ. An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. *AAPS Pharm Sci* 2002;4: 193–205.

67. Warren DB, Benameur H, Porter CJ, Pouton CW. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water soluble drugs: a mechanistic basis for utility. *J Drug Target* 2010;18: 704–731.
68. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res* 1995;12: 413–420.
69. Garg A, Kumar A, Kohli K. Dilution phenomenon in mixed surfactant based self-microemulsifying formulations of gingeroleoresin: ex vivo and in vivo performances. *Int J Drug Deliv* 2013;5: 270–283.
70. Yang SG. Biowaiver extension potential and IVIVC for BCS class II drugs by formulation design: case study for cyclosporine self microemulsifying formulation. *Arch Pharm Res* 2010;33: 1835–1842.
71. Donato EM, Martins LA, Fröhlich EE, Bergold AM. Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data. *J Pharm Biomed Anal* 2008;47: 547–552.
72. Porter CJ, Kaukonen AM, Boyd BJ, Edwards GA, Charman WN. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium chain lipid-based microemulsion formulation. *Pharm Res* 2004;21: 1405–1412.
73. Gupta S, Chavhan S, Sawant KK. Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovir dipivoxil: design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2011;392:145–155.
74. Ghai G, Sinha VR. Nanoemulsions as self-emulsified drug delivery carriers for enhanced permeability of the poorly water-soluble selective β 1-adrenoceptor blocker Talinolol. *Nanomedicine* 2012; 8:618–626.
75. Eedara BB, Veerareddy PR, Jukanti R, Bandari S. Improved oral bioavailability of fexofenadine hydrochloride using lipid surfactants: ex vivo, in situ and in vivo studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2014;40: 1030–1043.

76. Dahan A, Hoffman A. 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. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67: 96–105.
77. Strickley RG. Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drug products and excipients. In: David JH, editor. *Oral lipid based formulations*. Informa Healthcare; 2007: 1–32.
78. Williams HD, Sassene P, Kleberg K, Bakala-N’Goma JC, Calerone M, Janniv V, et al. Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *J Pharm Sci* 2012;101:3360–3380.
79. Nakahara N. Method and apparatus for making spherical granules. US Patent 3, 1966: 277-520.
80. Conine JW, Hadley HR. Preparation of small solid pharmaceutical spheres. *Drug Cosm Ind* 1970;106;38-41.
81. Jalal IM, Malinowski HJ, Smith WE. Tablet granulations composed of spherical-shaped particles. *J Pharm Sci* 1972;61;1466-1468.
82. Mehta KA, Rekhi GS, Parikh DM. Extrusion/Spheronization as a Granulation Technique. In James Swarbrick editor. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Taylor & Francis, LLC Group 2005: p. 333-363.
83. Devereus JE, Newton JM, Short MB. The influence of density on the gastrointestinal transit of pellets. *J Pharm Pharmacol* 1990;42;500-501.
84. O’Connor RE, Holinez J, Schwartz JB. Spheronization I: Processing and evaluation of spheres prepared from commercially available excipients. *Am J Pharm* 1984;156: 80-87.
85. Harrison PJ, Newton JW, Rowe RC. Flow defects in wet powder masses. *J Pharm Pharmacol* 1984;37;81-83.

86. Wan LSC, Heng PWS, Liew CV. Spheronization conditions on spheroid shape and size. *Int J Pharm* 1993;96;59-65.
87. Rowe RC. Spheronization: a novel pill-making process. *Pharm Int* 1985;6: 119-123.
88. Harrison PJ, Newton JM, Rowe RC. The characterization of wet powder masses suitable for extrusion/spheronization. *J Pharm Pharmacol* 1985;37: 686-691.
89. Harrison PJ, Newton JW, Rowe RC. The application of capillary rheometry to the extrusion of wet powder masses. *Int J Pharm* 1987;35;235-242.
90. Pinto JF, Buckton G, Newton JW. The influence of four selected processing and formulation factors on the production of spheres by extrusion and spheronization. *Int J Pharm* 1992;83;187-196.
91. Hasznos L, Langer I, Gyarmathy M. Some factors influencing pellet characteristic made by an extrusion/spheronization process, Effects on size characteristics and moisture content decrease of pellets. *Drug Dev Ind Pharm* 1992;18;409-437.
92. Hileman GA, Goskonda SR, Splitto AJ, Upadrashta SM. A factorial approach to high dose product development by an extrusion/spheronization process. *Drug Dev Ind Pharm* 1993; 19: 483-491.
93. Baert L, Fanara D, De Baets P, Remon JP. Instrumentation of a gravity feed extruder and the influence of the composition of binary and tertiary mixtures on the extrusion forces. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 745-749.
94. Hallen L, Yliruusi J, Merkku P, Kristofferson E. Process variables of instant granulator and spheronizer: I. Physical properties of granules, extrudate and pellets. *Int J Pharm* 1993;96;197-204.
95. Malinowski HJ, Smith WE. Use of factorial design to evaluate granulations prepared by spheronization. *J Pharm Sci* 1975; 64: 1688-1692.
96. Sinha VR, Agrawal MK, Agarwal A, Singh G, Ghai D. Extrusion-spheronization: process variables and characterization. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(3):275-331.

97. Dyer AM, Khan KA, Aulton ME. Effect of the drying method on the mechanical and drug release properties of pellets prepared by extrusion. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 3045-3068.
98. Reynolds AD. A new technique for the production of spherical particles. *Manuf Chem Aerosol News* 1970; 41: 40-43.
99. O'Connor RE, Holinez J, Schwartz JB. Spheronization I: processing and evaluation of spheres prepared from commercially available excipients. *Am J Pharm* 1984; 156: 80-87.
100. Conde K, Vergara-Jinenez M, Krause BR, et. al. Hypercholesterolemic actions of atorvastatin are associated with alterations on hepatic cholesterol metabolism and lipoprotein composition in the guinea pig. *J Lipid Res* 1996; 37: 2372-82.
101. Lipitor[®] (atorvastatin calcium) tablets. Data sheet. Parke Davis. Division of Warner-Lambert Company, Morris Plains, NJ 07950, USA. 1996.
102. Blum CBB. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol* 1994; 15; 74(6):639.
103. Rackley CE. Monotherapy with HMG-CoA reductase inhibitors and secondary prevention in coronary artery disease. *Clin Cardiol* 1996; 19: 683-689.
104. Sliskovic DR, Roth BD, Bocan TMA. Tissue selectivity of HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug News Perspect* 1992; 5 (9):517-533.
105. Davidson MM, McKenney JM, Stein EA, et al. Comparison of one year efficacy and safety of Atorvastatin versus Lovastatin in primary Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1997; 79(11):1475-1481.
106. Kang BK, Lee JS, Chon SK, Jeong SY, Yuk SH, Khang G, et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm* 2004; 274:65-73.
107. Illingworth DR, Tobert JA. A review of clinical trials comparing HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Ther* 1994; 16 (3) : 366-385.

108. Gibson DM, Bron NJ, Richens A, et al. Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 242-246.
109. Bocan TM A, Ferguson E, McNally W, et al. Hepatic and nonhepatic sterolsynthesis and tissue distribution following administration of a liver selective HMG-CoA reductase inhibitor. CI-98 I: comparison with selected HMG -CoA reduct ase inhibitors. *Biochim Biopys Acta* 1992; 24; 1123:133-144.
110. Duggan DE, Vickers S, Physiological disposition HMG-Co reductase inhibitors. *Drug Metab Rev* 1990; 22 (4): 333-362.
111. Haria M, MTavish D, Pravastatin: are appraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of coronary heart disease. *Drugs* 1997; 53 (2): 299-336.
112. Plosker GL, Wagstaff AJ, Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia. *Drugs* 1996; 51: 433-459.
113. Plosker GL, McTavish D, Simvastatin: a reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia. *Drugs* 1995; 50(2): 334-363.
114. Radulovic LL, Cilia DD, Posvar EL. Effect of food on the bioavailability of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 990-994.
115. Henwood JM, Heel RC. Lovastatin: a preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemi a. *Drugs* 1988; 36: 429-454.
116. Gibson DM, Yang B-B, Abel RB, et al. Effects of hepatic and renal impairment on pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of atorvastatin. *Pharm Res* 1996; 13 (9): S428.
117. Atorvastatin causes a dose dependent reduction in LDL-C and triglycerides. In: 66th Cong of the Eur Athero Soc Abst Book: 1996; 13-7; 212.

118. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program. Classification prevalence, detection and evaluation. *Circulation* 1994; 89: 1344 -1363.
119. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J et. al. A prospective study of triglyceride level low-density lipoprotein particle diameter and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1996; 18: 276: 882-888.
120. Pyorala K, De Backer G, Graham I et. al. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. Euro Athero Soc and Euro Soc Hypertension. *Atherosclerosis* 1994;110:121-61.
121. Oki Jc. Dyslipidemi as in patients with diabetes mellitus: classification and risks and benefits of therapy. *Pharmacotherapy* 1995;15(3):3:17-37.
122. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.
123. West of Scotland Coronary Prevention Group. West of Scotland Coronary Prevention Study: identification of high-risk groups and comparison with other cardiovascular intervention trials. *Lancet* 1996;16:348:1339-1342.
124. Sheperd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333(20): 1301-1307.
125. Heinonen T, Stein E, Issacsohn J et. al. Atorvastatin in the treatment of severe hypercholesterolemia (abstract). In: 66th Congress of the Italy,214.
126. Heinonen T, Black D. Atorvastatin monotherapy and combination therapy in the treatment of severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995;115:20.
127. Heinonen T, Schroll H, McKenney J et. al. The lipid-lowering effects of atorvastatin and colestipol used as monotherapies and in combination. *Atherosclerosis* 1994;15:109:314.

128. Gmerek A, Yang R, Bays H et. al. Atorvastatin causes a dose dependent reduction in LDL- C and triglycerides [abstract] . In: 66th Congress of the European Atherosclerosis Society Abstract Book:1996;13-17.
129. Dart A, Jerums G, Nicholson G et. al. A multicenter doubleblind one-year study comparing safety and efficacy of atorvastatin versus simvastatin in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1997;80:39-44.
130. Bertolini S, Bittolo Bon G, Campbell LM et. al. Efficacy and safety of atorvastatin compared to pravastatin in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1997.
131. Schucker B, Willes JT, Santanello NC et. al. Change in cholesterol awareness and action: results from national physician and public surveys. *Arch Intern Med* 1991;15:666- 673.
132. Thelle DS. Epidemiology of hypercholesterolemia and European management guidelines. *Cardiology* 1990; 77 Suppl. 4:2-7.
133. Naoumova RP, Marais D, Firth JC et. al. Atorvastatin augments therapy of homozygous familial hypercholesterolemia by inhibiting upregulation of cholesterol synthesis after apheresis and bile acid sequestrants. *Circulation* 1996;94:1-583.
134. Bakker-Arkema RG, Davidson MH, Goldstein RJ et. al. Efficacy and safety of a new HMG -CoA reductase inhibitor atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA* 1996;275:128-133.
135. Hangbao M, Young M, Yan Y. Thromboxane (TX), Prostaglandin (PG) and Atorvastatin(Lipitor) literatures. *New York Sci J* 2015;8(10):93-100.
136. Ooi TC, Heinonen T, Alaupovic P et. al. Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin in patients with combined hyperlipidemia: a comparison with fenofibrate. *Art Thrombosis Vase Biol* 1997;17(9):1793-1799.
137. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a

- new HMG-CoA reductase inhibitor. *Art Thrombosis Vasc Biol* 1995;15:678 - 682.
138. Newman TJ, Kassler-Taub KB, Gelarden RT et. al. Safety of pravastatin in long-term trials conducted in the United States. *J Drug Dev* 1990;275-28.
139. Garnell WR. Interactions with hydroxymethylglutaryl-coenzyme. A reductase inhibitors. *Am J Health System Pharm* 1995;52:1639-1645.
140. Gonzalez Mariscal L, Contreras RG, Bolivar JJ, Ponce A, Chavez De Ramirez B, Cereijido M. Role of Calcium in Tight Junction Formation Between Epithelial Cells. *Am J Physiol* 1990;259:978-986.
141. Gundogdu E, Mangas-Sanjuan V, Gonzalez-Alvarez, I, Bermejo M., Karasulu E. "In vitro-in situ permeability and dissolution of fexofenadine with kinetic modeling in presence of sodium dodecyl sulfate", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2012;37 (1), 65-75.
142. Komin N, Toral R. Drug Absorption Through A Cell Monolayer: A Theoretical Work on A Non-Linear Three-Compartment Model. *Eur J of Pharm Sci.* 2009;37(2):106-114.
143. Arturson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 Cell Monolayers in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport. *Adv Drug Del Rev* 2001;46: 27-43.
144. Miller DM, Kato ANG, Chikhale EG, Borchardt RT. Cell Culture Models for Examining Peptide Absorption Peptide-Based Drug Design 1995;375-500.
145. Tretiach M, Van DD, Gillies MC. Transendothelial Electrical Resistance of Bovine Retinal Capillary Endothelial Cells is Influenced By Cell Growth Patterns: An Ultrastructural Study. *Clin Exp Ophthalmol* 2003;31: 348–353.
146. Walter E, Kissel T. Heterogeneity In The Human Intestinal Cell Line Caco-2 Leads to Differences in Transepithelial Transport. *Eur J Pharm Sci* 1995;3: 215-230.
147. Wilson G. Cell Culture Techniques for the Study of Drug Transport. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetic* 1990;15 (2): 159-163.

148. Boulenc X, Roques C, Joyeux H, Berger Y, Fabre G. Bisphosphonates Increase Tight Junction Permeability in the Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Model. *Int J Pharm* 1995;123: 13-24.
149. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JAM, Marxer A. Expression and Intracellular Transport of Microvillus Membrane Hydrolases in Human Intestinal Epithelial Cells. *J Cell Biology* 1985;101:838-851.
150. Rousset M, Labarthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer Fessard C, Dussaulx E et al. Enterocytic Differentiation and Glucose Utilization In The Human Colon Tumor Cell Line Caco-2: Modulation By Forskolin. *J Cell Physiol* 1985;123: 377-385.
151. Miret S, Abrahamse L, De Grone Els M. Comparison of In Vitro Models for The Prediction of Compound Absorption Across The Human Intestinal Mucosa. *J Biomol Screen* 2004;9(7):598-606.
152. Pade V, Stavchansky S. Link Between Drug Absorption Solubility and Permeability Measurements In Caco-2 Cells. *J Pharm Sci* 1998;87(12):1604-1607.
153. Rubas W, Jezyk N, Grass GM. Comparison of The Permeability Characteristics of A Human Colonic Epithelial (Caco-2) Cell Line to Colon of Rabbit, Monkey and Dog Intestine and Human Drug Absorption. *Pharm Res* 1993;10: 113-118.
154. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 Cell Monolayer In Prediction of Intestinal Drug Absorption, *Biotechnol Prog* 2006;22: 186-198.
155. Yee S. In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo Absorption In Man-Fact or Myth. *Pharm Res* 1997;14 (6):763-766.
156. Grama L. K., Rist G. M., Lennernäs H., Steffansena B. Impact of Carriers in Oral Absorption: Permeation Across Caco-2 Cells for The Organic Anions Estrone-3-Sulfate and Glipizide. *Eur J Phar Sci* 2009;37(3-4):378-386.
157. Artursson P. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture: A model For Studying the Passive Diffusion of Drugs Over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci* 1990;79.6: 476-482.

158. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial Properties of Human Colonic Carcinoma Cell Line Caco-2: Electrical Parameters, *Am J Physiol* 1984;247: 260-267.
159. Hilers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharm Res* 1990;7 (9): 902-910.
160. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn Langguth H, Wunderli-allenspach H et. al. P-glycoprotein Mediated Efflux on Caco-2 Cell Monolayers: The Influence of Culturing Conditions and Drug Exposure on P-gp Expression Levels. *J Pharm Sci* 1998;87(6):757-762.
161. Bravo SA, Nielsen CU, Amstrup J, Frokjaer S, Brodin B. In Depth Evaluation Of Gly-Sar Transport Parameters as a Function of Culture Time in The Caco-2 Cell Model. *Eur J Pharm Sci* 2004;21(1): 77-86.
162. D'Souza VM, Shertzer HG, Menon AG, Pauletti GM. High Glucose Concentration in Isotonic Media Alters Caco-2 Cell Permeability. *AAPS Pharm Sci* 2003;5 (3): 17-25.
163. Hidalgo IJ. Assessing The Absorption of New Pharmaceuticals. *Curr Top Med Chem* 2001;1 (5): 385-401.
164. Shao J, Kaushal G. Normal Flora: Living Vehicles for Noninvasive Protein Drug Delivery. *Int J of Pharm* 2004;286 (1-2): 117-124.
165. Bohets H, Annaert P, Mannens G, Bejsterveldt L, Anciaux K, Verboven P. Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development. *Curr Top Med Chem* 2001;1(5):367-383.
166. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchard RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterol* 1989;96:736-749.
167. Unell AL, Karlson J. Cell Cultures In Drug Discovery: An Industrial Perspective. *Drug Bioavailability* 2003;18:90-131.

168. Arturson P, Karlson J. Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;175(3):880-885.
169. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchard RT. The Use of Cultured Epithelial and Endothelial Cells for Drug Transport and Metabolism Studies. *Pharm Res* 1990;7(5):435-449.
170. Hughes TE, Sasak WV, Ordovas JM, Forte TM, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. A Novel Cell Line for the Study of Intestinal Lipoprotein Synthesis. *J Biol Chem* 1987;262(8):3762-3767.
171. Arturson P, Magnusson C. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture II: Effect of Extracellular Calcium Concentration on The Paracellular Transport of Drugs of Different Lipophilicities Across Monolayers of Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci* 1990;79(7):595-600.
172. Green J, Clay V, Richardson J, Hassan IF. The Effect Of Zolendronate and Pamidronate on The Intestinal Permeability Barrier In Vitro and In Vivo. *Int J Pharm* 1997;153: 59-66.
173. Boulenc X, Marti E, Joyeux H, Berger Y, Fabre G. Importance of The Paracellular Pathway for The Transport of a New Bisphosphonate Using the Human Caco-2 Monolayers Model, *Biochem. Pharmacol* 1993;46(9):1591-1600.
174. Anderberg EK, Nystrom C, Arturson P. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture VII: Effects of Pharmaceutical Surfactant Excipients and Bile Acids of Transepithelial Permeability in Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cells. *J Pharm Sci* 1992;81(9):879-887.
175. Arturson P, Ungell AL, Löfroth JE. Selective Paracellular Permeability in Two Models Of Intestinal Absorption: Cultured Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cells and Rat Intestinal Segments. *Pharm Res* 1993;10(8):1123-1129.
176. Bhagwant DR, Joseph P, Kao Y, Polli JE. Effects of Nonionic Surfactants on Membrane Transporters in Caco-2 Cell Monolayers. *Eur J Of Pharm Sciences* 2002;16:237-246.

177. Davis WW, Pfeiffer RR, Quay JF. Normal and Promoted Gastrointestinal Absorption of Water-Soluble Substances. I. Induced Rapidly Reversible Hyperabsorptive State in the Canine Fundic Stomach Pouch. *J Pharm Sci* 1970;59: 960–963.
178. Koga K, Ohyashiki M, Kawashima S. Modification of Ceftibuten Transport by the Addition of Non-Ionic Surfactants. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;49:17–25.
179. Miller DW, Batrakova EV, Kabanov AV. Inhibition of Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) Functional Activity With Pluronic Block Copolymers. *Pharm Res* 1999;16:396–401.
180. Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT. The Use of Surfactants To Enhance The Permeability of Peptides Through Caco-2 Cells By Inhibition of an Apically Polarized Efflux System. *Pharm Res* 1996;13:528–534.
181. Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS. Reversal of Multidrug Resistance Phenotype by Surfactants: Relationship to Membrane Lipid Fluidity. *Arch Biochem Biophys* 1995;319:309–315.
182. Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Chojnowski G, Kriegler AB, Nink V, Webster LK, Sawyer WH. Reversal of Multidrug Resistance by Surfactants. *Br J Cancer* 1992;66:62–68.
183. Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of Common Excipients on Caco–2 Transport of Low Permeability Drugs. *J Pharm Sci* 2001;90:1776–1786.
184. Nerurkar MM, Ho NF, Burton PS, Vidmar TJ, Borchardt RT. Mechanistic Roles of Neutral Surfactants on Concurrent Polarized and Passive Membrane Transport of a Model Peptide In Caco–2 Cells. *J Pharm Sci* 1997;86: 813–821.
185. Karamustafa F. Alendronatin Mikroemülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi Ve Caco-2 Hücrelerinden Geçişinin Değerlendirilmesi, 2005; Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
186. Martin BM. Tissue Culture Techniques. In: Martin BM, editor. Department of biochemistry. Birkhauser Boston;1994:29-34.

187. Talegaonkar S, Mustafa G, Akhter S, Iqbal ZI. Design and Development of Oral Oil-in-Water. Nanoemulsion Formulation Bearing Atorvastatin: In Vitro Assessment. *J Disper Sci Technol* 2010;31:5,690-701.
188. Andrew PL, McTavish D. A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in the Management of Hyperlipidaemias International Limited, Auckland, New Zealand *Adis drug evaluation, Drugs* 1997; 53 (5): 828-847.
189. Jaipur R, Sai S, Sehore MP, Lakshmi N, Bhopal MP. Preparation and valuation of the self emulsifying drug delivery system containing atorvastatin HMG-COA inhibitor. *Int J Pharm and Pharmaceutical Sci* 2011;3.
190. Sachan K, Kasture SB. Self-Eumlsifying Drug Delivery System A Novel Approach for enhancement of Bioavalibility. *Inter J PharmTech Res CODEN IJPRIF ISSN : 0974-4304* 2010;2,1738-1745.
191. Nikolakakis I, Malamataris S. Self-Emulsifying Pellets: Relations Between Kinetic Parameters of Drug Release and Emulsion Reconstitution—Influence of Formulation Variables. *J Pharm Sci* 2014;103(5):1453-1465.
192. Akula S, Gurram AK, Devireddy SR. Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems: An Attractive Strategy for Enhanced Therapeutic Profile. *Hind Publis Corp Inter Scholarly Res Notices* 2014; 964051, 11 pages.
193. Lakshmi NV, Kalyan R, Kishore K, Raj KM, Srinivasa RP, Venkateswara RB. Enhanced Dissolution Rate of Atorvastatin Calcium using Solid Dispersion with PEG 6000 by Dropping Method. *J Pharm Sci & Res* 2010; 8: 484-491.
194. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. US Department of Healthy. FDA. Center For Drug Evaluation and Research 1998.
195. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. US Department Of Healthy FDA. Center For Drug Evaluation and Research 2000.

196. Venkatesh M, Mallesh K. Self-Nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of atorvastatin-formulation and bioavailability studies. *J Drug Deliver & Therapeutics* 2013;3(3),131-142.
197. Amruktar C, Salunkhe K, Chaudhari S. Study on self nano emulsifying drug delivery system of poorly water soluble drug rosuvastatin calcium. *J Pharm Res* 2014;3(4):2137-2151.
198. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm.
199. Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, Hall SD. The Effect of Rifampin Administration on the Disposition of Fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:114–121.
200. Gundogdu E, Karasulu HY, Koksall C, Karasulu E. “The Novel Oral Imatinib Microemulsions: Physical Properties, Cytotoxicity Activities And Improved Caco–2 Cell Permeability”. *J Microencapsulation* 2013;30(2),132-142.
201. Gonzalez AI, Fernandez TC, Garrigues TM, Casabo AV, Garcia RA, Bermejo M. Kinetic Modelling of Passive Transport and Active Efflux of a Fluoroquinolone Across Caco–2 Cell Using a Compartmental Approach In NonMEM, *Xenobiotica* 2005;35(12):1067–1088.
202. Okyar, A. “P-glikoprotein ve P-glikoproteininin İlaç Farmakokinetiğindeki Rolü”. *Türk Farmakoloji Derneği Bülteni* 2005;83:17-22.
203. Ege MA, Karasulu HY, Güneri T. Triangle Phase Diagram Analysis Software, The 4th International postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics. 2004 Abstract Book.
204. Sarpar K, Pawar YB, Bansal AK. Self emulsifying drug delivery systems; a strategy to improve oral biyoavailability. Department of pharmaceutics national institute of pharmaceutical education and research CRIPS Nagar 2010; 11(3):42-49.
205. Balamukar K, Raghavan CV, Selvan NT, Prasad RH, Abdu S. Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of Rosuvastatin calcium:

- Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013;112-337–343.
206. Bernard S, Mathew M, Senthilkumar KL, Girija KN. Simultaneous Estimation of Atorvastatin Calcium and Amlodipine besylate by UV Spectrophotometric method using hydrotropic solubilization. *J Drugs and Medicines* 2013;5(1): 105-112.
207. Monika S, Rajeev G, Grupta GD. Formulation and evaluation of solid dispersion of atorvastatin calcium. *J Pharm Sci Innovation* 2013;2(4),78-81.
208. Karasulu HY, Gündoğdu E, Turgay T, Türk UÖ, Apaydın S, Şimşir İY, Yılmaz C, Karasulu E. Development and Optimization of Self-emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) for Enhanced Dissolution and Permeability of Rosuvastatin. *Current Drug Delivery* 2016;13(3):362-370.
209. Suparna SB, Jasmine GA. Development and Evaluation of Liquid and Solid Self-microemulsifying Drug Delivery System of Lovastatin. *Asian J Pharm* 2016;10(1):22-35.
210. Ege MA, Karasulu HY, Karasulu E, Ertan G. "A computer program designed for in vitro dissolution kinetics, in vitro-in vivo kinetic correlations and routine applications" 4th Central European symposium on Pharmaceutical Technology, 2001; 127.
211. Çilek A, Çelebi N, Tırnaksız F. Lecithin-Based Microemulsion of a Peptide for Oral Administration: Preparation, Characterization, and Physical Stability of the Formulation. *Drug Deliver* 2006;13(1):19-24.
212. Weibull W. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics: Transactions of the ASME* 1951;18(3):293-297.
213. Langenbucher F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J Pharm and Pharmacology* 1972;24(12):979-981.
214. Ramteke KH, Dighe PA, Kharat AR, Patil SV. Mathematical Models of Drug Dissolution. *Sch Acad J Phar* 2014;3(5):388-396.

215. Medina JR, Salazar DK, Hurtado M, Contes AR, Dominguez-Ramirez AM. Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system. *J Saudi Pharm* 2014; 22:141–147.



ÖZGEÇMİŞ

26.09.1988 yılında Samsun'da doğdum. İlkokulu ve ortaokulu İlkadım İlköğretim okulu Samsun'da okudum. Lise öğrenimimi ise Ondokuz Mayıs Anadolu Lisesinde tamamladım. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne başladım ve 2012 yılında mezun oldum. 2013 yılı şubat ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

e-posta: mine.diril@gmail.com