



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

**DOKTORA
TEZİ**

**TENOFOVİR İÇEREN LİPİT KAYNAKLI KENDİLİĞİNDEN
EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI NANO SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

DERYA BEKTAŞ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2019



**TENOFOVİR İÇEREN LİPİT KAYNAKLI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE
İLAÇ TAŞIYICI NANO SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO-İN
VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Derya BEKTAŞ

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

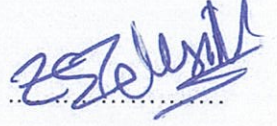
OCAK 2019

Derya BEKTAŞ tarafından hazırlanan "TENOFVİR İÇEREN LİPİT KAYNAKLI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI NANO SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

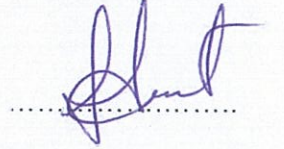
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan: Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Selma ŞAHİN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 18/01/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

18/01/2019

Derya BEKTAŞ



TENOFOVİR İÇEREN LİPİT KAYNAKLI KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE İLAÇ TAŞIYICI
NANO SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Derya BEKTAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2019

ÖZET

Tez kapsamındaki çalışmalar, hepatit B tedavisinde kullanılan tenofovirin düşük biyoyararlanım probleminin yeni ilaç taşıyıcı sistemlerle iyileştirilmesini hedeflemektedir. Bu amaçla, tenofovir içeren lipit kaynaklı kendiliğinden emülsifiye nano sistemler (SNEDDS) ve S/Y/S çoklu emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler (SDEDDS) geliştirilmiş ve in vitro in vivo değerlendirmeler yapılmıştır. Uygun yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeler seçilerek formülasyon ve işlem parametrelerinin etkisini araştırmak amacıyla formülasyon geliştirme sürecinde deneysel tasarım (DoE) yaklaşımından faydalanılmıştır. SNEDDS'in oluşturulmasında, kalite tasarımı (QbD) yaklaşımıyla kritik kalite parametreleri, kritik risk yönetim planı ve istatistiksel deney tasarımı modeli kullanılarak tenofovir için en uygun formülasyonlar geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların in vitro karakterizasyonları (damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, türbidite ve viskozite) yapılmıştır. Elde edilen optimum formülasyonlarda da in vitro karakterizasyonların yanında, morfolojik değerlendirmeler, in vitro çözünme hızı, stabilite, ex-vivo permeabilite, in vivo farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları, açlık tokluk durumlarındaki varyasyon değerlendirmeleri yapılmıştır. Ayrıca, lipit taşıyıcı sistemlerde, in vitro çözünme hızı/salım çalışmaları in vivoyu yeterince taklit edemediğinden SNEDDS formülasyonlarının çözünme ve sindirimini incelemek amacıyla açlık ve tokluk koşullarında in vitro lipoliz testleri geliştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda optimum damlacık boyutlu, termodinamik açıdan dayanıklı, ticari ürüne (Viread® tablet) benzer hızlı çözünme (15 dk'da %85'den fazla) gösteren SNEDDS ve SDEDDS elde edilmiştir. Açlık ve tokluk ortamlarında yapılan lipoliz çalışmalarında in vitro çözünme hızına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ex-vivo permeabilite çalışmalarında SDEDDS'in permeabilitesinin SNEDDS sistemlere göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. SNEDDS formülasyonlarının farmakokinetik profili ilk zaman noktalarındaki konsantrasyonların saptanamaması nedeniyle tanımlanamamıştır. Çoklu emülsiyon formülasyonun açlık ve tokluk AUC_{0-t} değerlerinin ticari ürüne göre yaklaşık 2 kat, C_{maks} değerlerinin ise yaklaşık 1,2 kat artış gösterdiği saptanmıştır. Çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasında da anlamlı fark (p>0,05) bulunmadığı görülmüştür. Sonuçlar, lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilen çoklu emülsiyon formülasyonunun tenofovirin oral biyoyararlanımını artırdığını ve açlık tokluk varyasyonunun bulunmadığını göstermektedir.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Tenofovir, nanoemülsiyon, çoklu emülsiyon, kalite tasarımı, lipoliz, biyoyararlanım
Sayfa Adedi : 249
Danışman : Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

THE DEVELOPMENT OF LIPID-BASE SELF EMULSIFYING DRUG DELIVERY NANO
SYSTEMS CONTAINING TENOFOVIR AND IN VITRO-IN VIVO EVALUATION

(Ph. D. Thesis)

Derya BEKTAŞ

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2019

ABSTRACT

This thesis aims to improve the low bioavailability problem of tenofovir used in the treatment of hepatitis B with new drug delivery systems. For this purpose, tenofovir-containing lipid-based self-nanoemulsifying systems (SNEDDS) and W/O/W double emulsion drug delivery systems (SDEDDS) were developed and these systems were evaluated in vitro and in vivo. In order to investigate the effect of formulation and process parameters by selecting suitable oil, surfactant and cosurfactants, design of experimental (DoE) approach was used in formulation development process. The most appropriate SNEDDS formulations for tenofovir have been developed by using critical quality parameters, critical risk management plan and statistical experimental design model with quality by design (QbD) approach. In vitro characterizations of the prepared formulations (droplet size, polydispersity index, zeta potential, turbidity, and viscosity) were performed. In addition to in vitro characterizations, morphological evaluations, in vitro dissolution, stability, ex-vivo permeability, in vivo pharmacokinetics, bioavailability studies, and fast and fed state variation were evaluated in the optimum formulations obtained. In addition to investigate the dissolution and digestion of SNEDDS formulations, in vitro lipolysis tests were developed in fast and fed state conditions due to sufficiently to mimic in vivo conditions due to in vitro dissolution rate/release studies in lipid-based drug delivery systems. As a result of studies, SNEDDS and SDEDDS have been obtained which have the optimal droplet size, thermodynamically stable, fast dissolution similar to commercial product (Viread® tablet) (more than 85% in 15 minutes). Lipolysis studies performed in fast and fed state conditions gave similar results in vitro dissolution rate. In the ex-vivo permeability studies, the permeability of SDEDDS was found to be approximately 2 times higher than that of the SNEDDS systems. The pharmacokinetic profile of SNEDDS formulations could not be identified because of the concentrations at the first time points could not be determined. The fast and fed states AUC_{0-t} values of the double emulsion formulation were found to be approximately 2-fold higher than the commercial product and C_{max} values increased approximately 1,2-fold. There was no significant difference (p>0,05) between the fast and fed state bioavailability of double emulsion. The results show that the double emulsion formulation, developed as a lipid-based drug delivery system, increases the oral bioavailability of tenofovir and does not have fast and fed state variation.

Science Code : 1020
Key Words : Tenofovir, nanoemulsion, double emulsion, quality by design,
lipolysis, bioavailability
Page Number : 249
Supervisor : Assoc.Prof. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel bir ortamda çalışmamı sağlayan değerli hocam Sn. Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, Lisans ve doktora eğitimim boyunca tecrübe ve bilgileriyle beni yönlendiren değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ ve Sn. Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK'e, Çalışmalarım boyunca verdikleri bilimsel destekler ve öneriler için doktora tez izleme komitemde yer alan Sn. Prof. Dr. Selma ŞAHİN'e, İn vivo analizler ve farmokinetik değerlendirmelerdeki yardımlarından dolayı Sn. Prof. Dr. Ercüment KARASULU'ya, Doktora çalışmalarımı değerli yardım ve katkılarıyla destekleyen Sn. Doç. Dr. Fatmanur Tuğcu DEMİRÖZ'e, Doktora çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Sn. Doç. Dr. Sibel İlbasmış TAMER'e, Dr. Ecz. Serdar TORT'a, Dr. Ecz. Alptuğ KARAKÜÇÜK'e, Ecz. Merve Çelik TEKELİ'ye ve Ecz. Seval Olgaç'a, İn vivo çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) öğretim üyeleri Vet. Hek. Dr. Elvan ANADOL ve Vet. Hek. Dr. Elif ERGÜVEN KAYA'ya, Bilimsel desteklerini aldığım ve birlikte güzel zamanlar geçirdiğimiz bölüm arkadaşlarıma ve Fatma ÇELİK'e, "Tenofovir İçeren Lipit Kaynaklı Kendiliğinden Nano Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro İn Vivo Değerlendirilmesi" 115S405 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a, Bilimsel çalışmalarım ve doktora eğitimim boyunca, eczanemde bana yardımcı olan kalfalarım ve doktora eğitimimi destekleyen hastalarım, Her zaman yanımda olan, tüm zorlukları aşmamda beni destekleyen ve iyi bir birey olarak yetişebilmem için emek veren sevgili annem Asuman BEKTAŞ'a, babam Mehmet BEKTAŞ'a ve biricik kardeşim Veli BEKTAŞ'a teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xviii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Oral Biyoyararlanım Artırma Stratejileri.....	5
2.2. Lipit Kaynaklı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	6
2.3. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler	7
2.3.1. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin avantajları ve dezavantajları	8
2.3.3. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan maddeler	11
2.3.4. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin hazırlanması	13
2.3.5. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde yapılan kontroller	17
2.4. Çoklu Emülsiyonlar	18
2.4.1. Çoklu emülsiyonun bileşenleri	20
2.4.2. Çoklu emülsiyonların hazırlama yöntemleri	20
2.4.3. Çoklu emülsiyonların avantajları ve dezavantajları	21
2.4.4. Çoklu emülsiyonların salım mekanizması	22
2.4.5. Çoklu emülsiyonlarda yapılan kontroller	22
2.4.6. Çoklu emülsiyonlarla yapılan çalışmalar	23

	Sayfa
2.5. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları	24
2.5.1. Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemlerde in vitro çözünme hızı testleri neden yeterli değildir?	24
2.5.2. İn vitro lipoliz testleri.....	24
2.5.3. Lipoliz deney ortamının koşul ve bileşenleri.....	26
2.5.4. Lipoliz ile yapılan güncel çalışmalar ve değerlendirmeler	33
2.5.5. İn vitro lipoliz verileriyle-in vivo veriler arasında korelasyon.....	34
2.6. Tenofovir	36
2.6.1. Fizikokimyasal, farmakokinetik ve farmokodinamik özellikleri	36
2.6.2. Tenofovirin tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar	41
2.6.3. Tenofovirlle yapılan biyoyararlanım çalışmaları	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Gereç	45
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	45
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler	46
3.2. Yöntem.....	47
3.2.1. Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin tespiti	47
3.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	49
3.2.3. Tenofovir-yardımcı madde etkileşim/geçimsizlik çalışmaları.....	52
3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	53
3.3.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi.....	53
3.3.2. Kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonun geliştirilmesi.....	55
3.3.3. Etkin madde yükleme çalışmaları	60
3.3.4. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonlarda yapılan kontroller	60
3.3.5. Çoklu emülsiyonlar.....	63

	Sayfa
3.3.6. Çoklu emülsiyon formülasyonu geliştirme çalışmaları	63
3.3.7. Etkin madde yükleme çalışmaları.....	64
3.4. İn vitro Çözünme Hızı Çalışmaları.....	64
3.4.1. İn vitro çözünme hızı ortamlarının hazırlanması	65
3.4.2. Çözünme ortamları için spektrofotometrik miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	66
3.4.3. Referans ürünün in vitro çözünme hızı çalışmaları	67
3.4.4. F1 ve F2 formülasyonların çözünme hızı çalışmaları.....	68
3.4.5. F3 formülasyonun çözünme hızı çalışmaları.....	69
3.5. Stabilite Çalışmaları	69
3.5.1. Termodinamik stabilite çalışmaları.....	69
3.5.2. Kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları	70
3.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları	70
3.6.1. Lipoliz çalışmaları deney prosedürü.....	70
3.6.2. Lipoliz örneklerinin analizi	73
3.7. Tenofovir İçeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde İn Vitro ve Ex-Vivo Olarak Geçişinin İncelenmesi	74
3.8. Biyoyararlanım Çalışmaları	76
3.8.1. Deney hayvanları	76
3.8.2. Biyoyararlanım çalışma tasarımı.....	77
3.8.3. Analiz yöntemi	78
3.9. İstatiksel Değerlendirmeler.....	81
4. BULGULAR	83
4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular	83
4.1.1. Çözünürlük.....	83
4.1.2. Partisyon katsayısı.....	83
4.1.3. Partikül büyüklüğünün belirlenmesi.....	83

	Sayfa
4.1.4. Tenofovirin erime derecesinin tayini.....	84
4.1.5. Stabilite çalışmaları bulguları	84
4.2. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine ait Bulgular.....	88
4.2.1. Etkin madde için λ_{maks} değerinin hesaplanması	88
4.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini ve standart doğrusunun çizilmesi.....	88
4.2.3. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemlerinin validasyonu.....	90
4.3. Tenofovir-Yardımcı Madde Etkileşim/Geçimsizlik Çalışmaları Bulguları.....	95
4.3.1. Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742 ve çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının DSC analizleri	96
4.3.2. Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742 ve çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının FT-IR analizleri	103
4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları Bulguları	107
4.4.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi.....	107
4.4.2. Tenofovirin yağ, YEM ve YYEM'deki çözünürlük/partisyon katsayısı ve HLB bulguları.....	107
4.4.3. Yağ, YEM ve YYEM seçilmesi	109
4.4.4. Faz diyagramları	109
4.4.5. Kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonun bulunması.....	111
4.4.6. F1 formülasyonu için deney tasarımı	111
4.4.7. F2 formülasyonu için deney tasarımı	121
4.4.8. Etkin madde yükleme çalışmaları	131
4.4.9. Geliştirilen formülasyonlarda yapılan karakterizasyon bulguları	132
4.4.10. Çoklu emülsiyonlar.....	135
4.4.11. Çoklu emülsiyon formülasyonu	137

Sayfa

4.4.12. Geliştirilen çoklu emülsiyon (S/Y/S) formülasyonunun karakterizasyon bulguları (F3).....	138
4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları Bulguları	141
4.5.1. Tenofovirin in vitro çözünme ortamlarındaki UV spektrumu	141
4.5.2. Spektrofotometrik miktar tayini ve kalibrasyonu	142
4.5.3. Spektrofotometrik miktar tayini yöntem validasyonu	145
4.5.4. Ticari üründe in vitro çözünme hızı çalışmaları	149
4.5.5. F1 ve F2 formülasyonlarının çözünme hızı çalışmaları bulguları	150
4.5.6. Çoklu emülsiyonda çözünme hızı çalışmaları bulguları	153
4.6. Stabilite Çalışmaları	154
4.6.1. Termodinamik stabilite çalışmaları	155
4.6.2. Hızlandırılmış kısa süreli stabilite çalışmaları	155
4.7. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları	157
4.7.1. Lipoliz çalışmaları sonuç bulguları	157
4.7.2. Lipoliz örneklerinin analizi	162
4.7.3. Lipoliz örneklerinin analizinin yöntem validasyonu	163
4.8. Tenofovir içeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde İn Vitro ve Ex-Vivo Olarak Geçişine Ait Bulgular	169
4.9. Biyoyararlanım Çalışmaları	171
4.9.1. Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yöntem geliştirilmesine ait bulgular	171
4.9.2. Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yönteminin validasyonu	173
4.9.3. Farmakokinetik ve biyoyararlanım sonuçları	183
5. TARTIŞMA.....	195
5.1. Tenofovirin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini	195
5.2. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	196
5.3. Tenofovir -Yardımcı Madde Etkileşim/Geçimsizlik Çalışmaları	198

	Sayfa
5.4. Formülasyonun Geliştirme Çalışmaları	199
5.4.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi.....	200
5.4.2. Etkin madde yükleme çalışmaları	204
5.4.3. Geliştirilen formülasyonlarda yapılan kontroller	204
5.4.4. Çoklu emülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi.....	206
5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	208
5.6. Geliştirilen Formülasyonlarda Stabilitate Çalışmaları	209
5.7. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları	211
5.7.1. Analiz yönteminin geliştirilmesi	211
5.7.2. İn vitro lipoliz deney modeli	211
5.8. Tenofovir İçeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi.....	214
5.9. İn Vivo Çalışmalar	215
5.9.1. Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yönteminin geliştirilmesi.....	215
5.9.2. Biyoyararlanım çalışmaları.....	216
5.10. İn Vitro-İn Vivo Korelasyon Değerlendirmeleri	218
6.SONUÇ	219
KAYNAKLAR.....	223
EKLER.....	245
EK-1. Etik Kurul Onayı.....	246
EK-2. Etik Kurul Onayı.....	247
ÖZGEÇMİŞ	248

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerle yapılan çalışma örnekleri.....	10
Çizelge 2.2. QbD yaklaşımının geleneksel formülasyon geliştirme proseslerine göre avantajları	15
Çizelge 2.3. Çoklu emülsiyonların uygulama alanlarına örnekler	19
Çizelge 2.4. İn vitro lipoliz koşullarına yönelik yapılan çalışma örnekleri	32
Çizelge 2.5. İn vitro lipoliz verileriyle-in vivo veriler arasında kurulan korelasyon örnekleri	35
Çizelge 2.6. Tenofovirin fizikokimyasal özellikleri	37
Çizelge 2.7. Tenofovirin farmakokinetik özellikleri	38
Çizelge 3.1. HLB değerlerine göre emülgatörlerin kullanımları.....	54
Çizelge 3.2. Hedeflenen nanoemülsiyonun özellikleri	56
Çizelge 3.3. Kendiliğinden nanoemülsifiye sistem için kritik kalite parametrelerinin belirlenmesi	56
Çizelge 3.4. Risk matrisi: Formülasyon geliştirilmesinde risk değerlendirmesi .	57
Çizelge 3.5. F1 formülasyonun deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin faktör seviyeleri ve yanıtlar.....	59
Çizelge 3.6. F2 formülasyonun deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin faktör seviyeleri ve yanıtlar	60
Çizelge 3.7. FDA çözünme hızı metotları veritabanında tenofovir için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi.....	64
Çizelge 3.8. pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 in vitro çözünme ortamları	65
Çizelge 3.9. Referans ürünün in vitro çözünme hızı test koşulları	67
Çizelge 3.10. F1 ve F2 formülasyonların in vitro çözünme hızı test koşulları ...	68
Çizelge 3.11. Gastrik lipoliz ortam koşulları (FASGIF-FESGIF)	72
Çizelge 3.12. İntestinal lipoliz ortam koşulları (FASSIF- FESSIF)	73
Çizelge 3.13. Tenofovir içeren emülsiyonlar	75
Çizelge 3.14. Biyoyararlanım çalışma tasarımı	78

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.15. HPLC sisteminin akış özellikleri.....	80
Çizelge 3.16. MS/MS sisteminin mass koşulları	80
Çizelge 4.1. Tenofovirin 25°C'de ve 37°C'de distile sudaki çözünürlük değerleri	83
Çizelge 4.2. Tenofovirin 25°C ve 37°C'de oktanol/distile su arasındaki partisyona katsayısına ait bulgular	83
Çizelge 4.3. Tenofovirin distile sudaki kalibrasyon parametreleri	88
Çizelge 4.4. Tenofovirin etanoldeki kalibrasyon parametreleri	89
Çizelge 4.5. Tenofovirin distile suda yapılan analizine ait geri elde sonuçları ..	90
Çizelge 4.6. Tenofovirin etanolde yapılan analizine ait geri elde sonuçları.....	90
Çizelge 4.7. Tenofovirin distile sudaki analizine ait kesinlik sonuçları	91
Çizelge 4.8. Tenofovirin etanoldeki analizine ait kesinlik sonuçları	91
Çizelge 4.9. Tenofovirin 25°C'de orta ve uzun zincirli yağlar ve distile su arasındaki ortalama partisyona katsayısı (A) ve yağlar (B), YEM-YYEM (C) çözünürlük ve HLB değerlerine ait bulgular	107
Çizelge 4.10. SNEDDS formülasyonların bileşenleri ve HLB değerleri	109
Çizelge 4.11. Nanoemülsiyonların Yağ-YEM-YYEM ve su yüzdelelerini gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler.....	110
Çizelge 4.12. Nanoemülsiyonların Yağ-YEM-YYEM ve su yüzdelelerini gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler.....	110
Çizelge 4.13. F1 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları	112
Çizelge 4.14. F1 formülasyonu için faktöriyel deney tasarım modeli ve yanıtları	114
Çizelge 4.15. F1 formülasyonu için damlacık boyutu ve PDİ yanıtları verilerinin dönüştürülmesi.....	114
Çizelge 4.16. F1 formülasyonu için damlacık boyutu modeli analiz tablosu....	115
Çizelge 4.17. F1 formülasyonu için PDİ analiz tablosu	117
Çizelge 4.18. Deneyisel olarak hedef formülasyonun %95 güven aralığında beklenen karakterizasyon bulguları	120

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.19. Deneysel olarak hedef formülasyonun karakterizasyon bulgular	121
Çizelge 4.20. F2 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları	122
Çizelge 4.21. F2 formülasyonu için faktöriyel deney tasarım modeli ve yanıtları	124
Çizelge 4.22. F2 formülasyonu için damlacık boyutu ve PDİ yanıt verilerinin dönüştürülmesi	124
Çizelge 4.23. F2 formülasyonu için damlacık boyutu modeli analiz tablosu	125
Çizelge 4.24. F2 formülasyonu için PDİ analiz tablosu	127
Çizelge 4.25. Deneysel olarak hedef formülasyonun %95 güven aralığında beklenen karakterizasyon bulguları	131
Çizelge 4.26. Deneysel olarak hedef formülasyon karakterizasyon özellikleri	131
Çizelge 4.27. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyon bileşenleri	132
Çizelge 4.28. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonların karakterizasyonları	132
Çizelge 4.29. Çoklu emülsiyona ait Yağ-YEM-YYEM çözünürlük ve HLB değerleri	136
Çizelge 4.30. Hidrofilik-lipofilik YEM oranının emülsiyon tipine etkisi	136
Çizelge 4.31. Primer emülsiyonun Km oranına göre damlacık boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları	137
Çizelge 4.32. Geliştirilen çoklu emülsiyonun karakterizasyon özellikleri	138
Çizelge 4.33. Tenofovirin pH 1,2'deki kalibrasyon parametreleri	143
Çizelge 4.34. Tenofovirin pH 4,5'deki kalibrasyon parametreleri	143
Çizelge 4.35. Tenofovirin pH 6,8'deki kalibrasyon parametreleri	144
Çizelge 4.36. Tenofovirin pH 4,5 ortamında geri elde sonuçları	145
Çizelge 4.37. Tenofovirin pH 4,5 ortamında kesinlik sonuçları	146
Çizelge 4.38. Referans ürünün pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki çözünme değerleri	150
Çizelge 4.39. F1 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 'deki çözünme değerleri	151

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.40. F2 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'deki çözünme değerleri	152
Çizelge 4.41. F3 formülasyonun pH1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki çözünme değerleri	154
Çizelge 4.42. F1 (A) ve F2 (B) formülasyonuna ait 25°C (a), 4°C (b) ve 40°C (c) stabilite sonuçları	155
Çizelge 4.43. F3 formülasyonun 25°C stabilite sonuçları	157
Çizelge 4.44. Gastrik lipolizde 15. dk'da çözünen/sindirilen ortalama tenofovir miktarı	158
Çizelge 4.45. Gastrik lipoliz açlık-tokluk durumunda harcanan sırasıyla HCl ve NaOH miktarları	158
Çizelge 4.46. İntestinal lipoliz açlık-tokluk durumunda harcanan NaOH miktarı	159
Çizelge 4.47. İntestinal lipolizde 15. dk'da çözünen/sindirilen tenofovir miktarı a) Açlık durumu, b) Tokluk durumu	160
Çizelge 4.48. Tenofovirin asetonitril ortamındaki kalibrasyon parametreleri ...	163
Çizelge 4.49. Tenofovirin asetonitril ortamındaki %geri elde sonuçları	164
Çizelge 4.50. Tenofovirin asetonitrilde yapılan analizine ait kesinlik sonuçları	164
Çizelge 4.51. Tenofovir içeren emülsiyonların ve çözeltisinin akı ve permeabilite değerleri	170
Çizelge 4.52. Tenofovire ait analiz veriler-tenofovir ve ornidazol	171
Çizelge 4.53. Tenofovir kalibrasyon konsantrasyon aralığı	172
Çizelge 4.54. Stok çözelti kararlılığı bulguları	173
Çizelge 4.55. Carry over (taşınma) bulguları	174
Çizelge 4.56. Dilüsyon doğruluğu bulguları	174
Çizelge 4.57. Gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları	175
Çizelge 4.58. Günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (1.gün, 2.gün, 3.gün ve günler arası)	175
Çizelge 4.59. Kısa süreli oda sıcaklığı (KSOS) kararlılığı bulguları	177
Çizelge 4.60. Tenofovir ve iç standart ornidazole ait LLOQ bulguları	178

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.61. Matriks etkisi bulguları.....	178
Çizelge 4.62. Yöntem seçimliği bulguları.....	179
Çizelge 4.63. Açlık grubuna ait farmakokinetik parametreler.....	191
Çizelge 4.64. Tokluk grubuna ait farmakokinetik parametreler.....	192

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Lipit kaynaklı sistemlerin intestinal ilaç transportu	7
Şekil 2.2. Yıllar içerisindeki SEDDS çalışmalarının gelişimi ve ticari ürünlere ait örnekler	9
Şekil 2.3. Üçgen faz diyagramı	13
Şekil 2.4. Çoklu emülsiyonlar	18
Şekil 2.5. Çoklu emülsiyon tipleri	19
Şekil 2.6. Lipitlerin gastrointestinal sistemdeki sindirim süreci.....	26
Şekil 2.7. İn vitro lipoliz model tasarımı	29
Şekil 2.8. TNO gastrointestinal model (TIM) dinamik lipoliz modeli	30
Şekil 2.9. Tenofovir disoproksil fumaratın kimyasal yapısı	36
Şekil 2.10. Tenofovirin metabolizması	39
Şekil 3.1. Tenofovir içeren SNEDDS için yapılan Ishikawa (Fishbone) diyagramı	57
Şekil 3.2. Çoklu emülsiyonun geliştirilmesi	64
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan akış gradient	80
Şekil 4.1. Tenofovirin partikül büyüklüğü dağılım grafiği.....	84
Şekil 4.2. Tenofovirin erime derecesi	84
Şekil 4.3. Tenofovirin distile suda 25°C'deki stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlar a)0. gün, b)1.gün, c)1. ay, d)3. ay	86
Şekil 4.4.Tenofovirin distile suda, 4°C'de yapılan stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlar a)0. gün, b)1.gün, c)1. ay, d)3. ay	87
Şekil 4.5. Tenofovirin distile sudaki UV spektrumu	88
Şekil 4.6. Tenofovirin distile sudaki kalibrasyon grafiği	89
Şekil 4.7. Tenofovirin etanoldeki kalibrasyon denklemi	89

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. Tenofovir, çözünme ortamı ve formülasyon bileşenlerinin UV spektrumları a)Tenofovir, b)Distile su, c)Etanol, d)Oleik asit, e)İmwitor 742, f)Cremophor RH 40, g)Tween 20, h)Propilen glikol, i)Abil Em 90, j)Labrafil.....	95
Şekil 4.9. 100°C'deki DSC termogramları a)Tenofovir, b)Oleik asit, oleik asit-tenofovir, c)Tween 20, Tween 20-tenofovir, d)Cremophor RH 40, Cremophor RH 40-tenofovir.....	99
Şekil 4.10. 150°C'deki DSC termogramları a)Tenofovir, b)Oleik asit-tenofovir, c)Tween 20-tenofovir, d)Cremophor RH 40-tenofovir e)İmwitor 742-tenofovir, f)Propilen glikol-tenofovir, g)Labrafil-tenofovir, h)Abil Em 90-tenofovir	102
Şekil 4.11. Tenofovir ve formülasyon bileşenlerinin 1:1 karışımlarından elde Edilen FT-IR grafikleri a)Tenofovir, oleik asit, tenofovir-oleik asit (1:1), b)Tenofovir, Tween 20, tenofovir-Tween 20 (1:1), c)Tenofovir, Cremophor RH 40 tenofovir-Cremophor RH 40 (1:1), d)Tenofovir, İmwitor 742, tenofovir-İmwitor 742 (1:1), e)Tenofovir, propilen glikol, tenofovir-propilen glikol (1:1), f) Tenofovir, Labrafil, tenofovir-Labrafil (1:1), g)Tenofovir, Abil Em 90, tenofovir-Abil Em 90 (1:1)	106
Şekil 4.12. Oleik asite ait üçlü faz diyagramlar	110
Şekil 4.13. İmwitor 742'ye ait ait üçlü faz diyagramları	111
Şekil 4.14. F1 formülasyonuna ait bileşen miktarların damlacık boyutu üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri	116
Şekil 4.15. F1 formülasyonuna ait bileşen miktarların PDİ üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri	118
Şekil 4.16. F1 formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi deney verileri ile model sonucu oluşan tahmini verilerin karşılaştırılması.....	119
Şekil 4.17. Hedef formülasyon bileşimi ve karakterizasyon özellikleri	120
Şekil 4.18. Hedef formülasyona ait damlacık boyutu ve PDİ özellikleri.....	121
Şekil 4.19. F2 formülasyonuna ait bileşen miktarların damlacık boyutu üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri	126
Şekil 4.20. F2 formülasyonuna ait bileşen miktarların PDİ üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri	128

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. F2 formülasyonuna ait, damlacık boyutu ve polidispersite indeksi yanıtlarına ait deney verileri ile model sonucu oluşan tahmini verilerin karşılaştırılmasına ait grafik.....	129
Şekil 4.22. Hedef formülasyon bileşimi ve karakterizasyon özellikleri	130
Şekil 4.23. Deneysel ortamda hedef formülasyona (F2) ait damlacık boyutu ve PDİ özellikleri	131
Şekil 4.24. Formülasyonların TEM görüntüleri A)F1, B)F2	135
Şekil 4.25. Primer emülsiyonun damlacık boyutu ve PDİ dağılımı.....	137
Şekil 4.26. F3 formülasyonun polarize mikroskop görüntüsü	140
Şekil 4.27. F3 formülasyonun TEM analiz görüntüleri	140
Şekil 4.28. Tenofovirin pH 1,2 (a), pH 4,5 (b) ve pH 6,8 (c) ortamlarındaki UV spektrumları	142
Şekil 4.29. Tenofovirin pH 1,2 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu	143
Şekil 4.30. Tenofovirin pH 4,5 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu	144
Şekil 4.31. Tenofovirin pH 6,8 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu	144
Şekil 4.32. Tenofovirin F1, F2 ve F3 formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin pH 4,5'daki UV spektrumları; a)pH 4,5 ortamı, b)Oleik asit, c)İmwitor 742, d)Cremophor RH 40, e)Tween 20, f)Propilen glikol, g)Abil Em 90, h)Labrafil	148
Şekil 4.33. Viread® tabletin pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri.....	149
Şekil 4.34. F1 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri.....	151
Şekil 4.35. F2 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri.....	152
Şekil 4.36. Viread®, F1 ve F2 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı profilleri	153
Şekil 4.37. F3 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri.....	154
Şekil 4.38. FASGIF ortamında harcanan HCl miktarı	158
Şekil 4.39. FESGIF ortamında harcanan NaOH miktarı	159
Şekil 4.40. FASSIF ortamında harcanan NaOH miktarı.....	160

Şekil	Sayfa
Şekil 4.41. FESSIF ortamda harcanan NaOH miktarı.....	161
Şekil 4.42. Geliştirilen oleik asit ve İmwitor 742 formülasyonu FASGIF, FESGIF, FASSIF, FESSIF lipoliz ortamındaki %yığılmalı çözünen tenofovir miktarı	162
Şekil 4.43. Tenofovirin asetonitrildeki UV spektrumu.....	162
Şekil 4.44. Tenofovirin asetonitrildeki kalibrasyon denklemi	163
Şekil 4.45. F1 ve F2 formülasyon bileşenlerinin lipoliz ortamındaki asetonitril ile oluşan UV spektrumları a)FASGIF, b)FESGIF, c)FASSIF, d)FESSIF, e)Oleik asit, f)İmwitor 742, g)Cremophor RH 40, h)Tween 20, i)Propilen glikol, j)Asetonitril.....	168
Şekil 4.46. F1, F2 ve F3 formülasyonların diyaliz membrandan geçen %tenofovir miktarı	169
Şekil 4.47. F1, F2 ve F3 emülsiyonların koyun doku hücresinden geçen %tenofovir miktarı	170
Şekil 4.48. Tenofovir (a) ve ornidazol (b) ait kromatogramlar	172
Şekil 4.49. Tenofovire ait kalibrasyon eğrisi	173
Şekil 4.50. Tenofovire ait seçicilik/seçimlilik kromatogramları a)Tenofovir, b)Kör 1, c)Kör 2, d) Kör 3, e) Kör 4, f) Kör 5, g) Kör 6.....	182
Şekil 4.51. Çözelti açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çözelti, B)Ortalama çözelti	184
Şekil 4.52. Viread® açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Viread®, B) Ortalama Viread®	185
Şekil 4.53. Çoklu emülsiyon açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çoklu emülsiyon, B)Ortalama çoklu emülsiyon.	186
Şekil 4.54. Çözelti tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çözelti, B)Ortalama çözelti	187
Şekil 4.55. Viread® tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Viread®, B) Ortalama Viread®	188
Şekil 4.56. Çoklu emülsiyonun tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Çoklu emülsiyon B) Ortalama çoklu emülsiyon	189
Şekil 4.57. Çözelti, Viread® ve çoklu emülsiyona ait açlık sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman grafiği	190

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.58. Çözelti, Viread® ve çoklu emülsiyona ait tokluk sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman grafiği	190
---	-----

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. F1, F2 ve F3 formülasyonların sinker kullanılarak çözünme hızı çalışmaları	69
Resim 3.2. İn vitro lipoliz deney modeli	71
Resim 3.3. Franz difüzyon yöntemi çalışmaları	76
Resim 3.4. Oral gavaj ile sıçanlara formülasyonların verilmesi ve kuyruk veninden kan örneklerinin alınması	77
Resim 4.1. Geliştirilen formülasyonlar ve 1:250 oranında seyreltilmiş sulu emülsiyonların görünümü A)F1 ve F2, B)F1 ve F1-seyreltilmiş emülsiyon, C)F2 ve F2-seyreltilmiş emülsiyonu	134
Resim 4.2. Geliştirilen formülasyon ve 1:250 oranında seyreltilmiş sulu emülsiyonun görünümü A)F3, B) F3 ve F3-seyreltilmiş emülsiyon	139

SİMGELER VE KISALTMALAR

Tez çalışması kapsamında kullanılmış olan simge ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
AUC_{0-∞}	Sıfırdan Sonsuza Kadar Plazma Zaman Eğrisi Altında Kalan Alan
%BS	Yüzde Bağıl Sapma
C_{maks}	Plazmadaki Maksimum Konsantrasyon
F1	Oleik Asit Formülasyonu
F2	İmwitor 742 Formülasyonu
F3	Çoklu Emülsiyon
k_d	Uzaklaşma Hız Sabiti
mL	Mililitre
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
QbD	Kalite Tasarımı
nm	Nanometre
ng	Nanogram
µm	Mikrometre
R²	Determinasyon Katsayısı
X_{ort}	Örneklerin Ortalaması
λ_{maks}	Maksimum Dalga Boyu
t_{maks}	C _{maks} 'a Ulaşmak İçin Geçen Süre
t_{1/2}	Biyolojik Yarı Ömür
V_d	Dağılım Hacmi

Kısaltmalar	Açıklamalar
Abs	Absorbance (Absorbans)
BCS	Biopharmaceutics Classification System (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi)
CL	Clearance (Klirens)
CMA	Critical Material Attributes (Kritik Materyal Özellikleri)
CPP	Critical Process Attributes (Kritik İşlem Parametreleri)
CQA	Critical Quality Attributes (Kritik Kalite Özellikleri)
DoE	Design of Experiment (Deney Tasarım Modeli)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyal Taramalı Kalorimetri)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FASGIF	Fasted State Simulated Gastric Fluid (Açlık% Durumunu Taklit Eden Mide Sıvısı)
FASSIF	Fasted State Simulated İntestinal Fluid (Açlık Durumunu Taklit Eden İnce Bağırsak Sıvısı)
FDA	Federal Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FESGIF	Fed State Simulated Gastric Fluid (Tokluk Durumunu Taklit Eden Mide Sıvısı)
FESSIF	Fed State Simulated İntestinal Fluid (Tokluk Durumunu Taklit Eden İnce Bağırsak Sıvısı)
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi
GA	Güven Aralığı
GI	Gastrointestinal
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
HLB	Hidrofilik Lipofilik Balans
ICH	International Conference on Harmonisation (Uluslararası Uyumlaştırma Kongresi)
IVIVC	İn Vitro-İn Vivo Korelasyon

Kısaltmalar	Açıklamalar
LCT	Long Chain Triglycerides (Uzun Zincirli Trigliserit)
LOD	Limit of Detection (En Küçük Saptayabilme Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (En Küçük Konsantrasyon Değeri)
MCT	Medium Chain Triglycerides (Orta Zincirli Trigliserit)
NTU	Nephelometric Turbidity Unit (Bulanıklık Birimi)
Ort	Ortalama
PDI	Polidispersite İndeksi
QTP	Hedef Ürün Kalite Profili
RSD	Relatif Standart Sapma
SCT	Short Chain Triglycerides (Kısa zincirli trigliserit)
SDEDDS	Self Double Emulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Oluşan Çoklu Emülsifiye Sistem)
SMEDDS	Self Microemulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Oluşan Mikro Emülsifiye Sistem)
SNEDDS	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Oluşan Nano Emülsifiye Sistem)
SEDDS	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Oluşan Emülsifiye Sistem)
SS	Standart Sapma
SRM	Maximum Supersaturation Ratio (Süpersatürasyon Oranı)
TEM	Transmission Electron Microscope (Transmisyon Elektron Mikroskobu)
TNF	Tenofovir Disoprosil Fumarat
UV	Ultraviyole
YEM	Yüzey Etkin Madde
YYEM	Yardımcı Yüzey Etkin Madde
RES	Retikulo Endotelial Sistem
TIM	TNO Gastrointestinal Model

1. GİRİŞ

Günümüzde daha etkin ve daha biyoyararlı ilaç şekillerinin arayışları sürmekte, etkili ve düşük doz tedavi alternatifleri gibi yenilikçi dozaj şekilleri ve tedavi yaklaşımlarıyla, hastaların yaşam süresi ve yaşam kalitelerinin artırılarak sürdürülmesi hedeflenmektedir. Özellikle son yıllarda yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve nanoteknolojiye dayalı yeni yaklaşımların kullanılması bu anlamda önem kazanmıştır.

Hepatit B kronik viral hepatitlerin en yaygın olan formu olup, dünyada yaklaşık 240 milyon insanda görülmektedir (Zampino ve diğerleri, 2015). Siroz ve karaciğer kanserine yol açan hepatit B ve hepatit C virüslerinden kaynaklanan hepatit hastalığı tedavi edilmezse, karaciğer nakli kaçınılmaz olmakta, karaciğer hasarı ve karaciğer yetmezliği ilerleyen vakalarda ölüme sebep olmaktadır. 2010 yılında yapılan küresel hastalık risk raporu çalışmasına göre, büyük çoğunluğunun karaciğer kanseri ve siroza sebep olan hepatit B virüsünün yılda 786 000 ölümlerle sonuçlandığı tahmin edilmektedir (MacLachlan ve Cowie, 2015).

Hepatit B tedavisi zor ve pahalı bir tedavidir. 2001 yılında FDA onayı alan tenofovir disoproksil fumarat vücutta hızla tenofovire dönüşen bir ön ilaç olarak, HIV/AIDS (Peterson ve diğerleri, 2007) ve hepatit B (2008) hastalığının tedavisinde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır (Bhat ve Yelsangikar, 2009). Tenofovir, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) Sınıf 3 yani yüksek çözünürlüklü ve düşük permeabiliteli P-glikoprotein (P-gp) substratı olan lipofilik bir etkin maddedir. Permeabilitesinin düşük olmasından dolayı absorpsiyonu sınırlıdır ve biyoyararlanım sorunu göstermektedir. Açlık oral biyoyararlanımı %25'dir ve optimum etki için yiyeceklerle birlikte yani tok karnına kullanılması gerekmektedir. Yağ içeriği yüksek yiyecek alımı, tenofovirin AUC'sinde yaklaşık %40 ve C_{maks} 'ta %14'lük bir artışla oral biyoyararlanımını artırmaktadır (Kearney ve diğerleri, 2004). Tenofovirin düşük oral biyoyararlanımı klinik etkinliğini sınırlandırmaktadır. Tenofovir içeren ürünler pazarının büyüklüğü göz önüne alındığında, biyoyararlanımdaki %33'lük bir iyileşme ile standart 300 mg tenofovir dozunda 245 mg'a düşme ile sonuçlanan doz azaltımının, yıllık 50-75 milyon dolar sağlık

harcamalarında azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (Watkins ve diğerleri, 2017). Tenofovirin biyoyararlanımını önemli ölçüde iyileştirmek, ülkeler için sağlık harcamalarında da önemli bir tasarruf sağlayacaktır. Bunu başarmak için, yenilikçi ilaç taşıyıcı sistem stratejilerini uygulamak önemlidir. Tenofovirin biyoyararlanımını artırmak için değişik ilaç taşıyıcı sistemlerin ve dozaj şekillerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bunlar, polimerik (dendrimerler, nanopartiküller, nanokapsüller, nanofiberler, miseller, nano-konjugatlar), lipit (lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, nanoyapılı lipit taşıyıcılar), inorganik (altın, gümüş, kalsiyum, demir oksit, silika) nanotaşıyıcılar ve nanosüspansiyonlardır. Tenofovirin biyoyararlanımını artırmak için, PLGA-nanopartiküller (Shailender ve diğerleri, 2017b), sıvı kristal prekürsörü (Patil ve diğerleri, 2017), lipozom (Spinks ve diğerleri, 2017), niozom (Kamboj ve diğerleri, 2014) ve kitosan nanopartikülleri (Shailender ve diğerleri, 2018) gibi çeşitli formülasyon yaklaşımları geliştirilmiştir. Ayrıca nanoemülsiyon ve nanoemulgel sistemler transdermal olarak (Rambharose, 2017) ve hibrit-polimer lipit nanotaşıyıcı sistem de (Porkharkar ve diğerleri, 2015), tenofovirin nazal yoldan verilmesi için geliştirilmiş formülasyon yaklaşımlarıdır.

Hepatit B tedavisi zor ve pahalı bir tedavi olup, yeni ilaç lipit kaynaklı taşıyıcı sistemlerin ve nanoteknolojik yaklaşımların bu tarz ilaçların biyoyararlanım ve tedavi etkinliklerinin artırılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla, lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların yanı sıra lipofilik yapıdaki ilaçların biyoyararlanımını artırmak için alternatif bir yol olarak düşünülmektedir. Bu sistemler aynı zamanda metabolizma ve effluks etkisini azaltmak gibi yollarla lipofilik ilaçların çözünürlüğünü ve absorpsiyonunu da artırmaktadır (Dahan ve Hoffman, 2008).

Son yıllarda lipit formülasyonların çoğu, kendiliğinden nano emülsifiye olan sistemler (SNEDDS) şeklinde geliştirilmektedir. Bu sistemler çok az su varlığında mide-bağırsak kanalında kendi kendine yağ/su (Y/S) tipi nano emülsiyon oluşturma yeteneğine sahiptir (Gürsoy ve Çevik, 2011). Lipit kaynaklı kendiliğinden emülsifiye olan sistemler, tenofovirin lipofilik özelliği nedeniyle biyoyararlanımının artırılması için uygunluk göstermektedir. Bu amaçla, tenofovirle yapılmış SNEDDS ve SDEDDS çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır. Tez kapsamında, SNEDDS yani kendiliğinden nano emülsifiye ve SDEDDS yani kendiliğinden çoklu emülsifiye

sistemler geliştirilerek, tablet formülasyonuna göre absorpsiyonu ve biyoyararlanımı artırılmış daha etkili bir dozaj şeklinin oluşturulması ve yiyecek etkisinin azaltılması ile hepatit B tedavisinde alternatif bir yol olabileceği düşünülmektedir.

Kendiliğinden emülsifiye sistemler yağ, sürfaktan, yardımcı çözücü ve ilaç bileşenlerinden oluşan, su ile düşük hızda karıştırıldıklarında yağ/su mikroemülsiyonu veya nanoemülsiyonu oluşturabilen izotropik ve termodinamik açıdan dayanıklı sistemlerdir (Gürsoy ve Çevik, 2011). Kendiliğinden emülsifiye dozaj şeklinin yapısında bulunan sürfaktan ve yardımcı sürfaktanların P-gp inhibisyonu etkisiyle, uzun zincirli yağ asitlerinin de lenfatik sisteme geçiş etkisiyle etkin maddenin absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını artırabileceği de belirtilmektedir (Gürsoy ve Benita, 2004).

Tez kapsamında, tenofovirin BCS Sınıf 3 ilaç olması ve suda çözünürlüğünün fazla olması göz önüne alındığında, SNEDDS'lerle karşılaştırmak amacıyla SDEDDS formülasyonu da hazırlanarak tenofovirin emilim ve biyoyararlanım artışının sağlanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, BCS Sınıf 3 ilaçlar için son dönemlerde kullanılan SDEDDS'in tenofovirin de emilim ve biyoyararlanımını artırabilecek alternatif bir dozaj şekli olabileceği de düşünülmektedir. SDEDDS'ler genellikle su/yağ/su (S/Y/S) emülsiyonlardır ve formülasyonu oluşturmak için hidrofilik ve lipofilik sürfaktanlarla birlikte kullanılmaktadır ve bu sistemlerin absorpsiyonu artırma etkisi daha fazladır.

Tez çalışmalarının diğer bir amacı da lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemlerde, in vitro çözünme hızı/salın çalışmalarının in vivo'yu yeterince taklit edememesinden dolayı, optimum SNEDDS formülasyonların çözünme ve sindirim olaylarının değerlendirilmesinde açlık ve tokluk durumlarındaki in vitro lipoliz testlerinin geliştirilmesini sağlamaktır. Uygun yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeler seçilerek yapılan önformülasyon çalışmalarından sonra, optimum SNEDDS'lerin geliştirilmesinde, kalite tasarımı (QbD) yaklaşımıyla kritik kalite parametreleri, kritik risk yönetim planı ve istatistiksel deney tasarımı modeli (DoE) kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların in vitro karakterizasyon özellikleri (damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, türbidite ve viskozite)

incelenmiştir. Elde edilen optimum formülasyonlarda da in vitro karakterizasyonların yanında, morfolojik değerlendirmeler, in vitro çözünme hızı, stabilite, ex-vivo permeabilite, in vivo farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmaları, açlık tokluk durumlarındaki varyasyon değerlendirmeleri yapılmıştır. Ayrıca, lipit taşıyıcı sistemlerde, in vitro çözünme hızı/salın çalışmaları in vivo yeterince taklit edemediğinden SNEDDS formülasyonlarının çözünme ve sindirimini incelemek amacıyla açlık ve tokluk koşullarında gastrointestinal in vitro lipoliz testleri geliştirilmiştir.

Hidrofilik ilaçlar genel olarak ince bağırsakta parasellüler yolla geçmektedir. Limitli yüzey alanı ve sıkı-kavşak (tight-junctions) bağlantı noktaları parasellüler yolla geçişte ilacın biyoyararlanımını sınırlandırmaktadır. Lenfatik sistemle absorpsiyon, ilk geçiş etkisi ve zayıf emilimden kaynaklı düşük biyoyararlanıma sahip ilaçların emilimini artırabilir. Nano boyuttaki SNEDDS ve SDEDDS sistemler damlacık boyutundan dolayı pasif şekilde retikülo endotelial sisteme (RES) ilaç hedeflendirilmesini de sağlayabilir. Hepatit B'nin tedavisinde, RES sisteme pasif hedeflendirmenin de tedaviye olumlu katkı sağlayabileceği de düşünülmektedir.

Biyoyararlanım sorunu olan tenofovir içeren lipit kaynaklı kendiliğinden nano emülsifiye ve kendiliğinden çoklu emülsifiye sistemlerinin emilim, biyoyararlanım artışı ve yiyecek etkisinden kaynaklanan varyasyonun azaltılması ile uygun birer dozaj şekli olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, TÜBİTAK 1001 araştırma projesi ile desteklenen “Tenofovir İçeren Lipit Kaynaklı Kendiliğinden Nano Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro İn Vivo Değerlendirilmesi” tez çalışması hepatit B tedavisinde kullanılan tenofovirin düşük biyoyararlanım probleminin lipit kaynaklı kendiliğinden emülsifiye nano sistemler (SNEDDS) ve S/Y/S şeklinde çoklu emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerle (SDEDDS) iyileştirilmesini hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Biyoyararlanım Artırma Stratejileri

Yeni kimyasal moleküllerin sadece %8'i yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite gösterirken, yaklaşık %40'ı suda çözünürlüğünün zayıf olmasıyla nedeniyle uygun formülasyon geliştirme zorluğu göstermekte ve ilaç geliştirme çalışmalarında başarısız olmaktadır (Kansara ve diğerleri, 2015). DSÖ listesinin LogP veya cLogP permabilite/geçirgenlik korelasyonlarına dayanarak sırasıyla %43 ve %50'si referans ilaç metoprololden daha yüksek emilim gösterirken, sırasıyla %31,7 ve %35 zayıf emilim göstererek BCS Sınıf 3'te yer almaktadır (Dahan ve diğerleri, 2009). Suda çözünürlüğü düşük (BCS Sınıf 2) ve lipofilik özellikte veya permabilitesi zayıf (BCS Sınıf 3) olup çözünürlüğü iyi olan ilaçların suda çözünürlükleri veya permeabiliteleri artırılırsa, in vivo etkinlikleri ve biyoyararlanımları da artırılmış olacaktır. Bu ilaçların biyoyararlanımını artırmak için kullanılan yöntemler aşağıda sunulmaktadır (Kansara ve diğerleri, 2015):

- Yardımcı çözücü kullanımı
- Mikronizasyon
- Amorf formlar
- Sürfaktan kullanımı
- Kimyasal ilaç modifikasyon
- Fonksiyonel polimer teknolojisi
- Kontrollü çöktürme teknolojisi
- İnklüzyon kompleksleri
- Nanopartikül teknolojisi
- Nanokristal teknolojisi
- Kendiliğinden emülsifiye olan lipit kaynaklı sistemler
- Mikroemülsiyon teknolojisi
- Miseller teknoloji
- Katı dispersiyon tekniği
- Basit ötektik karışımlar
- Camsı çözelti ve camsı süspansiyonlar

2.2. Lipit Kaynaklı İlaç Taşıyıcı Sistemler

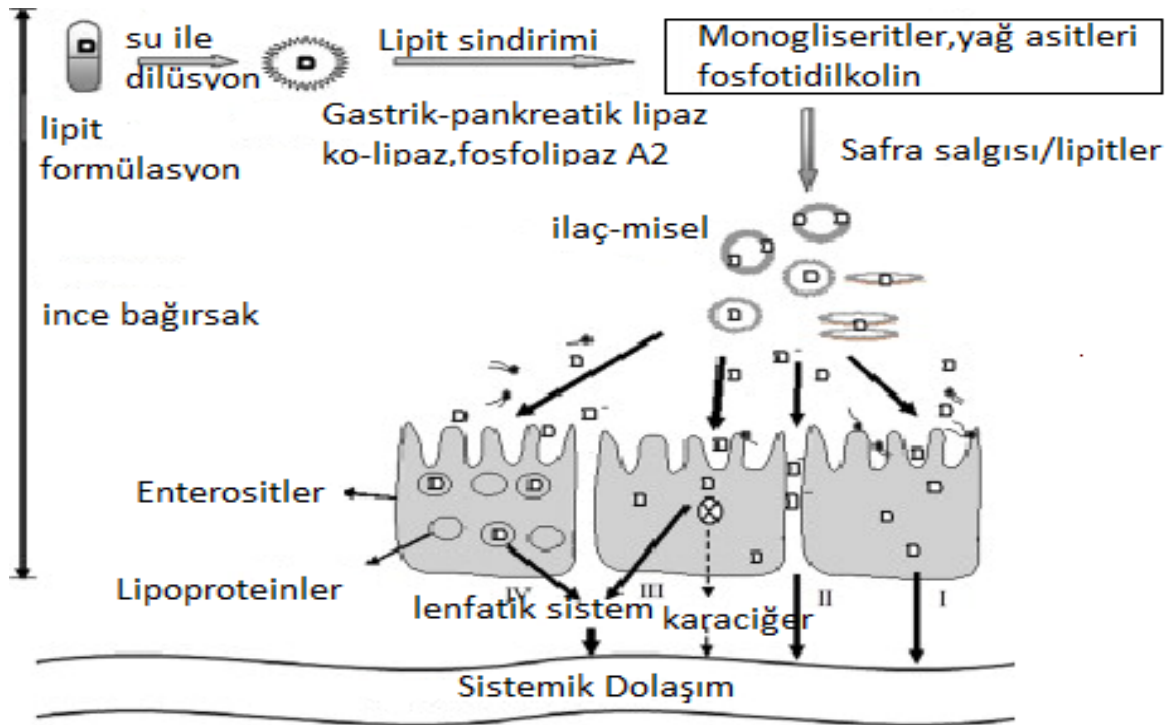
Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler, suda çözünürlüğü düşük ve lipofilik yapıdaki ilaçların, çözünürlük ve biyoyararlanımını artırmak için kullanılan en önemli stratejilerden biridir. Gelişen teknoloji ve gerekliliklere bağlı olarak yağlı solüsyonlar, emülsiyonlar, mikroemülsiyonlar (SMEDDS), nanoemülsiyonlar, çoklu emülsiyonlar (SDEDDS) ve lipozomlar gibi farklı dozaj şekilleri geliştirilmiştir.

Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler, kullanılan yardımcı madde ve formülasyonlardaki oranları dikkate alınarak Pouton tarafından 5 gruba ayrılmıştır (Pouton, 2000). Bu yardımcı maddeler trigliseritler, gliserit karışımları, lipofilik sürfaktanlar, hidrofilik yüzey etkin madde ve suda çözünebilir yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin maddeler olarak sıralanmıştır. Tip I formülasyonlarda ilaç, trigliserit veya gliserit karışımında çözünürken, Tip II formülasyonlarda sadece yüzey etkin madde bulunan yağlı karışımlarda, Tip III formülasyonlar ise hidrofilik yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin madde içeren karışımlarda çözünmektedir. Tip III formülasyonlar, formülasyonların hidrofilik madde içeriğine göre 2 gruba ayrılmış ve Tip IIIB formülasyonlar daha hidrofilik formülasyonlar olarak tanımlanırken (Gürsoy ve Çevik, 2011), Tip IIIA formülasyonlar da %40-80 yağlı sıvağ bulunduğu için daha lipofildir. Bu sınıflandırma; damlacık büyüklüğü ve dağılımı, su ile seyreltilmesi, kullanılan yağların sindiriminin formülasyon üzerindeki etkisi hakkında bilgi vermektedir (Pouton, 2000).

Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Dahan ve Hofman, 2008):

- Çözünürlük problemi olan ilaçların çözünürlüğünü artırmak
- Gastrik boşalma zamanını artırmak
- Lenfatik sistemle dolaşım sistemine katılması ve intestinal permeabiliteyi artırmak
- Metabolizma ve effluks etkisini azaltmak gibi yollarla lipofilik ilaçların çözünürlüğünü ve absorpsiyonunu artırmak

Oral veriliş sonrasında, lipitler ve lipofilik yardımcı maddeler ilacın absorpsiyonunu, biyoyararlanımını ve dağılımını 3 temel mekanizma ile etkiler. Bunlar, intestinal ortamın içeriği ve karakterizasyonun değişmesi, lenfatik ilaç geçişinin etkisi ve enterosit kaynaklı geçiş sistemi ile etkileşimdir (Porter ve diğerleri, 2007; Gürsoy ve Çevik, 2011). Ayrıca lipit kaynaklı sistemler, ilk geçiş etkisine sahip ilaçların emilimini Peyer plakları yolu ile lenfatik sistemle emilimini artırarak, midedeki enterositlerde bulunan sitokrom P450 metabolizmasını azaltarak ve transselüler-paraselüler emilim yolunu artırarak emilim ve oral biyoyararlanımı artırır (Porter ve Charman, 2001; Balakrishnan ve diğerleri, 2009). Şekil 2.1'de lipit kaynaklı sistemlerin intestinal ilaç transportunun şematik gösterimi sunulmaktadır:



Şekil 2.1. Lipit kaynaklı sistemlerin intestinal ilaç transportu (Nekkanti ve Sandeep, 2012) (I: transselüler yol, II: paraselüler yol, III-IV: lenfatik yol)

2.3. Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler

Lipofilik yapıdaki BCS Sınıf 2 ilaçların çözünürlüklerini ya da BCS Sınıf 3 ilaçların emilimlerini artırmak amacıyla lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler (emülsiyon, SEDDS ve lipozom gibi) kullanılmaktadır. Son yıllarda, lipit formülasyonların kendiliğinden emülsifiye olan sistemler şeklinde geliştirilmesi tercih edilmektedir. Bu

sistemler, çok az su varlığında mide-bağırsak kanalında kendi kendine Y/S tipi nanoemülsiyon oluşturma yeteneğine sahiptir (Elnaggar ve diğerleri, 2009). SEDDS çeşitli yağlar, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerden oluşan, su ile düşük hızda karıştırıldıklarında yağ/su mikroemülsiyonu oluşturabilen izotropik ve termodinamik açıdan dayanıklı sistemlerdir (Gürsoy ve Benita, 2004). SEDDS'lerin gelişen teknoloji ile SMEDDS ve SNEDDS ile damlacık boyutları küçültülmüş ve mikro ve nano sistemler olarak geliştirilmektedir. Mikroemülsiyonlar, nanosistemlere göre termodinamik olarak daha stabil sistemlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SMEDDS'lerin aslında vücutta SNEDDS olduğu düşünüldükçe SNEDDS formülasyonlar geliştirilmiştir (Christophersen ve diğerleri, 2014). Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerde kullanılan yağlar, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeler yağ-su ara yüzey gerilimini düşürerek, P-gp inhibisyonu, lenfatik yolun kullanılması gibi etkilerle ilaçların çözünürlük ve biyoyararlanımlarının artmasında rol oynamaktadır (Müllertz ve diğerleri, 2010).

2.3.1. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin avantajları ve dezavantajları

Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin avantajları şu şekilde özetlenebilir (Naggadi ve diğerleri, 2012):

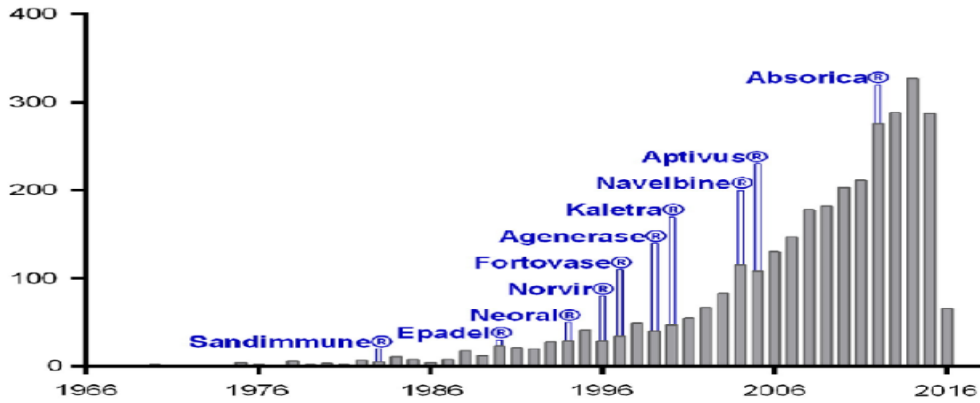
- Emilimi arttırarak biyoyararlanımda artış sağlaması, buna bağlı doz azaltılmaya gidilmesi
- İlaçların mide ortamında korunabilmesi
- Üretimlerinin kolay olması
- Mide-bağırsak kanalında özel bölgelerde emilime yönelik olarak ilaçların hedeflenmesi, ilaç emiliminin artırılması ve lenfatik emilimi artırma
- Scale up çalışmalarının yapılabilmesi ve kolaylıkla üretilebilirlik
- Yiyecek etkisini azaltma
- İlaç yükleme kapasitesini artırma
- Sıvı ya da katı dozaj form şeklinde kullanılabilme
- Formülasyonda su içermemesi nedeniyle iyi bir fiziksel dayanıklılık

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerin pek çok avantajı olmakla birlikte dezavantajları da şu şekilde sıralanabilir (Shukla ve diğerleri, 2010):

- Lipit kaynaklı sistemlerin genel stabilite problemlerinin gözlenmesi

- Ambalajlanmaları ve taşınmaları sırasında yağlı sistemden sızmanın görülebilme olasılığı
- Bu sistemlerde kullanılan yüksek yüzey etkin madde miktarının gastrointestinal sistemde irritasyon yapma olasılığının bulunması
- Sıvı SEDDS formülasyonların dolum yapılacağı yumuşak jelatin kapsül teknolojisinin pahalı bir teknoloji olması

Kendiliğinden emülsifikasyon dışarıdan enerji desteği olmadan, birbiri ile karışmayan iki sıvının temas halinde emülsiyon oluşturması esasına dayanan süreçtir. Kendiliğinden emülsifikasyon terimi ilk defa 1878 yılında Johannes Gad tarafından ortaya atılmıştır (Gürsoy ve Çevik, 2011). Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin potansiyel farmasötik yararını gösteren ilk çalışmalar, 1970'lerin başında Groves tarafından başlamış (Groves ve Mustafa 1974; Groves ve Galindez 1976), 1980'lere Pouton ve grubunun yaptığı çalışmalara ek olarak Charman, Wakerly, Feeney ve grubunun yaptığı çalışmalarla (Pouton ve diğerleri, 1985; Charman ve diğerleri, 1992; Wakerly ve diğerleri, 1986, Feeney ve diğerleri, 2016) devam etmiştir. İlk ticari ürün siklosporin içeren Sandimmune® olmakla birlikte, ticari preparatlar olarak Norvir®, Fortovase®, Agenerase®, Vesanoid®, Accutane®, Sandimmun®, Kaletra®, Aptivus®, Solufen® ve Lipirex® sayılabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Yıllar içerisindeki SEDDS çalışmalarının gelişimi ve ticari ürünlere ait örnekler (Feeney ve diğerleri, 2016)

SNEDDS sistemlerle yapılan çalışma örnekleri ile çözünürlük ve biyoyararlanım artışı Çizelge 2.1'de değerlendirilmiştir:

Çizelge 2.1. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerle yapılan çalışma örnekleri

Etkin Madde	Etki	Çözünürlük/Biyoyararlanım	Referans
Karvedilol	Antihipertansif	Köpeklerde yapılan çalışmada biyoyararlanımı piyasadaki tablet formülasyonuna kıyasla 4 kat artmıştır.	(Wei ve diğerleri, 2005)
İndometazin	Antienflamatuar, Antiromatik	Sıçanlarda yapılan çalışmada sulu süspansiyon formuna göre 1,57 kat daha yüksek biyoyararlanım elde edilmiştir	(Kim ve Ku, 2000)
Ondansetron HCl	Antiemetik	Sıçanlarda yapılan çalışmada piyasadaki ağızda dağılan tablet şekline göre biyoyararlanımı yaklaşık olarak 10 kat artmıştır.	(Beg ve diğerleri, 2013)
Rosuvastatin	Antihiperlipidemik	Sıçanlarda yapılan çalışmada ilacın sulu süspansiyon şekline göre SEDDS'in bağlı biyoyararlanımı %245 bulunmuştur.	(Balakumar ve diğerleri, 2013a)
Nevirapin	Antiviral	Sıçanlarda yapılan çalışmada ticari ürün süspansiyon formuna göre biyoyararlanımı yaklaşık 2,5 kat artmıştır.	(Chudasama ve diğerleri, 2014)
Takrolimus	İmmüsupresif	Sıçanlarla yapılan biyoyararlanım çalışmasında ticari ürüne kıyasla 2 kat biyoyararlanım artışı sağlanmıştır.	(Seo ve diğerleri, 2015)
Nifedipin	Ca kanal blokörü	Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmada sulu süspansiyon formuna göre yaklaşık 3 kat biyoyararlanımı artmıştır.	(Weerapol ve diğerleri, 2014)
Dutaserid	BPH	Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmada sulu süspansiyon formuna göre yaklaşık olarak 4 kat biyoyararlanımı artmıştır.	(Lee ve diğerleri, 2014)
Silastazol	Kalp-damar sistemi	Tavşanlarda yapılan in vivo çalışmada piyasadaki tablet formülasyonuna göre biyoyararlanımı yaklaşık 3 kat artmıştır.	(Mahmoud ve diğerleri, 2014)
Darunavir	HIV tedavisi	Sıçanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmalarında sıvı-SNEDDS ve katı-SNEDDS toz darunavire göre sırasıyla 2 ve 2,5 kat biyoyararlanımı artmıştır.	(Inugala ve diğerleri, 2015)
Efavirenz	HIV/AIDS tedavisi	Çözünme hızı çalışmalarında, SNEDDS dozaj şekli 30 dk'da %80 çözünürken, toz etkin madde yaklaşık %18,3 çözünmüştür. Sıçanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmalarında, süspansiyon dozaj şekline göre, SNEDDS biyoyararlanımı 2,63 kat artmıştır.	(Senapati ve diğerleri, 2016)
Andrografolid	Antipiretik, analjezik	Çözünme hızı çalışmalarında 60 dk'da %25 çözünürken, SNEDDS formülasyonda %85'e ulaşmıştır. Tavşanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmalarında ise toz etkin maddeye göre, SNEDDS biyoyararlanımı 1,2 kat artmıştır.	(Syukria ve diğerleri, 2018)

2.3.2. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin oluşma mekanizması

Kendiliğinden emülsifiye sistemler, oluşturdukları küçük boyutlu damlacıklar ve gastrointestinal kanalda lipoliz sonucu oluşturdukları karışık miseller ile geniş yüzey alan sağlamaları, ilaç difüzyonunu artırmaları, yüzey etkin madde varlığı ile olası

P-gp inhibisyonu ile ilaç emiliminin artırılması ve lenfatik emilimi artırmaları nedeniyle yüksek etkinlik gösterirler (Gürsoy ve Benita, 2004).

Kendiliğinden emülsifikasyon mekanizmaları üzerine çeşitli görüşler mevcuttur. 1986 yılında Rieger tarafından ortaya atılan kendiliğinden emülsifiye sistemlerin oluşum mekanizmaları üç teori ile açıklanabilir (Rieger, 1986):

- Ara yüzey gerilimini düşürmek ve termodinamik stabilizasyonu sağlamak
- Bir ara yüzey filmi oluşturmak ve koalesansa karşı mekanik bariyer sağlamak
- Bir elektriksel çifte tabaka oluşturmak ve elektriksel bariyer sağlamak

Bunların dışında farklı teoriler de vardır. Bunlar, yüzeyler arası türbülans, negatif yüzeyler arası gerilim, difüzyon ve bükülme teorileridir (Gürsoy ve Çevik, 2011).

2.3.3. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan maddeler

Formülasyon geliştirilmesinde kullanılan yardımcı maddelerin seçimi, etkin maddenin çözünürlüğünü, emilimini ve formülasyonun oluşumunu etkileyeceğinden çok kritiktir. Yardımcı madde seçiminde karışabilirlik, çözme kapasitesi, toksisite, saflık, sindirilebilirlik, kimyasal dayanıklılık, kendiliğinden emülsifiye olma özelliği gibi fizikokimyasal özellikler önemlidir (Müllertz ve diğerleri, 2010; Pouton ve Porter, 2008a).

Bu sistemlerde kullanılan yardımcı madde grupları ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

Yağlar (Porter ve diğerleri, 2008b; Mohsin ve diğerleri, 2012; Pouton, 2007)

- Orta zincirli trigliseritler: Sindirilebilir ve emilebilir özelliktedir. Uzun zincirli yağ asitlerine göre daha iyi çözme kapasitesine sahiptir. Migliol 810-812-818, Captex 300-355, Captex 810D, Neobee N5, Labrafac.
- Orta zincirli mono ve digliseritler: Capmul MCM C8-C10, İmwitor 988-742-928.
- Uzun zincirli yağ asitleri: Soya yağı, susam yağı, mısır yağı, zeytinyağı ve fıstık yağı.
- Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları: Maisine, Peceol.
- Propilen glikol esterleri: Capryol 90, Lauroglycol 90.

Yüzey etkin maddeler (YEM)

Yağ-su ara yüzeyi enerjisini düşürerek emülsiyonun oluşumunu sağlar ve dayanıklılığını artırır. YEM'ler kendiliğinden emülsifiye oluşturan sistemlerin en kritik bileşenidir. YEM'ler suda çözünen (>10 HLB) ve suda çözünmeyen olarak (<10 HLB) olarak ikiye ayrılır (Thanki ve diğerleri, 2013):

- Suda çözünmeyen YEM'ler: Oleat esterleri (Span 85) Span 20 ve gliseril trioleat
- Suda çözünen YEM'ler: Cremophor EL, Cremophor RH 40, Labrasol, Myrij, Solutol

HLB değeri 10 altında olan YEM'ler ile kendiliğinden emülsifiye sistem gerçekleşmez. Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerde genellikle yüksek HLB'ye sahip noniyonik YEM kullanılır (Arslan, 2013).

Yardımcı yüzey etkin maddeler (YYEM)

Yardımcı yüzey etkin maddeler, yüzey etkin madde içeriği yüksek olduğunda (>%40) dayanıklı bir sistem elde edilmesi için formülasyonlarda kullanılır. İlacın çözünme kapasitesini artırmak ve su ile karşılaşan formülasyonun çökme oranını azaltmak gibi etkileri vardır.

- Etanol, gliserin, propilen glikol, propilen karbonat, polioksietilen ve polietilen glikol.

Diğer yardımcı maddeler (antioksidanlar)

Yağlı bir sistem olan SEDDS'lerin oksitlenmesini ve bozunmasını önlemek amacıyla formülasyona eklenebilirler.

- α tokoferol, β karoten, bütıl hidroksi anisol, bütıl hidroksi tolue (Arslan, 2013).

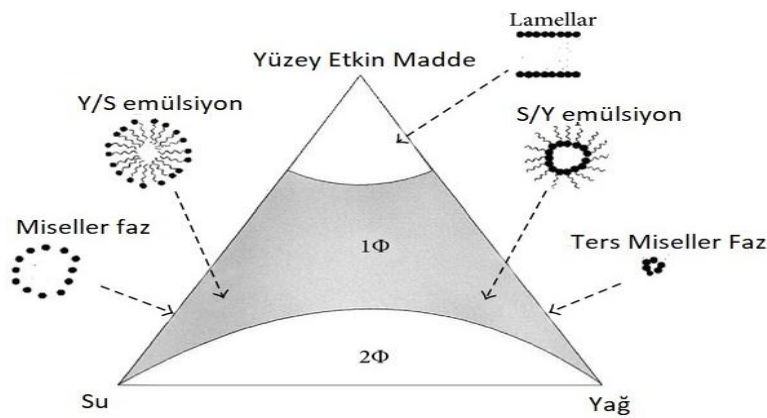
Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerde kullanılan yağ, YEM, YYEM ve kosolvanların kullanım amaçları aşağıda verilmektedir:

- Formülasyonun kolaylıkla oluşumunu sağlamak
- Yağ-su arayüzey gerilimini düşürmek
- Kullanılan yardımcı maddenin özelliğine bağlı olarak P-gp inhibisyonu sağlamak
- Lenfatik yolun kullanılması gibi etkilerle lipitlerin çözünürlük ve biyoyararlanımlarının artmasına yardımcı olmak olarak sayılabilir.

2.3.4. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin hazırlanması

Faz diyagramları

Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin geliştirilmesinde kullanılan (yağ, YEM ve YYEM) maddelerle optimum formülasyonu bulmak için faz diyagramlarından yararlanılır (Şekil 2.3). YEM-YYEM karışımı yağ fazı ile titre edilip üçgen faz diyagramları oluşturularak yağ fazını en fazla alan bölge belirlenir (tektür karışımı oluşturduğu alanın belirlenmesi). Yağ fazını en fazla alan bölgeden hareketle Km oranı (YEM:YYEM) seçilir (Beg ve diğerleri, 2013; Weerapol ve diğerleri, 2014). Km oranına göre belirlenen YEM-YYEM ve yağ fazı su ile titre edilir. Oluşturulan üçgen faz diyagramlarından hareketle nanoemülsiyon oluşturma alanları belirlenir. Rastgele ya da üçgen faz diyagramının ağırlık merkezinden hareketle seçilen formülasyonların damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel, dansite ve türbidite gibi özellikleri incelenir.



Şekil 2.3. Üçgen faz diyagramı (Lawrence ve Rees, 2001)

Yüzey etkin madde ve yardımcı maddelerin birden fazla olması durumunda oluşabilecek yüzlerce formülasyonun arasından daha kısa sürede, daha etkili optimum formülasyonu seçmek amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Tarama sistemi (High throughput screening system)

Bu yöntemde, formülasyonları oluşturan bileşenler robotik sıvı karıştırıcısıyla mikrolitre düzeyinde hazırlanır, hızlı bir türbidite analizi ile faz stabilitesi ve mikroemülsiyon görüntüleri incelenip, uygun formülasyonlar seçilir. Türbidite analizinde formülasyonların bulanıklık şiddetleri ölçülmekte ve bu durum fiziksel stabiliteleri hakkında bilgi vermektedir (Gürsoy ve Çevik, 2011). Bu sistem kullanılarak geliştirilen SNEDDS formülasyonlara ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir:

Alzheimer tedavisinde kullanılan nilvadipinin tarama sistemi kullanılarak kendiliğinden mikroemülsifiye sistem formülasyonu hazırlanmıştır. Robotik karışma sistemi 40 dk'da 96 formülasyon hazırlamış, görüntü (saydam, yarı-saydam, opak) ve türbidite analizine göre optimum formülasyon seçilmiştir. Seçilen formülasyonların damlacık boyutu ve faz stabilitesi incelenmiş ve yüksek verimli görüntüleme sisteminin uygun formülasyonları hızlı ve etkili bir şekilde belirlediği görülmüştür (Sakai ve diğerleri, 2009).

2018 yılında kurkumin ile yapılan çalışmada bitkisel kaynaklı yağlı madde olan sülforafan ile kurkuminin tarama tekniği kullanarak en uygun formülasyon geliştirilmiştir. Seçilen yüzey etkin maddeler, yağlı sıvı (sülforafan) ve etkin madde, farklı oranlarda kullanılarak karıştırılmış ve türbidite ve çökme özelliklerine göre optimum oranlar seçilerek formülasyon geliştirilmiştir (Kamal ve Nazza, 2018).

Kalite tasarımı (QbD) yaklaşımı

Kalite tasarımı yaklaşımı, önceden tanımlanmış hedeflere göre ürün ve süreç odaklı, kalite risk yönetimine göre proses kontrolü içeren sistematik bilimsel çalışma sistemidir.

ICH Q8 göre ise “önceden tanımlanmış amaçlarla, son ürün ile sürecin bilim ve kalite risk yönetimine dayalı olarak anlaşılmasını vurgulayan sistematik bir ilaç geliştirme yaklaşımıdır”. Farmasötik gelişim sürecinin amacı, kaliteli bir ürün ve ürün için öngörülen performansa tutarlı olarak ulaşılmasını sağlayacak olan imalat prosesinin tasarlanmasıdır (Aksu, 2013). Çizelge 2.2’de kalite tasarımının geleneksel formülasyon geliştirme proseslerine göre avantajları değerlendirilmiştir:

Çizelge 2.2. QbD yaklaşımının geleneksel formülasyon geliştirme proseslerine göre avantajları (Aksu, 2013)

Kritik Süreçler	Geleneksel	QbD
Formülasyon geliştirme	Deneysel, rastgele optimizasyon	Sistematik ve çok değişkenli deneyler
Süreç kontrolü	İn-process kontroller	Sürekli süreç izleme
Ürün spesifikasyonları	Seri verilerine göre kalite kontrol ölçümleri	İstenilen ürünün performansına bağlı olarak tüm aşamalarda kalite kontrol
Kontrol stratejisi	Test ve denetim mekanizmasına bağlı	Risk tabanlı kontrol stratejisi
Yaşam döngüsü yönetimi	Sorunlara duyarlı	Tasarım alanı içinde etkin, sürekli iyileştirme

QbD’nin ilk adımı, ürün için tasarım hedeflerinin belirlenmesidir. ICH Q8 farmasötik geliştirmede, “kullanım amacı ve uygulama yolu gözetilerek, müstahzarın kalitesi için kritik olan özelliklerin belirlenmesini” gerektirir. Hedef ürün kalite profili (QTP) oluşturulur ve kritik kalite özellikleri belirlenir.

Kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi kadar kritik risk yönetimini oluşturmak da önemlidir. Kritik risk yönetimi, ürünün yaşam döngüsü boyunca kalitesine etki eden risklerin değerlendirilmesi, kontrolü, gözden geçirilmesi ve iletişimine dair sistematik bir prosestir. Kritik risk yönetimini kolaylaştırmak için Ishikawa/Fishbone (neden-sonuç) diyagramlarından yararlanılabilir. Tasarımda kalite yaklaşımında önemli bir yere sahip olan istatistiksel deney tasarımında (DoE), model oluşturma ve değerlendirme, istatistiksel proses kontrolü gibi amaçlarla farmasötik formülasyonların gelişimi için önerilen çoklu değişkenli bir yaklaşımdır.

DoE, kritik proses parametrelerinin belirlenmesi ve tasarım alanının oluşturulması evrelerinden oluşur. DoE istatistiksel olarak birçok avantajının yanı sıra, optimum etkinin belirlenmesine de yardımcı olur. Bir seferde bir değişken yerine, bir seferde birkaç değişkeni değiştirmek, etkin sonuçlar alınmasını sağlar. Değişkenler arasındaki etkileşimler değişim yapılarına kadar görülemeyecek olan sorunlara neden olabilir. DoE sayesinde birçok faktör eş zamanlı olarak değiştirilirken, her bir faktör birbirinden bağımsız olarak değerlendirilir. İyi seçilen tasarımlar, belirli bir miktarda deneysel çalışma için elde edilebilecek bilgi miktarını en üst düzeye çıkarır (Aksu, 2013).

QbD yaklaşımı SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aşağıda QbD yaklaşımı ile geliştirilen SNEDDS formülasyonları değerlendirilmiştir:

- Kalp-damar sistemi hastalıklarında kullanılan BCS Sınıf 2 ilaç olan silastazolün kritik fizikokimyasal özellikleri olarak damlacık boyutu, zeta potansiyel ve çözünürlüğü dikkate alınarak kalite tasarımıyla kendiliğinden emülsifiye sistem başarıyla geliştirilmiştir (Pund ve diğerleri, 2014).
- Alzheimer ve kanser tedavisinde farmasötik bir ürün geliştirmek amacıyla çalışılan bitkisel kaynaklı kurkumin üzerine yapılan bir çalışmada, çözünürlük, damlacık boyutu, polidispersite indeksi ve emülsifikasyon zamanı gibi kritik fizikokimyasal özellikleri dikkate alınarak kendiliğinden emülsifiye sistem geliştirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2010).
- Kolesterol düşürücü ilaçlar arasında bulunan BCS Sınıf 2 ilaç lovastatin kritik kalite basamakları dikkate alınarak, kendiliğinden nano emülsifiye ilaç sistemi başarıyla geliştirilmiştir (Beg ve diğerleri, 2015).
- Anti-HIV tedavisinde kullanılan nelfinavir ile yapılan çalışmada, kalite tasarımı yaklaşımıyla SNEDDS formülasyon geliştirilmiştir. Yapılan permeabilite çalışmalarında süspansiyon formuna göre 4,57 kat emilimi artmıştır. Tavşanlarla yapılan biyoyararlanım çalışmalarında, biyoyararlanım 3,6 kat artmıştır (Kamboj ve Rana, 2016).
- Hipertansiyon tedavisinde kullanılan BCS Sınıf 2 ilaç olan bosentanın kalite tasarımı yaklaşımıyla SNEDDS formülasyonları geliştirilmiştir. Kalite tasarımı yaklaşımıyla seçilen optimum formülasyondan 15 dk'da %98,5

oranında etkin madde salınmıştır. Katı toz şekli ile yapılan karşılaştırmalı biyoyararlanım çalışmalarında oral biyoyararlanım yaklaşık 2,5 kat artmıştır (Charan ve diğerleri, 2018).

2.3.5. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde yapılan kontroller

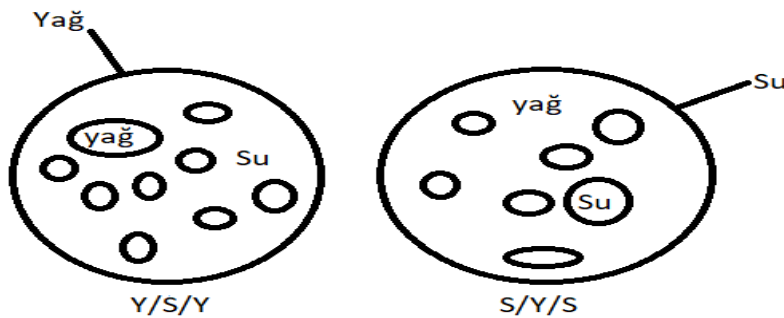
Bu sistemlerde yapılan kontroller aşağıda verilmiştir:

- Morfolojik incelemeler: SNEDDS'lerde öncelikli olarak fiziksel incelemeler yapılmaktadır. 50 nm boyutunda damlacık büyüklüğüne sahip SNEDDS'ler berrak ve şeffaf bir görünüme sahipken, damlacık büyüklüğü arttıkça bulanıklık artmaktadır (Gürsoy ve Çevik, 2011). Formülasyonların morfolojik açıdan görüntülenmesinde genel olarak Cryo-TEM (Larsen ve diğerleri, 2012; Tran ve diğerleri, 2017), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Vatsraj ve diğerleri, 2014; Kassem ve diğerleri, 2016; Senapati ve diğerleri, 2016) ya da taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Inugula ve diğerleri, 2015; HyuckPark ve diğerleri, 2018) kullanılmaktadır.
- Damlacık büyüklüğü ve dağılımı: Damlacık büyüklüğü ve dağılımı, ilacın çözünme hızı ve emilimini etkileyebilmektedir. Damlacık büyüklüğünün ölçülmesinde, foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılımı tekniğine göre çalışan cihazlar kullanılmaktadır.
- Zeta potansiyeli özellikleri: Zeta potansiyel, formülasyonda kullanılan bileşenler (yağ, YEM, YYEM) ve ilacın yükünden etkilenir. Damlacıkların yükünün ölçülmesinde elektroforetik ışık saçılımı ve dinamik ışık saçılım tekniğini kullanarak damlacıkların yükü ölçülmektedir. Damlacık yükü formülasyonun stabilitesinde etkili olmaktadır.
- Reolojik özellikleri: Emülsiyonların viskozitesi stabilitesi ve formülasyonun kapsül dışında verilmesi durumunda (örn. kaşıkla verilmesi) akışkanlığı açısından önemlidir. Emülsiyonlarda gerilim altında viskozite artabilir veya azalabilir. Bunlar incelme (shear thinning) ve koyulaşma (shear thickening) olarak bilinir (Çelebi, 2009).
- Türbidite özellikleri: Formülasyonun damlacık büyüklüğüne göre türbiditesi değişmektedir. Formülasyonun damlacık boyutu ve stabilitesi hakkında da bilgi vermektedir.

- Stabilité çalışmaları: Termodinamik stabilité çalışmaları ve kısa süreli hızlandırılmış stabilité çalışmaları (4°C , $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ sıcaklık/bağıl nem ortamlarında) yapılmaktadır.
- Salım/çözünme hızı çalışmaları: SNEDDS formülasyonlarda yapılan salım/çözünme hızı çalışmalarında genellikle palet (Beg ve diğerleri, 2013; Balakumar ve diğerleri, 2013b) ya da sepet yöntemi (Syukri ve diğerleri, 2018; Senapati ve diğerleri 2016) kullanılmaktadır. Ayrıca formülasyon ortama verilirken, diyaliz membran (Elnaggar ve diğerleri, 2009; Kang ve diğerleri, 2004; Inugala ve diğerleri, 2015; Balakumar ve diğerleri, 2013) ya da kapsül (Hong ve diğerleri, 2006; Syukri ve diğerleri, 2018) kullanılmaktadır.
- Lipoliz çalışmaları: Lipit kaynaklı formülasyonların sindirimini/çözünme hızını saptamak için yapılan çalışmalardır.

2.4. Çoklu Emülsiyonlar

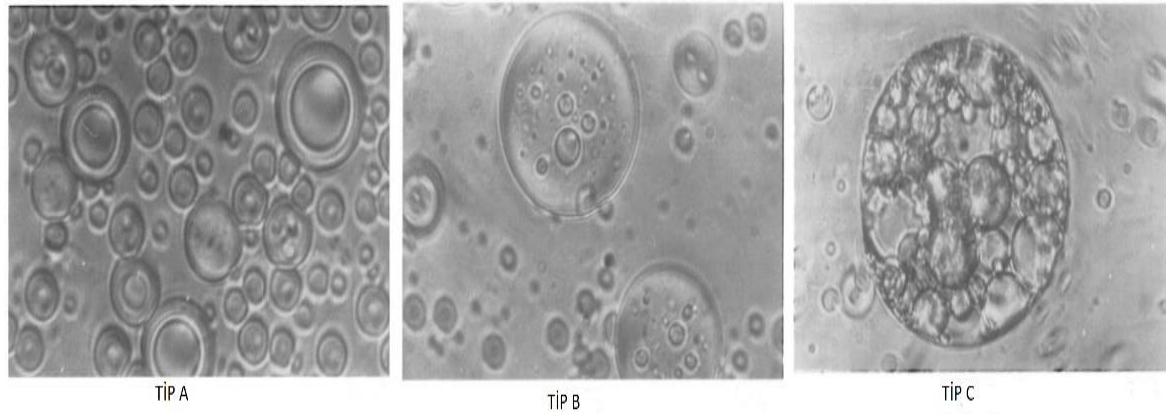
Kendiliğinden çoklu emülsifiye sistemler su/yağ/su (S/Y/S) ya da yağ/su/yağ (Y/S/Y) emülsiyonlarıdır (Besnard ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.4). Dış fazı su olan (su/yağ/su) emülsiyonlar, kendiliğinden çoklu emülsifiye sistemler olarak da adlandırılmaktadır (Qi ve diğerleri, 2011). Su/yağ/su emülsiyonları yağ fazı, su fazı, hidrofilik-hidrofobik YEM'lerden oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Çoklu emülsiyonlar

Çoklu emülsiyon fikri ilk kez 1925 yılında Seifriz tarafından ortaya atılmış fakat çalışmalar 1970'lerin sonunda başlamıştır (Iqbal ve diğerleri, 2015). İlk çalışmalar Florence ve Whitehill, Matsumoto ve Frenkel arkadaşları tarafından yapılmıştır (Florence ve Whitehill, 1981; Matsumoto ve diğerleri, 1980; Frenkel ve diğerleri,

1983). Florence and Whitehill tarafından çoklu emülsiyonlar 3 tip olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.5). Tip A ve B daha küçük iç faz damlacıklarından oluşmaktadır. Tip C birden fazla küçük damlacığın birleşmesinden oluşmaktadır. C'deki sistemin etkin maddeyi daha yavaş salması beklenmektedir (Iqbal ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.5. Çoklu emülsiyon tipleri (Iqbal ve diğerleri, 2015)

Çoklu emülsiyonların kontrollü salım, fiziksel stabiliteyi artırıcı ve birden fazla etkin maddeyi bir arada kullanılabilme gibi avantajlarından dolayı oral, dermal, oküler ve vajinal uygulamaları mevcuttur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Çoklu emülsiyonların uygulama alanlarına örnekler (Fidan, 2011)

Emülsiyon tipi	Etkin madde	Uygulama	Referans
S/Y/S	C vitamini	Dermal	Gallarate ve diğerleri, 1999
Y/S/Y	Retinol	Dermal	Benichou ve diğerleri, 2007
S/Y/S	Teofilin, insülin	Oral	Nakhare ve Vyas, 1995
S/Y/S	Rifampisin	Oral	Cole ve Whataley, 1997
S/Y/S	Metronidazol	Vajinal	Özer ve Özyapıcı, 2007
S/Y/S	Prednisolon	Oküler	Safwat ve diğerleri, 1994

BCS Sınıf 3 ilaçlar için son dönemlerde kullanılan SDEDDS, absorpsiyon problemi bulunan ilaçların permeabilite ve biyoyararlanımını artırabilecek alternatif dozaj şekilleridir (Zhu ve Zhang, 2011; Chourasia ve Khutle, 2015; Hu, 2016).

2.4.1. Çoklu emülsiyonun bileşenleri

- Yağ fazı

Orta-uzun zincirli yağ asitleri, digliseritler ve monogliseritler kullanılmaktadır.

- Yüzey etkin maddeler

Çoklu emülsiyon hazırlanmasında yüzey etkin maddenin seçimi ve oranlarının belirlenmesi çok önemlidir. Y/S tipi primer emülsiyonun oluşumunda lipofilik ve hidrofilik yüzey etkin maddeler kullanılırken, S/Y/S tipi çoklu emülsiyonların oluşumunda ise, hidrofilik yüzey etkin maddeler kullanılmıştır.

- Elektrolit ve polimerler

Emülsiyonların stabilitesini artırmak amacıyla, NaCl ve jelatin çözeltisi, PLGA gibi polimerler kullanılır. Elektrolitin su/yağ/su tipi çoklu emülsiyonun yağ damlaları içindeki su damlacıkları arasında Ostwald ripening olayını engellediği bildirilmektedir (Ali ve diğerleri, 2010).

2.4.2. Çoklu emülsiyonların hazırlama yöntemleri

Çoklu emülsifiye sistemler genel olarak; iki basamaklı emülsifikasyon, ters faz yöntemi ve membran emülsifikasyon yöntemleri ile hazırlanmaktadır. Formülasyon geliştirilmesinde karıştırma hızı, süresi ve sıcaklık çok önemlidir. Primer emülsiyon hazırlanırken karıştırma hızının yüksek, sekonder emülsiyon için ise düşük olması gerekmektedir. Primer emülsiyon için sıcaklığın genellikle 70°C, sekonder (çoklu emülsiyon) emülsiyon için ise 25°C olması istenir (Çelebi, 2009).

- İki adımda emülsifikasyon

Öncelikle uygun yüzey etkin madde ile yağ/su ya da su/yağ primer emülsiyon hazırlanır. Hazırlanan primer emülsiyona uygun YEM eklenerek, sekonder emülsiyon oluşturulur.

- Ters faz yöntemi

Hidrofilik YEM içeren sulu faz ve lipofilik YEM içeren yağ fazı yüksek hızla karıştırılır. Bu iki faz karıştıktan sonra hidrofilik YEM içeren su fazına ya da lipofilik YEM içeren yağ fazına sistem eklenir.

- Membran emülsifikasyon yöntemi

Dış fazı su/iç fazı yağ olan emülsiyon basınç altında dış fazı su olacak şekilde poröz cam membrandan kontrollü bir şekilde geçirilir.

2.4.3. Çoklu emülsiyonların avantajları ve dezavantajları

SDEDDS'lerin avantajları ve dezavantajları aşağıda sunulmaktadır (Chourasia ve Khutle, 2015).

SDEDDS'lerin avantajları:

- Hidrofilik ve hidrofobik özellikteki iki ayrı etkin maddenin bir formülasyon içinde verilebilmesi
- İç fazda hapsedilen etkin maddenin bozulmasının engellenmesi ve birbiriyle geçimsiz bileşenlerin bir arada verilebilmesi
- Etkin maddenin sürekli ve kontrollü salımının sağlanması
- Tadı hoş olmayan etkin maddeleri en iç faza saklayarak tatlarının maskelenebilmesi
- Midenin zararlı etkilerinden koruma avantajları
- Çevre koşullarına daha dayanıklı olması

SDEDDS'lerin dezavantajları ise:

- Formülasyonların geliştirilmesi ve işlem basamaklarının validasyonunun zor olması
- Uzun süreli stabilite sorunlarının gözlenmesi

2.4.4. Çoklu emülsiyonların salım mekanizması

Çoklu emülsiyonların salım mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bununla beraber, sistemin taşıdığı etkin maddenin yapısına bağlı olarak, üç çeşit salım mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmalar:

- İyonize olmayan, yağda çözünen etkin maddenin yağ tabakasından pasif difüzyon ile geçişi
- Yağlı membranın şişmesi ve kırılması yolu ile etkin maddenin serbestleşmesi
- İyonize olan ve olmayan maddelerin lipofilik yüzey aktif madde ile kolaylaştırılmış transportudur (Soytürk ve Tarımcı, 2000).

2.4.5. Çoklu emülsiyonlarda yapılan kontroller

Çoklu emülsifiye sistemlerde yapılan kontroller aşağıda verilmektedir:

- Morfolojik çalışmalar: Çoklu emülsiyonlar görünüşü, renk ve faz ayrışması olup olmadığı hazırlama anında ve saklama süresi boyunca incelenir.
- Damlacık boyutu ve dağılımı: Geliştirilen çoklu emülsiyon ve primer emülsiyonun damlacık boyutu ve dağılımı kontrol edilir. Çoklu emülsiyon sistemlerinin fiziksel stabilitesini, damlacık boyutu dağılımındaki değişim etkilemektedir (Ursica ve diğerleri, 2005).
- Viskozite: Hazırlanan primer ve çoklu emülsiyonların viskozitesi ve viskozitede zamana bağlı olarak oluşan değişimler incelenir. Çoklu emülsiyonlar uygun viskozitede olmazsa faz ayrışması gerçekleşebilir.
- Türbidite çalışmaları: Formülasyonun berraklık ölçütü olan türbiditesi incelenir.
- Stabilité çalışmaları: Termodinamik stabilite ve kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları (4°C , $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ sıcaklık/bağıl nem koşullarında) yapılmaktadır.
- Salım çalışmaları: Palet yöntemi (Laugel ve diğerleri, 2000), diyaliz kese yöntemi (Tırnaksız ve Kalsın, 2005), diyaliz tüp yöntemi (Okochi ve Nakano, 1996) ve Franz difüzyon yöntemi (Yener ve diğerleri, 2009) gibi birçok yöntemle yapılmaktadır (Fidan, 2011).

2.4.6. Çoklu emülsiyonlarla yapılan çalışmalar

2011 yılında yapılan çalışmada immünomodülatör özellik gösteren peptit yapıdaki pidotimod, yüksek suda çözünürlük ve zayıf emilim özelliği göstermektedir. Farelerde yapılan in vivo çalışmalarda, geliştirilen çoklu emülsiyon sulu süspansiyon formuna göre biyoyararlanımı 2,56 kat artmıştır (Qi ve diğerleri, 2011).

2015 yılında yapılan çalışmada trombolitik aktivite gösteren nattokinaz enzimi yüklü uzatılmış salım gösteren, yaklaşık %86,2 yükleme kapasitesi ve mide koşullarına dayanıklı çoklu emülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Farelerde yapılan farmakodinamik çalışmalarda doza bağlı olarak kan pıhtılaşma zamanının uzadığı görülmüştür (Wang ve diğerleri, 2015).

Matos ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada, antioksidan, antikanserojenik ve antienflamatuar özelliğe sahip resveratrol yüklü S/Y/S tipi çoklu emülsiyon geliştirilmiştir. Resveratrol suda çözünürlüğü düşük, ışığa duyarlı, parçılanma ömrü az ve hızlı metabolize olan bir maddedir. Resveratrolü çevresel şartlardan korumak ve daha yavaş salımını sağlamak amacıyla iki adımda emülsifikasyon yöntemi ile S/Y/S tipi çoklu emülsiyon geliştirilmiştir. Geliştirilen emülsiyonun %58 yükleme kapasitesine sahip, karıştırılınca-incelme davranışı gösteren, elastik karakter ve iyi stabilite özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir (Matos ve diğerleri, 2018).

2018 yılında yapılan diğer bir çalışmada, opal filmlerden üretilen farklı boyutlardaki silika materyaller ile bottom-up yaklaşımıyla Y/S/Y tipi çoklu emülsiyon geliştirilmiştir. Genel olarak kullanılan hazırlama yöntemlerinin dışında kullanılan bu yöntem, istenilen damlacık boyutlarında emülsiyon geliştirilebilme imkanı sağlamaktadır (Ma, 2018).

2.5. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

2.5.1. Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemlerde in vitro çözünme hızı testleri neden yeterli değildir?

Formülasyon geliştirilmesi sırasında, ilaçların in vivo performansını tahmin etmek amacıyla in vitro testler yapılmaktadır. İn vitro testler vücudumuzdaki olayları ne kadar iyi temsil ederse in vivo tahminler açısından o kadar başarılı olabilir. İn vitro çözünme hızı testleri, ilacın kalitesinin ve performansının bir göstergesidir ve özellikle konvansiyonel dozaj şekillerinin çözünme hızı değerlendirilmesinde en önemli adımdır.

İn vitro çözünme hızı testleri lipit kaynaklı sistemlerin değerlendirilmesinde yeterli değildir. Bu sistemlerde, taşıyıcı lipit karışımı içerisinde olan etkin madde su ile karşılaştığında YEM ve YYEM'lerle ara yüzey enerjisi düşer ve su içerisinde yağ damlacıkları oluşur. Formülasyonda kullanılan orta ve uzun zincirli trigliserit ve digliseritler duodenumda safra tuzunun etkisiyle yüzey alanını artırır, pankreatik lipaz ile de yağ asitlerine parçalanır. Bu aşamada, in vitro çözünme hızı testleri, lipitlerin sindirimi ve emilen kısım olan misel karışımları ve bunların çözünmeleri hakkında bilgi vermez. Ayrıca, in vitro çözünme hızı çalışmaları lipit taşıyıcı sistemler açısından in vivo ortamı yeterince taklit edemez. pH 6,4 duodenumu taklit etmek için yapılan çalışmalarda, safra tuzu ve lipaz enzimi bulunmamaktadır. Yağlar vücutta sindirilerek dolaşıma katılan ürünler olduğu için, lipit taşıyıcı sistemlerin sindiriminin incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, in vivo'ya daha yakın bir model oluşturup, oral lipit formülasyonlarındaki çözünmeyi ve sindirimi görmek için in vitro lipoliz testlerini geliştirmek amaçlanmaktadır.

2.5.2. İn vitro lipoliz testleri

Lipitler ana enerji kaynaklarından. Vücuttaki hormonların, çoğu vitaminlerin ve hücre zarının yapısı lipitlerden oluşmaktadır. Lipitlerin sindirimi gastrik lipazla midede başlar ve emülsifikasyon duodenumda gerçekleşir. Yağ asitleri, fosfolipitler, safra tuzları ve kolesterol hidrofilik gruplar içerir. Polar grup su, non-polar grup yağ

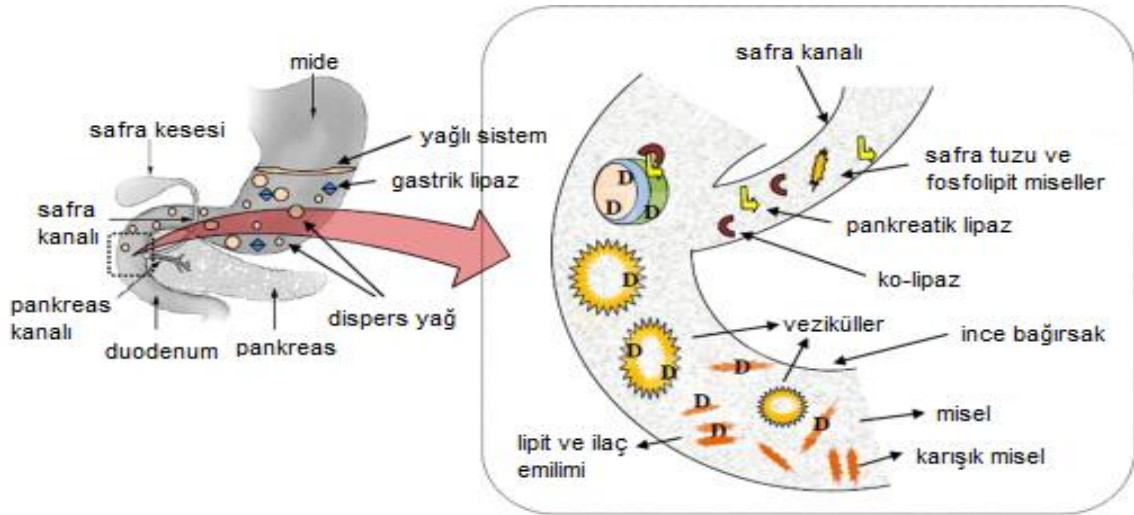
fazına gelecek şekilde yağ-su ara yüzeyine yerleşen lipitler sulu ortamda miselleri oluştururlar.

Lipitlerin sindirimi midede gastrik lipazla başlar. Gastrik lipaz, lipit sindiriminin yaklaşık olarak %10-40'ını karşılar (Armand ve diğerleri, 1995; Miled ve diğerleri, 2000). İnsan gastrik lipazın ticari bir ürünü bulunmamaktadır. Mikrobiyal yapıdaki *C. antartica* lipaz (Christophersen ve diğerleri, 2014; Thomas ve diğerleri, 2014) ya da köpeklerden elde edilen lipaz kullanılmaktadır. Gastrik lipaza en çok benzeyen *C. antartica* lipazdır (Thomas ve diğerleri, 2014).

Mideden sonra ince bağırsağa boşalan lipitler, içinde lipitlerin sindirilmesine yardımcı olan lipaz ve lipaz-kolipaz gibi enzimler bulunduran pankreas öz suyuyla karşılaşmaktadır. Ayrıca bikarbonat sekresyonu pH aralığını 6-8 arasında tutarak pankreatik lipaz için optimum bir pH aralığı hazırlamaktadır (Thomas ve diğerleri, 2012). Bu enzim, yağ-su arayüzeyine girerek katalitik aktivite oluşturur. İnsan intestinal lipazı en iyi taklit eden domuz pankreatin olduğu anlaşılmış ve çalışmalarda genel olarak domuz pankreatini (intestinal lipaz) kullanılmıştır (Alvarez ve Stella, 1989; Dahan ve Hoffman, 2006-2007).

Kolipaz, pankreatik lipazın yağ/su arayüzeyine bağlanmasını kolaylaştırır. Safra tuzları ve fosfolipitlerin varlığında, pankreatik lipazın optimum aktivitesi için kolipaz gereklidir. Fosfolipaz A₂ fosfolipitlerin hidrolizinde, pankreatik lipaza yardımcı olur (Patton ve Carey, 1981; Larsen ve diğerleri, 2011). Kolesterol esteraz, pankreatik lipaz ve Fosfolipaz A₂ aracılığıyla trigliseritlerine ayrılan fosfolipitlerin daha küçük parçalara hidrolize olmasını sağlar (Patton ve Carey, 198; Larsen ve diğerleri, 2011). Kolipaz-lipaz enzimi yağların sindirilmesi ve misellere parçalanmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca safra bezinden salgılanan safra asitleri de yağların yüzey alanını artırmakla birlikte, yağ-su ara yüzey enerjisini düşürerek lipitlerin çözünürlüğünü artırmaktadır. İnsanda safra tuzu konsantrasyonu açlık intestinal sıvılarda 2-5 mM, tokluk intestinal sıvı da ise 8-15 mM aralığındadır (Kalantzi ve diğerleri, 2006; Persson ve diğerleri, 2005; Larsen ve diğerleri, 2011). Safra tuzları, insanlarda taurin konjuge (taurokolik asit, taurokenodeoksikolik asit, taurodeoksikolik asit) ya da glisin konjuge (glikokolik asit, glikodeoksikolik asit,

glükonodeoksikolik asit) olarak bulunmaktadır. Çalışmalarda safra tuzu kaynakları farklılık gösterebilir. Genellikle domuz kaynaklı safra tuzları kullanılmaktadır. Domuz kaynaklı safra tuzları, insan safra tuzlarını karşılamakla birlikte bünyesinde insanda olmayan farklı safra asitleri de bulunmaktadır (Larsen ve diğerleri, 2008). Fosfolipitler, safra tuzu varlığında su-yağ ara yüzeyine bağlanarak pankreatik lipaz aktivitesini inhibe eder, fakat ortamda bulunan Fosfolipaz A₂ bu durumu engellemektedir. İnsandaki fosfolipit konsantrasyonu açlık durumunda 0,1-0,6 mM, tokluk durumunda da 0,1-4,8 mM aralığındadır (Larsen ve diğerleri, 2011). Oral lipit formülasyonları için, in vitro koşulları oluştururken gastrik-intestinal lipaz ve safra tuzlarının etkileri de incelenmelidir. Bu amaçla in vitro lipoliz testleri geliştirilmektedir. Şekil 2.6'da lipitlerin gastrointestinal sistemdeki sindirim süreci verilmektedir (Kalepu ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.6. Lipitlerin gastrointestinal sistemdeki sindirim süreci (Kalepu ve diğerleri, 2013)

2.5.3. Lipoliz deney ortamının koşul ve bileşenleri

Lipoliz deney ortamının koşul ve bileşenleri aşağıda verilmektedir:

- Safra tuzları ve fosfolipitler

Safra asitleri doğal yüzey aktif maddelerdir, sindirim ve lipitlerin emiliminde önemli bir rol oynarlar. Safra kesesinden salgılanan safra tuzları yağların yüzey alanını arttırarak ve yağ-su ara yüzeyi enerjisini düşürerek lipitlerin çözünürlüğünü

arttırmaktadır. Vücuttaki safra tuzlarının konsantrasyonu, açlık halindeki 2-6,4 mM, (Galia ve diğerleri, 1998; Persson ve diğerleri, 2005) tokluk durumunda 8-15 mM'dir (Persson ve diğerleri, 2006; Kalantzi ve diğerleri, 2006). Fosfolipitler safra tuzlarının varlığında yağ-su ara yüzeyine bağlanarak pankreatik lipaz aktivitesini inhibe eder. Vücuttaki fosfolipit konsantrasyonu açlık durumunda 0,1-0,6 mM iken, tokluk durumunda 0,1-4,8 mM'dir (Kleberg ve diğerleri, 2010; Larsen ve diğerleri, 2011). Lipoliz ortamında kullanılacak safra tuzları ve fosfolipit miktarı, FASGIF, FESGIF (Jantratid ve Dressman, 2009), FASSIF ve FESSIF ticari ürünlerinde bulunan miktarları dikkate alınarak kullanılmıştır.

- Lipaz kaynakları

İnsan gastrik lipazın ticari bir ürünü yoktur. Mikrobiyal yapıda *C. antartica* lipaz, mide lipazına en yakın olan lipazdır (Christophersen ve diğerleri, 2014). Domuz pankreatini insan intestinal lipazını en çok taklit eden lipaz kaynağı olduğu için çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Alvarez ve Stella, 1989; Dahan ve Hoffman, 2006-2007; Thomas ve diğerleri, 2014). Domuz pankreatin, sindirim sürecinde bulunan tüm enzimleri içerir. Lipoliz çalışmasında seçilen enzim kaynakları *C. antartica* lipaz A ve domuz pankreatin (8xUSP), enzim aktivitesi de 1000 TBU/mL'dir (Porter ve diğerleri, 2004; Sek ve diğerleri, 2001). Tribütün ünitesi (TBU) enzim aktivitesini gösteren bir terimdir. Kuru pankreatin tozunun her miligramının tribütün ünitesi, dk'da 1 μ mol bütirik asit salgılayan enzim miktarıdır (Benito-Gallo ve diğerleri, 2015).

- pH değeri

Gastrik-intestinal lipazın optimum aktivite profili, gastrointestinal sistemi temsil eden fizyolojik pH'dan etkilenir. Gastrik lipaz için pH 2, pankreatik lipaz için ise pH 6,5-8 kullanılmıştır (Carriere ve diğerleri, 1993, Larsen ve diğerleri, 2011).

- Kalsiyum ilavesi

Kalsiyum çeşitli nedenlerle in vitro lipoliz deney ortamına eklenir. Lipoliz ortamında serbest yağ asitlerinin varlığı pankreatik lipazı inhibe eder. Lipoliz ortamına kalsiyum ilavesinde, sürekli ilave etmek ya da deneyin başlangıcında sabit bir miktarda ilave etmek üzere iki yaklaşım vardır. Dinamik in vitro lipoliz modeli olarak da bilinen Kopenhag modelinde kalsiyum sürekli deney ortamına eklenirken (Zangenberg, 2001a), Monash ve Kudüs modelinde deneyin başlangıcında lipoliz ortamına eklenmektedir (Larsen ve diğerleri, 2012).

Serbest yağ asitleri, lipoliz ortamında pankreatik lipazın aktivitesini pH'ı değiştirerek düşürmektedir. Ortamda Ca^{+2} iyonu varlığında yağ asitleriyle birleşerek kalsiyum sabunu oluşturur ve yağ asitlerini ortamdaki uzaklaştırır. Fizyolojik ortamda böyle bir durum olmasa da kalsiyum ilavesi yağ asitlerinin ortamdaki uzaklaştırılması için kullanılmaktadır.

- NaOH ve HCl konsantrasyonu

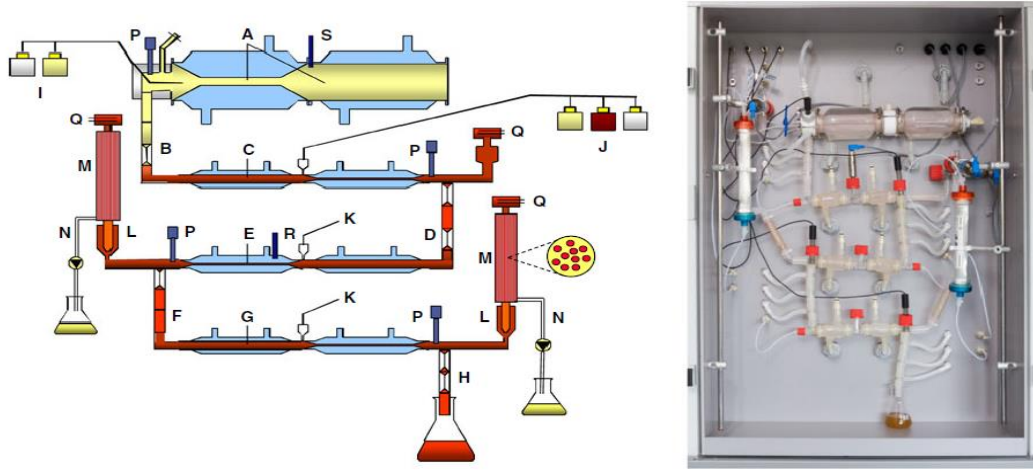
İn vitro lipoliz deneyleri, kullanılan NaOH konsantrasyonu dikkate alınarak yapılmalıdır. Lipoliz boyunca açığa çıkan yağ asitleri ortamın pH'sını düşürür. Pankreatik lipazın optimum etkiyi göstermesi için pH'ın sabit tutulması gereklidir. Bu aşamada lipoliz ortamı NaOH ile titre edilerek pH sabit tutulur. Yağ asitleri sabunlaşarak ortamdaki uzaklaştırılır. Sabunlaşma sırasında etkin madde kaybı da oluşabilir. Ayrıca NaOH ve HCl konsantrasyonu yüksek olduğunda (1M), lipoliz ortamının pH'ının kontrol edilmesi zorlaşmaktadır.

- Örnekleme

Örnekleme zamanları, in vitro çözünme hızı çalışmalarının örnekleme zamanları dikkate alınarak belirlenebilir. Tenofovir formülasyonlarının çözünme hızı çalışmaları 90 dk yapılmış ve lipoliz çalışmaları için gastrik lipoliz deney süresi 30 dk ve intestinal lipoliz deney süresi ise 60 dk olarak belirlenmiştir.

İn vitro lipoliz modelinin oluşturulmasında kritik parametreler aşağıda verilmektedir:

sıcaklık ve sindirim enzimlerinin sekresyonu gibi faktörlerle sistem kontrol edilir (Abrahamse ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.8. TNO gastrointestinal model (TIM) dinamik lipoliz modeli (Abrahamse ve diğerleri, 2012)

Son yıllarda yapılan in vitro lipoliz çalışmaları, lipoliz modelini etkileyebilecek kritik özellikler incelenerek lipoliz modeli koşullarını standartlaştırmaya yöneliktir. Yapılan çalışmalar aşağıda değerlendirilmektedir:

- 2010 yılında yapılan ilk çalışmada, model ilaç olarak seçilen sinnarizin etkin maddesinin in vitro lipoliz deneyi boyunca çökmesinin nedenleri araştırılmıştır. NaOH miktarındaki artış etkin maddenin ortamda çökmesini doğrusal olarak artırmıştır. Pellet fazdaki (çökelti) etkin maddenin incelenmesi sonucunda, çöken ilacın amorf yapıda olduğu ve çözünürlüğünün katı kristal haline göre arttığı görülmüştür. İn vitro lipoliz çalışmalarının, etkin maddenin çözünürlüğü üzerine negatif bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Sassene ve diğerleri, 2010).
- 2012 yılında yapılan diğer çalışmada, in vitro lipoliz koşulları oluşturulmaya çalışılmış ve farklı formülasyon tiplerinin in vitro lipoliz modeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Model ilaç olarak seçilen danazolun lipit sınıflandırma sistemine (Pouton, 1985) göre 8 farklı formülasyonu geliştirilmiştir. Formülasyonda kullanılan yağ, YEM ve YYEM farklılıklarının etkin maddenin çözünürlüğünü ve formülasyonun sindirimini etkilediği anlaşılmıştır (Williams ve diğerleri, 2012b).
- 2012 yılında yapılan bir çalışmada, safra tuzu konsantrasyonunun ve ilaç yükleme kapasitesinin, in vitro lipoliz deneyleri boyunca etkin maddenin çözünürlüğüne ve deney ortamında çökmesine olan etkisi incelenmiştir. 3 mM ve üzerindeki

safr tuzu konsantrasyonu etkin madde çözünürlüğünü artırmakla birlikte, ilacın deney ortamında çökmesini de azaltığı gözlenmiştir. Uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan formülasyonda, ilacın çökmesi orta zincirli yağ asitlerinden oluşan formülasyona göre daha az olmuştur. Teorikte, ortamda çökelti oluşmadan maksimum ilaç konsantrasyonundaki çözünürlüğünün, sindirim ortamındaki ilaç çözünürlüğüne oranını maksimum süpersatürasyon oranı (SRM) olarak tanımlanmıştır. 2,5 üzerindeki SRM oranında, ilacın çökme artışının fazla olacağı ve buna dayalı olarak lipit taşıyıcı sistemlere yüklenebilecek maksimum ilaç konsantrasyonu miktarının lipoliz modellerinin katkısıyla da saptanabileceği belirtilmiştir (Williams ve diğerleri, 2012a).

- 2013 yılında yapılan çalışmada, lipit sınıflandırma sistemine göre uzun ve orta zincirli yağ asitlerinden oluşan formülasyonlardan hareketle, in vitro lipoliz testleri boyunca oluşan çökme ve süpersatürasyon oranı değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm formülasyonlarda SRM oranının 3'ün üzerinde olması etkin maddenin çökme miktarını artırmıştır (Williams ve diğerleri, 2013).
- 2014 yılında yapılan çalışmada, in vitro lipoliz modellerinden hareketle, formülasyonların dispersiyon ve sindirimini dikkate alan yeni bir lipit sınıflandırma sistemi önerilmiştir (Williams ve diğerleri, 2014).
- 2014 yılında yapılan çalışmada ise pankreatin ve Ca^{+2} oranlarının in vitro lipoliz testi boyunca model ilaç danazolün dağılımı ve formülasyonların sindirimine olan etkisi araştırılmıştır. Pankreatin oranları sindirimi etkilerken, ilacın çökmesini etkilememiştir. Ca^{+2} oranı sindirimi çok az etkilerken, yüksek Ca^{+2} seviyeleri ilacın çökmesini artırmıştır. Ayrıca yüksek Ca^{+2} seviyelerinin safra tuzlarıyla birleşerek çökebileceğini ve bu durumun etkin madde çözünürlüğünü azaltacağı düşünülmektedir. İn vitro sindirim modellerindeki, in vivo biyoyararlanıma etki eden fizyolojik seviyedeki kalsiyumun (1,4 mM açlık koşulları) etkin maddedeki ve safra tuzundaki çökme oranını artırırsa bile tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır (Sassene ve diğerleri, 2014).
- 2015 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise açlık/tokluk koşulları altında, rekombinant köpek gastrik lipazı kullanılarak, gastrik ve intestinal pH'larda orta ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan formülasyonlardaki sindirimi ölçmek için pH-stat tekniği kullanılmıştır. Çalışma sonucunda gastrik lipazın, lipit sindirimini midede başlattığı ve ince bağırsakta da aktivitesini devam ettirdiği ve tüm

formülasyonların sindiriminde rol oynadığı anlaşılmıştır (Bakala-N'Goma ve diğerleri, 2015).

İn vitro lipoliz testleri, lipit kaynaklı sistemlerin etkin maddeyi çözme ve formülasyonların sindirimine olan etkisini incelemektedir. Lipoliz koşullarını oluşturmak için yapılmış çalışmalardan bazıları da Çizelge 2.4'de sunulmaktadır. İn vivo'ya en yakın ve şartları optimize edilmiş lipoliz koşulları henüz belirlenememiştir.

Çizelge 2.4. İn vitro lipoliz koşullarına yönelik yapılan çalışma örnekleri (Thomas ve diğerleri, 2012)

Hacim (mL)	Süre (dk)	pH	Tampon	Lipaz kaynağı	Safra tuzu	Kalsiyum	Referans
9	12	6,5	Tris-maleat (2 mM)	Pankreatin (24 TBU/mL)	NaTDC 8 mM	10 mM	Reymond ve Sucker, 1988
5	-	8,5	Tris-maleat (50 mM)	Domuz pankreası (168-280 TBU/mL)	NaTDC 0-30 mM	0-30 mM	Alvarez ve Stella, 1989
10	-	6-9	Tris-maleat (2 mM)	Saflaştırılmış insan pankreatik sıvı (1-8 TBU/mL)	NaTC NaTDC NaCDC 6 mM	10 mM	Patton ve Carey, 1981
40	30	6,8-7,4	Tris-maleat (50 mM)	Domuz pankreatin (1 000 IU/mL)	NaTC 5mM	5 mM	Dahan ve Hoffman, 2006-2007
37,5	20-120	7,0	Fosfat (5 mM)	Domuz pankreası tip 2 (100-400 U/mg)	Domuz safra ekstratı 20 mM	10 mM	Li ve McClemens, 2010
300	40-90	6,5	Tris-maleat (2 mM)	Domuz pankreatin (300-800 USP unit/mL)	Domuz safra ekstratı 5-30 mM/ 1-5 mM PC	Sürekli ilave (0,045-0,181 mM)	Larsen ve diğerleri, 2008; Fatouros ve diğerleri, 2007
10-40	30-60	7,5	Tris-maleat (50 mM)	Domuz pankreatini (1 000 TBU/mL)	NaTDC/lesitin (5-20 mM) /1,25-5 mM	5 mM	Guine ve diğerleri, 2008; Kaukonen ve diğerleri, 2004
100	40	6,5	Tris-maleat (50 mM)	Pankreatin ekstratı (8 TBU/mg)	Safra tuzu/lesitin (5mM) /1,25 mM	5 mM	Ali ve diğerleri, 2008

2.5.4. Lipoliz ile yapılan güncel çalışmalar ve değerlendirmeler

2017 yılında BCS Sınıf 2 ilaç olan sinnarazin ile yapılan çalışmada, ilaç yükleme kapasitesinin (%80 ve %200) ve dozaj şeklinin (SNEDDS ve süspansiyon) emilim ve biyoyararlanım üzerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, sulu fazdaki etkin madde miktarının lipoliz ve emilen miktarlar üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. SNEDDS formülasyonların sulu fazdaki etkin madde miktarını, formülasyonun yağlı kısmına olan yükleme miktarı etkilemiştir (Siqueira ve diğerleri, 2017).

BCS Sınıf 2 ilaç olan nimodipin ile yapılan çalışmada, SNEDDS formülasyonu kalite tasarımı yaklaşımıyla geliştirilmiş ve formülasyon bileşenlerinin, formülasyonun karakterizasyonuna, emülsifikasyonuna ve lipoliz sonuçlarına olan etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, farklı oranlardaki formülasyon bileşenleri olan yüzey etkin madde ve yağın, lipoliz sonuçlarını etkilediği görülmüştür. Damlacık boyutu daha küçük olan formülasyonların sindirimi artmıştır. Ayrıca lipoliz oranlarını, açlık-tokluk lipoliz ortamlarının enzimsel farklılıkları da etkilemiştir (Alayoubi ve diğerleri, 2018).

2018 yılında yapılan diğer bir çalışmada, R3040 model maddesiyle SNEDDS formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyon insan ve sıçanın gastrointestinal enzimsel farklılıkları dikkate alınarak iki ayrı lipoliz deney şartları ve lipoliz deney modeli hazırlanmış ve in vitro sonuçlar sıçanlarda yapılan in vivo çalışma sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Ayrıca SNEDDS formülasyonlara farklı oranlarda (%80-%200) etkin madde yüklenerek, yükleme kapasitesinin lipoliz üzerine etkisi incelenmiştir. Sıçanların gastrointestinal sistemini taklit eden modelde gastrik ve intestinal enzimsel farklılıklarla oluşturulurken, insan modeli için sadece intestinal enzimsel farklılıkların etkisi incelenmiştir. Yükleme kapasitesinin lipoliz sonuçlarını etkilemediği ve sadece formülasyonun yağlı kısmına yüklenen miktarın önemli olduğu anlaşılmıştır. İn vivo çalışmalar sonucunda, insan lipoliz modeli ile in vivo sonuçlar arasında benzerlik kurulamazken, sıçan lipoliz modeli AUC_{0-1} ve C_{maks} sonuçları ile benzerlik göstermiştir (Daniela ve diğerleri, 2018).

2018 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise, dinamik in vitro lipoliz modeli kullanılarak SNEDDS formülasyonun kapsülle verilmesi ve kalsiyum aljinat boncuklarının lipoliz üzerine olan etkisi incelenmiştir. 1995 yılında Minekus ve arkadaşlarının TNO gastrointestinal model 1 (TIM-1) modeli geliştirilerek gastrointestinal dinamik lipoliz modeli oluşturulmuştur. Bu modelde mide, ince bağırsak, ileum, jejunum sekresyonları, pH kinetikleri ve geçiş zamanları bilgisayarlı sistemle kontrol edilmiştir. Aljinat boncukları ile geliştirilen SNEDDS formülasyon ya da formülasyonun kapsüllenmesinin, lipolizi ertelediği ve aljinat boncuklarının da lipaz enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür (Corstens ve diğerleri, 2018).

2.5.5. İn vitro lipoliz verileriyle-in vivo veriler arasında korelasyon

Biyofarmasötik açıdan IVIVC in vitro salım karakterleri ile in vivo biyoyararlanım parametreleri arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. IVIVC, ilaç şeklinin in vitro özelliği (ilacın çözünme hızı veya yüzde çözünen miktar) ile in vivo yanıt (plazma ilaç derişimi veya emilen ilaç miktarı) arasındaki matematiksel ilişki olarak tanımlanır.

İn vitro-in vivo farmakokinetik korelasyon modelleri ilaç keşfi ve geliştirme sürecinin önemli bir parçasıdır. Bu modeller ilaçların in vivo davranışını, bir formülasyonun geliştirilmesi ve ölçeklendirilmesi sırasında farmakokinetik özelliklerin test edilmesi, kalite güvencesi, kalite kontrolünü kapsayan in vitro çalışmalarla doğru bir şekilde tahmin edebilir (Gómez ve Valencia, 2015).

Edwards (1951) ve Nelson'un (1957) oral uygulama sonrasında aspirin ve teofilin çözünme oranlarını, in vivo görünümüleriyle ilişkilendirmedeki öncü çalışmaları ile IVIVC, farmasötik ürün geliştirme alanında giderek daha fazla önem kazanmıştır (Lu ve diğerleri, 2011).

Lipit kaynaklı sistemlerde in vitro çözünme hızı sonuçları yerine, in vitro lipoliz sonuçlarını kullanmak hedeflenmektedir. İn vitro lipoliz verileriyle-in vivo veriler arasında kurulan korelasyon örnekleri Çizelge 2.5'de verilmektedir (Kollipara ve Gandhi, 2014).

Çizelge 2.5. İn vitro lipoliz verileriyle-in vivo veriler arasında kurulan korelasyon örnekleri (Kollipara ve Gandhi, 2014).

İlaç	Lipoliz verileri	İn vivo veri	IVIVC	Referans
Halofantrin	LCT solüsyon> LCT/MCT karışım> MCT solüsyon	Beagle cinsi köpeklerle yapılan çalışmada LCT solüsyon> LCT/MCT karışım>MCT solüsyon	Veriler arasında korelasyon var LCT solüsyon> MCT solüsyon, fakat IVIVC kurulamadı	Khoo ve diğerleri, 1998
Griseofulvin	MCT>LCT>SCT> sulu formülasyon	Köpeklerle yapılan çalışmada MCT>LCT>SCT> sulu formülasyon	Veriler arasında korelasyon var, fakat IVIVC kurulamadı	Bates ve Carrigan, 1975
Sinnarazin	SNEDDS>tablet Açlık-tokluk	Köpeklerde yapılan çalışmada açlık koşullarında SNEDDS> tablet – SNEDDS>tablet tokluk koşullarında tablet formülasyonun performansı arttı.	IVIVC kurulamadı	Christophersen ve diğerleri, 2014
Deksametazon	MCT=LCT=SCT	Sıçanlarda yapılan çalışmada MCT=LCT=SCT	IVIVC kurulamadı	Dahan ve Hoffman, 2007
Danazol	Solüsyon> LC-SMEDDS> MC-SMEDDS	Köpeklerle yapılan çalışmada solüsyon>LC-SMEDDS>MC-SMEDDS	Veriler arasında korelasyon var, ancak IVIVC kurulamadı	Porter ve diğerleri, 2004
Probuco	SMEDDS> SNEDDS>yağlı solüsyon	Domuzlarla yapılan çalışmada, SMEDDS>SNEDDS>yağlı solüsyon	AFM modeliyle IVIVC kuruldu korelasyon>0,91	Fatouros ve diğerleri, 2008
Vitamin D3	MCT>LCT>SCT	LCT>MCT>SCT	IVIVC kurulamadı	Dahan ve Hoffman, 2005
Vitamin D3, progesteron	MCT>LCT>SCT	Farelere şiloheksimid enjekte edilerek lenfatik sisteme gidişi engellendi. MCT>LCT>SCT	IVIVC kuruldu R ² >0,99	Dahan ve Hoffman, 2006

(LCT: Uzun zincirli trigliserit, MCT: Orta zincirli trigliserit, SCT: Kısa zincirli trigliserit)

Yapılan tüm çalışmalar sonucunda henüz in vitro lipoliz modeli şartlarının standartlaştırılmamış olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, ortama eklenen NaOH, yağ asitleriyle birlikte etkin maddenin de çökmesine sebep olmuştur. Gelecekte yağların ortamdan uzaklaştırılması (yapay membran) için farklı deney düzenekleri oluşturulabilir. İn vitro lipoliz deney modeli şartları insanlarda bulunan enzimsel farklılıklar/miktarlar dikkate alınarak oluşturulmaktadır. Fakat sıçan ve farelerde safra tuzu miktarı daha fazladır. Safra tuzu miktarı çözünürlük ve biyoyararlanıma olumlu katkı sağlarken, hayvanlarda yapılan in vivo deneyler in vitroyla farklılık gösterebilmektedir. Ortam hacmi, deney süresi, açlık-tokluk koşulları enzim ve pH farklılıkları dikkate alınarak lipoliz deney koşullarını oluşturmak için çalışmalar devam etmektedir.

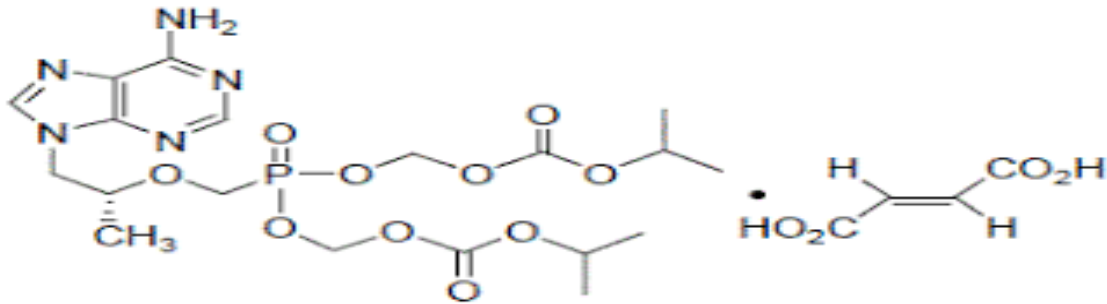
2.6. Tenofovir

2.6.1. Fizikokimyasal, farmakokinetik ve farmokodinamik özellikleri

- Fizikokimyasal özellikleri

Nükleozid ters transkriptaz inhibitörü olarak 2001'de FDA tarafından HIV-AIDS tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan tenofovir disoproksil fumarat, ön ilaç olan tenofovir disoproksilin fumarat tuzudur (Palacin ve diğerleri, 2001). 2008 yılında hepatit B tedavisinde de etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tenofovirin ön ilaç formu olan tenofovir disoproksil fumaratın lipofilitesi (logP 1,2) tenofovirden (logP -1,6) daha yüksektir (Yuan ve diğerleri, 2001; Choi ve diğerleri, 2008). Tenofovir BCS Sınıf 3'te bulunan suda çözünürlüğü yüksek permeabilitesi zayıf bir ilaçtır (Çizelge 2.6). Tenofovir P-gp substratı değilken, tenofovirin disoproksil fumarat P-gp substratıdır (Mallants ve diğerleri, 2005; Kiser ve diğerleri, 2008; Shailender ve diğerleri, 2017a).

Tenofovir disoproksil fumaratın kimyasal adı (Kurt ve diğerleri, 2015); 9(R)2 [[bis [[(izopropoksikarbonil) oksi] metoksi] fosfonil] metoksi] propil] adenin fumarat (1:1)'dir (Şekil 2.9). Kimyasal formülü ise $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ şeklinde olup moleküler ağırlığı 635,52 g/mol'dür (Hazra ve diğerleri, 2004).



Şekil 2.9. Tenofovir disoproksil fumaratın kimyasal yapısı (Rxlist, 2018)

Çizelge 2.6. Tenofovirin fizikokimyasal özellikleri (25 °C) (FDA, 2012)

Çözünürlük	13,4 mg/mL (distile su)
pK_a	3,8 ve 6,7
cLogP	1,25 (pH 6,5)
Molekül Ağırlığı	635,52 g/mol

Tenofovir disoprosil fumarat içeren tablet dozaj şeklinde referans (Viread®) ve eşdeğer ürünler (Abavir®, Doro®, Evasif®, Hiverac®, Nefovir®, Ovirproksil®, Sotacar®, Tenevir®, Tenoviral®, Tenribel®, Ternavir®, Veforix®, Virsoem®, Virtenix®, Voxus®, Zentovir®) ilaç piyasasında bulunmaktadır.

- Farmakokinetik özellikleri

Emilim

Tenofovir düşük absorpsiyon sorunu gösteren, açlık biyoyararlanımı %25 olan (Lee ve diğerleri, 2010; Anderson ve diğerleri, 2011; Murakami ve diğerleri, 2015) lipofilik bir etkin maddedir (Kearney ve diğerleri, 2004; Gelder ve diğerleri, 2002). Yüksek yağlı yiyecek alımı ile yapılan tokluk biyoyararlanım çalışmalarında, C_{maks} %14 ve AUC %40 artarak açlık durumuna göre biyoyararlanımı artmıştır (Kearney ve diğerleri, 2004; Çizelge 2.7). Referans ürünü Viread® tablettir ve tok karnına alınmaktadır. Viread® tabletin tokluk biyoyararlanımı %45'in üzerindedir. Tenofovirin biyoyararlanımı yüksek yağlı gıda alımından etkilendiği için yiyeceklerle birlikte alınması önerilir, bu durum yağların, endojen lipazlar ve esterazlar için alternatif substratlar olarak tenofovirin metabolizmasını/parçalanmasını engellemede rolü olduğu belirtilmektedir (Watkins ve diğerleri, 2017). Farelerde, köpeklerde ve maymunlarda yapılan biyoyararlanım çalışmaları sonucunda sırasıyla %2, %17,1 ve %5,3 zayıf biyoyararlanım ve zayıf absorpsiyon gösterdiği görülmüştür (Shailender ve diğerleri, 2017b). Tenofovirin farmakokinetik özellikleri Çizelge 2.7'de verilmektedir:

Çizelge 2.7. Tenofovirin farmakokinetik özellikleri

Doz	AUC-C _{maks}	t _{maks}	t _{1/2}
Günde bir kez 300 mg tenofovir disoproksil fumarata eşdeğer 245 mg tenofovir disoproksil (fumarate olarak) veya 136 mg tenofovir	Açlık: 2287±685 ng·sa/mL (AUC) 296±90 ng/mL (C _{maks}) Tokluk: 3324±1370 ng·sa/mL (AUC) 326±119 ng/mL (C _{maks})	Açlık: 1,0±0,4 sa Tokluk: 2 sa	17 sa

Tenofovirin hayvanlarla yapılan biyoyararlanım çalışmalarında maksimum plazma konsantrasyonuna 0,25-1,5 sa içerisinde ulaşmış ve iki faz olarak azalmıştır. Tenofovirin en yüksek biyoyararlanımı köpeklerde yapılan çalışmada görülmüştür (Kearney ve diğerleri, 2004).

Dağılım

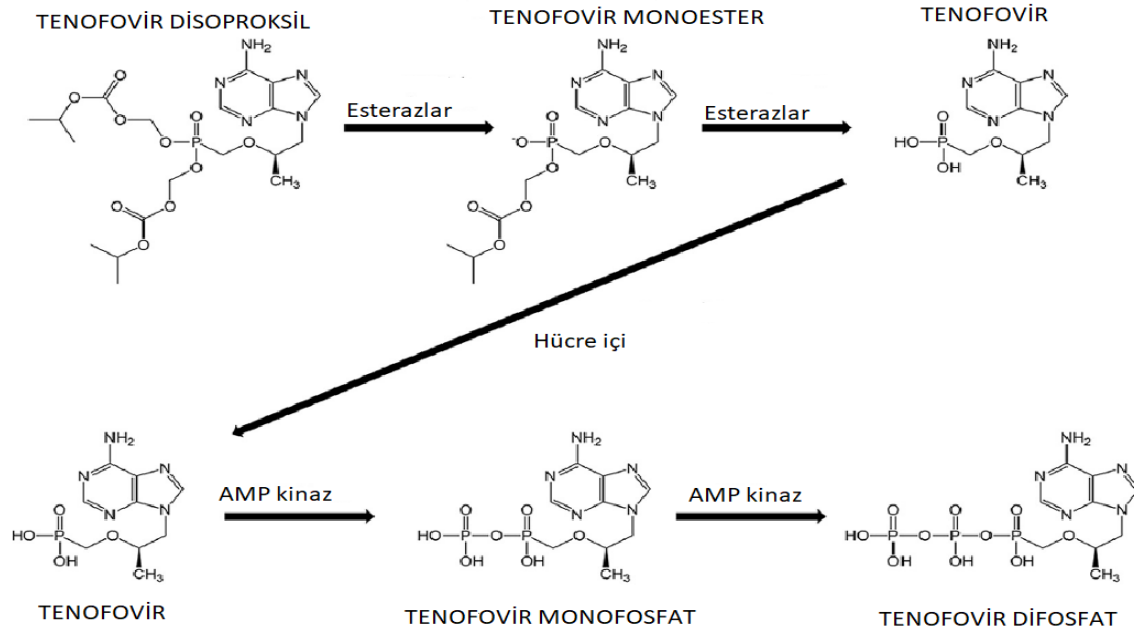
İntravenöz uygulama sonrasında, tenofovirin kararlı durum dağılım hacminin yaklaşık 800 mL/kg olduğu tahmin edilmiştir. Tenofovirin serum yarılanma ömrü 17 saat ve hücre içi yarılanma ömrü ise 60 saatin üzerindedir. Proteinlere bağlanma oranı %10'dan azdır (Kurt ve diğerleri, 2015). Tenofovirin ultrasantrifüj yöntemiyle insan plazma ve serumunda değerlendirilen protein bağlanma konsantrasyon aralığı 0,01-25,01 mg/mL (FDA, 2007).

Metabolizma ve eliminasyon

Tenofovir disoproksil fumarat, ara metabolit olarak tenofovir monofosfonat ester ile iki adımda tenofovire hidrolize olmaktadır. İlk adım karboksilesterazlar ve ikincisi fosfodiesterazlar ile katalize edilir. Tenofovir, hücre içi kinazlar ile aktif bifosforile edilmiş kısmına dönüştürülür (Watkins ve diğerleri, 2017; Şekil 2.10)

Nükleozit analoglarının, HIV ters transkriptaz özelliklerinin oluşması için hücresel enzimlerle fosforilasyon gerekmektedir. Genellikle nükleozit analoglarının 3-OH

grupları yoktur ve grubun olmaması HIV-ters transkriptaz tarafından viral DNA'ya bağlanarak, daha fazla DNA zincirinin oluşmasını engeller. Nükleozidler hücrede, trifosfat formlarına adım adım fosforile edilir ve böylece HIV ters transkriptazı için potansiyel substratlar haline gelirler. Bu işlemde yer alan kinazlar, hücre içindeki aktif ilaç seviyesini korurlar (Varga ve diğerleri, 2013)



Şekil 2.10. Tenofovirin metabolizması (Watkins ve diğerleri, 2017)

Ne tenofovir ne de tenofovir DF CYP enzim substratı değildir ve bu durumdan ötürü ilaç etkileşimleri daha az görülmektedir (Shailender ve diğerleri, 2017a). Tenofovir glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon kombinasyonu ile elimine edilmektedir. Toplam klerensin yaklaşık 230 mL/s/kg (yaklaşık 300 mL/dk) ve renal klerensin ise yaklaşık 160 mL/s/kg (yaklaşık 210 mL/dk) olduğu tahmin edilmektedir (Kurt ve diğerleri, 2015).

Çözünme hızı çalışmaları

FDA çözünme hızı metotlarına ait veritabanında tenofovir için önerilen in vitro çözünme hızı yönteminde, 900 mL 0,1 N HCl ortamında 50 rpm'de palet yönteminin kullanımı önerilmektedir (FDA, 2007).

Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi

Tenofovir BCS Sınıf 3'te bulunan suda çözünürlüğü yüksek permeabilitesi zayıf lipofilik bir ilaçtır (Patil ve diğerleri, 2017).

Farmakodinamik çalışmalar

Tenofovir disoproksil fumarat, ön ilaç olan tenofovir disoproksilin fumarat tuzudur. Tenofovir disoproksil absorbe edilir ve bir nükleotid analogu olan etkin madde tenofovire dönüştürülür. Tenofovir daha sonra aktive T hücrelerinde iki etkin metabolit tenofovir difosfata dönüştürülür. Tenofovir difosfat, doğal deoksiribonükleotid substratı ile doğrudan bağlanma rekabeti yaparak viral polimerazları inhibe eder ve DNA'ya girdikten sonra DNA zincirini sonlandırır (Tenoviral®, 2019).

HIV-1'deki klinik etkinlik

Tenofovir disoproksil fumaratın HIV-1 ile enfekte yetişkinlerdeki etkisi 48 haftalık çalışmalarda gösterilmiştir. 24. haftada, log10 plazma HIV-1 RNA düzeylerindeki başlangıça göre zaman ağırlıklı ortalama değişim 0,03 log10 kopya/mL ve -0,61 log10 kopya/mL'dir. Tenofovir disoproksil fumarata antiviral cevap 48 hafta boyunca sürmüştür (Tenoviral®, 2019).

Kronik hepatit B'deki klinik etkinlik

Tenofovir disoproksil fumarat, kronik karaciğer hastalığı olan, HBeAg pozitif ve HBeAg negatif kronik hepatit B'li yetişkinlerde ve HIV-1 ve hepatit B virüsü ile ko-enfekte hastalardaki histolojik, virolojik, biyokimyasal ve serolojik cevaplar esas alınarak yapılan çalışmalarda, tenofovir disoproksil fumarat, lamivudine dirençle ilişkili mutasyonları içeren hepatit B virüslü hastalarda anti-hepatit B virüsü aktivitesi göstermiştir (Tenoviral®, 2019).

Yan etkiler

Hepatit B tedavisi sırasında halsizlik, bulantı, kusma, karın ağrısı, kas ağrıları, baş ağrısı, iştahsızlık, ALT yüksekliği ve trombositopeni gibi yan etkiler görülmüştür (Demirtürk ve Demirdal, 2011; Jenh ve Pham, 2010). Bazı durumlarda osteomalasiye ilerleyebilen hipofosfatemi de görülebilmektedir (Kim ve diğerleri, 2015).

HIV enfeksiyonu tedavisinde, 2-9 yıl süreyle tenofovir kullanan hastaların %15'inde fosfatüri, glikozüri, bikarbonat atılımı, proteinüri ve aminoasidüriyle karakterize renal tübüler disfonksiyon bildirildiği görülmektedir (Aşçı ve diğerleri, 2015). Tenofovir, 65 yaş üstü ve 18 yaş altı hastalarda incelenmemiştir. Yaşlı hastaların böbrek ya da karaciğer fonksiyonlarının azalması da olasıdır, bu nedenle yaşlı hastalar tenofovir ile tedavi edilirken dikkatli olunmalıdır.

2.6.2. Tenofovirin tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar

Tenofovir, hepatit B ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tenofovir bir nükleotid ters transkriptaz inhibitörüdür ve virüslerin çoğalması için esas olan enzimlerin (hepatit B'de DNA polimeraz, HIV'de ters transkriptaz) çalışmasını engelleyerek aktivite gösterir (Kurt ve diğerleri, 2015).

AIDS hastalığının nedeni olan HIV virüsü, insan vücudunun hastalıklara karşı direncini sağlayan bağışıklık sistemini zayıflatmaktadır. HIV virüsünün, bağışıklık sistemini hastalıklarla mücadele edemeyecek kadar zayıf düşürmesi nedeniyle AIDS hastalığı oluşmaktadır (Kurt ve diğerleri, 2015). Dünya çapında yaklaşık 240 milyon insan, hepatit B virüsü enfeksiyonu taşımaktadır (Zampino ve diğerleri, 2015). Hepatit B kronik viral hepatitlerin en yaygın olan formudur. Siroz ve karaciğer kanserine yol açan hepatit B ve hepatit C virüslerinden kaynaklanan hepatit hastalığı tedavi edilmezse, karaciğer nakli kaçınılmaz olmakta, karaciğer hasarı ve karaciğer yetmezliği ilerleyen vakalarda ölüme sebep olmaktadır.

Tenofovirin düşük oral biyoyararlanımı klinik etkinliğini sınırlandırmaktadır. Tenofovir içeren ürün pazarının büyüklüğü göz önüne alındığında, biyoyararlanımdaki %33'lük bir iyileşme ile standart 300 mg tenofovir dozunda 245 mg'a düşme ile sonuçlanan doz azaltımı, sağlık harcamalarında yıllık 50-75 milyon dolar azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (Watkins ve diğerleri, 2017). Tenofovirin biyoyararlanımını önemli ölçüde iyileştirmek, ülkeler için sağlık harcamalarında önemli bir tasarruf sağlayacaktır. Bunu başarmak için, yenilikçi ilaç taşıyıcı sistem stratejilerini uygulamak önemlidir. Tenofovirin biyoyararlanımını artırmak için değişik ilaç taşıyıcı sistemlerin ve dozaj şekillerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bunlar, polimerik (dendrimerler, nanopartiküller, nanokapsüller, nanofiberler, miseller, nano-konjugatlar), lipit (lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, nanoyapılı lipit taşıyıcılar), inorganik (altın, gümüş, kalsiyum, demir oksit, silika) nanotaşıyıcılar ve nanosüspansiyonlardır. Tenofovirin biyoyararlanımını artırmak için, PLGA-nanopartiküller (Shailender ve diğerleri, 2017b), sıvı kristal prekürsörü (Patil ve diğerleri, 2017), lipozom (Spinks ve diğerleri, 2017), niozom (Kamboj ve diğerleri, 2014) ve kitosan nanopartikülleri (Shailender ve diğerleri, 2018) gibi çeşitli formülasyon yaklaşımları geliştirilmiştir. Ayrıca, nanoemülsiyon ve nanoemulgel sistemler transdermal olarak (Rambharose, 2017), hibrit-polimer lipit nanotaşıyıcı sistem de (Porkharkar ve diğerleri, 2015) tenofovirin nazal yoldan verilmesi için geliştirilmiş formülasyon yaklaşımlarıdır.

Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler, lipofilik ilaçların biyoyararlanımını artırmak için kullanılan en önemli stratejilerdendir (Pouton, 2000; Nicolaos ve diğerleri, 2003; Thomas ve diğerleri, 2012). Birçok çalışma, lipofilik ilaçların lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler ile uygulandığında biyoyararlanımlarının arttığını göstermiştir (Fatouros ve diğerleri, 2007; Mu ve diğerleri, 2013). Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler, yiyeceklerle birlikte alımın veya yiyecek yokluğunun neden olduğu biyoyararlanımdaki varyasyonları başarılı bir şekilde azaltmıştır (Kovarık ve diğerleri, 1994; Mueller ve diğerleri, 1994). Lipofilik ilaçların emilimini arttırmak için lipit taşıyıcıların (ilaç taşıyıcı sistemde veya gıdada) kullanılması uzun yıllardır bilinmektedir (Fleisher ve diğerleri, 1999).

Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler, lipofilik ilaçların bağırsak geçirgenliğini etkileyerek de emilimini arttırabilir. Çeşitli lipitlerin bağırsak duvarının fiziksel bariyer

işlevini değiştirerek geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (Constantinides ve Wasan, 2007; Dahan ve Hoffman, 2008; Mullertz ve diğerleri, 2010). Farklı tiplerde lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler arasında sıklıkla kullanılan, kendiliğinden nano emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Khan ve diğerleri, 2012; Rehman ve diğerleri, 2017). Bu sistemler, düşük çözünürlük, zayıf absorpsiyon, kimyasal stabilite, enzimatik degradasyon ve bağırsak duvarından effluks etkisine uğrayan ilaçların oral biyoyararlanımını arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca düşük permeabilite özelliği gösteren ilaçlar için geliştirilen sistemlerden biri de çoklu emülsiyonlardır. Çoklu emülsiyonlar, birden fazla etkin maddenin taşınabilmesi avantajıyla birlikte, etkin maddeyi çevre şartlarından korumakta ve emilimini arttırmaktadır. Tenofovir ile bugüne kadar yapılmış kendiliğinden nano emülsifiye sisteme ve çoklu emülsiyona ait bir çalışma bulunmamaktadır. Tenofovir BCS 3 ilaç olması nedeniyle suda çözünürlüğünün fazla olması ve kendiliğinden emülsifiye sistemleri karşılaştırma adına, son zamanlarda BCS 3 ilaçlar için tercih edilen çoklu emülsiyonlar da geliştirilerek tenofovirin emilim ve biyoyararlanım artışı için en uygun sistemin geliştirilmesi tez kapsamında gerçekleştirilmiştir.

2.6.3. Tenofovirle yapılan biyoyararlanım çalışmaları

Tenofovir ile yapılan biyoyararlanım çalışmalarında fareler, sıçanlar, köpekler ve maymunlar kullanılmıştır (Prathipati ve diğerleri, 2016; Shailender ve diğerleri, 2017a; Shailender ve diğerleri, 2017b). İnsanlarda yapılan in vivo çalışmaların tenofovir tayininde RP-HPLC (Onah ve diğerleri, 2011) ve LC-MS/MS (Delahunty ve diğerleri, 2009) yöntemleri kullanılmıştır.

Tenofovir, yüksek oranda yüklü fosfonat grubu bulunması nedeniyle çok düşük bağırsak geçirgenliğine sahiptir. Yapılan bir çalışmada, tenofovirin (2 metil karbonat esteri) biyoyararlanımı farelerde %20, köpeklerde %30 ve insanlarda %30'un altında bulunmuştur (Watkins ve diğerleri, 2017). Fare, köpek ve maymunlarda yapılan farklı bir çalışmada da, en yüksek biyoyararlanımı köpekler de (%17,1) göstermesine rağmen (Kearney ve diğerleri, 2004), sıçanlarla yapılan çalışmaların uygulanabilirliği daha fazla olduğundan in vivo çalışmalar kapsamında deney hayvan modeli olarak sıçan kullanılmıştır. Ayrıca sıçanlarda yapılan çalışmalarda intestinal enzim aktivitelerinin insanlara benzediği tespit edilmiştir (Yoshigae ve

diğerleri, 1998). Sıçanlara verilecek doz, FDA insan dozunun hayvan dozuna dönüştürme oranından (yüzey alanına göre doz dönüştürme) hareketle belirlenmiştir (Nair ve Jacob, 2016). Sıçanlarda safra kesesi bulunmamakla birlikte safra salgısı vardır. Pankreatik lipaz konsantrasyonu insanlara benzerken, safra asidi/pankreatik lipaz oranı insanlara kıyasla yüksektir (Sjögren ve diğerleri, 2014). Bu bilgiler göz önüne alındığında, in vitro lipoliz çalışmalarının in vivo çalışmalarla korelasyonu için sıçanlarla yapılan çalışmanın yeterli verileri sağlamaması olasıdır. Bu nedenle, sıçanlardaki in vivo çalışmalardaki öncelikli amaç kıyaslamalı biyoyararlanım çalışmaları olarak belirlenmiştir. Tezdeki in vivo değerlendirmeler, geliştirilen farklı formülasyon gruplarının (SNEDDS ve SDEDDS) referans ürünle farmakokinetik ve biyoyararlanım açısından karşılaştırılmasına, açlık/tokluk biyoyararlanımlarındaki değişkenliğin ve biyoyararlanım farklılıklarının belirlenmesine yönelik olarak planlanmıştır.

Tenofovirle 2017 yılında yapılan bir çalışmada, ince bağırsak esterazlarının tenofovir disoproksil fumaratın emilimindeki rolü değerlendirilmiştir. Ester bağlantıları bakımından zengin ve esteraz inhibe etme kapasitesi olan meyve suları ve farmasötik eksipiyanların (ester bağları olan) tenofovirin metabolizması üzerine olan etkisi incelenmiştir. İn vitro ve ex-vivo çalışmalar sonucunda, Cremophor-EL ve en yüksek inhibisyon seviyesine sahip olan greyfurt suyunun tenofovirin metabolizmasını azalttığı görülmüştür. Ayrıca sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalarda, tenofovirin greyfurt suyu ile birlikte verildiğinde oral biyoyararlanımının %97 oranında arttığı belirtilmektedir (Shailender ve diğerleri, 2017a).

2018 yılında yapılan bir çalışmada ise, kitozan kaynaklı nanopartiküllerin tenofovirin emilim ve biyoyararlanım üzerine olan etkisi incelenmiştir. Kitozan kaynaklı polimerik nanopartiküller tenofovirin hızla metabolize olmasını koruyarak emilimini artırmıştır. Sıçanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmasında, tenofovirin biyoyararlanımı, kitozan nanopartiküller ile sulu süspande formuna göre %380 artmıştır. Kitozan nanopartiküllerinin klatrin bağımlı endositoz yolu ile emilerek tenofovirin emilimini ve biyoyararlanımını artırdığı belirtilmektedir (Shailender ve diğerleri, 2017b).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Abil Em 90.....	Evonik Nutrition&Care GmbH, Almanya
Arlacel 20.....	Sigma, ABD
Capmul MCM.....	ABITEC, ABD
Captex 355.....	ABITEC, ABD
Cremophor RH 40.....	Sigma, ABD
C. antartica lipaz A.....	Sigma, ABD
Disodyum fosfat dihidrat	Merck, Almanya
Fosfotungustik asit.....	Sigma, ABD
Fosfotidilkolin	Sigma, ABD
Gelucire 44.....	Gattefossé, Fransa
Gliserol.....	Sigma, ABD
HCl %37 (h/h).....	Merck, Almanya
Heparin	Nevparin®, Türkiye
İmwitor 742.....	IOI Oleo GmbH, Almanya
İmwitor 988.....	IOI Oleo GmbH, Almanya
İmwitor 948.....	IOI Oleo GmbH, Almanya
Kalsiyum klorür.....	Sigma, ABD
Ketamin %10 (h/h)	Göksa Veteriner Kliniği, Türkiye
Labrafac Lipophile WL 1349.....	Gattefossé, Fransa
Labrafil M1944CS.....	Gattefossé, Fransa
Labrasol.....	Gattefossé, Fransa
Maisine35-1.....	Gattefossé, Fransa
Miglyol 818.....	Sigma, ABD
Mono propilen glikol.....	Sigma, ABD
NaOH.....	Merck, Almanya
Nar çekirdeği yağı.....	Helvacızade, Türkiye
Oleik asit.....	Sigma, ABD

PEG 400.....	Sigma, ABD
Propilen glikol.....	Sigma, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat.....	Merck, Almanya
Pankreatin	Sigma, ABD
Safra tuzu	Sigma, ABD
Sodyum asetat trihidrat.....	Merck, Almanya
Span 20.....	Sigma, ABD
Span 85.....	Sigma, ABD
Susam yağı.....	Helvacızade, Türkiye
Tenofovir	Pharmactive, Türkiye
Viread®	Gilead Sciences, Almanya
Transcutol P.....	Gattefossé, Fransa
Trizma maleat	Sigma, ABD
Tween 20.....	Sigma, ABD
Üzüm çekirdeği yağı.....	Helvacızade, Türkiye
4-bromobenzenboronik asit.....	Sigma, ABD

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

Altılı manyetik karıştırıcı	Variomag, USA
Bidistile su cihazı	Barnstead D11901
Çözünme hızı test cihazı	Varian VK-7000, ABD
Damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçme cihazı	Malvern ZetaSizer, İngiltere
Distile su cihazı	Nüve NS112, İngiltere
Diyaliz membran (25mm, 24 000 Da)	Sigma, ABD
DoE yazılım	Design Expert Software Version 10, ABD
DSC	Shimadzu DSC-60, Japonya
Enjektör 50 µL, 100 µL	Hamilton, Avustralya
Etüv	Heraeus KT-500, Almanya
Franz difüzyon hücreleri	Çalışkan Cam, Türkiye
FT-IR spektrometre	Perkin Elmeri, ABD
Hassas terazi	Shimadzu AW-320, Kolombiya
Isıtıcı su banyosu	Nüve NB-20, Türkiye
İklimlendirme dolabı	Sanyo, ABD

LC-MS/MS cihazı	Shimadzu HPLC Sistemi & AB Sciex API 4000, Japonya
Lipoliz cihazı	Metrohm 902 Titrand, Thermo 1.3, İsviçre
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
Membran filtre 0,22 µm, 0,45 µm	Sartorius, Almanya
Otomatik pipet 10-100 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL	Eppendorf, Almanya
Otomatik pipet seti	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Sympatec GmbH System, Almanya
pHmetre	Sartorius, Almanya
Polarize mikroskop	Leica DMEP, Almanya
Rotasyonel vizkozimetre	Brookfield DV III+ Rheometer, ABD
Santrifüj	Selecta Mixatase, İspanya
Spektrofotometre küvetleri	Helma QS 100, Almanya
TEM	FEI Tecnai G2 Spirit, ABD
Termostatlı ısıtıcı	Nüve NB 20, Türkiye
Türbidimetre	Velp Türbidimeter, İtalya
Ultrasantrifüj	Hitachi CS 150GXL, Japonya
Ultrasonik su banyosu	Branson 221, Almanya
UV spektroskopi	Shimadzu UV 1700, Japonya

3.2. Yöntem

Çalışmanın bu bölümünde tenofovirin fizikokimyasal özelliklerinin tespiti, miktar tayini yöntemlerinin geliştirilmesi, formülasyonların geliştirilmesi, in vitro çözünme hızı/permeabilite ve in vivo çalışmalara ait deneyler detaylı olarak sunulmaktadır.

3.2.1. Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin tespiti

Çözünürlük

Tenofovirin çözünürlüğünü belirlemek için, etkin maddenin aşırı miktarı distile suya eklenerek süspansiyon çözeltisi hazırlandı (n=3). Karışımlar, 37±0,5°C ve 25±0,5°C sıcaklıktaki su banyosunda manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. 0,5., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. saatlerde alınan örnekler, 0,45 µm'lik membran filtre kullanılarak süzüldü. Uygun seyreltmeler yapılarak önceden belirlenmiş olan dalga boyunda

(λ_{maks}) UV spektrofotometre ile absorbans değerleri okundu. Belirlenen kalibrasyon denkleminde, bu absorbanslar kullanılarak konsantrasyon değerleri bulundu. Çözünürlük çalışmalarında 2. saatten itibaren konsantrasyon değeri sabitlendiğinden çalışmalar 8. saate kadar sürdürüldü.

Partisyon katsayısı

Tenofovirin partisyon katsayısının belirlenmesi amacıyla, 300 mL su ve 300 mL oktanol manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılarak fazların birbirine doyması sağlandı. Ayırma hunisiyle bu iki faz ayrıldı. Tenofovirin stok çözeltisi için oktanolle doyurulmuş olan distile su kullanılarak, oda sıcaklığında 1 mg/mL derişimde olacak şekilde hazırlandı. Stok çözeltiden hareketle, 10 mL stok çözelti ve 10 mL doyurulmuş oktanol eklenerek her bir saat için kullanılacak olan karışımlar hazırlandı. Vücut sıcaklığı ve oda sıcaklığını taklit etmesi açısından $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karışımlar 1., 2., 4., 6., 7. ve 8. saatlerde ayırma hunisi kullanılarak fazları ayrıldı. Tam bir ayrışma sağlanabilmesi için ayırma hunisinde ayrılmış olan su fazı 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen su fazlarının UV spektrofotometrede belirlenen λ_{maks} 'da absorbansları okundu. Kör olarak yağlarla doyurulmuş olan su fazı kullanıldı. Elde edilen derişimlerden hareketle partisyon katsayısı hesabı yapıldı (Eşitlik 1).

Önformülasyon çalışmalarında, çeşitli orta ve uzun zincirli yağ asitlerinde tenofovirin partisyon katsayısı hesaplandı. Oktanole yerine yağlar kullanılarak 25°C 'deki partisyon katsayısını bulmak için, 24 saat manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı (Syukri ve diğerleri, 2018) ve tenofovirin partisyon katsayısını saptamak amacıyla yapılan ve yukarıda anlatılan deney tasarımı uygulandı. Elde edilen derişimlerden hareketle partisyon katsayısını hesaplamak için Eşitlik 2 kullanıldı.

$$\text{Log } K = \log \left[\frac{C (\text{Oktanole})}{C (\text{Distile su})} \right] \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$\text{Log } K = \log \left[\frac{C (\text{yağ})}{C (\text{distile su})} \right] \quad (\text{Eşitlik 2})$$

K: Partisyon katsayısı

C: Konsantrasyon

Tenofovirin erime derecesinin tayini

Tenofovirin erime derecesinin tayini için DSC aleti (DSC 60 Shimadzu) kullanıldı. 10°C/dk tarama hızında ve 300°C'ye kadar olan sıcaklık aralığı kullanıldı. Alet açıldıktan sonra nitrojen tüpü vanası açılarak azot gazı akışı sağlandı. Bu akış dk'da 50 mL olacak şekilde ayarlandı. Cihazın sol haznesine referans olarak alüminyum pan yerleştirilirken, sağ gözüne de tenofovir içeren alüminyum örnek kabı yerleştirilip, ısıtma hücreğine koyuldu. 0-300°C sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında çalışmalar gerçekleştirildi.

Partikül büyüklüğünün belirlenmesi

Etkin maddenin partikül büyüklüğü tayini için Sympatec Helos aleti kullanılarak lazer ışık difraksiyonu yöntemi ile ölçümler yapıldı. Lazer ışık saçılımı tekniği, partikül yüzeyine çarpan ışığın gösterdiği optik etki prensibiyle çalışır. Bu etkileşmeler saçılım ve absorbsiyona neden olur. Difraksiyon ise saçılım ve absorbsiyondan sonra ışığın geriye kalan kısmıdır. Enerji yoğunluğu merkezden uzaklaştıkça düşer. Işık yoğunluğu orantılı bir akıma dönüştürülüp, kaydedilir ve değerlendirilir. Ölçümler sonucu elde edilen verilerin X_{ort} ve SS değerleri hesaplandı (n=3).

Stabilite çalışmaları

Tenofovirin distile sudaki stabilitesini belirlemek için hazırlanan tenofovir çözeltisi 0. gün, 1. gün, 1 ay ve 3 ay süresince oda sıcaklığında (25°C/%60 sıcaklık/bağıl nem) ve 4°C/ortam nemi sağlayan iklim dolaplarında bekletildi. Etkin maddenin dalga boyu ve spektrumu kontrol edildi.

3.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Etkin madde için λ_{maks} değerinin hesaplanması

Tenofovirin λ_{maks} değerinin belirlenmesi için, distile suda 10 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti kuvartz küvet hücresi kullanılarak UV

spektrofotometrede (UV 1700 Shimadzu) 200-800 nm arasındaki dalga boylarında tarandı ve tenofovirin λ_{maks} değeri saptandı.

Kalibrasyon denkleminin hesaplanması

Tenofovirin standart doğru denklemini bulmak için distile suda ve yağlardaki çözünürlüğünü tespit etmek için, yağlar, YYEM, YYEM ve etkin madde tenofoviri çözebilen madde olarak etanolde (Valli ve diğerleri, 2016) çalışıldı. Tenofovirin distile su ve etanolde 100 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak distile su için 10-40 µg/mL ve etanol için 10-35 µg/mL aralığındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Çalışmalar 3 paralel olacak şekilde yapıldı. Önceden belirlenen λ_{maks} değerine karşılık gelen absorbanslar okundu ve ortalama absorbans değerleri hesaplandı. Regresyon istatistikleri yapıldı ve doğru denklemleri bulundu.

UV spektrofotometre ile miktar tayini yönteminin validasyonu

Validasyon, kullanılan yöntemin sürekli olarak beklenen sonuçları sağladığının kanıtlanması amacıyla yapılması gereken işlemleri kapsamaktadır. Valide edilmiş bir yöntem kullanıldığında yapılan işlemin kesin, doğru, spesifik, geçerli ve güvenilir olduğu garanti edilmiş olur.

Doğruluk ve geri elde

Saptanan değer gerçeğe yakınlığı olarak tanımlanır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır. Bu amaçla kalibrasyon eğrisinden hareketle en düşük, orta ve en yüksek üç değeri kapsayan 3 ayrı derişimde geri elde çalışması yapıldı. Tenofovirin distile su ve etanolde 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Uygun seyreltmeler yaparak distile suda 40 µg/mL ve etanolde de 35 µg/mL derişimde hazırlanan çözelti %100 kabul edilerek işlemler yapıldı. Çalışmalar 3 paralel olacak şekilde yapıldı. Her bir ortam için bulunan standart doğru denklemlerinde absorbans değerleri yerine koyularak derişimler saptandı. Geri elde yüzdesi aşağıdaki Eşitlik 3 kullanılarak hesaplandı. ICH kılavuzuna göre, doğruluk

ve geri elde çalışmaları yüzde sonuçları etkin madde için %97-%103 arasında, dozaj şekli için de %95-%105 arasında olması gerekmektedir (FDA, 2003).

$$\% \text{Geri Elde} = \left[\frac{C(\text{Pratik})}{C(\text{Teorik})} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin birbirini takip eden ölçümlerinin birbiriyle olan tutarlılığının ölçüsüdür. Bu çalışmada analizler aynı laboratuvarında, tek bir araştırmacı tarafından yapıldığı için “repeatability” denilen kesinlik değeri hesaplandı. Aynı derişimde hazırlanan numunenin art arda yapılan ölçümlerinin birbirine yakınlığı yöntemin kesinliğini, kesinlik de tekrar edilebilirliği gösterir. Bu amaçla, distile su ve etanol için kalibrasyon eğrisinden hareketle en düşük, orta ve en yüksek üç değeri kapsayan derişimdeki örnekler kullanılarak 3 noktada 3 kez tekrar edildi ve absorbanlara karşılık gelen derişimlere ait X_{ort} , SS ve %BS hesaplandı. ICH kılavuzuna göre kesinlik analizi minimum 3 noktada ve 3 tekrarlı yapılabilmektedir ve kesinlik analiz sonuçları %2’nin altında %BS göstermelidir (FDA, 2003).

Özgünlük ve seçicilik

Yöntemin özgünlük ve seçiciliğini tayin etmek amacıyla çözücü veya çözeltilerinden ileri gelebilecek herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi. Spektrofotometrik yöntemin sadece analizi istenen tenofoviri saptayabilmesi amacıyla, etkin madde içermeyen distile su, etanol ve formülasyon bileşenlerinin 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrumları alındı.

Doğrusallık

Örnekteki etkin maddenin derişimi ile elde edilen deney bulgularının belirli aralıkta orantılı olduğunun göstergesidir. Distile su ve etanol için doğrusallık çalışmaları yapıldı ve absorban değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre regresyon doğrusu çizildi ve regresyon doğrusunun eğimi ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplandı. ICH

kılavuzuna göre, doğrusallık analizi sonuçlarının R^2 değeri 0,995'e eşit ya da büyük olması gerekmektedir (FDA, 2003).

Duyarlılık ve saptama sınırı

Duyarlılık bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeri olup, saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edebileceği en küçük konsantrasyon değeri (LOQ) ile ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı, aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmaktadır.

$$\text{Duyarlılık sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S \quad (\text{Eşitlik 4})$$

$$\text{Saptama sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S \quad (\text{Eşitlik 5})$$

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.3. Tenofovir-yardımcı madde etkileşim/geçimsizlik çalışmaları

Etkin madde tenofovir ile yardımcı madde arasında etkileşim/geçimsizlik bulunup bulunmadığı DSC ve FT-IR analizleriyle değerlendirildi.

Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742, çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının DSC analizleri

DSC analizlerinde DSC-60 Shimadzu cihazı kullanıldı. Alet açıldıktan sonra nitrojen tüpü vanası açılarak azot gazı akışı sağlandı. Bu akış dk'da 50 mL olacak şekilde ayarlandı. Cihazın sol haznesine referans olarak alüminyum pan yerleştirildi. Sağ göze ise oleik asit, Tween 20, Cremophor RH 40 için 5 µL'ye karşılık gelen miktarları, etkin madde tenofovirin ve etkin maddeyle 1:1 oranında karışmış oleik asit, Tween 20, Cremophor RH 40, İmwitor 742, Abil Em 90, Labrafil ve propilen glikolün 2 mg'ı sırasıyla pana yerleştirilerek göze koyuldu. Ön deneme çalışmaları açısından yağlar 100°C'nin üzerinde bozunup/uçabileceğinden, sıcaklık bilgisayar programından 100°C'ye ayarlandı. Örneklerin çıkılacak sıcaklığı her 1 dk'da 5°C artışla toplam 100°C olarak belirlendi ve deney başlatıldı.

2. aşamada ise tenofovirin erime sıcaklığı (121°C) göz önüne alınarak çalışma sıcaklığı belirlendi ve tenofovir, tenofovir-oleik asit, tenofovir-İmwitor 742, tenofovir-Tween 20, tenofovir-Cremophor RH 40, tenofovir-propilen glikol, tenofovir-Abil Em 90, tenofovir-Labrafil örnekleri 150°C 'ye çıkartıldı. Bu sıcaklıkta yağların uçuculuğu ve yağ-tenofovir miktarındaki yağ miktarının azalması göz önüne alınarak grafikler değerlendirildi.

Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742 ve çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının FT-IR analizleri

Etkin madde tenofovir, oleik asit-İmwitor 742 içeren SNEDDS ve çoklu emülsiyon formülasyonlarının bileşenleri oleik asit, İmwitor 742, Tween 20, Cremophor RH 40, propilen glikol, Abil Em 90, Labrafilin etkin maddeyle 1:1 oranında karışmış örnekler ATR (Attenuated Total Reflectance) kristalinin üzerine koyularak $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında FT-IR spektroskopisi ile ölçüldü.

3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

3.3.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi

Tenofovirin yağ, YEM ve YYEM'deki çözünürlük çalışmaları

Tenofovir içeren SNEDDS formülasyonları geliştirmek amacıyla tenofovirin öncelikle yağ, YEM ve YYEM'deki çözünürlükleri saptandı. Bu amaçla, tenofovirin çeşitli uzun zincirli (üzüm çekirdeği yağı, susam yağı, nar çekirdeği yağı, mısır yağı, çörek otu yağı, Maisine 35-1, oleik asit) ve orta zincirli yağ asidi (Miglyol 818, Labrafac, Miglyol 840, İmwitor 742, İmwitor 988, İmwitor 948, Capmul MCM ve Captex 355) içeren yağlar, yüzey etkin madde (Cremophor RH 40, Cremophor EL, Labrafil, Labrasol ve Abil Em 90) ve yardımcı yüzey etkin maddelerdeki (Tween 20, Tween 80, PEG 400, propilen glikol, mono propilen glikol, Transcutol P, Gelucire 44 ve gliserol) çözünürlüğünü tespit etmek için, tenofovirin aşırı miktarı yağ, YEM ve YYEM'lerin 10 mL'sine eklendi. Karıştırıcılı su banyosunda $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 24 saat karıştırıldı (Syukri ve diğerleri, 2018). Karışımlar 4000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.

Sulu kısımdan alınan örnekler etanolle seyreltilerek UV spektrofotometrede önceden belirlenen dalga boyunda absorbansları okundu. Etanol için bulunan kalibrasyon denkleminde yerine koyularak çözünürlük değerleri hesaplandı.

Yağ, YEM ve YYEM seçilmesi

Formülasyon geliştirme aşamasında ilk olarak yağ, YEM ve YYEM, tenofovirdeki çözünürlükleri ve hidrofilik-lipofilik balans (HLB) değerleri dikkate alınarak seçildi.

HLB değeri

HLB değeri, yüzey etkin maddelerdeki, suda çözünen molekül ucun (baş) molekül ağırlığının, yağda çözünen molekül kısmın (kuyruk) molekül ağırlığına oranıdır. 1-20 arasındaki HLB değerleri arasında 9'un üzerinde hidrofilik, 9'un altında ise lipofilik özellik gösterir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. HLB değerlerine göre emülgatörlerin kullanımları (Im-Emsap ve Siepmann, 2002)

HLB değeri	Kullanım amacı
1,5-3	Köpük giderici
3,5-6	Yağ içinde su emülsiyonu
4-10	Sütsü dağılım
7-9	Islatma ajanı
8-18	Su içinde yağ emülsiyonu
10-20	Islatıcı
13-15	Deterjan etkili
15-18	Çözündürme ajanı

HLB değerinin hesaplanması

Emülsiyonun özelliklerini ve tipini önceden belirlemek için ampirik bir hesaplama yöntemi olarak geliştirilmiştir. Yağ-YEM-YYEM karışımı kullanarak emülsiyonun oluşması için istenilen HLB değeri aşağıda verilen eşitlikle hesaplanabilir (Im-Emsap ve Siepmann, 2002).

$$HLB_{\text{karışım}} = \text{Yağ (HLB)} \times \text{Yüzde (Yağ)} + \text{YEM (HLB)} \times \text{Yüzde (YEM)} + \text{YYEM (HLB)} \times \text{Yüzde (YYEM)} \quad (\text{Eşitlik 6})$$

Faz diyagramları

Öncelikle SNEDDS formülasyonları oluşturan yağ, YEM ve YYEM'nin birbiriyle karışabilme ve berrak bir karışım oluşturabilme alanları faz diyagramlarından yararlanılarak saptandı.

Çalışmanın ilk aşamasında seçilen YEM (Cremophor RH 40) ve YYEM'nin (Tween 20) birbiriyle karışıp karışmadığı kontrol edildi. Sonraki aşamada oleik asit-İmwitor 742 (yağ), Cremophor RH 40 (YEM) ve Tween 20 (YYEM)'nin karışabilirliğini saptamak amacıyla, çeşitli oranlarda YEM:YYEM karıştırılarak yağ ile titre edildi. Farklı oranlarda YEM:YYEM ve yağ karışımı ile oluşturulan kaba emülsiyonların en fazla yağı aldığı YEM:YYEM oranı bulundu. Sonrasında farklı oranlarda YEM:YYEM/yağ karışımı ile oluşturulan kaba emülsiyonlar su ile karıştırılarak, emülsiyonların su alma kapasitesini de incelemek amacıyla, yağ ve YEM:YYEM karışımı su ile titre edildi. Titrasyon sonucunda elde edilen verilerle üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Kaba emülsiyon ve nanoemülsiyon bölgeleri, yağ, YEM, YYEM ve yağ, YEM:YYEM, su titrasyonları sonucu elde edilen yüzdelerin üçgen faz diyagramına yerleştirilip noktalarının birleştirilmesiyle belirlendi.

Çalışmalarda, uzun zincirli yağ asidi (oleik asit) içeren formülasyon F1, orta zincirli yağ asidi (İmwitor 742) içeren formülasyon F2 ve çoklu emülsiyon formülasyonu da F3 olarak isimlendirilmiştir.

3.3.2. Kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonun geliştirilmesi

F1 formülasyonu için deney tasarımı

QbD yaklaşımı, önceden tanımlanmış hedeflere göre ürün ve süreç odaklı, kalite risk yönetimi ve proses kontrolünü içeren sistematik bilimsel çalışma sistemidir. QbD'nin ilk adımı, ürün için tasarım hedeflerinin belirlenmesidir (Çizelge 3.2). ICH Q8 kılavuzuna göre farmasötik geliştirmede, "kullanım amacı ve uygulama yolu gözetilerek, müstahzarın kalitesi için kritik olan özelliklerin belirlenmesini" gerektirir. Hedef ürün kalite profili oluşturulur ve kritik kalite özellikleri belirlenir (Çizelge 3.2-3.3). Kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi kadar kritik risk yönetimini oluşturmak da

önemlidir. Kritik risk yönetimi, ürünün yaşam döngüsü boyunca kalitesine etki eden risklerin değerlendirilmesi, kontrolü, gözden geçirilmesi ve iletişimine dair sistematik bir prosestir. Kritik risk yönetimini kolaylaştırmak için Ishikawa/Fishbone (neden-sonuç) diyagramlarından yararlanılabilir.

QbD yaklaşımında önemli bir yere sahip olan istatistiksel deney tasarımı (Design of Experiment, DoE), model oluşturma ve değerlendirme, istatistiksel proses kontrolü gibi amaçlarla farmasötik formülasyonların gelişimi için önerilen çoklu değişkenli bir yaklaşımdır. DoE, kritik proses parametrelerinin belirlenmesi ve tasarım alanının oluşturulması evrelerinden oluşur. Bir seferde bir değişken yerine, bir seferde birkaç değişkeni değiştirmek, etkin sonuçlar alınmasını sağlar. DoE sayesinde birçok faktör eş zamanlı olarak değiştirilirken, her bir faktör birbirinden bağımsız olarak değerlendirilir.

Çizelge 3.2. Hedeflenen nanoemülsiyonun özellikleri

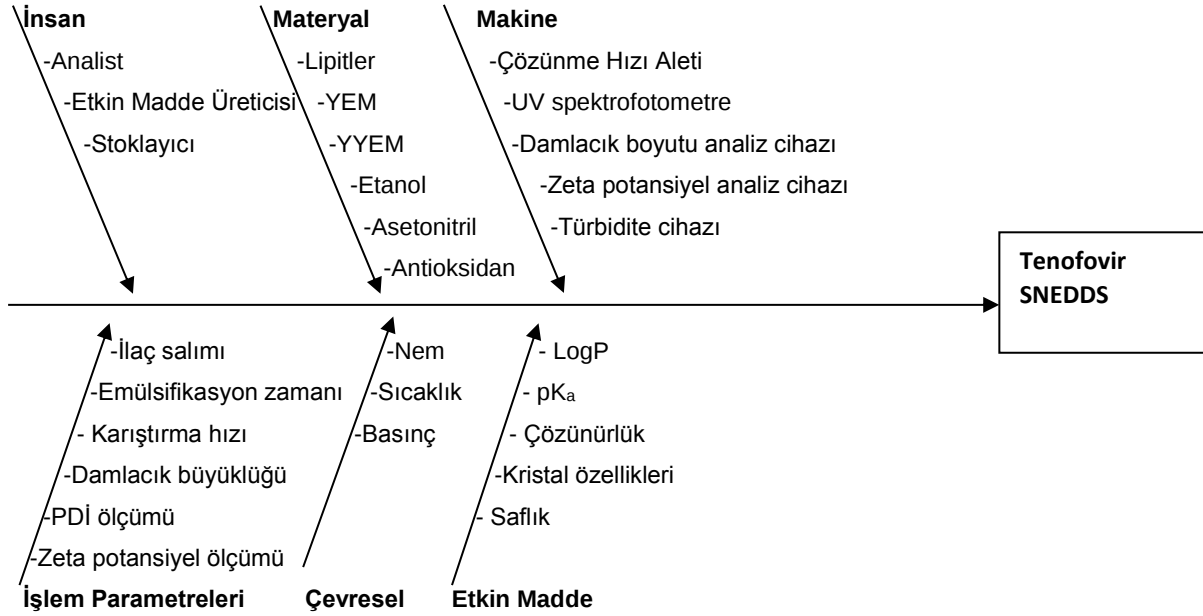
Etkin madde miktarı	245 mg (referans ürüne eşdeğer)
Damlacık boyutu	<100 nm
Zeta potansiyel	-30<ZP<30
Polidispersite indeksi (PDI)	0<PDI<0,1

Çizelge 3.3. Kendiliğinden nanoemülsifiye sistem için kritik kalite parametrelerinin belirlenmesi

Etkin madde kalite özellikleri	Hedef	Kritik mi?	Kritikliğin doğrulanması
Görünüş	Şeffaf ve saydam	Hayır	Diğer parametreler kontrol altına alındığında kritik değildir.
Çözünme hızı (15 dk)	Min %85	Evet	Formülasyondaki YEM, YYEM miktarlarından etkilenir
Emülsifikasyon zamanı	<1 dk	Hayır	Diğer parametreler kontrol altına alındığında kritik değildir.
Zeta potansiyel	-30<ZP<30	Evet	Etkin madde, YEM ve YYEM'in elektriksel yükünden etkilenebilir.
Polidispersite indeksi	0<PDI<0,1	Evet	Formülasyondaki YEM, YYEM miktarlarından etkilenir.
Damlacık büyüklüğü	<100 nm	Evet	Formülasyondaki YEM, YYEM miktarlarından etkilenir.

Risk yönetim çalışmaları, ürün üretimini etkileyebilecek kritik materyal özellikleri (CMA) ve kritik proses parametrelerini (CPP) tanımlamak şeklinde yönetilir. Fishbone diyagramı SNEDDS üretimini etkileyebilecek potansiyel risk faktörlerini

tanımlamaktadır (Şekil 3.1). Tez çalışmaları kapsamında formülasyon geliştirilirken oluşabilecek riskler göz önüne alınarak; CMA ve CPP'nin formülasyonun hazırlanmasına olan etkisini tanımlamak için her parametreyi düşük-orta-yüksek risk seviyesinde tanımlayan risk matrisi oluşturuldu (Çizelge 3.4).



Şekil 3.1. Tenofovir içeren SNEDDS için yapılan Ishikawa (Fishbone) diyagramı

Çizelge 3.4. Risk matrisi: Formülasyon geliştirilmesinde risk değerlendirmesi

Ürün Üretimi CQAs	Yağ Tipi ve Miktarı	Yüzey Etkin Madde Miktarı	Yardımcı Yüzey Etkin Madde Miktarı	Karıştırma Hızı	Sıcaklık	Analiz Cihazı	Etkin Madde Özelliği
Formülasyon	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
Yükleme Kapasitesi	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta	Orta	Orta	Düşük
Çözünme Hızı	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Viskozite	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Damlacık Boyutu	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük

Risk matrisi, SNEDDS formülasyonun geliştirilmesinde kritik materyal özelliklerinin önem taşıdığını göstermektedir. Çalışmanın bu aşamasında, kalite tasarımı

yaklaşımı ile kritik materyal özelliklerinden hareketle deney tasarım modeli oluşturmak ve formülasyon optimizasyonu sağlamak hedeflenmektedir.

Üçgen faz diyagramları oluşturulduktan sonra, nanoemülsiyon alanından rastgele noktalar seçilerek ve bu noktalara karşılık gelen su, yağ ve YEM:YYEM yüzdeleri belirlendi. Üçgen faz diyagramı nanoemülsiyon oluşturma alanındaki her noktayı rastgele seçimler ve ölçümlerle denemek zor olacağı ve uzun zaman alacağı için deney tasarım modeli oluşturulmuştur.

SNEDDS formülasyonu için CMA; yağ asidi, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve etkin maddedir. Yağ asidi, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde çalışmanın bağımsız değişkenleridir.

Üçgen faz diyagramındaki nanoemülsiyon bölgesinden, yağ, YEM ve YYEM karşılık gelen alt-üst değerler kullanılarak faktöriyel tasarım ile istatistiksel deney tasarım modeli oluşturuldu (Çizelge 3.5). Hedeflenen formülasyonun belirlenmesinde yanıt cevaplar (bağımlı değişken) olarak, damlacık boyutu ve polidispersite indeksi seçildi. Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi, formülasyonun hedeflenen özellikte oluşup oluşmadığını gösteren en önemli karakterizasyon ölçütlerindendir. Zeta potansiyel ve türbidite, damlacık boyutu ve polidispersite indeksi özellikleriyle benzer sonuçlar gösterebilmektedir. Örneğin, damlacık boyutu küçük olan formülasyon, damlacık boyutu büyük olan formülasyona göre daha berraktır (türbidite). Polidispersite indeksi ölçütü de formülasyonda yağ, YEM, YYEM ve etkin maddenin homojen dağılıp dağılmadığının göstergesidir. Bu durum formülasyonun zeta potansiyelini de etkilemektedir.

Formülasyonların hazırlanmasında kritik materyal özellikleri ve formülasyonun sonucunu belirleyen kritik sonuçlar dikkate alınarak deney tasarım modeli geliştirildi. Bu model ile 3 faktörlü (alt-orta ve üst değer)-3 değişken (yağ asidi-YEM-YYEM), 3 tekrarlı ve 3^3 faktöriyel tasarım kullanıldı, 81 adet formülasyon Design Expert Software Version 10 programı kullanılarak oluşturuldu. Çizelge 3.5'de verilen yağ asidi (oleik asit), YEM (Cremophor RH 40) ve YYEM (Tween 20) miktarları oda sıcaklığında karıştırıldı ve 81 adet formülasyon hazırlandı. Sonuç formülasyonlara 250 mL su eklenerek nanomülsiyonlar oluşturuldu. Sıvı hacmi olarak 250 mL

kullanılmasının nedeni; EMA kılavuzunda ilacın bir seferlik dozu 250 mL hacmindeki pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında çözünüyorsa, ilacın çözünürlüğünün yüksek kabul edilmesidir (EMA, 2018). Hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutu ve polidispersite indeksleri Malvern Zetasizer Nano ZS ile $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ölçüldü. Bu amaçla tek kullanımlık küvetler kullanıldı, çalışmalar üç paralel olacak şekilde yapıldı. Formülasyona ait, ortalama damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi verileri tablolastırılarak yazılıma yüklendi. Yazılım aracılığıyla, bağımsız değişken yağ, YEM, YYEM ile bağımlı değişken ortalama damlacık büyüklüğü ve PDI verileri arasındaki ilişki matematiksel modellerle saptandı.

Çizelge 3.5. F1 formülasyonun deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin faktör seviyeleri (mL) ve yanıtlar

Bağımsız değişken	Formülasyonda kullanılan faktörlerin seviyeleri (mL)		
	Alt	Orta	Üst
Yağ asidi miktarı (mL)	1	2	3
Solvent miktarı (mL)	1,4	1,6	1,8
Kosolvent miktarı (mL)	5,6	6,4	7,2
Yanıtlar			
Damlacık Boyutu			
Polidispersite indeksi			

F2 formülasyonu için deney tasarımı

Orta zincirli yağ asidi olan İmwitor 742 için, uzun zincirli yağ asidi formülasyonu olan F1 formülasyonuna benzer kritik risk yönetim planı ve deney tasarım modeli geliştirilmiştir. F2 formülasyonu için de kritik materyal özellikleri; yağ, YEM, YYEM çalışmanın bağımsız değişkenleri, damlacık boyutu ve PDI de deney tasarım modelinin bağımlı değişkenleridir. Üçgen faz diyagramındaki nanoemülsiyon bölgesinden, yağ, YEM ve YYEM karşılık gelen alt-üst değerler kullanılarak faktöriyel tasarım ile istatistiksel deney tasarım modeli oluşturuldu (Çizelge 3.6). Bu model ile 3 faktörlü (alt, orta ve üst değer)-3 değişken (yağ asidi-YEM-YYEM), 3 tekrarlı ve 3^3 faktöriyel tasarım kullanıldı, 81 adet formülasyon Design Expert Software Version 10 yazılımı ile oluşturuldu.

Çizelge 3.6.F2 formülasyonun deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin faktör seviyeleri (mL) ve yanıtlar

Bağımsız değişken	Formülasyonda kullanılan faktörlerin seviyeleri (mL)		
	<i>Alt</i>	<i>Orta</i>	<i>Üst</i>
Yağ asidi miktarı (mL)	0,5	1,5	2,5
Solvent miktarı (mL)	0,5	0,65	0,8
Kosolvent miktarı (mL)	2	2,6	3,2
Yanıtlar			
Damlacık boyutu			
Polidispersite indeksi			

Çizelge 3.6'da verilen yağ asidi, YEM ve YYEM oranları dikkate alınarak 81 adet formülasyon hazırlandı. Sonuç formülasyonlara 250 mL su eklenerek nanomülsiyonlar oluşturuldu. Program yardımıyla bağımsız değişken yağ, YEM, YYEM ile bağımlı değişken ortalama damlacık büyüklüğü ve PDI verileri arasındaki ilişki matematiksel modellerle belirlendi.

3.3.3. Etkin madde yükleme çalışmaları

İmwitor 742 ve oleik asit SNEDDS formülasyonlarına, etkin madde yükleme çalışmaları yapıldı. Tenofovirin aşırı miktarı ve önceden belirlenen oranlardaki formülasyon bileşenleri eklenerek karıştırıldı ve formülasyonlar elde edildi. Yükleme çalışmaları sonucunda, nanoemülsiyonlardan örnekler alınıp, etanolle uygun seyreltmeler yapılarak UV spektrofotometrede önceden belirlenen dalga boyunda absorbanları okunarak yüklenen tenofovir miktarı deneysel olarak saptandı. Ayrıca yüklenen tenofovir miktarı, formülasyonun dayanıklılığı da incelenerek (ısıtma-soğutma ve faz ayrışması) kontrol edildi.

3.3.4. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonlarda yapılan kontroller

Nanoemülsiyonlarda damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, türbidite (bulanıklık), viskozite ve morfolojik inceleme (yapı) kontrolleri yapılmıştır.

Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi

Damlacık büyüklüğü ve dağılımı ilaç emilimini etkileyen bir faktördür. Küçük damlacık büyüklüğüne sahip sistemler daha geniş yüzey alanı sağlamaları nedeni ile ilaç

absorpsiyonunda da artış sağlarlar. Hedeflenen SNEDDS formülasyonları için 100 nm'den küçük damlacık boyutu ve sıfıra yakın polidispersite indeksi karakterizasyon özellikleri istenmektedir. Geliştirilen formülasyonların damlacık büyüklüğünü ölçmek için, Malvern Zeta Sizer Nano ZS cihazı kullanıldı. Bu cihaz dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle çalışmaktadır. Bu cihaz ile damlacık boyutu/partikül büyüklüğü 0,6 ile 6000 nm aralığında ölçüm yapabilmektedir.

SNEDDS'lerin 1 mL'sinin üzerine 250 mL distile su ile eklenerek seyreltilmesi (1:250) sonrasında oluşan nanoemülsiyonların damlacık büyüklükleri ölçüldü. Damlacık büyüklüğü ölçümleri Malvern Zetasizer ile $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirildi. Bu amaçla tek kullanımlık küvetler kullanıldı, çalışma üç paralel olarak yapıldı. Çalışma sonucunda ortalama damlacık büyüklüğü değeri elde edildi.

Türbidite

Bulanıklık ölçümleri $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirildi (Velp Turbidimeter, İtalya). Ölçümler 0-20 NTU aralığında yapıldı. Ölçüm için 5 mL örnek kullanıldı. Çalışma 3 paralel olarak yapıldı ve küvetten kaynaklanabilecek hatayı engellemek amacıyla her ölçümde aynı küvet kullanıldı.

Zeta potansiyel

Zeta potansiyel damlacıkların yükü ile birlikte formülasyonun stabilitesini gösteren önemli parametrelerden birisidir. SNEDDS'lerin 1:250 oranında distile su ile seyreltilmesi sonrasında oluşan nanoemülsiyonların zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer cihazı kullanılarak yapıldı. Ölçümler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu cihazın çalışma prensibi elektroforezdir. Elektroforez ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade eder. Zeta potansiyel değeri formülasyonda kullanılan yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde yüküne bağlı olarak değişebilir.

Viskozite

Formülasyonların viskozite ölçümleri için rotasyonel koni plaka viskometresi kullanıldı (Brookfield Viskozimetresi, ABD). Bu çalışmada her bir ölçüm %dönme momenti (%torque) değeri 2-100 arasında olacak şekilde yapıldı. Ölçümler oda sıcaklığında 40 rpm'de (cpe-42 spindle) yapıldı. Viskozimetrenin yazılım programının (Rheocalc V2.4) verdiği kayma hızı ve kayma geriliminden hareketle formülasyonların reolojik (akış) özelliği saptandı.

Morfolojik özellikler

Geliştirilmiş SNEDDS formülasyonların morfolojik özellikleri TEM ile görüntülendi. 100 kv potansiyel farkı altında oda sıcaklığında 1:250 oranında seyreltilmiş örnek, 10 µL %1(a/h) fosfotungstik asit çözeltisi ile boyanarak (Li ve diğerleri, 2013) bakır grid üzerine koyulduktan sonra oda sıcaklığında 3 dk kurutuldu. Örneklerin TEM (FEI/Tecnaı G2 Spirit Biotwin, ABD) ile görüntüleri alındı.

Emülsifikasyon zamanı

Formülasyonların emülsifikasyon zamanını tespit etmek için, çözünme hızı deneyi ortamı kullanıldı. 50 rpm ve $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki çözünme ortamına formülasyon (1 mL) eklendi ve nanoemülsiyon formülasyonları görsel olarak değerlendirildi, emülsifikasyon süresi belirlendi. Kendi kendine emülsifikasyon süreci, formülasyonun her biri için çözünme hızı çalışmaları sırasında görsel olarak da izlendi. Geliştirilen formülasyonların dağılma zamanı, her bir formülasyon çalışması için ölçüldü. Formülasyonların dağılma/emülsifikasyon zamanı özelliklerine göre, formülasyonlar için derecelendirme sistemi oluşturulmuştur (Gurpreet ve Singh, 2018). Grade A'da nanoemülsiyonlar 1 dk içinde hızla oluşur ve formülasyonun dağılma görüntüsü açık ya da mavimsi olur. Grade B'de nanoemülsiyonlar hızla oluşur. Fakat emülsiyonların mavimsi beyaz olduğu görülmektedir. Grade C'de nanoemülsiyonlar ince sütümsü emülsiyondur ve bu durum 2 dk içinde oluşur. Grade D'de ise donuk, grimsi beyaz renkte ve biraz yağlı görünüme sahip emülsiyonların oluşumu daha yavaştır (>2 dk). Grade E'de ise nanoemülsiyonlar zor oluşur ve yüzeyde büyük yağ damlacıkları vardır (Gurpreet ve Singh, 2018).

3.3.5. Çoklu emülsiyonlar

BCS Sınıf 3 ilaçlar için son dönemlerde kullanılan SDEDDS'ler ilaçların permeabilite ve biyoyararlanımını artıracak alternatif bir dozaj şeklidir. Yüksek çözünürlük ve düşük permabiliteye sahip BCS Sınıf 3 ilaçların gastrointestinal sistemdeki sınırlı absorpsiyon basamağı aşıldığında dozaj şeklinin biyoyararlanımının da artması olasıdır. Özellikle, ilk geçiş etkisine maruz kalan ve sınırlı absorpsiyona sahip ilaçların, lipid kaynaklı sistemlerle lenfatik sisteme geçişi artırarak, absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını arttıracak düşünölmektedir. Bu amaçla çoklu emülsifiye sistemler geliştirilmiştir.

3.3.6. Çoklu emülsiyon formölasyonu geliştirme çalışmaları

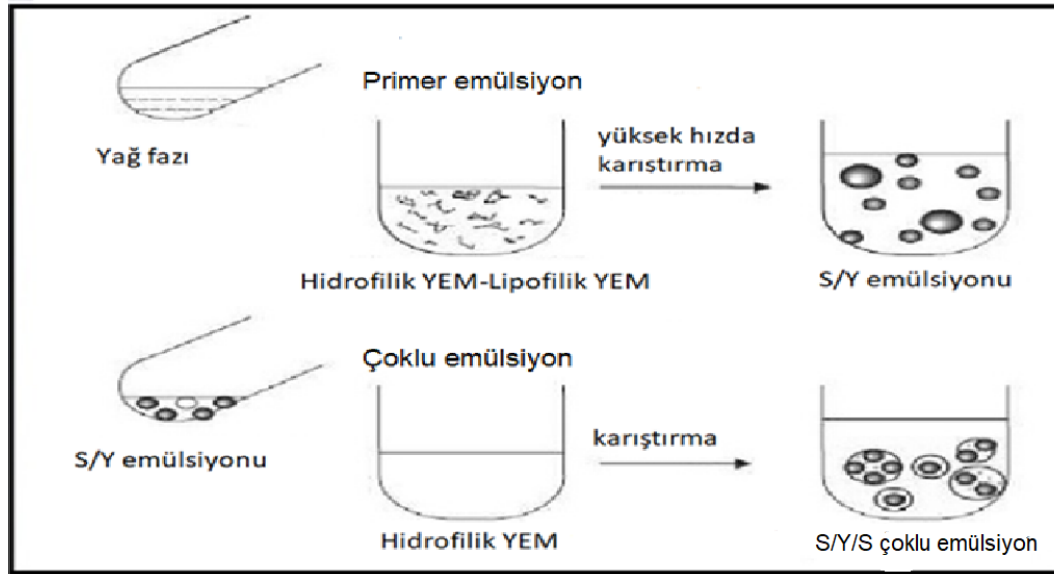
Çoklu emülsiyonu geliştirmek için iki adımda emülsifikasyon yöntemi kullanıldı (Şekil 3.2). İlk aşamada iç faz olan s/y emülsiyonu oluşturuldu.

S/Y emülsiyonu (primer emülsiyon)

Primer emülsiyonu geliştirmek için, tenofovirin yağ, hidrofilik ve lipofilik YEM ve YYEM'lerdeki çözünürlükleri hesaplandı. Etkin madde tenofovirin formölasyonun hazırlanmasında çözünürlük çalışmalarına göre etkin maddenin en fazla çözündüğü yağ seçildi. Hidrofilik/lipofilik YEM oranının formölasyonun tipi, iç faz damlacık boyutu ve polidispersite indeksi üzerine olan etkisi incelendi. Belirlenen yağ, hidrofilik-lipofilik YEM ve YYEM 75±0,5°C sıcaklıkta, 750 rpm'de 45 dk karıştırıldı. Formölasyonun dış fazının yağ olup olmadığı, distile su ile seyreltilerek kontrol edildi.

Sekonder emülsiyon

Çoklu emülsiyonu hazırlamak için, etkin maddenin çözünürlüğünün en yüksek olduğu hidrofilik YEM kullanılarak, primer emülsiyon hidrofilik YEM ile oda sıcaklığında karıştırıldı. Formölasyonun 1mL'sinin üzerine 250 mL su eklenerek, S/Y/S formölasyonu oluşturuldu ve örnekler Leica DMEP mikroskobu ve TEM ile incelendi. Geliştirilen formölasyonun damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyel, türbidite ve viskozite özellikleri tespit edildi (25°C±0,5).



Şekil 3.2. Çoklu emülsiyonun geliştirilmesi

3.3.7. Etkin madde yükleme çalışmaları

İki adımda emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyon için en önemli sorun etkin madde yükleme sorunudur. Önformülasyon çalışmaları ile primer emülsiyonun karakterizasyonun, çoklu emülsiyon karakterizasyonu ve dayanıklılığı üzerine olan etkisi incelendi. Tenofovirin aşırı miktarına önceden belirlenen oranlardaki formülasyon bileşenleri sıra ile eklenerek formülasyon geliştirildi. Çoklu emülsiyon geliştirildikten sonra alınan örnekler etanolle seyreltilip UV spektrometrede okunarak çoklu emülsiyonun yükleme kapasitesi belirlendi.

3.4. İn vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

FDA çözünme hızı metotlarına ait veritabanında tenofovir için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi Çizelge 3.7’de sunulmaktadır:

Çizelge 3.7. FDA çözünme hızı metotları veritabanında tenofovir için önerilen in vitro çözünme hızı yöntemi (FDA, 2007)

İlaç	Dozaj Şekli	Cihaz	Hız (rpm)	Çözünme Ortamı	Hacim (mL)	Örnekleme Zamanı (dk)	Güncelleme Tarihi
Tenofovir Disoprosil Fumarat	Tablet	II (Palet Yöntem)	50	0,1 N HCl	900	10, 20, 30 ve 45	01/03/2007

Viread® için yukarıdaki koşullarda pH 1,2’de yapılan çalışmaların yanısıra pH 4,5 ve pH 6,8 in vitro ortamlarında da çözünme hızı çalışmaları yapılarak çözünme hızı profilleri elde edilmiştir. Bu amaçla öncelikle kalibrasyon ve validasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

3.4.1. İn vitro çözünme hızı ortamlarının hazırlanması

Oral olarak alınan tenofovirin referans ürünü ve geliştirilecek formülasyonlar için gastrointestinal sistemi taklit etmek amacıyla, pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 çözünme ortamları hazırlandı (USP 30).

Tamponlar için gereken miktarlarda maddeler tartıldı ve manyetik karıştırıcıda çözeltiler karıştırıldı. Hazırlanan çözeltilerin pH değerlerinin uygunluğu pHmetre ile kontrol edildi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 in vitro çözünme ortamları

pH 1,2
Sodyum klorür2 gr
Derişik HCl.....7 mL
Distile su.....ym 1000 mL
pH 4,5
NaC ₂ H ₃ O ₂ . 3H ₂ O2,99 gr
2N CH ₃ COOH.....14 mL
Distile su.....ym 1000 mL
pH 6,8
0,2 M Monobazik potasyum fosfat çözeltisi.....250 mL
0,2 M NaOH112 mL
Distile su.....ym 1000 mL
*Monobazik potasyum fosfat çözeltisi hazırlamak için, 27,22 gr monobazik potasyum fosfat distile suda çözüldü 1000 mL’ye distile suyla tamamlandı.

3.4.2. Çözünme ortamları için spektrofotometrik miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Tenofovirin pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki λ_{maks} değerinin belirlenmesi için, çözünme ortamları kullanılarak 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler uygun seyreltmeler yapılarak 200-800 nm arasındaki dalga boylarında tarandı ve kuvartz küvet kullanılarak UV spektrofotometrede (UV 1700 Shimadzu) absorbansları ölçüldü.

Kalibrasyon denklemlerinin eldesi

Tenofovirin standart doğru denklemini bulmak için pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 tampon çözeltiler kullanılarak 100 $\mu\text{g/mL}$ stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 10-40 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Çalışmalar 3 paralel olacak şekilde yapıldı. Önceden belirlenen λ_{maks} değerine karşılık gelen absorbanslar okundu ve ortalama absorbans değerleri hesaplandı. Doğrusal regresyon analizi yapılarak ve her bir ortam için doğru denklemleri bulundu.

In vitro yöntem validasyonu

Doğruluk ve geri elde

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi en düşük, orta ve en yüksek üç değeri kapsayan 3 ayrı derişimde geri elde çalışması yapıldı. 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde hazırlanan çözeltiden hareketle hazırlanan 40 $\mu\text{g/mL}$ %100 kabul edildi.

Kesinlik

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı üzere seçilen örneklerle ait ölçümlerin X_{ort} , SS ve %BS değerleri hesaplandı.

Özgünlük ve seçicilik

Spektrofotometrik yöntemin sadece analizi istenen tenofoviri saptayabilmesi amacıyla, etkin madde içermeyen çözünme ortamının ve formülasyon bileşenlerinin 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrumu alındı.

Doğrusallık

Doğrusallık, regresyon doğrusunun saptanması ve determinasyon katsayısının hesaplanması ile gösterildi.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi analitik yöntemin LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

3.4.3. Referans ürünün in vitro çözünme hızı çalışmaları

Viread® tablet (son kullanma tarihi 12/20 ve parti numarası VHGWD) ile gerçekleştirilen in vitro çözünme hızı test koşulları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Referans ürünün in vitro çözünme hızı test koşulları

Yöntem	Palet Yöntemi
Çözünme Ortamı	pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8
Ortam Hacmi	900 mL
Dalga Boyu	258 nm (pH 1,2) ve 260 nm (pH 4,5 ve pH 6,8)
Ortam Sıcaklığı	37±0,5°C
Hız	50 rpm
Deney Süresi	90 dk
Örnek Alma Süreleri	15, 30, 45, 60 ve 90 dk
Tablet Sayısı	6

Çözünme hızı deneyinde Varian VK 7000 çözünme hızı aleti kullanılmıştır. Paletler örnek kabın tabanından 2,5 cm yüksekte olacak şekilde yerleştirildi. İn vitro çözünme ortamları cam kaplara koyuldu. Tabletler çözünme ortamına atılarak Çizelge 3.9'da belirtilen deney koşullarına göre çözünme hızı çalışması yapıldı. 15,

30, 45, 60 ve 90 dk zaman aralıklarında çözünme ortamından 5 mL örnek membran filtreden (0,45 µm) süzülerek alındı ve alınan her örnek için yerine aynı hacimde (5 mL) çözelti çözünme ortamına ilave edildi. Alınan örneklerde uygun seyreltmeler yapılarak spektrofotometrik miktar tayini yapıldı. Ölçülen absorpsiyon değerleri, farklı ortamlara ait kalibrasyon denklemleri aracılığıyla derişime çevrildi ve zamana karşı %yığılmalı çözünen tenofovir miktarları grafiğe geçirildi. %yığılmalı çözünen ortalama tenofovir miktarları (X_{ort}) ve %BS değerleri hesaplandı.

3.4.4. F1 ve F2 formülasyonların çözünme hızı çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarda yapılan çözünme hızı çalışmalarında diyaliz membran (Kang ve diğerleri, 2004; Inugala ve diğerleri, 2015; Balakumar ve diğerleri, 2013) ya da kapsül (Hong ve diğerleri, 2006; Syukri ve diğerleri, 2018) kullanılmıştır. Geliştirilen orta (F2) ve uzun zincirli yağ asidi (F1) içeren formülasyonlar sert jelatin kapsüllere (00, Coni-snap®) koyularak çözünme ortamlarına eklenmiştir (Resim 3.1). Bölüm 3.4.3’de anlatılan çözünme hızı çalışma yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 3.10). Ölçülen absorpsiyon değerleri, farklı ortamlara ait kalibrasyon denklemleri aracılığıyla derişime çevrildi ve zamana karşı %yığılmalı çözünen tenofovir miktarları grafiğe geçirildi. %yığılmalı çözünen tenofovir miktarı (X_{ort}) ve %BS değerleri hesaplandı.

Çizelge 3.10. F1 ve F2 formülasyonların in vitro çözünme hızı test koşulları

Yöntem	Palet Yöntemi
Çözünme Ortamı	pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8
Ortam Hacmi	900 mL
Dalga Boyu	258 nm (pH 1,2) ve 260 nm (pH 4,5-pH 6,8)
Ortam Sıcaklığı	37±0,5°C
Hız	50 rpm
Deney Süresi	90 dk
Örnek Alma Süreleri	15, 30, 45, 60 ve 90 dk
Kapsül Sayısı	6

3.4.5. F3 formülasyonun çözünme hızı çalışmaları

Geliştirilen formülasyon (F3) sert jelatin kapsül (00, Coni-snap®) kullanılarak çözünme ortamlarına eklenmiştir (Resim 3.1). Bölüm 3.4.3’de anlatılan çözünme hızı çalışma yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 3.10). Ölçülen absorbans değerleri, farklı çözünme ortamlarına ait kalibrasyon denklemleri aracılığıyla derişime çevrildi, %yığılmalı çözünen ortalama tenofovir miktarı ve %BS değerleri hesaplandı ve zamana karşı %yığılmalı çözünen tenofovir miktarları grafiğe geçirildi.



Resim 3.1. F1, F2 ve F3 formülasyonların sinker kullanılarak çözünme hızı çalışmaları

3.5. Stabilite Çalışmaları

3.5.1. Termodinamik stabilite çalışmaları

Formülasyonların dayanıklılığını saptamak amacıyla yapılan termodinamik stabilite çalışmaları ısıtma-soğutma döngüsü ve santrifüjleme olmak üzere 2 adımda yapılmaktadır. Isıtma-soğutma döngüsü, formülasyonların stabilitelere sıcaklığın etkisini gözlemlemek amacıyla farklı sıcaklık koşullarında gerçekleştirilir.

Dondurup-çözme çalışmaları: Yüksek sıcaklık, koalesans ve kremalaşma hızını artırır. Dondurma işlemi zorlanmış koşul olup, emülsiyonun dayanıklılığına yüksek sıcaklıktan daha çok etki eder. Nedeni de donmanın emülgatörlerin çözünürlüğüne

etki etmesidir ve buz kristallerinin emülsiyon damlacıklarının küresel şeklini bozmasıdır (Çelebi, 2009). Formülasyonlar 24 saat -81°C 'de dondurulup, 24 saat 40°C 'de bekletildi. Bu döngü bir gün aralıklarla 3 kez yapıldı ve çalışma sonucunda emülsiyonların damlacık büyüklüğü kontrol edildi ve kararlı olan formülasyonlar santrifüjleme için seçildi.

Santrifüjleme: Santrifüjleme emülsiyonların, stabilitesini etkileyebilecek stres koşullarından biridir. Emülsiyonların stabilitesini gözlemlemek amacıyla, 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.

3.5.2. Kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları

Geliştirilen nanoemülsifiye formülasyonların dayanıklılığını ölçmek amacıyla, 4°C , $25\pm 2^{\circ}\text{C}/\%60\pm 5$ ve $40\pm 2^{\circ}\text{C}/\%75\pm 5$ sıcaklık/bağıl nem ortamlarını karşılayan iklim dolaplarında 6 ay süreyle bekletilmiştir. Çalışma aralıkları 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 ay olarak belirlendi. Geliştirilen F1, F2 ve F3 formülasyonlarından alınan örneklerle damlacık büyüklüğü, PDI, viskozite, türbidite ve zeta potansiyel özelliklerindeki değişim 6 ay süresince kontrol edildi.

3.6. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

3.6.1. Lipoliz çalışmaları deney prosedürü

Lipoliz çalışmaları için, orta zincirli (İmwitor 742) ve uzun zincirli (oleik asit) yağ asitleri, yüzey etkin madde (Cremophor RH 40) ve yardımcı yüzey etkin maddelerden (Tween 20 ve propilen glikol) oluşan ve tenofovir içeren SNEDDS formülasyonlar hazırlandı ($61,25\text{ mg/mL}$). İn vitro lipoliz deneylerinde Metrohm 902 Stat Titrandro cihazı kullanıldı ve cihazın su banyosu ile koordineli bir şekilde çalışması sağlandı (Resim 3.2).



Resim 3.2. İn vitro lipoliz deney modeli

Lipoliz çalışması gastrik lipoliz ve intestinal lipoliz olmak üzere iki aşamada yapılmıştır.

Yaklaşık 35 mL gastrik lipoliz ortamı, $37 \pm 0,5$ °C sıcaklıkta kontrollü bir şekilde pH 2 ve pH 5'e ayarlandı. SNEDDS formülasyonlar ortama eklendi.

- 35 mL ortam içine gastrik lipazı taklit etmesi için 10 mg/mL (Christophersen ve diğerleri, 2014) insan gastrik lipaza benzer aktivite gösteren Candida antartica lipaz A eklenerek (5 mL) 30 dk boyunca karıştırıldı.
- Ortamda olan yağ asitlerinin fazlasının pH'ı değiştirmemesi için NaOH (tokluk) ve HCl (açlık) ile titre edilerek ortamın pH'ı sabit tutuldu.
- 15. ve 30. dk'larda örnekler alınıp 25 µL lipaz inhibitörü (1 M metanolde 4-bromobenzenboronik asit) eklenerek lipoliz durduruldu (Christophersen ve diğerleri, 2014) ve örnekler santrifüj edildi.
- Sulu fazdaki etkin madde miktarı tayin edildi.

Yaklaşık 30 mL intestinal lipoliz ortamı cihaza eklendi ve pH 6,5'a getirildi.

- Lipoliz ortamına, insan pankreatik lipaza en çok benzeyen domuz pankreatin lipaz eklendi. Pankreatin lipaz çözeltisi 1000 USP lipaz aktivitesini sağlamak amacıyla 50 gr tartıldı ve 100 mL distile su ile tamamlandı (Zangenberg ve diğerleri, 2001b). 37°C sıcaklıkta 15 dk karıştırıldı ve 4000 rpm'de santrifüj edildi. Deney ortamına 10 mL eklendi.

- Ca (5 mM), NaTDC (5 mM-15 mM), 2 mM trismaleat, fosfatidilkolin (0,75 Mm-3,75 mM) eklendi. Ortamda olan yağ asitlerinin fazlasının ortamın pH'ını değiştirmemesi için NaOH ile titre edilerek ortamın pH'ı sabit tutuldu.
- 15., 30., 45. ve 60. dk'larda örnekler alınıp lipaz inhibitörü koyularak 15 000 rpm'de 30 dk santrifüj edilip sulu faz ve pellet faz ayrıldıktan sonra sulu fazdaki etkin madde miktar tayini yapıldı.
- Gastrik lipoliz ve intestinal lipolizde harcanan NaOH ve HCl miktarlar (mL) hesaplandı.

Gastrik lipoliz

Açlık gastrik ortamı (FASGIF) temsil eden (Çizelge 3.11) yaklaşık 35 mL ortam sıcaklık kontrollü bir şekilde ($37 \pm 0,5$ °C) pH 2'ye 0,1 M HCl ile ayarlanırken, tokluk gastrik ortamı (FESGIF) (Çizelge 3.11) ise pH 5'e 0,1 M NaOH ile ayarlandı. 0,5 mL (61,25 mg/mL) SNEDDS formülasyonlar deney ortamına eklendi. 35 mL ortam içine, gastrik lipazı taklit etmesi için 10 mg/mL (Thomas ve diğerleri, 2014) insan gastrik lipaza benzer aktivite gösteren Candida antartica lipaz A (Christophersen ve diğerleri, 2014) eklendi (5 mL), 30 dk karıştırıldı ve 15. ve 30. dk'larda örnekler alınıp 25 µL lipaz inhibitörü (1M metanolde 4-bromobenzenboronik asit) eklenerek lipoliz durduruldu.

Örnekler santrifüj edilerek sulu faz ve pellet faz ayrıldı (15 000 rpm 15 dk). Sulu fazdan 100 µL alınarak 900 µL asetronitril ile seyreltilip tekrar santrifüj edildi (15 000 rpm 15 dk) ve etkin madde miktar tayini için UV spektrofotometrede önceden belirlenen dalga boyunda absorbanlar saptandı. Uzun zincirli ve orta zincirli formülasyonlar için (n=3) FASGIF ve FESGIF ortam şartları oluşturularak deneyler yapıldı ve deney süresince harcanan HCl ve NaOH miktarları hesaplandı.

Çizelge 3.11. Gastrik lipoliz ortam koşulları (FASGIF-FESGIF)

Ortam	pH	Safra tuzu	Fosfolipit	Trisma maleat	NaCl	CaCl ₂	Asetik asit	Sodyum asetat	Süt
FASGIF	2	0,08 mM	0,02 mM	2 mM	34,2 mM	5 mM	-	-	-
FESGIF	5	-	-	-	237,02 mM	5 mM	17,12 mM	29,75 mM	1:1

İntestinal lipoliz

Açlık (FASSIF) ve tokluk (FESSIF) intestinal lipoliz ortamları (Çizelge 3.12) sıcaklık kontrollü bir şekilde ($37\pm0,5$ °C) 30 mL olacak şekilde ortama eklendi ve pH 6,5'a getirildi. 0,5 mL (61,25 mg/mL) SNEDDS formülasyonlar deney ortamına eklendi. İntestinal lipoliz ortamı için, insan pankreatik lipaza en çok benzeyen domuz pankreatin lipaz çözeltisi (Guine ve diğerleri, 2008; Kaukonen ve diğerleri, 2004; Porter ve diğerleri, 2004) kullanıldı. Ortamda sindirilen/çözünen yağ asitlerinin fazlasının ortamın pH'sını düşürmemesi için 0,1 M NaOH ile titre edilerek pH sabit tutuldu. 15., 30., 45. ve 60. dk'larda örnekler alınıp, 25 µL lipaz inhibitörü ilave edilerek santrifüjlendi. Sulu faz ve pellet faz ayrıldıktan sonra sulu fazdan 100 µL alınarak 900 µL asetonyitril ile seyreltilip tekrar santriüj edildi (15 000 rpm -15 dk) ve etkin madde miktar tayini UV spektrofotometre ile tespit edildi. Uzun zincirli ve orta zincirli formülasyonlar (n=3) için FASSIF ve FESSIF ortam şartları oluşturularak lipoliz deneyleri yapıldı ve harcanan NaOH miktarları hesaplandı.

Çizelge 3.12. İntestinal lipoliz ortam koşulları (FASSIF- FESSIF)

Ortam	pH	Safra tuzu	Fosfolipit	Trisma maleat	NaCl	CaCl ₂
FASSIF	6,5	3 mM	0,75 mM	10 mM	106 mM	5 mM
FESSIF	6,5	15 mM	3,75 mM	-	203 mM	5 mM

3.6.2. Lipoliz örneklerinin analizi

Tenofovirin spektrofotometrik miktar tayini analizi ve asetonyitril kalibrasyonu

Lipoliz deney yönteminde belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, etkin maddenin %çözünen/sindirilen miktarları tespit edildi. Tenofovirin lipoliz ortamındaki çözünürlüğünü tespit etmek için, lipoliz ortamını oluşturan yağlı maddeleri de çözebilen asetonyitril çözücü olarak kullanıldı (Larsen ve diğerleri, 2012). Asetonyitril için 50 µg/mL stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 10-40 µg/mL arasındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı (n=3). Tenofovirin standart doğru denklemini bulmak için Bölüm 3.2.2'de anlatılan kalibrasyon ve validasyon çalışmaları yapıldı.

İn vitro yöntem validasyonu

Doğruluk ve geri elde

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı üzere 50 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltiden hareketle hazırlanan 25 µg/mL %100 kabul edildi.

Kesinlik

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı üzere örneklerin X_{ort} , SS ve %BS değerleri hesaplandı.

Özgünlük ve seçicilik

Spektrofotometrik yöntemin sadece analizi istenen tenofoviri saptayabilmesi amacıyla, etkin madde içermeyen asetonyril, asetonyril-lipoliz ortamları ve formülasyon bileşenlerinin 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrumları alındı.

Doğrusallık

Asetonyril için doğrusallık, absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi uygulanarak regresyon doğrusu ve determinasyon katsayısının saptanmasıyla gösterildi.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi analitik yöntemin LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

3.7. Tenofovir İçeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde İn Vitro ve Ex-Vivo Olarak Geçişinin İncelenmesi

BCS Sınıf 3 bir madde olan tenofovirin permeabilite/geçirgenlik özelliklerini tespit etmek amacıyla "Franz difüzyon hücresi yöntemi" ile geçişi incelendi (Franz, 1975). Öncelikle in vitro deneyler, diyaliz membran kullanılarak yapıldı. Etkin madde içeren

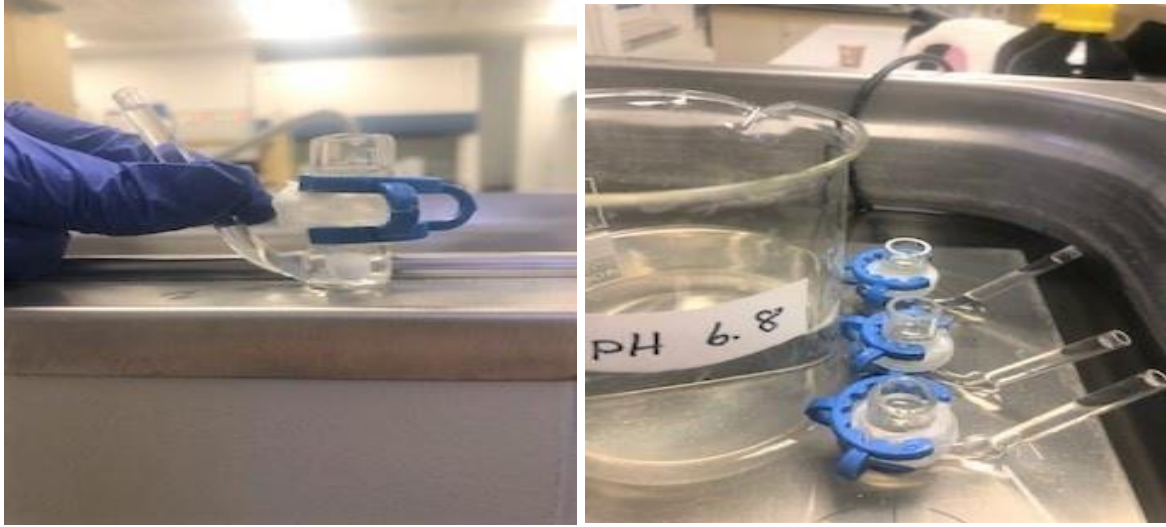
SNEDDS ve SDEDDS formülasyonlar (Çizelge 3.13) Franz difüzyon hücrelerine her hücreye 1 mL olacak şekilde eklendi ve 24 000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membrandan geçiş incelendi.

Çizelge 3.13. Tenofovir içeren emülsiyonlar

Oleik asit SNEDDS	İmwitor 742 SNEDDS	S/Y/S çoklu emülsiyon
F1	F2	F3

Kullanılan membranlar, yatay Franz difüzyon hücrelerine yerleştirildi. Üzerine (donör kısma), tenofovir içeren emülsiyonlar eklendi. Hücrenin alt kısmına (reseptör kompartmanına) ise pH 6,8 tamponu ve küçük magnetler koyularak 6'lı magnetik karıştırıcı içeren $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki su banyosu üzerine yerleştirildi (Resim 3.3). Sabit hızda karıştırma deney süresince devam etmiştir. Geçiş bölgesinin alanı 1 cm^2 'dir. 15, 30, 60, 120, 360, 240 ve 360. dk'larda alt hücre içindeki örneğin tamamı alındı ve yerine pH 6,8 tamponu eklendi. Alınan örneklerin absorbansı önceden belirlenen dalga boyunda UV spektrofotometre (UV 1700 Shimadzu) ile ölçüldü.

Ex-vivo deneylerde ise Franz difüzyon hücrelerine diyaliz membran yerine koyun ince bağırsak dokusu koyularak F1, F2 ve F3 emülsiyonları için geçiş çalışmaları yapıldı. Geçiş çalışmalarında, difüzyonel kesit 1 cm^2 olduğu için sıçan gibi küçük hayvanların bağırsağı kullanılamamıştır. Franz difüzyon hücrelerinin reseptör bölmesi, taze hazırlanmış pH 6,8 fosfat tamponu ile dolduruldu. Verici ve reseptör bölmesi arasında sıkıştırılan koyun ince bağırsak dokusu, epitelyal yüzeyin donör kısmına doğru yönlendirildiğini dikkate alarak tespit edildi. Verici bölmesine, tenofovir içeren formülasyonlar koyuldu (61,25 mg/mL). Numuneler yukarıda belirtilen periyodik zamanlarda reseptör fazından alındı ve aynı hacimde tampon çözeltisi ilave edildi. Sonuçlar standart doğru denklemine yerine koyularak diyaliz membrandan ve doku hücrelerinden geçen etkin madde miktarı hesaplandı ($n=3$). Spektrofotometrik olarak yapılan analizin ardından kümülatif miktardaki nüfuz eden tenofovir miktarı zamana karşı grafiğe geçirildi. Eğrilerin doğrusal kısmından akı değerleri hesaplandı. Permeabilite katsayısı ise verici bölmesindeki akı/konsantrasyon oranından hesaplandı.



Resim 3.3. Franz difüzyon yöntemi çalışmaları (n=3)

3.8. Biyoyararlanım Çalışmaları

İn vivo çalışmalar, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan 05.03.2015 tarihli, 66332047-604.01.02/27705 sayılı yerel etik kurul onayı (EK 1) ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde yapıldı.

3.8.1. Deney hayvanları

İn vivo deneyler için 200-250 gr erkek Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanların 35 tanesi açlık grubunda, 35 tanesi tokluk grubunda (ad libitum beslenen grup) yer aldı. Ad libitum beslenen sıçanlar ve aç sıçanlar standart laboratuvar kafeslerinde 18-22°C sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyodunda tutuldu.

Çözelti ve tabletin dispersiyon ortamı distile sudur. Sıçanlar için tenofovirin uygulama dozu 61,25 mg/mL/gün olacak şekilde planlandı. Sıçan ağırlıklarından hareketle kg başına verilecek doz hesapları yapıldı. Uygulamalar, 250 gr olan sıçana bir 1 mL formülasyon olacak şekilde oral gavaj ile yapıldı. Kan numuneleri alınmadan önce sıçanlar hayvanların hareketlerini kısıtlayan alete (restrainer) koyuldu. Kuyrukları sıcak su ile yıkanarak kuyruk venlerinin belirgin hale getirilmesiyle rahat kan alınması sağlandı (Resim 3.4).

Kan numuneleri 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde 150 µL kuyruk veninden toplanarak heparinli tüplere alındı. 4 000 rpm'de 20 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı ayrılarak analize kadar -81°C'de saklandı.



Resim 3.4. Oral gavaj ile sıçanlara formülasyonların verilmesi ve kuyruk veninden kan örneklerinin alınması

3.8.2. Biyoyararlanım çalışma tasarımı

Biyoyararlanım çalışma tasarımı Çizelge 3.14'de gösterilmektedir. Açlık grubundaki sıçanlara formülasyonların uygulamasından 12 saat önce yemek (yem) verilmesi kesildi ve sadece suya erişimleri sağlandı. Uygulamadan 6 saat sonra yemek (yem) verildi. Bu şekilde gece beslenen sıçanların hepsinin benzer tokluk düzeyine sahip olması ve grup içi varyasyonun en aza indirgenmesi sağlandı. Deney tasarımında açlık ve tokluk gruplarının oluşturulmasının nedeni, tenofovirin açlık/tokluk durumunda biyoyararlanımının değişken olmasıdır. Çalışmalarla, tenofovirin ticari ürünü ve emülsifiye sistemlerin açlık/tokluk varyasyonu değerlendirildi. Oral uygulamadan sonra tenofovirin yarılanma ömrü yaklaşık 12-18 saattir. Çalışmada 24. saate kadar kan toplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.14. Biyoyararlanım çalışma tasarımı

Açlık Grubu			Ad libitum Beslenen Grup		
Grup No	Sıçan Sayısı	Uygulama	Grup No	Sıçan Sayısı	Uygulama
1	7	Tenofovir çözelti	1	7	Tenofovir çözelti
2	7	Oleik asit-SNEDDS (F1)	2	7	Oleik asit-SNEDDS (F1)
3	7	İmwitor 742-SNEDDS (F2)	3	7	İmwitor 742-SNEDDS (F2)
4	7	Çoklu emülsiyon-SDEDDES (F3)	4	7	Çoklu emülsiyon-SDEDDES (F3)
5	7	Viread® (ticari ürün)	5	7	Viread® (ticari ürün)

Kan örneklerinde tenofovir miktarı LCMS/MS yöntemiyle analiz edilerek konsantrasyonlar saptandı ve plazma-zaman profilleri çizildi. Verilerden hareketle doğrusal olmayan regresyon programı WinNonlin™ kullanılarak, C_{maks} (plazmadaki maksimum konsantrasyon), t_{maks} (C_{maks} 'a ulaşmak için geçen süre), AUC_{0-24} (sıfırdan 24. saate kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan), $AUC_{0-\infty}$ (sıfırdan sonsuza kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan), k_d (uzaklaşma hız sabiti), $t_{1/2}$ (biyolojik yarı ömür), V_d (dağılım hacmi) ve Cl (klirens) gibi farmakokinetik parametreler nonkompartımantal analiz ile hesaplandı ve biyoyararlanım değerlendirmeleri yapıldı.

3.8.3. Analiz yöntemi

Plazma örneklerinden tenofoviri in vivo miktar tayini analizi ve validasyonları LC-MS/MS yöntemi ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR)'da yapılmıştır.

Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

LC-MS/MS yöntemi için Shimadzu HPLC Sistemi & AB Sciex API 4000 cihazı kullanılmıştır. LC-MS/MS çalışmalarında maddeleri kütle/yük oranlarına göre moleküllerine ayıran bir sistemdir. Bu sistem sıvı kromatografi sistemi ile maddelerin analizine yardımcı olmaktadır. Her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi oluşturulmuştur.

Sistemin tercih edilmesindeki en önemli özellikler seçicilik, hassasiyet ve hızdır (Yılmaz, 2017).

LC-MS/MS sistemi çalışma koşulları

Çalışmanın bu aşamasında, miktar tayini analizinin optimum parametrelerini bulmak için çeşitli çalışmalar yapılarak, etkin maddenin en yüksek intensite elde edildiği metot geliştirilmiştir. Uygun mobil fazı bulabilmek için formik asitin iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalanıldı ve en uygun intensiteyi mobil faz A %0,1 'lik formik asitli distile su, mobil faz B %0,1'lik formik asitli asetronitril ile yapılan çalışmada elde edilmiştir.

Sıvı sistem özellikleri

Mobil Faz A: 1 M amonyum format çözeltisinden 2 mL ve %99,8 saflıkta formik asitten 2 mL alınarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Mobil Faz B: 1 M amonyum format çözeltisinden 2 mL ve %99,8 saflıkta formik asitten 2 mL alınarak yüksek saflıkta asetronitril ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Fırın sıcaklığı: 40°C

Otomatik örnekleyici sıcaklığı: 40°C

Akış hızı: 0,9 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Kolon: C8 (4,6 x 100 mm 3,5 µm)

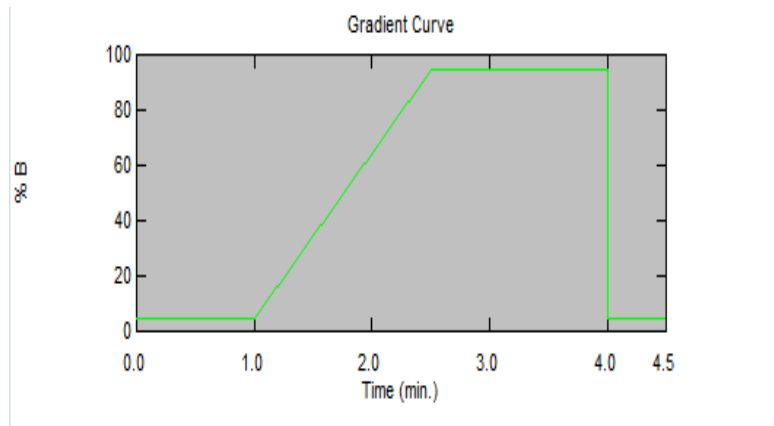
Mobil Faz A: %0,1'lik formik asitli distile su

Mobil Faz B: %0,1 'lik formik asitli asetronitril

HPLC üzerine uygulanan akış diyagramının (Şekil 3.3) parametreleri Çizelge 3.15'de görülmektedir.

Çizelge 3.15. HPLC sisteminin akış özellikleri

Zaman	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0,01	95	5
1,00	95	5
2,50	5	95
4,00	5	95
4,01	95	5
4,50	95	5



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan akış gradient

MS/MS Sistem Özellikleri

Shimadzu HPLC Sistemi & AB Sciex API 4000 cihazının mass süresi 4,5 dk ve mass koşulları Çizelge 3.16'da verilmiştir. En yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırasıyla tenofovir için 288,086/176,1, iç standart ornidazol için de 220,024/128 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.16. MS/MS sisteminin mass koşulları

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Zaman (dk)	ID	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
288,086	176,1	150	Tenofovir	61	10	35	14
220,024	128,0	150	Ornidazol (İç Standart)	81	10	23	12

Plazma örneklerinin ekstraksiyon yöntemi

LC-MS/MS cihazının ekstraksiyon yöntemi aşağıda anlatıldığı gibi geliştirilmiştir:

100 µL sıçan plazması üzerine 5 µg/mL derişimindeki iç standarttan (ornidazol) 10 µL eklenir ve 30 sn vortekslenir. Üzerine 900 µL ekstraksiyon solventi* ilave edilir. 5 dk vortekslenir. +4°C 15,300 rpm'de 10 dk santrifüjlenir. Üst faz 0,45 µm 13 mm Nylon filtreden geçirilerek HPLC vialine alınır ve enjeksiyon yapılır.

(*Solvent: %0,1 formik asitli su/%0,1 formik asitli asetonitril; (10/90; v/v))

Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yöntemi validasyonu

Tenofovirin LC-MS/MS miktar tayini yöntemi validasyonunda incelenen validasyon parametreleri aşağıda sunulmaktadır:

1. Stok Çözelti Kararlılığı
2. Carry-Over (Taşınma)
3. Dilüsyon Doğruluğu
4. Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik
5. Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik
6. Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı
7. En Düşük Miktar Saptama Alt Sınırı (LLOQ)
8. Matriks Etkisi
9. Seçicilik-Seçimlilik

3.9. İstatiksel Değerlendirmeler

İn vitro ve in vivo çalışma sonuçları $\text{ort} \pm \text{SS}$ şeklinde verilmiştir. Spektrofotometrik miktar tayinin geliştirilmesinde, validasyonda, in vitro çözünme hızı deneylerinde ve permeabilite sonuçlarında %BS ile değerlendirmeler yapılmıştır. F1 ve F2 formülasyonlarının geliştirilmesinde Design Expert Software Version 10 yazılımı kullanılarak deney tasarımı yapılmıştır ($p < 0,05$).

İn vivo çalışmaların sonuçları ve farmakokinetik parametreler WinNonlin™ programı kullanılarak hesaplanmış ve geliştirilen formülasyonun (F3) açlık-tokluk varyasyonu t testi uygulanarak değerlendirilmiştir ($p > 0,05$).

4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular

4.1.1. Çözünürlük

Tenofovirin $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki çözünürlük çalışması Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Tenofovirin 37°C ve 25°C 'deki çözünürlüğü X_{ort} ve SS değerleri Çizelge 4.1'de verilmektedir.

Çizelge 4.1.Tenofovirin 25°C 'de ve 37°C 'de distile sudaki çözünürlük değerleri (n=3)

Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Çözünürlük (mg/mL) ($\text{ort} \pm \text{SS}$)
25	$14,90\pm0,08$
37	$16,90\pm0,04$

4.1.2. Partisyon katsayısı

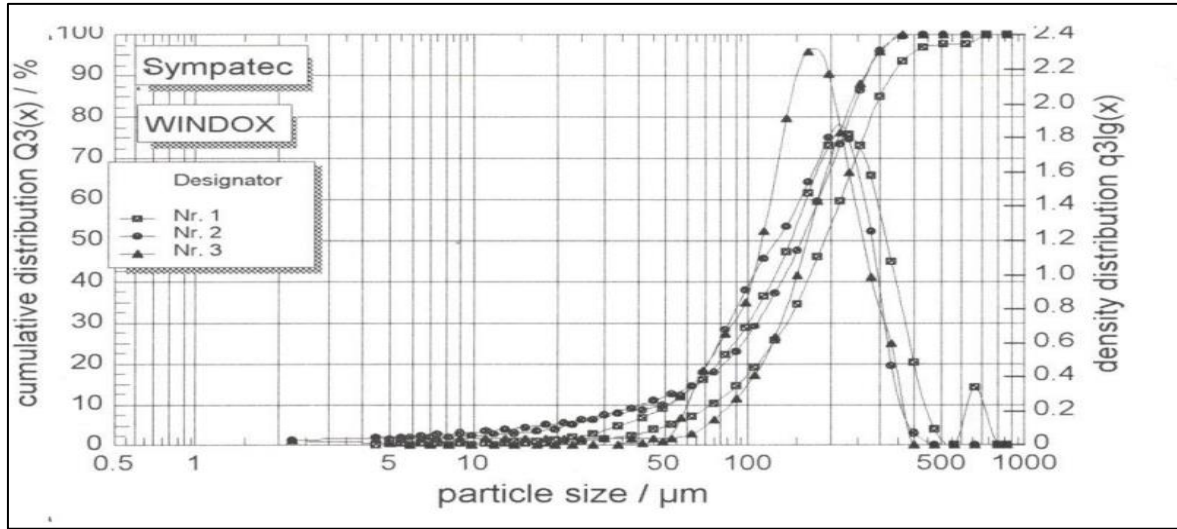
Tenofovirin $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki partisyon katsayısı tayini Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Tenofovirin 37°C ve 25°C 'deki partisyon katsayıları Çizelge 4.2'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.2.Tenofovirin 25°C ve 37°C 'de oktanol/distile su arasındaki partisyon katsayısına ait bulgular

Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Partisyon Katsayısı
25	3,55
37	4,00

4.1.3. Partikül büyüklüğünün belirlenmesi

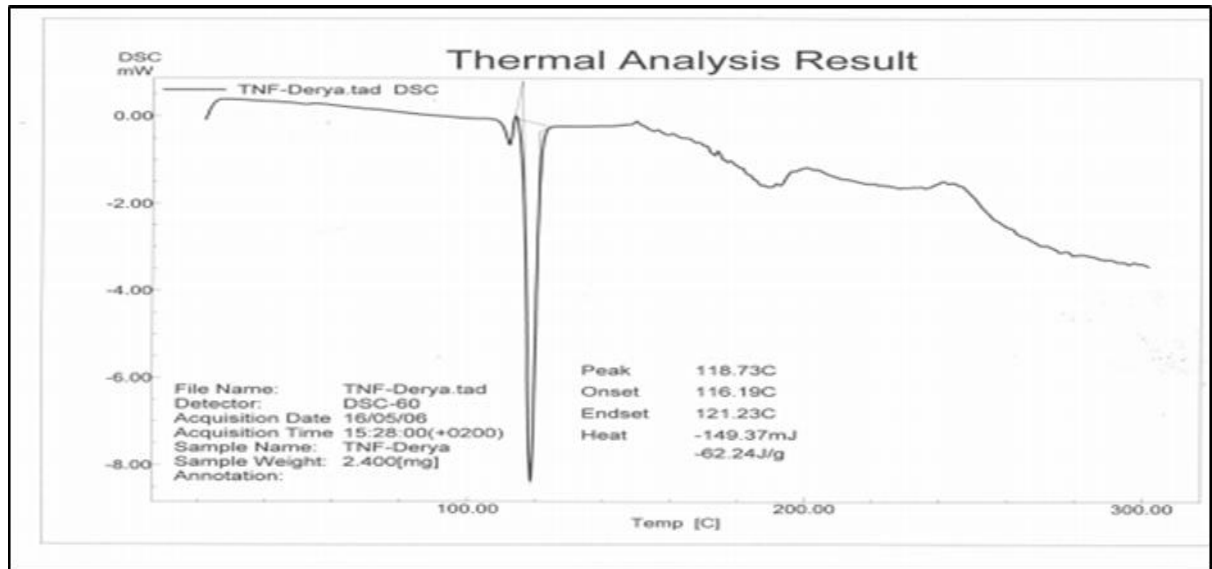
Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi tenofovirin partikül büyüklüğü analizi yapıldı (Şekil 4.1). Çalışma sonucunda tenofovirin ortalama partikül büyüklüğü $171\pm17,8 \mu\text{m}$ olarak tespit edildi (n=3, $X_{\text{ort}} \pm \text{SS}$).



Şekil 4.1. Tenofovirin partikül büyüklüğü dağılım grafiği

4.1.4. Tenofovirin erime derecesinin tayini

Tenofovirin erime derecesinin tayini için DSC aleti (DSC 60 Shimadzu) kullanıldı. Tenofovirin erime noktası 118,73°C olarak tespit edildi (Şekil 4.2).



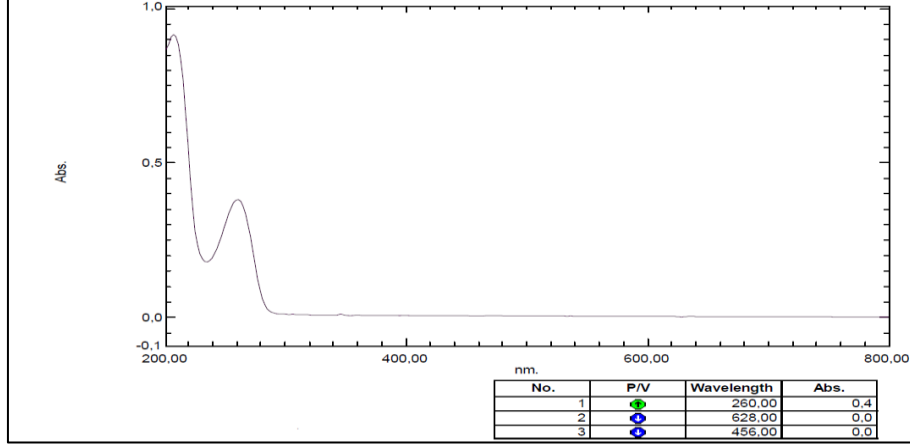
Şekil 4.2. Tenofovirin erime derecesi

4.1.5. Stabilité çalışmaları bulguları

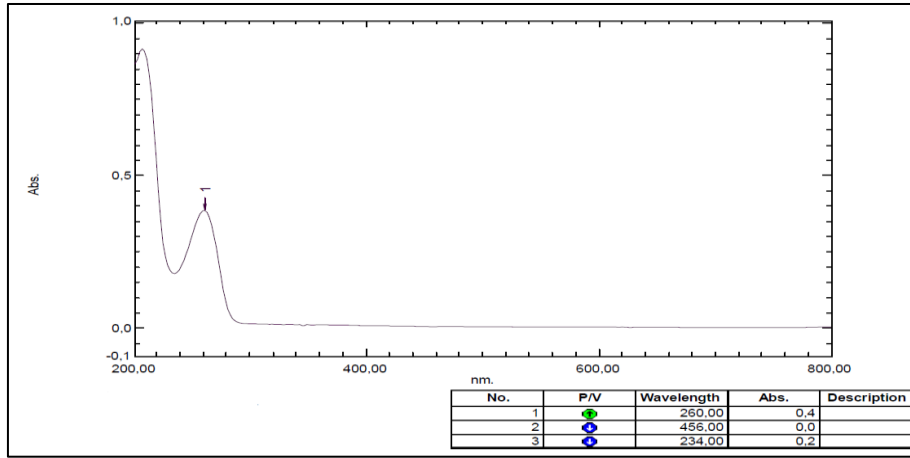
Tenofovirin distile sudaki stabilitesini incelemek için hazırlanan tenofovir çözeltisi 0. gün, 1. gün, 1 ay ve 3 ay süresince oda sıcaklığında (Şekil 4.3) ve 4°C'deki iklim

dolaplarında (Şekil 4.4) bekletildi. Tenofovirin λ_{maks} değeri 260 nm olarak bulundu. Tenofovirin distile sudaki çözeltisi üç ay boyunca oda sıcaklığı ve 4°C’de stabil olduğu ve dalga boyunun değişmediği gözlemlendi.

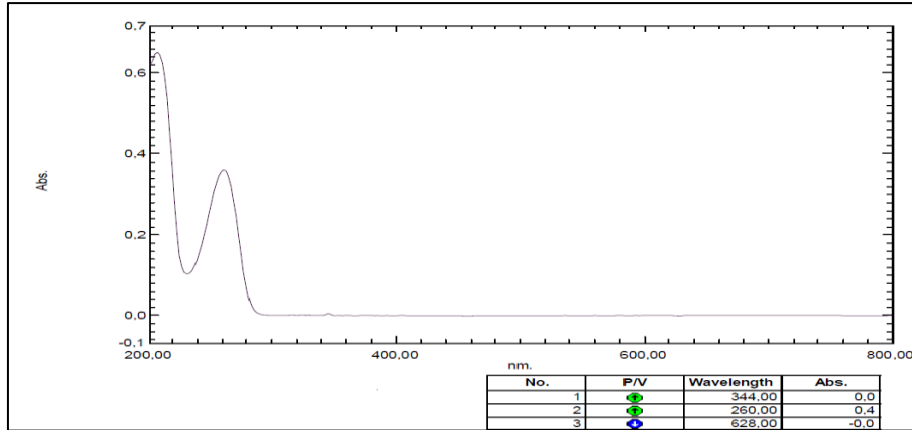
a) 0. gün



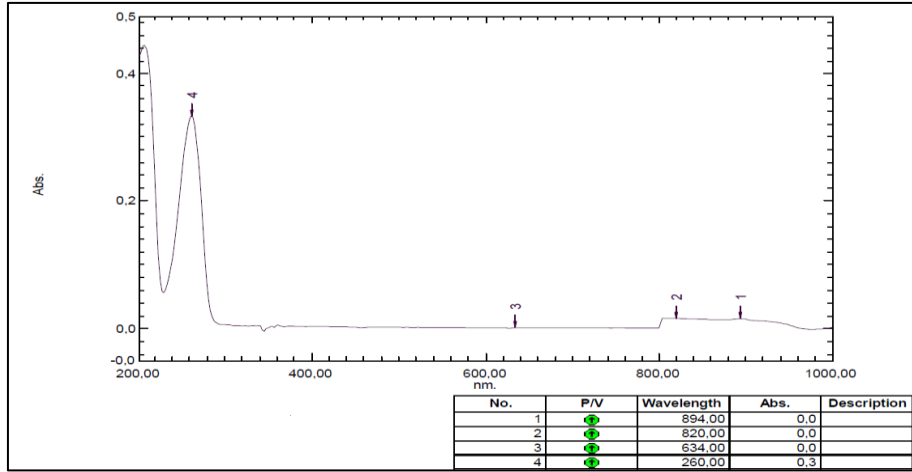
b) 1. gün



c) 1. ay

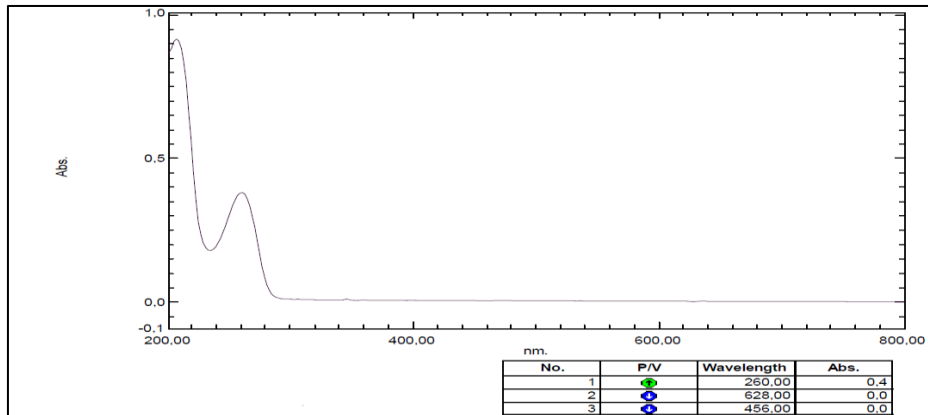


d) 3. ay

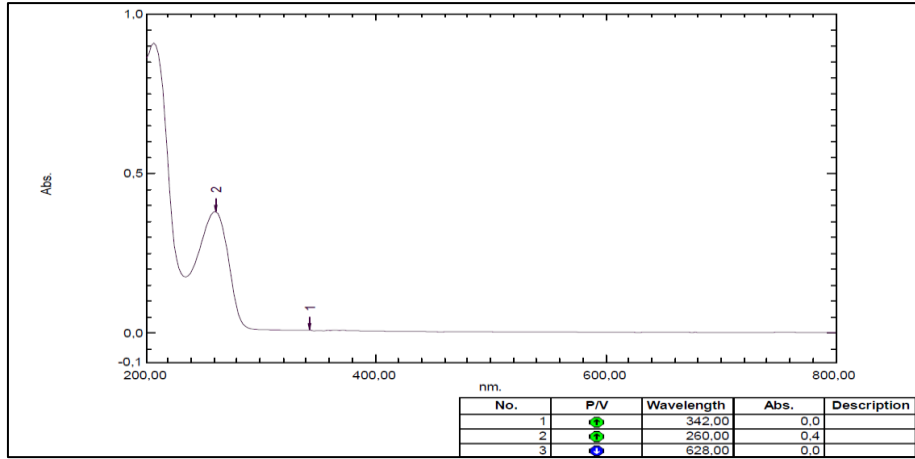


Şekil 4.3. Tenofovirin distile suda 25°C'deki stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlar a)0. gün, b)1.gün, c)1. ay, d)3. ay (260 nm)

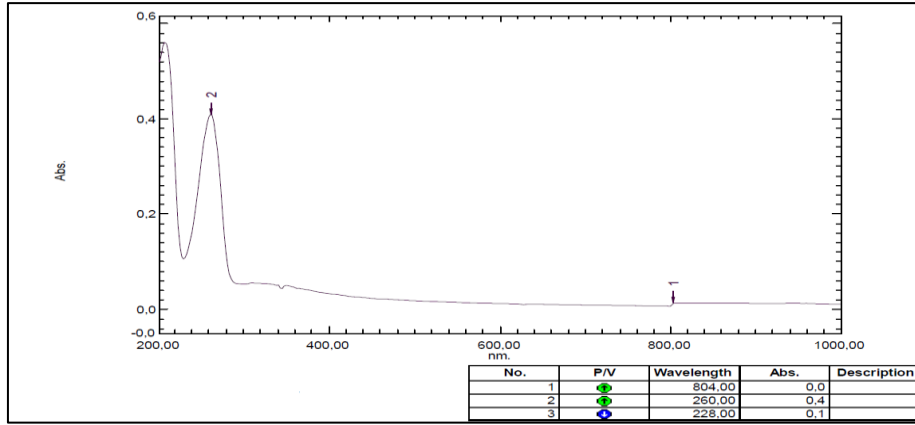
a) 0. gün



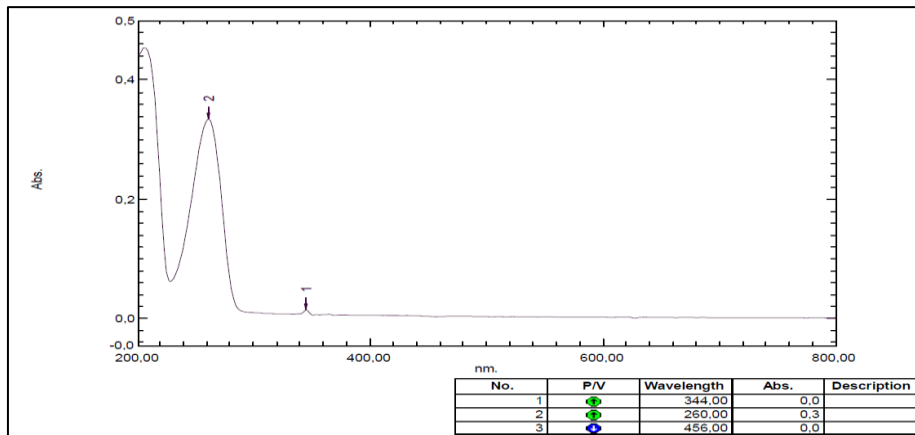
b) 1. gün



c) 1. ay



d) 3. ay

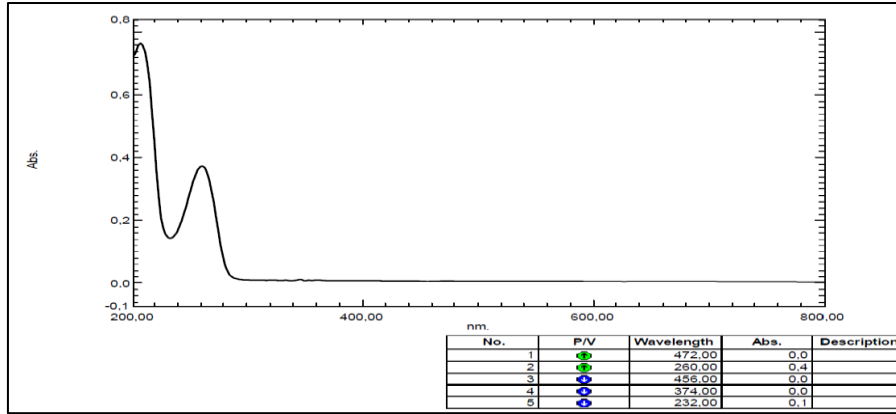


Şekil 4.4. Tenofovirin distile suda, 4°C'de yapılan stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlar a)0. gün, b)1.gün, c)1. ay, d)3. ay (260 nm)

4.2. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine ait Bulgular

4.2.1. Etkin madde için λ_{maks} değerinin hesaplanması

Tenofovirin λ_{maks} değerinin belirlenmesi için, distile sudaki 20 $\mu\text{g/mL}$ çözeltilerin λ_{maks} değeri 260 nm olarak saptandı (Şekil 4.5).



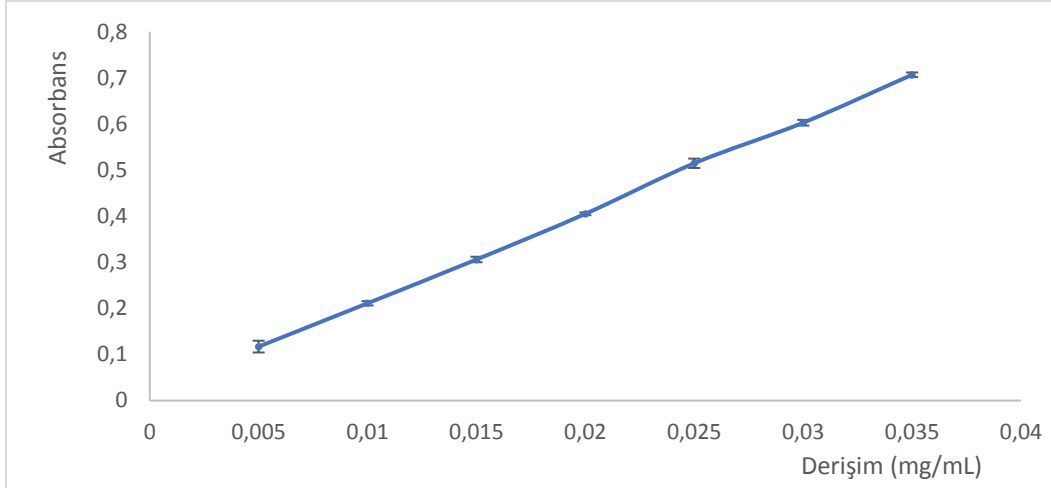
Şekil 4.5. Tenofovirin distile sudaki UV spektrumu

4.2.2. Spektrofotometrik miktar tayini ve standart doğrusunun çizilmesi

Tenofovirin standart doğru denklemini bulmak için distile suda 100 $\mu\text{g/mL}$ stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak distile suda 10-40 $\mu\text{g/mL}$, etanolde 10-35 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Tenofovirin distile suda (Çizelge 4.3) ve etanoldeki (Çizelge 4.4) regresyon istatistikleri ve doğru denklemleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.3. Tenofovirin distile sudaki kalibrasyon parametreleri

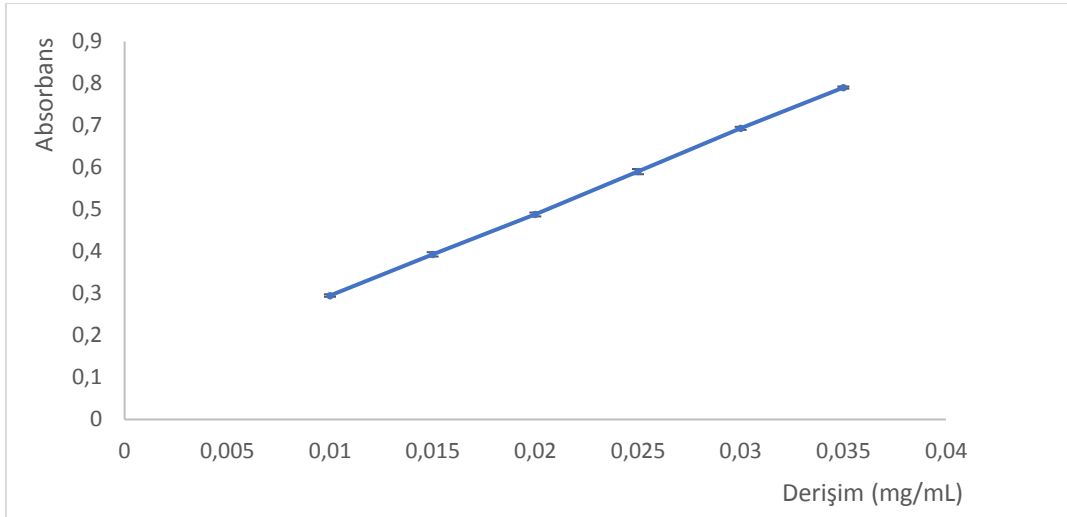
Kalibrasyon Denklemi	$y = 20,06 + 0,007$
R^2	0,999
Regresyon standart sapması	0,005
Gözlem sayısı	7



Şekil 4.6. Tenofovirin distile sudaki kalibrasyon grafiği (n=3, ort ± SS)

Çizelge 4.4. Tenofovirin etanoldeki kalibrasyon parametreleri

Kalibrasyon Denklemi	$y = 19,86x + 0,094$
R²	0,999
Regresyon standart sapması	0,0025
Gözlem sayısı	6



Şekil 4.7. Tenofovirin etanoldeki kalibrasyon denklemi (n=3, ort ± SS)

4.2.3. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemlerinin validasyonu

Doğruluk ve Geri elde

Deneyler Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi yapıldı ve deney sonuçları Çizelge 4.5-4.6'da gösterildi. Tenofovirin distile su ve etanol de üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden geri elde edilen miktarları bulundu (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). Bu üç sonucun ortalaması alınarak %geri elde hesaplandı. Etanol ve distile su için bulunan sonuçlar distile suyun düşük konsantrasyonu dışında, %BS değerleri %2'den daha az olduğu ve %geri elde sonuçları %98-103 arasında saptandığından sonuçlar uygun bulundu.

Çizelge 4.5. Tenofovirin distile suda yapılan analizine ait geri elde sonuçları

0,005 mg/mL			0,02 mg/mL			0,04 mg/mL		
Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde
0,112	0,0052	100,0	0,415	0,0203	101,5	0,810	0,0400	100,0
0,113	0,0053	100,0	0,418	0,0204	102,0	0,812	0,0401	100,3
0,118	0,0055	110,0	0,418	0,0204	102,0	0,808	0,0400	100,0
X_{ort}	0,0053	103,3	X_{ort}	0,0204	101,8	X_{ort}	0,0403	100,1
SS	0,0002		SS	0,0001		SS	0,0001	
%BS	2,88		%BS	0,080		%BS	0,140	

Çizelge 4.6. Tenofovirin etanolde yapılan analizine ait geri elde sonuçları

0,01 mg/mL			0,02 mg/mL			0,035 mg/mL		
Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde
0,295	0,0100	100,0	0,488	0,0198	99,0	0,790	0,0350	100,0
0,293	0,0100	100,0	0,490	0,0199	99,5	0,792	0,0350	100,0
0,290	0,0098	98,7	0,485	0,0197	98,4	0,794	0,0352	100,6
X_{ort}	0,0099	99,6	X_{ort}	0,0198	99,0	X_{ort}	0,0351	100,2
SS	0,0001		SS	0,0001		SS	0,0001	
%BS	1,16		%BS	0,500		%BS	0,330	

Kesinlik

Yöntemin kesinliğini ölçmek için, distile su ve etanolde 3 farklı derişimde çalışma tekrarlandı. Deneyler Bölüm 3.2.2.'de anlatıldı ve sonuçlar Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de gösterildi. Bağlı sapma sonuçları distile suyun düşük konsantrasyonu dışında, diğer konsantrasyonlar ve etanolde %2'den az olduğu için sonuçlar uygun bulundu.

Çizelge 4.7. Tenofovirin distile sudaki analizine ait kesinlik sonuçları

Derişim (mg/mL)	0,005	0,020	0,040
Absorbans	0,112	0,415	0,810
	0,113	0,418	0,812
	0,118	0,418	0,808
X_{ort}	0,114	0,417	0,810
SS	0,003	0,002	0,002
%BS	2,81	0,415	0,247

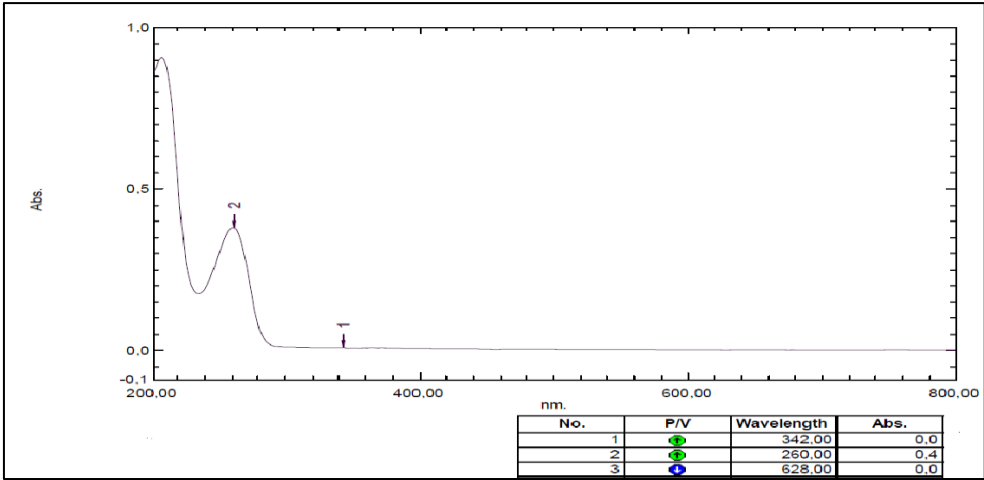
Çizelge 4.8. Tenofovirin etanoldeki analizine ait kesinlik sonuçları

Derişim (mg/mL)	0,010	0,020	0,035
Absorbans	0,295	0,488	0,790
	0,293	0,490	0,792
	0,290	0,485	0,794
X_{ort}	0,293	0,488	0,792
SS	0,002	0,002	0,002
%BS	0,860	0,516	0,253

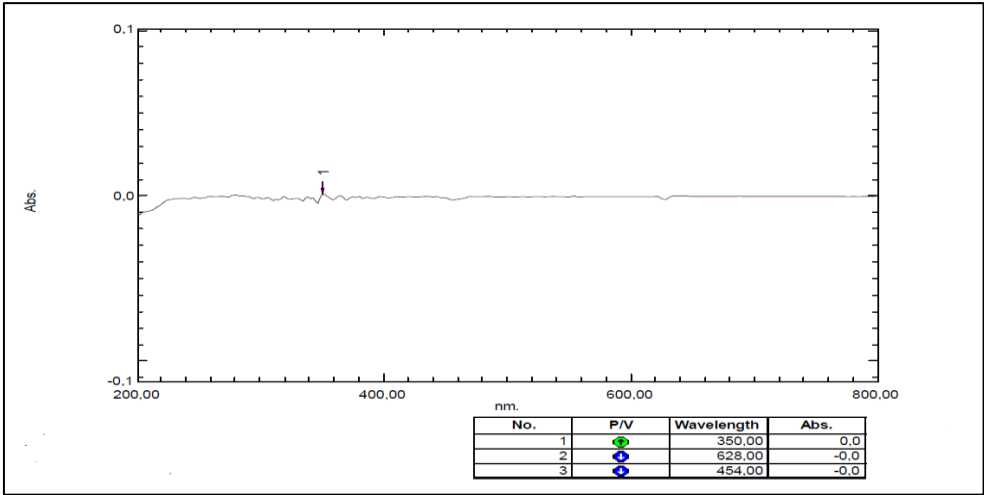
Özgünlük ve seçicilik

Geliştirilen analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptayabildiğinin, çözücü ortam ve formülasyon bileşenlerinden etkilenip etkilenmediğinin kontrolü yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan çözücü ortamı ve formülasyon bileşenleri tenofovirle (260 nm) aynı dalga boyunda absorbans vermemektedir (Şekil 4.8).

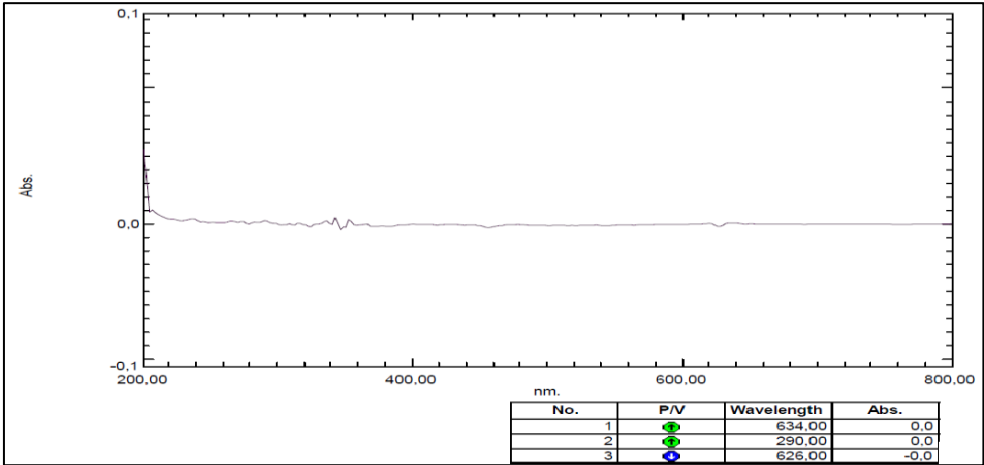
a) Tenofovir



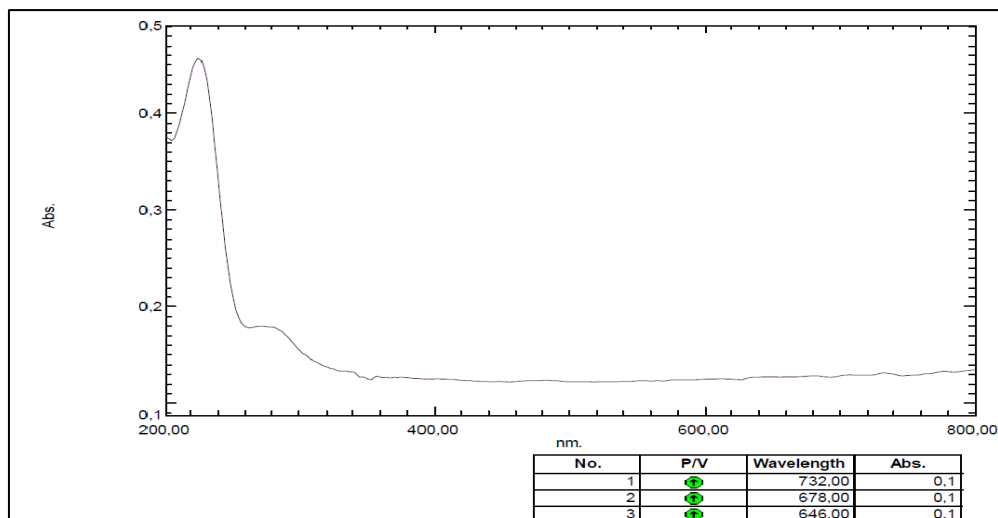
b) Distile su



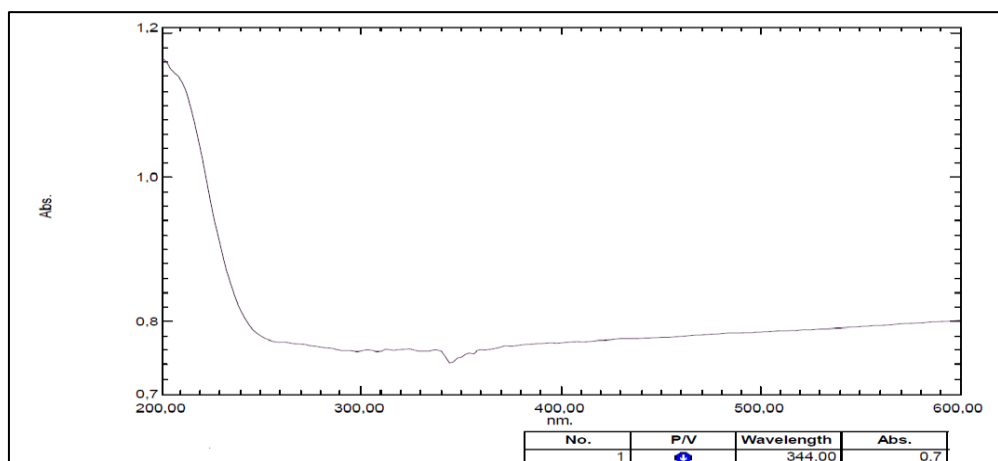
c) Etanol



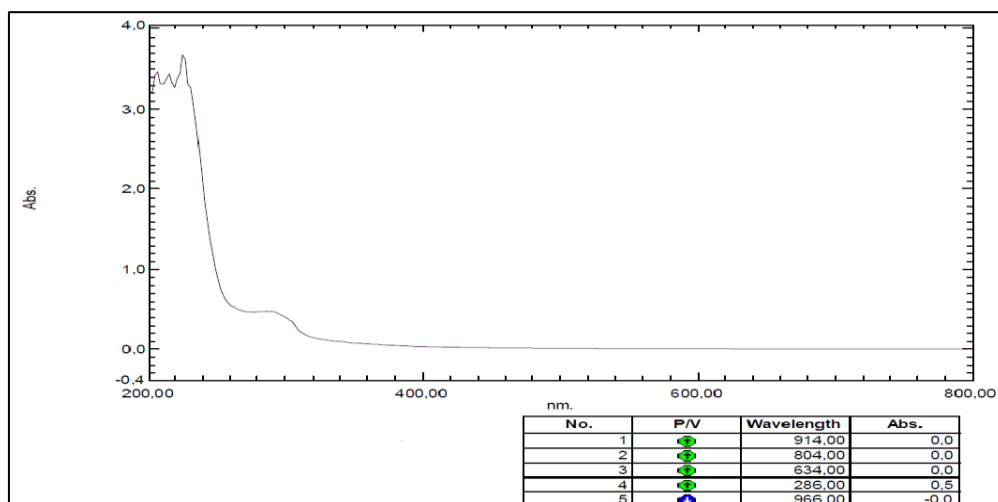
d) Oleik asit



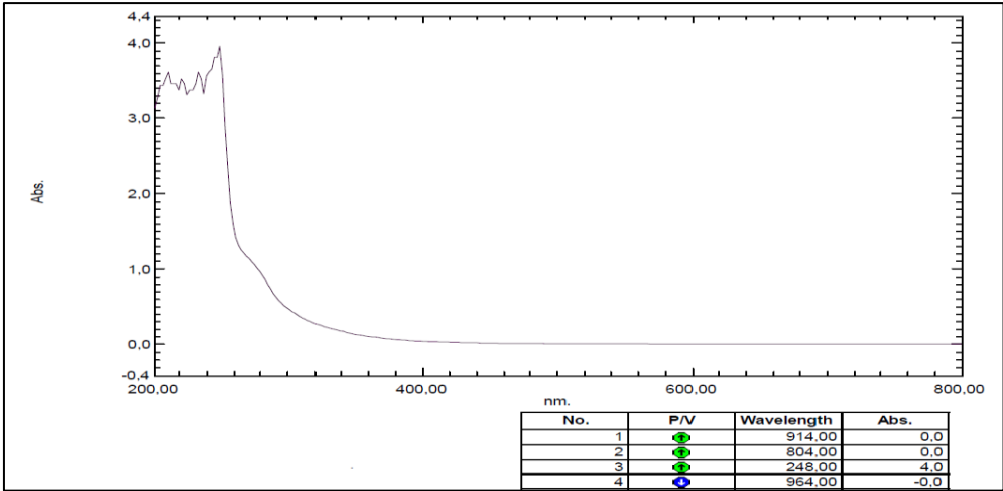
e) İmwitor 742



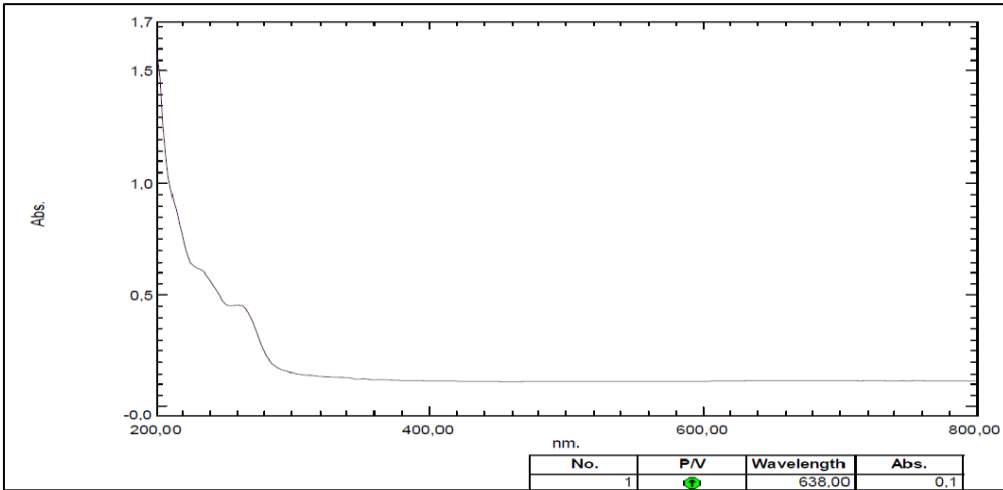
f) Cremophor RH 40



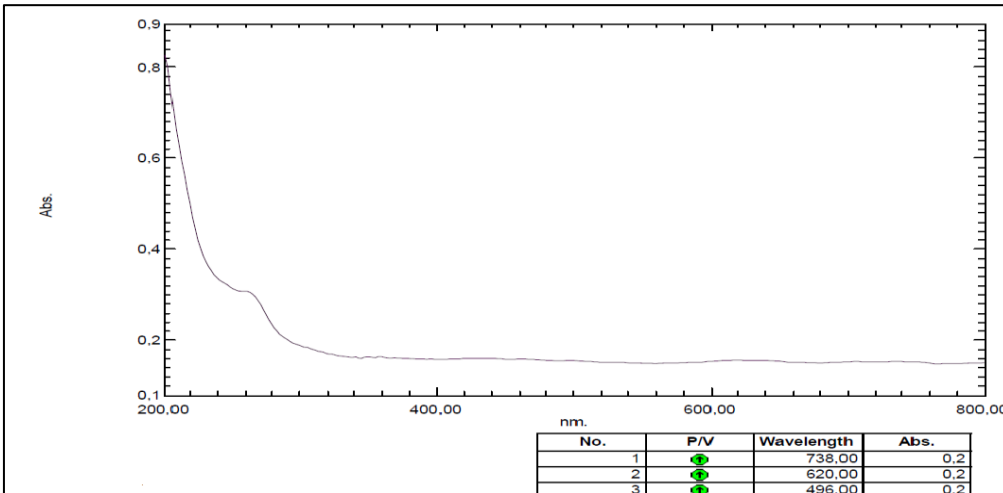
g) Tween 20



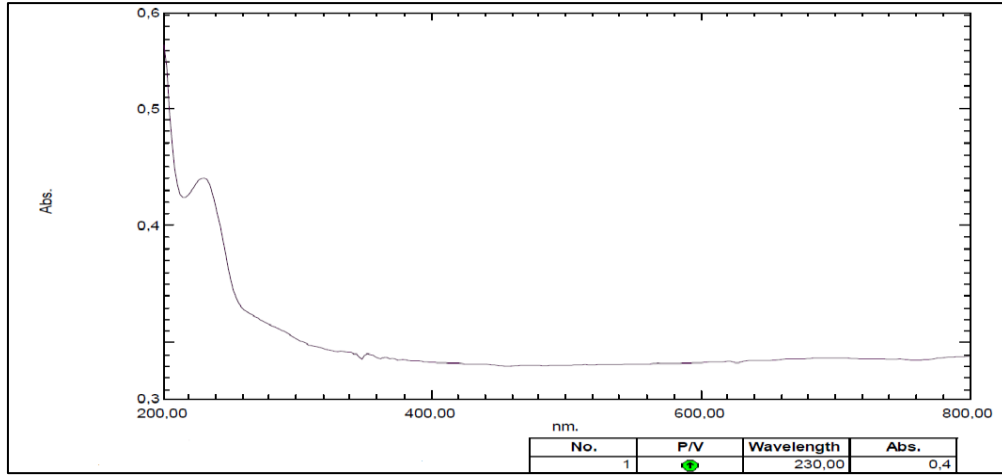
h) Propilen glikol



i) Abil Em 90



j) Labrafil



Şekil 4.8. Tenofovir, çözünme ortamı ve formülasyon bileşenlerinin UV spektrumları a)Tenofovir, b)Distile su, c)Etanol, d)Oleik asit, e)İmwitor 742, f)Cremophor RH 40, g)Tween 20, h)Propilen glikol, i)Abil Em 90, j)Labrafil

Doğrusallık

Doğrusallık, absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi uygulanarak regresyon doğrusunun saptanmasıyla gösterildi (Şekil 4.6-4.7). Determinasyon katsayısı 1'e yakın ve 0,999 olarak saptanarak, sonuçların doğrusallığı kabul edildi.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Analitik yöntemin distile su ve etanol için sırasıyla LOD değerleri 0,538 µg/mL ve 0,418 µg/mL, LOQ değerleri 1,630 µg/mL ve 1,267 µg/mL olarak bulundu.

4.3. Tenofovir-Yardımcı Madde Etkileşim/Geçimsizlik Çalışmaları Bulguları

Etkin madde tenofovir ile yardımcı madde etkileşim/geçimsizlik bulunup bulunmadığı DSC ve FT-IR analizleriyle değerlendirilmiş olup sonuçlar aşağıda sunulmaktadır:

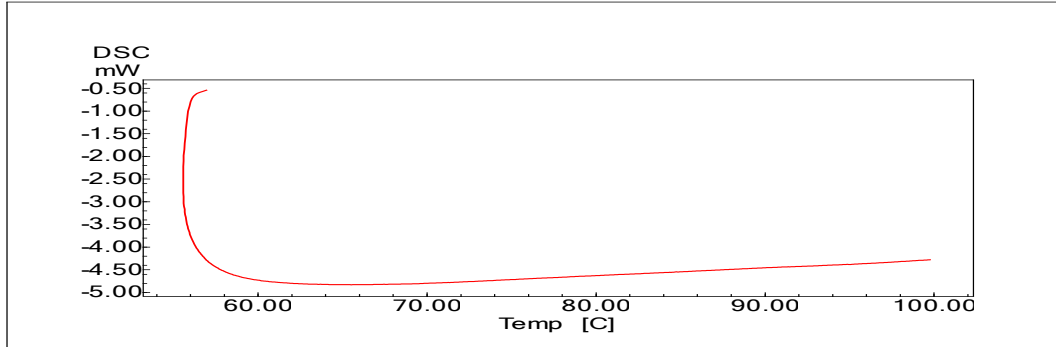
4.3.1. Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742 ve çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının DSC analizleri

Ön deneme çalışmaları kapsamında 100°C'de tenofovir, oleik asit, Cremophor RH 40 ve Tween 20'nin DSC analizleri yapıldı. Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi 100°C'de yapılan çalışmalarda tenofovir ve bileşenlerden herhangi bir bulgu alınamadığı için ve tenofovirin erime sıcaklığı (121°C) da göz önüne alınarak tenofovir, tenofovir-oleik asit, tenofovir-İmwitor 742, tenofovir-Tween 20, tenofovir-Cremophor RH 40, tenofovir-propilen glikol, tenofovir- Abil Em 90 ve tenofovir-Labrafil örnekleri 150°C'de analiz edildi. Analiz sonucu termogramlar değerlendirildi (Şekil 4.10).

a) Tenofovir

File Name: Tenofovir DF.tac
Detector: DSC-60
Acquisition Date: 17/03/24
Acquisition Time: 09:58:51(+0200)
Sample Name: Tenofovir DF
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

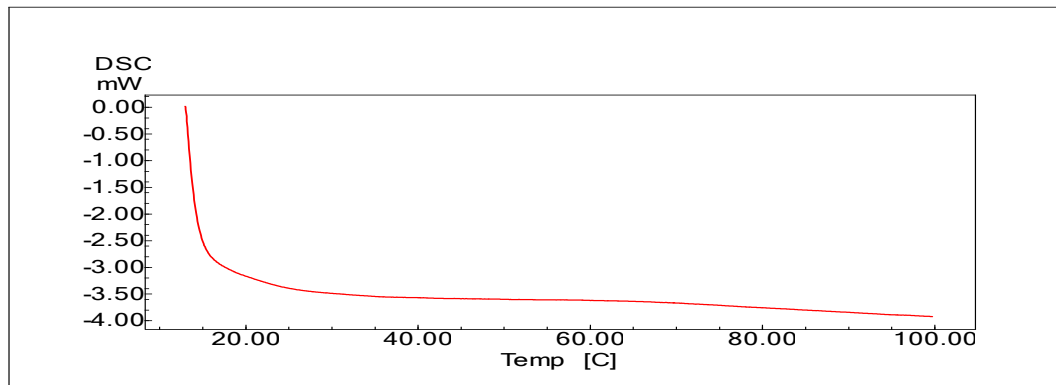
— Tenofovir DF.tac DSC



b) Oleik asit, oleik asit-tenofovir

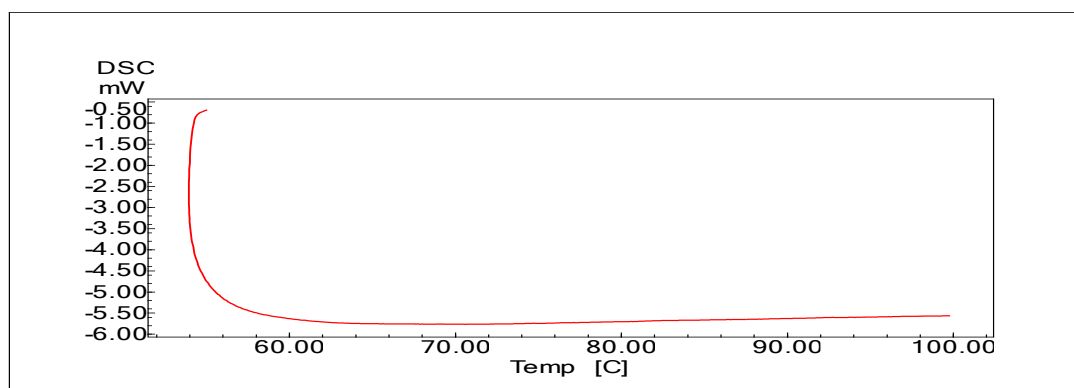
File Name: oleik asit.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date 17/03/24
Acquisition Time 08:49:37(+0200)
Sample Name: oleik asi
Sample Weight: 4.480[mg]
Annotation:

oleik asit.ta DSC



File Name: Oleik asit -Tenofovir DF.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date 17/03/24
Acquisition Time 10:26:14(+0200)
Sample Name: Oleik asit -Tenofovir D
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

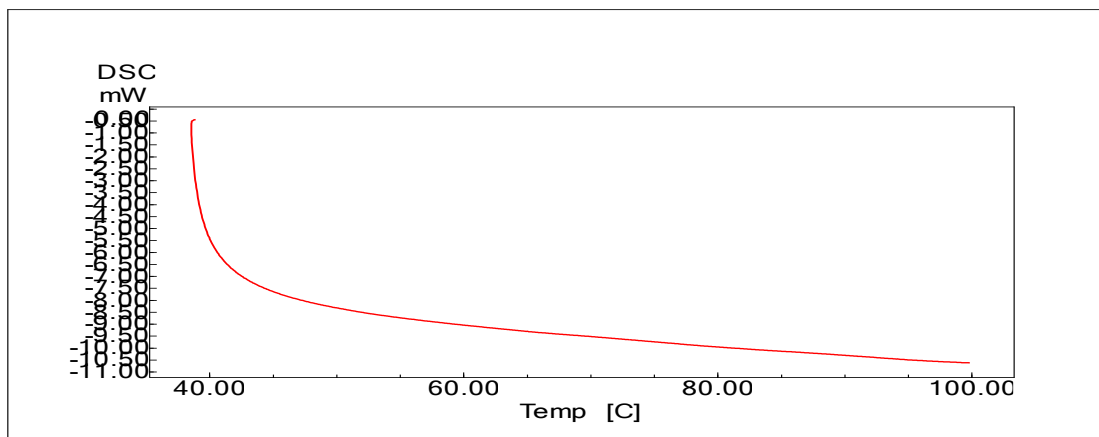
Oleik asit -Tenofovir DF.ta DSC



c) Tween 20, Tween 20-tenofovir

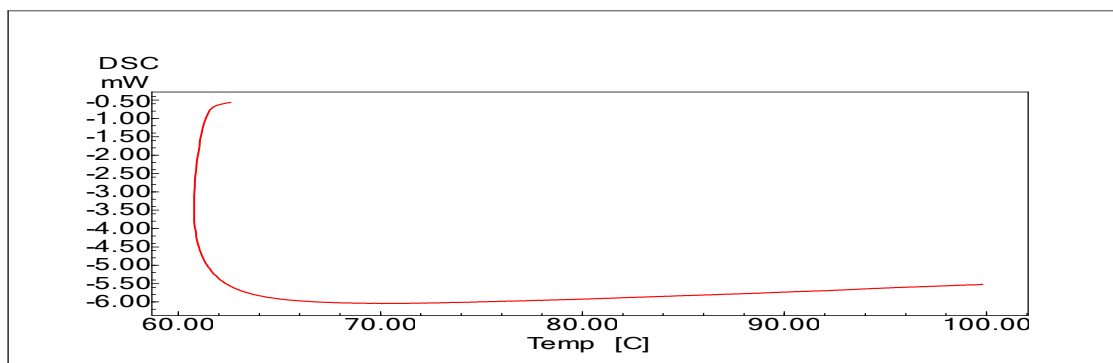
File Name: Tween 20.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date 17/03/24
Acquisition Time 09:40:53(+0200
Sample Name: Tween 20
Sample Weight: 5.500[mg]
Annotation:

— Tween 20.ta DSC



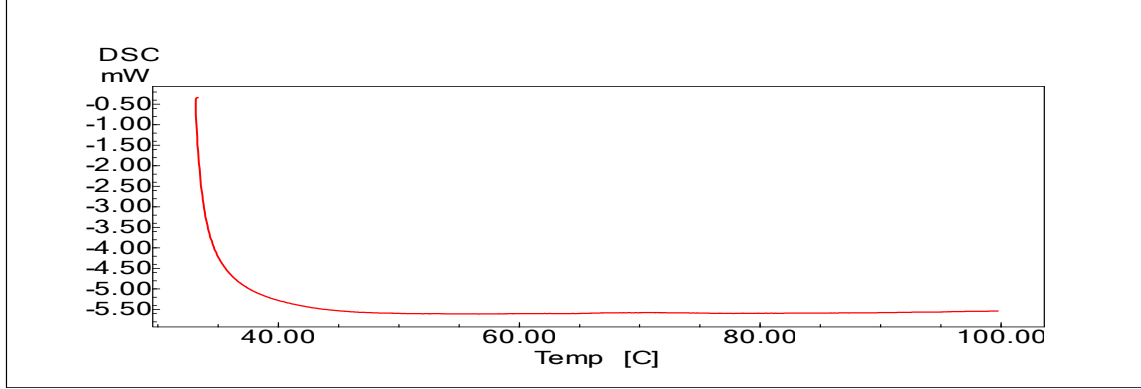
File Name: Tween 20- Tenofovir DF.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date 17/03/24
Acquisition Time 10:12:33(+0200
Sample Name: Tween 20- Tenofovir D
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

— Tween 20- Tenofovir DF.ta DSC

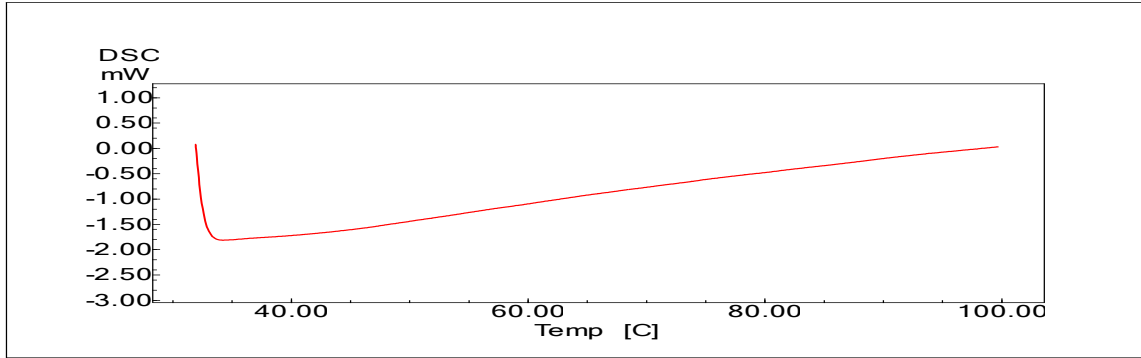


d) Cremophor RH 40, Cremophor RH 40-tenofovir

File Name: Cremophor RH 40.ta
 Detector: DSC-60
 Acquisition Date: 17/03/24
 Acquisition Time: 09:18:29(+0200)
 Sample Name: Cremophor RH 40
 Sample Weight: 5.000[mg]
 Annotation:



File Name: Cremophor Rh 40 -Tenofovir DF 30.ta
 Detector: DSC-60
 Acquisition Date: 17/03/24
 Acquisition Time: 12:15:52(+0200)
 Sample Name: Cremophor Rh 40 -Tenofovir DF 30
 Sample Weight: 2.000[mg]
 Annotation:

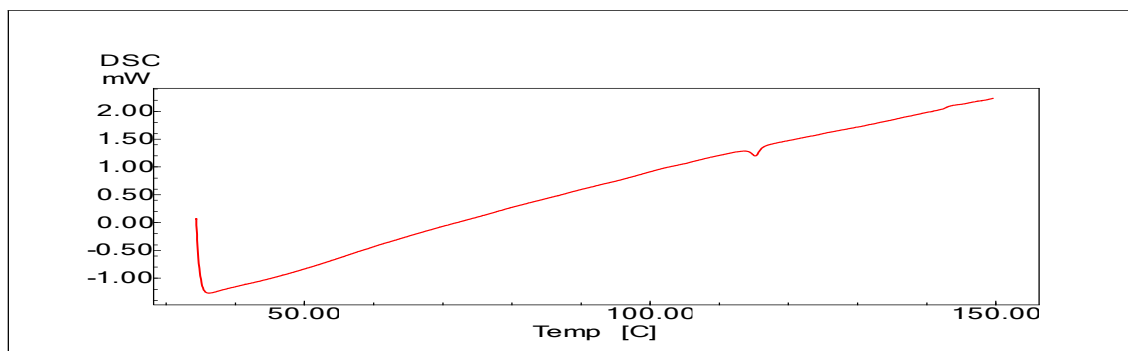


Şekil 4.9. 100°C'deki DSC termogramları a)Tenofovir, b)Oleik asit, oleik asit-tenofovir, c)Tween 20, Tween 20-tenofovir, d)Cremophor RH 40, Cremophor RH 40-tenofovir

a) Tenofovir

File Name: Tenofovir DF 150.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date: 17/03/24
Acquisition Time: 13:27:54(+0200)
Sample Name: Tenofovir DF 150
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

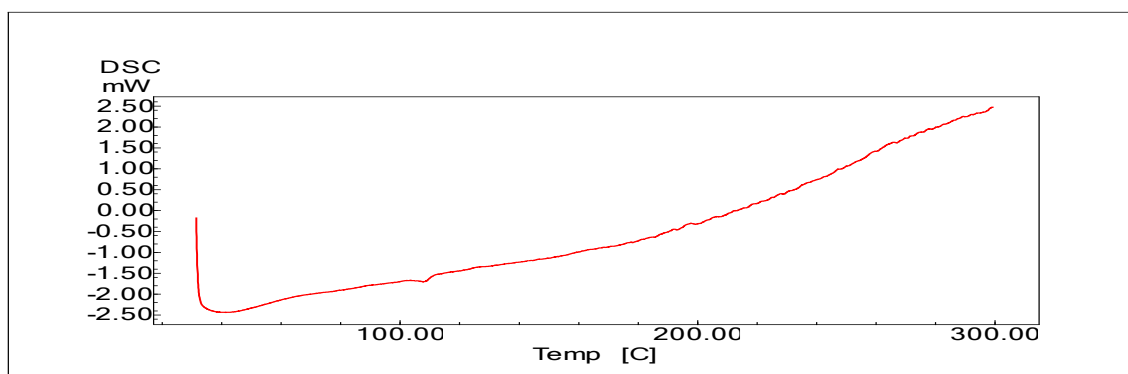
— Tenofovir DF 150.ta DSC



b) Oleik asit-tenofovir

File Name: Oleik asit -Tenofovir DF 300.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date: 17/03/24
Acquisition Time: 10:49:44(+0200)
Sample Name: Oleik asit -Tenofovir DF 300
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

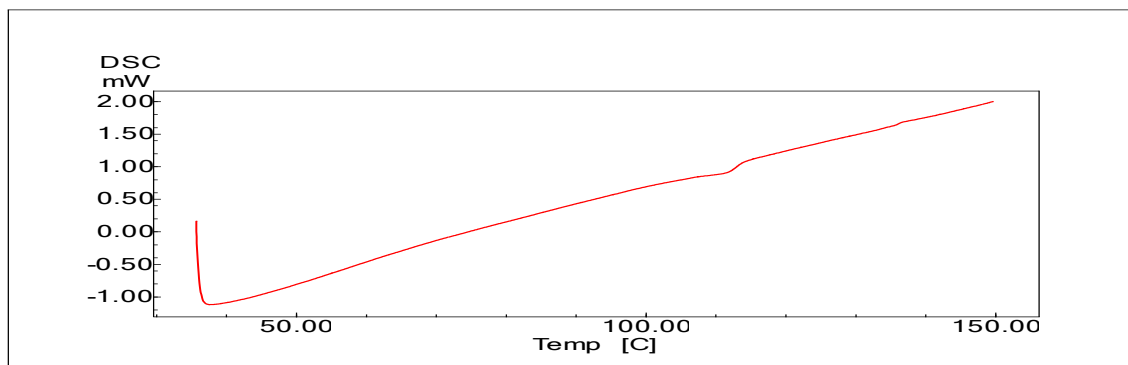
— Oleik asit -Tenofovir DF 300.ta DSC



c) Tween 20-tenofovir

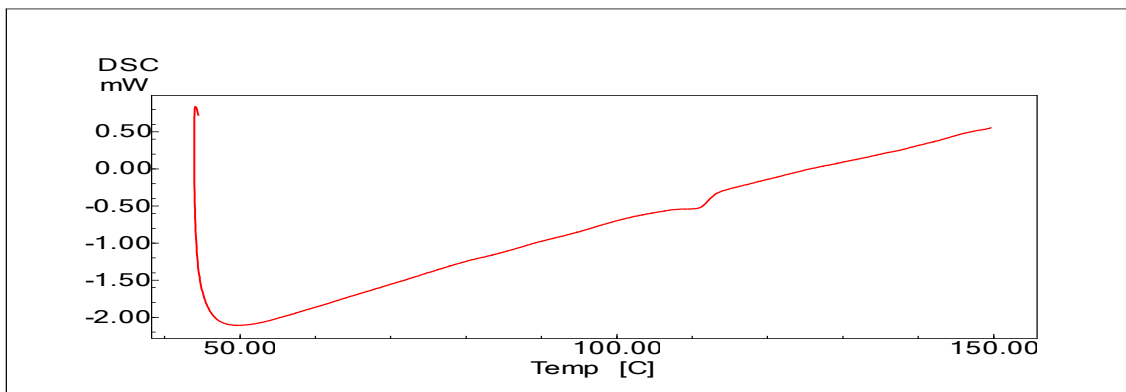
File Name: Tween 20- Tenofovir DF 150.ta
Detector: DSC-60
Acquisition Date: 17/03/24
Acquisition Time: 14:06:53(+0200)
Sample Name: Tween 20- Tenofovir DF-15
Sample Weight: 2.000[mg]
Annotation:

— Tween 20- Tenofovir DF 150.ta DSC



d) Cremophor RH40-tenofovir

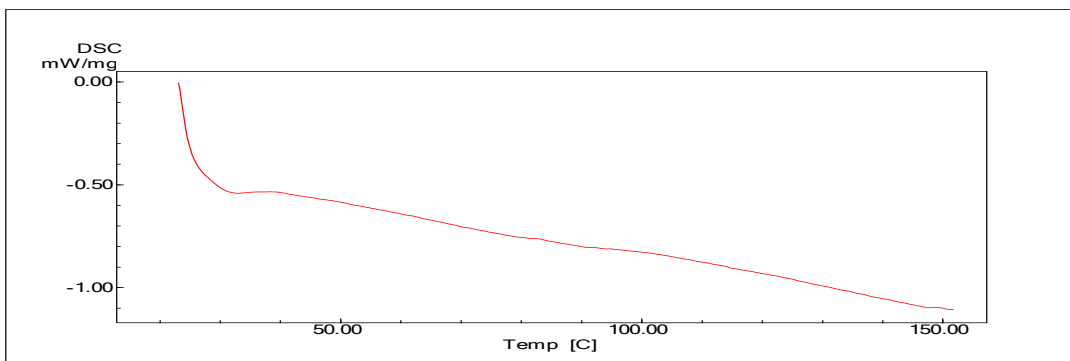
File Name: Cremophor Rh40 -Tenofovir DF150.ta
 Detector: DSC-60
 Acquisition Date 17/03/24
 Acquisition Time 12:46:45(+0200)
 Sample Name: Cremophor Rh 40 -Tenofovir DF 15
 Sample Weight: 2.000[mg]
 Annotation:



e) Imwitor 742-tenofovir

File Name: Imwitor 742_TNF.ta
 Detector: DSC-60
 Acquisition Date 02/04/12
 Acquisition Time 02:00:16(-0800)
 Sample Name: Imwitor 742_TNF
 Sample Weight: 2.000[mg]
 Annotation:

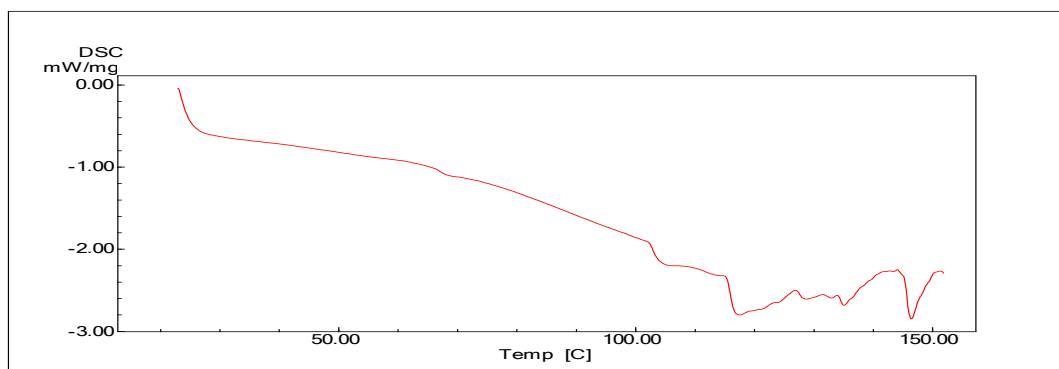
[Temp Program
 Start Temp 25.0
 Temp Rate Hold Temp Hold Time
 [C/min] [C] [min]
 10.00 150.0 0



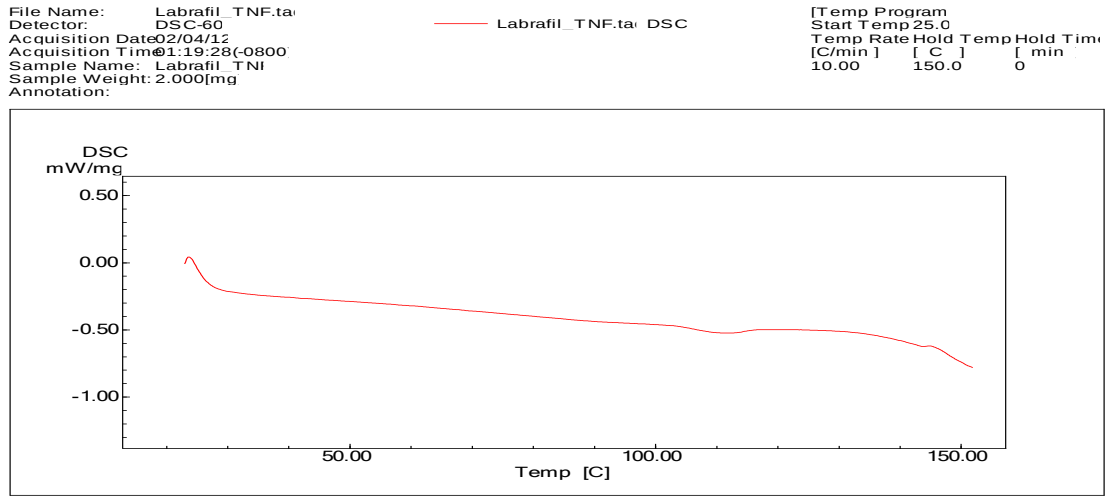
f) Propilen glikol-tenofovir

File Name: Propilen glikol_TNF.ta
 Detector: DSC-60
 Acquisition Date 02/04/12
 Acquisition Time 00:34:40(-0800)
 Sample Name: Propilen glikol_TN
 Sample Weight: 2.000[mg]
 Annotation:

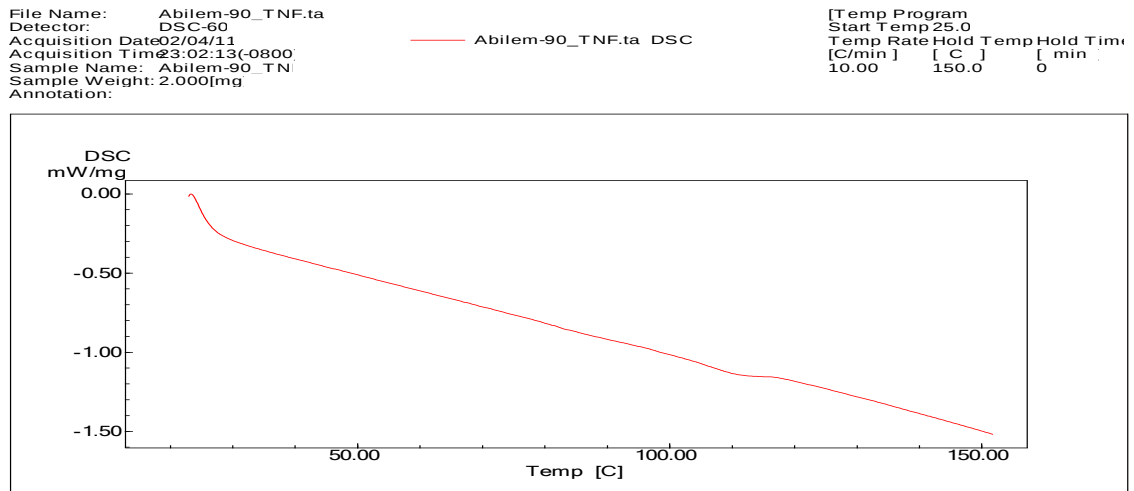
[Temp Program
 Start Temp 25.0
 Temp Rate Hold Temp Hold Time
 [C/min] [C] [min]
 10.00 150.0 0



g) Labrafil-tenofovir



h) Abil Em 90-tenofovir



Şekil 4.10. 150°C'deki DSC termogramları a)Tenofovir, b)Oleik asit-tenofovir, c)Tween 20-tenofovir, d)Cremophor RH 40-tenofovir e)İmwtitor 742-tenofovir, f)Propilen glikol-tenofovir, g)Labrafil-tenofovir, h)Abil Em 90-tenofovir

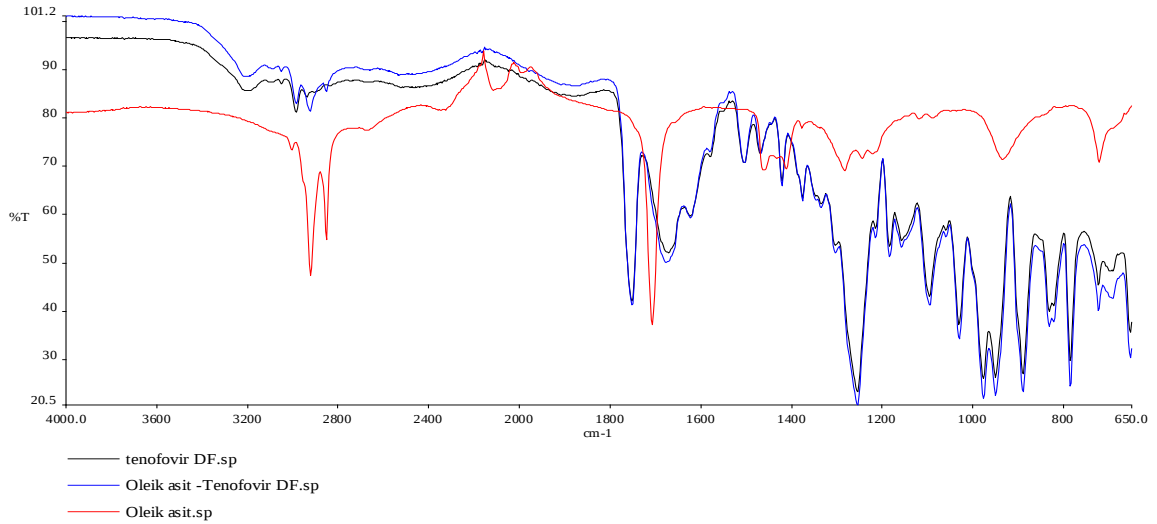
150°C sıcaklıkta yağların uçuculuğu ve yağ-tenofovir miktarındaki yağ miktarının azalması göz önünde bulundurularak termogramlar değerlendirildi. Termogramlarda formülasyon bileşenlerinin tenofovirle girişim yapacak bir etkileşimde olmadığı görüldü. Tenofovirin yağlı yapıdaki yardımcı bileşenlerle olan birebir karışımı, yağlı bileşenlerle toz tenofovirin homojen dağılmamasından dolayı, bazı termogramlarda tenofovir piki daha küçük görüldü.

4.3.2. Tenofovirin oleik asit, İmwitor 742 ve çoklu emülsiyon formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerle hazırlanan karışımlarının FT-IR analizleri

Yağların yüksek sıcaklıkta uçuculuğu ve bozunma ihtimali düşünülerek, FT-IR ile yapı analizlerinin de incelenmesine karar verildi. Tenofovirin FT-IR spektrumu incelendiğinde karakteristik pikleri, aromatik C-H ve O-H bandı $2800-3200\text{ cm}^{-1}$ 'de, NH₂- bandı $1600-1800\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmüştür (Şekil 4.11). Tenofovirin geliştirilen formülasyon bileşenleri kullanılarak yapılan FT-IR analiz spektrumlarında, tenofovirin yapısını etkileyebilecek herhangi bir girişim görülmemiştir.

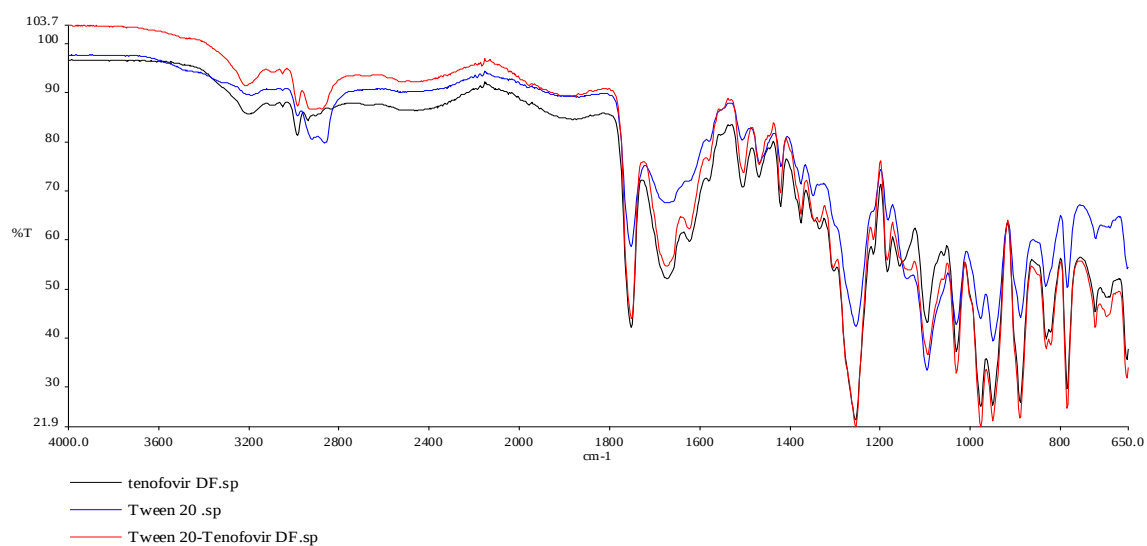
a) Tenofovir, oleik asit-tenofovir, oleik asit

Date: Thursday, March 23, 2017



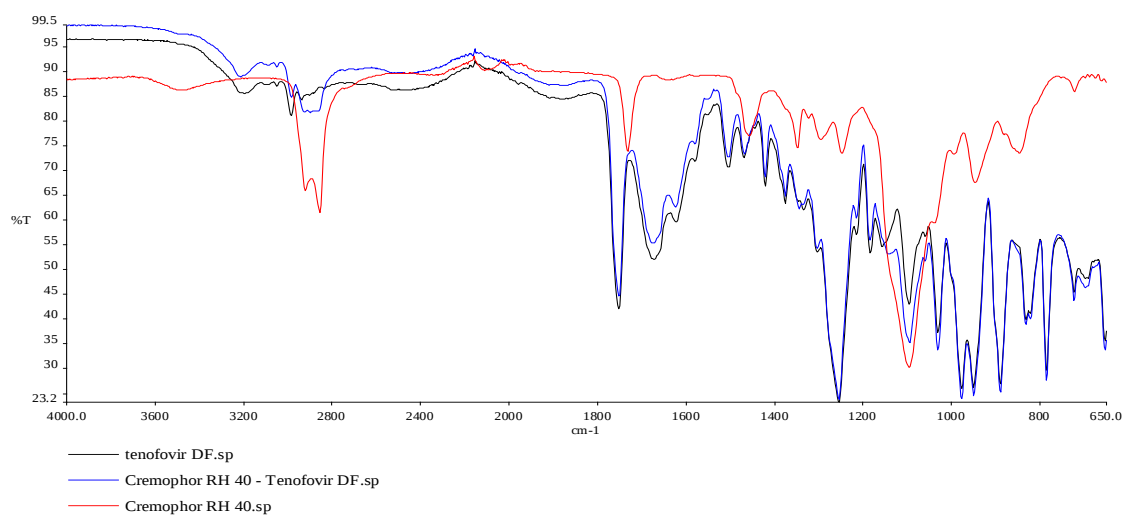
b) Tenofovir, Tween 20-tenofovir, Tween 20

Date: Thursday, March 23, 2017



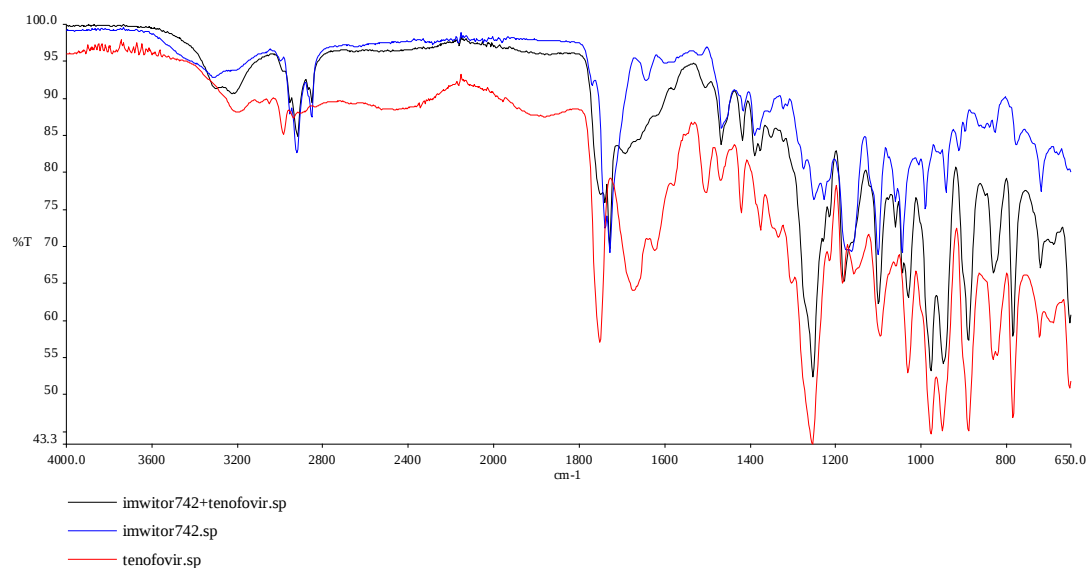
c) Tenofovir, Cremophor RH 40-tenofovir, Cremophor RH 40

Date: Thursday, March 23, 2017



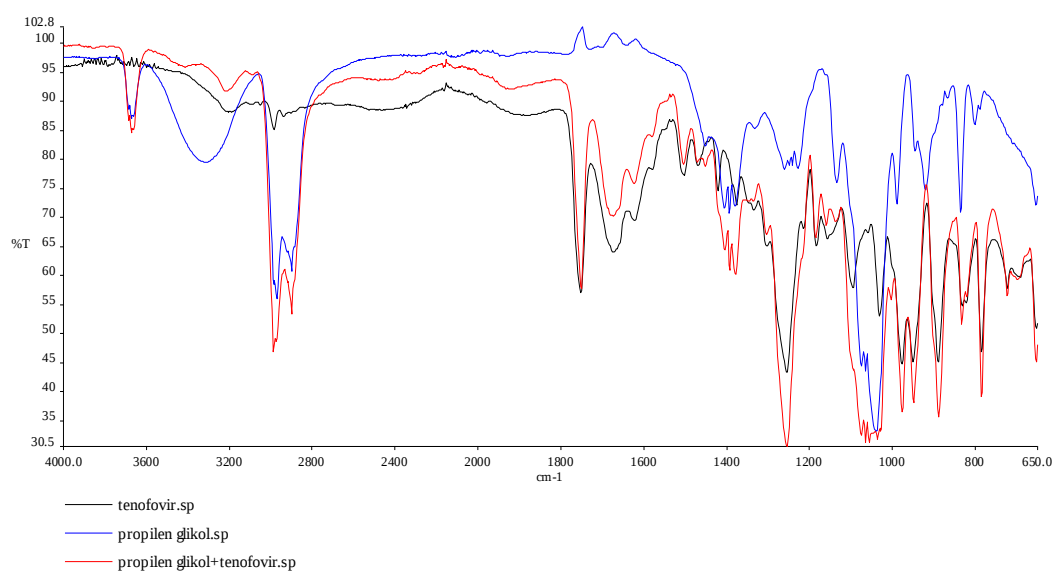
d) Tenofovir, Imwitor 742-tenofovir, Imwitor 742

Date: Thursday, January 25, 2018



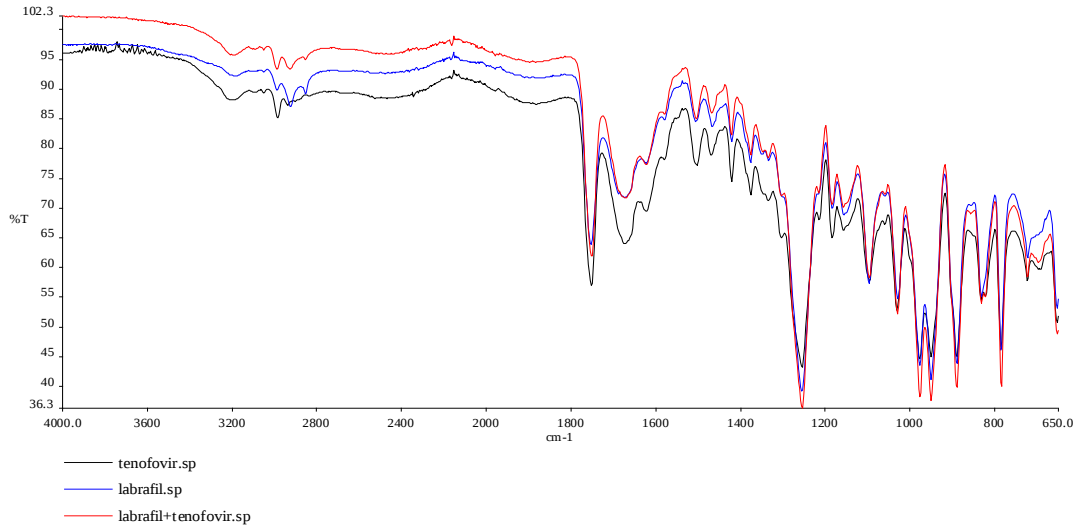
e) Tenofovir, propilen glikol-tenofovir, propilen glikol

Date: Thursday, January 25, 2018



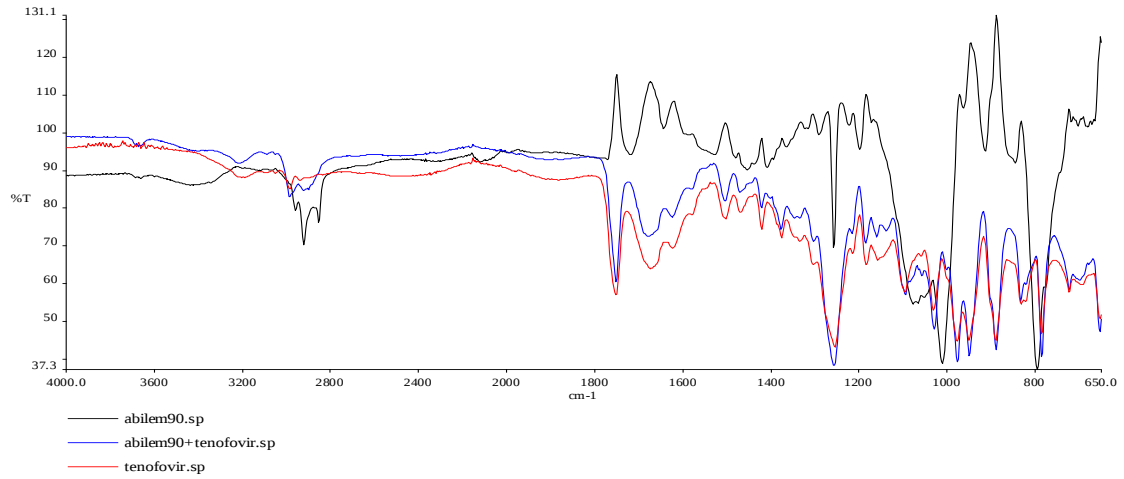
f) Tenofovir, Labrafil-tenofovir, Labrafil

Date: Thursday, January 25, 2018



g) Tenofovir, Abil Em 90-tenofovir, Abil Em 90

Date: Thursday, January 25, 2018



Şekil 4.11. Tenofovir ve formülasyon bileşenlerinin 1:1 karışımlarından elde edilen FT-IR grafikleri a)Tenofovir, oleik asit, tenofovir-oleik asit, b)Tenofovir, Tween 20, tenofovir-Tween 20, c)Tenofovir, Cremophor RH 40 tenofovir-Cremophor RH 40, d)Tenofovir, İmwitor 742, tenofovir-İmwitor 742, e)Tenofovir, propilen glikol, tenofovir-propilen glikol, f) Tenofovir, Labrafil, tenofovir-Labrafil, g)Tenofovir, Abil Em 90, tenofovir-Abil Em 90

4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları Bulguları

4.4.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi

Tenofovir biyoyararlanım sorunu göstermekte olup açlık oral biyoyararlanımı %25'dir ve optimum etki için yiyeceklerle birlikte yani tok olarak kullanılması gerekmektedir. Yağ içeriği yüksek yemek, tenofovirin AUC'sinde yaklaşık %40 ve C_{maks} 'ta %14'lük bir artışla oral biyoyararlanımını artırmıştır (Kearney ve diğerleri, 2004). Tenofovirin lipofilik yapıda olması (Rompay ve diğerleri, 2012; Spinks ve diğerleri, 2017; Gasselin ve diğerleri, 2009) SNEDDS formülasyonların geliştirilmesinin uygun olabileceğini göstermiştir.

4.4.2. Tenofovirin yağ, YEM ve YYEM'deki çözünürlük/partisyon katsayısı ve HLB bulguları

Tenofovir içeren SNEDDS formülasyonları geliştirmek ve yükleme kapasitesini artırmak amacıyla çeşitli yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerdeki tenofovirin çözünürlüğü tespit edildi ve sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterildi. Ayrıca tenofovirin yağ/su arasındaki ilgisini anlamak amacıyla çeşitli yağlarda partisyon katsayısı da hesaplandı. Tenofovirin çözünürlüğü ve partisyon katsayısı en yüksek oleik asit ve İmwitor 742 yağlarında bulundu.

Çizelge 4.9. Tenofovirin 25°C'de orta ve uzun zincirli yağlar ve distile su arasındaki ortalama partisyon katsayısı (A) ve yağlar (B), YEM-YYEM (C) çözünürlük ve HLB değerlerine ait bulgular (n=3)

A)

Yağ tipi	Yağlar	Partisyon katsayısı
Orta zincirli yağ asidi	Miglyol 818	0,00
	Labrafac	0,250±0,010
	Miglyol 812	0,00
	Miglyol 840	0,00
	İmwitor 742	3,83±0,02
	İmwitor 988	3,53±0,01
Uzun zincirli yağ asidi	Üzüm çekirdeği yağı	0,26±0,02
	Susam yağı	0,05±0,02
	Nar çekirdeği yağı	0,15±0,02
	Mısır yağı	0,09±0,03
	Çörek otu yağı	Hesaplanamadı
	Maisine 35-1	Hesaplanamadı
	Oleik asit	6,70±0,06

Çizelge 4.9. (devam) Tenofovirin 25°C'de orta ve uzun zincirli yağlar ve distile su arasındaki ortalama partiyon katsayısı (A) ve yağlar (B), YEM-YYEM (C) çözünürlük ve HLB değerlerine ait bulgular (n=3)

B)

Yağ tipi	Yağlar	Çözünürlük (mg/mL)	HLB
Orta zincirli yağ asidi	Miglyol 818	0,016±0,002	10
	Labrafac	0,25±0,01	3-4
	Miglyol 812	0,770±0,019	5
	Miglyol 840	0,460±0,010	5
	İmwitor 742	64,400± 0,007	3-4
	İmwitor 988	48,300±0,005	3-4
	İmwitor 948	0,96±0,01	3-4
	Capmul MCM	48,300±0,005	4,6
	Captex 355	0,430±0,009	4-5
Uzun zincirli yağ asidi	Üzüm çekirdeği yağı	15,1±0,4	7
	Susam yağı	3,30±0,02	7
	Nar çekirdeği yağı	7,51±0,02	7
	Mısır yağı	2,10±0,02	1,2
	Çörek otu yağı	2,17±0,01	4-5
	Maisine 35-1	13,60±0,01	4
	Oleik asit	113±0,004	1

C)

Yüzey Etkin Madde-Yardımcı Yüzey Etkin Madde		Çözünürlük (mg/mL)	HLB
Yüzey Etkin Madde	Cremophor RH 40	18,100±0,004	15
	Cremophor EL	126±0,005	12-14
	Labrafil	105± 0,060	6-7
	Labrasol	87±0,010	14
	Abil Em 90	84±0,005	5
Yardımcı Yüzey Etkin Madde	Tween 20	52,400±0,006	16,7
	Tween 80	32,10±0,89	15
	PEG 400	122±1,35	9,7
	Propilen glikol	173±0,020	11,6
	Monopropilen glikol	184±0,050	11-12
	Transcutol P	33,60±0,03	4,2
	Gelucire 44	133±0,006	14
	Gliserol	113±0,004	12-14

4.4.3. Yağ, YEM ve YYEM seçilmesi

Tenofovirin en fazla çözündüğü uzun zincirli yağ asidi olarak oleik asit, orta zincirli yağ asidi olarak da İmwitor 742 tespit edildi ve bu yağlar yağ fazı olarak seçildi. YEM ve YYEM seçiminde, bileşenlerin tenofovirdeki çözünürlükleri ve HLB değerleri dikkate alınarak Cremophor RH 40 ve Tween 20 olarak seçildi (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. SNEDDS formülasyonların bileşenleri ve HLB değerleri

Formülasyon Tipi	Yağ asidi	YEM	YYEM
Uzun zincirli	Oleik asit (1)	Cremophor RH 40 (15)	Tween 20 (16,7)
Orta zincirli	İmwitor 742 (3-4)	Cremophor RH 40 (15)	Tween 20 (16,7)

4.4.4. Faz diyagramları

Yağ, YEM ve YYEM'nin karışabilirliğini saptamak amacıyla, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 oranlarında YEM:YYEM karıştırılarak yağ ile titre edildi. Kaba emülsiyonların en fazla yağı aldığı YEM:YYEM oranı bulundu. Bu aşama Km oranının (YEM:YYEM) belirlenmesine yardımcı oldu. Oleik asit ve İmwitor 742 formülasyonu için, Km oranı 1:4 olarak belirlendi. Ayrıca 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 oranlarda YEM:YYEM (1:4) ve yağ kullanılarak oluşturulan kaba emülsiyonlar su ile karıştırılarak, emülsiyonların su alma kapasitesi de incelendi (Çizelge 4.11-4.12).

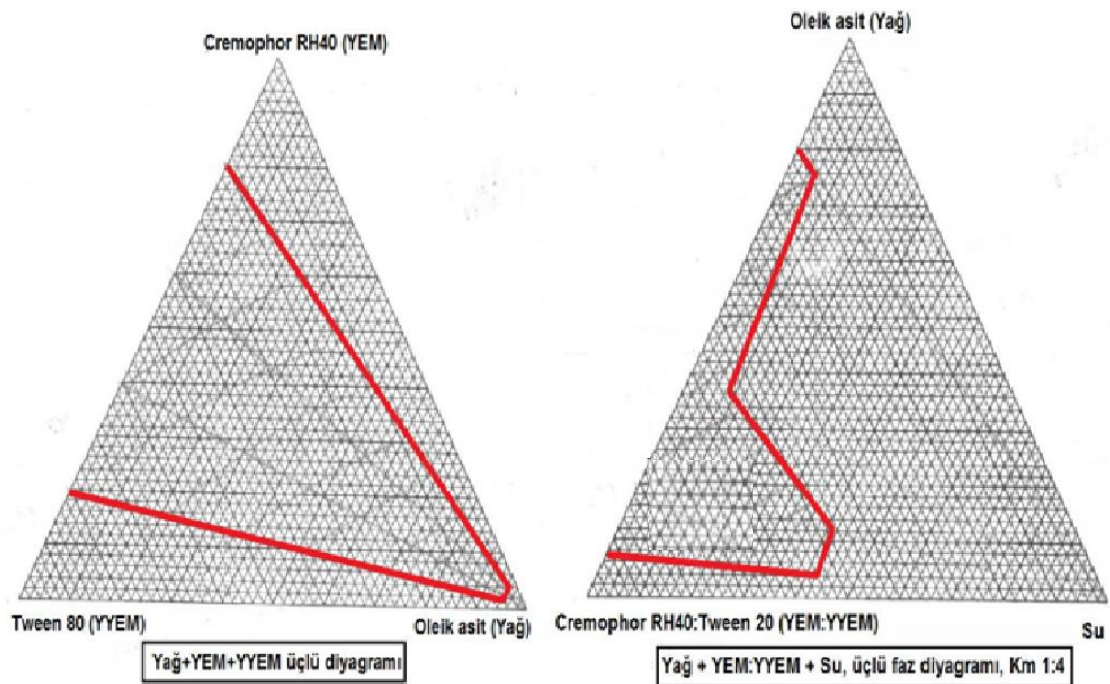
Titrasyon sonucunda elde edilen % verilerle üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Kaba emülsiyon ve nanoemülsiyon bölgeleri belirlendi (Şekil 4.12-4.13). Bu çalışmaların amacı yağ, YEM ve YYEM'in nanoemülsiyon oluşturma yüzdelerinin belirlemek ve belirlenen tüm bu alanı deney tasarım modelinde kullanmaktır.

Çizelge 4.11. Nanoemülsiyonların Yağ-YEM-YYEM ve su yüzdeleri gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (Km 1:4)

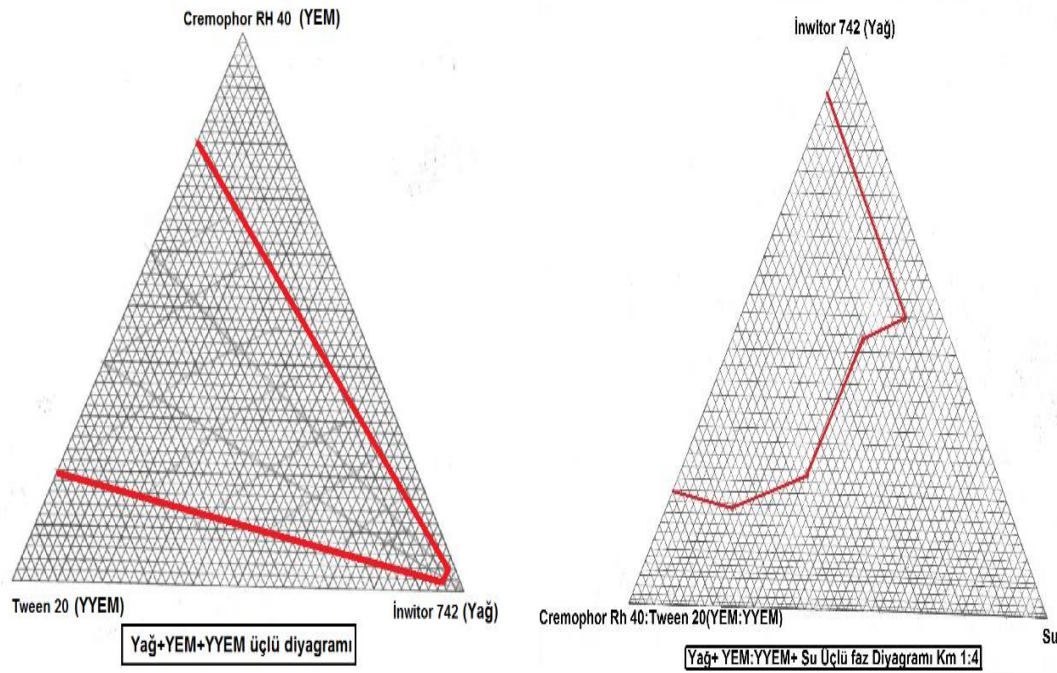
%yağ (oleik asit)	%YEM:YYEM	%distile su
46,3	46,3	7,4
36,4	54,5	9,1
24,2	56,4	19,4
15,6	62,5	21,9
7,3	66,2	26,5

Çizelge 4.12. Nanoemülsiyonların Yağ-YEM-YYEM ve su yüzdeleri gösteren üçgen faz diyagramına ait veriler (Km 1:4)

%yağ (İmwitor 742)	%YEM:YYEM	%distile su
63,5	15,9	20,6
46,2	30,7	23,1
21,1	31,5	47,4
9,5	38,1	52,4



Şekil 4.12. Oleik asite ait üçlü faz diyagramları (Km 1:4)



Şekil 4.13. İmwitor 742'ye ait üçlü faz diyagramları (Km 1:4)

Çalışmada oleik asit içeren formülasyon F1, İmwitor 742 içeren formülasyon F2 ve çoklu emülsiyon da F3 şeklinde isimlendirilmiştir.

4.4.5. Kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonun bulunması

Yüzey etkin madde ve yardımcı maddelerin birden fazla olması durumunda oluşabilecek yüzlerce formülasyonun arasından daha kısa sürede, daha etkili optimum formülasyonu seçmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de kalite tasarımı yaklaşımı ve deney tasarım modelidir. Üçgen faz diyagramı nanoemülsiyon oluşturma alanındaki her noktayı rastgele seçimler ve ölçümlerle denemek zor olacağı ve uzun zaman alacağı için deney tasarım modeli oluşturuldu.

4.4.6. F1 formülasyonu için deney tasarımı

F1 formülasyonun deney tasarımını oluşturan bağımsız değişkenlerin faktör seviyelerinden hareketle 81 adet formülasyon hazırlandı. Formülasyonların ortalama damlacık büyüklüğü ve PDİ verileri Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. F1 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları

Formülasyon	Faktör 1 Yağ (mL)	Faktör 2 YEM (mL)	Faktör 3 YYEM (mL)	Damlacık Boyutu (nm)	PDI
1.	2	1,4	5,6	212,967	0,282
2.	3	1,8	5,6	325,770	0,522
3.	2	1,6	6,4	194,833	0,269
4.	3	1,4	7,2	211,100	0,339
5.	1	1,4	5,6	10,490	0,176
6.	3	1,6	6,4	224,220	0,472
7.	1	1,6	5,6	10,300	0,166
8.	3	1,8	5,6	333,830	0,549
9.	3	1,8	7,2	219,522	0,311
10.	2	1,6	7,2	144,300	0,241
11.	1	1,6	7,2	9,553	0,098
12.	1	1,4	6,4	10,350	0,112
13.	1	1,8	5,6	8,840	0,092
14.	2	1,8	7,2	185,967	0,276
15.	2	1,8	5,6	206,133	0,276
16.	1	1,4	6,4	10,800	0,115
17.	3	1,6	5,6	265,620	0,488
18.	2	1,4	7,2	173,967	0,276
19.	1	1,8	6,4	12,133	0,242
20.	1	1,8	7,2	9,693	0,082
21.	3	1,4	5,6	340,367	0,521
22.	1	1,6	7,2	9,376	0,073
23.	2	1,4	7,2	182,767	0,240
24.	1	1,8	6,4	11,833	0,236
25.	2	1,6	6,4	191,933	0,260
26.	2	1,4	7,2	181,000	0,258
27.	2	1,8	7,2	177,867	0,264
28.	2	1,4	5,6	201,867	0,295
29.	2	1,6	7,2	160,830	0,242
30.	3	1,8	7,2	212,960	0,312
31.	2	1,4	6,4	219,360	0,278
32.	1	1,4	5,6	10,390	0,178
33.	2	1,4	5,6	201,567	0,305
34.	3	1,4	6,4	213,667	0,478
35.	3	1,6	6,4	221,230	0,460
36.	3	1,8	6,4	223,700	0,474
37.	1	1,6	7,2	9,394	0,081
38.	3	1,4	5,6	342,633	0,544
39.	1	1,6	6,4	9,186	0,069
40.	2	1,8	6,4	187,000	0,259
41.	3	1,8	7,2	215,900	0,315

Çizelge 4.13. (devam) F1 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları

42.	3	1,6	7,2	204,433	0,313
43.	2	1,4	6,4	214,100	0,270
44.	1	1,4	7,2	9,714	0,113
45.	1	1,8	6,4	11,473	0,222
46.	3	1,4	6,4	213,067	0,482
47.	3	1,6	5,6	267,820	0,490
48.	1	1,8	5,6	8,950	0,102
49.	2	1,8	5,6	206,367	0,286
50.	3	1,4	7,2	212,333	0,305
51.	2	1,6	6,4	186,367	0,275
52.	3	1,6	6,4	224,530	0,304
53.	3	1,6	5,6	267,255	0,498
54.	2	1,8	6,4	183,567	0,234
55.	1	1,4	7,2	9,496	0,097
56.	2	1,8	5,6	194,433	0,313
57.	3	1,4	5,6	342,300	0,533
58.	3	1,4	6,4	210,900	0,478
59.	1	1,6	6,4	8,856	0,077
60.	2	1,6	5,6	215,967	0,287
61.	3	1,8	6,4	223,533	0,470
62.	1	1,8	7,2	9,246	0,090
63.	3	1,4	7,2	211,000	0,321
64.	1	1,6	6,4	8,714	0,076
65.	3	1,6	7,2	188,833	0,311
66.	2	1,6	5,6	207,400	0,289
67.	1	1,4	6,4	11,200	0,119
68.	1	1,4	7,2	9,193	0,110
69.	3	1,8	5,6	335,700	0,556
70.	2	1,6	7,2	159,660	0,245
71.	2	1,8	7,2	177,567	0,261
72.	3	1,6	7,2	185,433	0,308
73.	1	1,8	7,2	9,193	0,106
74.	2	1,4	6,4	206,167	0,273
75.	2	1,8	6,4	181,667	0,296
76.	1	1,4	5,6	10,183	0,155
77.	1	1,6	5,6	11,5	0,123
78.	1	1,6	5,6	10,7	0,124
79.	3	1,8	6,4	227,367	0,484
80.	2	1,6	5,6	213,767	0,292
81.	1	1,8	5,6	9,050	0,089

Çizelge 4.14. F1 formülasyonu için faktöriyel deney tasarım modeli ve yanıtları

Faktör	İsim	Birim	Minimum	Ort.	Maksimum	Standart Sapma		
A	Oleik asit	mL	1,0	2,0	3,0	0,822		
B	Cremophor RH 40	mL	1,4	1,6	1,8	0,164		
C	Tween 20	mL	5,6	6,4	7,2	0,657		
Yanıtlar	İsim	Birim	Minimum	Ort.	Maksimum	Standart Sapma	Verilerin Dönüştürülmesi	Model
Y1	Damlacık Büyüklüğü	nm	8,714	39,320	342,633	106,673	Logaritmik	Kübik
Y2	PDİ		0,069	8,058	0,556	0,141	Güç dönüşümü	Kübik

Yağ asidi, YEM ve YYEM oranları dikkate alınarak 81 adet formülasyona ait damlacık boyutu ve PDİ sonuç verileri normal dağılıma getirildi. Damlacık boyutu verileri logaritmik, PDİ verileri de güç dönüşümü modeliyle dönüştürüldü (Çizelge 4.14-4.15).

Çizelge 4.15. F1 formülasyonu için damlacık boyutu ve PDİ yanıtları verilerinin dönüştürülmesi (R^2 değerleri)

	Damlacık Büyüklüğü		PDİ	
Model	Ayarlanmış R^2	Hesaplanmış R^2	Ayarlanmış R^2	Hesaplanmış R^2
Dönüştürülme yapılmadı	0,974	0,970	0,926	0,916
Karekök	0,991	0,990	0,911	0,898
Logaritmik	0,997	0,996	0,881	0,863
Ters karekök	0,995	0,994	0,837	0,813
Ters	0,986	0,984	0,784	0,754
Güç dönüşümü	0,974	0,970	0,926	0,911

Geliştirilen formülasyonların bağımsız değişkenlerinin miktarları ile polisipersite indeksi ve damlacık boyutu sonuçları arasındaki etkileşimini açıklamak için, polidispersite ve damlacık boyutu polinom modelleri oluşturuldu.

Damlacık büyüklüğü polinom denklemi:

$$y = +5,2 + 1,6 \cdot A - 9,523E-003 \cdot B - 0,11 \cdot C + 9,374E-003 \cdot AB - 0,088 \cdot AC + 0,018 \cdot BC - 1,36 \cdot A^2 + 0,064 \cdot B^2 + 0,01 \cdot C^2 - 0,011 \cdot ABC$$

Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda A değeri olan yağ asidi miktarı arttıkça damlacık boyutu artarken, B değeri YEM miktarı ve C değeri YYEM miktarı arttıkça damlacık boyutu azalmaktadır. Çizelge 4.16'daki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca yağ asidi miktarı (A) ve Tween 20 (C) miktarı damlacık boyutunu etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Çizelge 4.16'ya göre ikili etkileşimler anlamlı değildir.

Çizelge 4.16. F1 formülasyonu için damlacık boyutu modeli analiz tablosu

Kaynak	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Model	2165,980	10	216,600	253,860	<0,0001
A-Yağ_miktar	1808,890	1	1808,890	2120,070	<0,0001
B-Crem_miktar	0,026	1	0,026	0,031	0,861
C-Tween20_miktar	20,30	1	20,300	23,790	<0,0001
AB	10,890	1	10,890	12,770	0,001
AC	0,100	1	0,100	0,120	0,731
BC	0,750	1	0,750	0,870	0,353
A ²	321,460	1	321,460	376,760	<0,0001
B ²	0,870	1	0,870	1,010	0,317
C ²	0,700	1	0,700	0,820	0,368
ABC	2,000	1	2,000	2,340	0,131

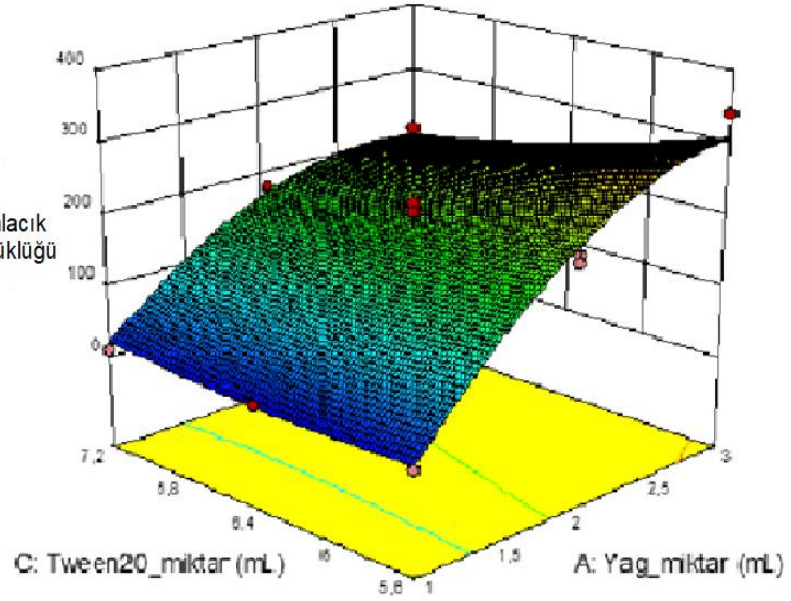
Cremophor RH 40'ın 1,4 mL olarak sabit tutulduğu Şekil 4.14'deki kontur ve yüzey grafiğinde, yağ miktarının azalması ve Tween 20 miktarının artması damlacık boyutunu küçültmüştür.

Design-Expert® Software

342,633
8,714

X1 = A: Yag_miktar
X2 = C: Tween20_miktar

Actual Factor
B: Crem_miktar = 1,4

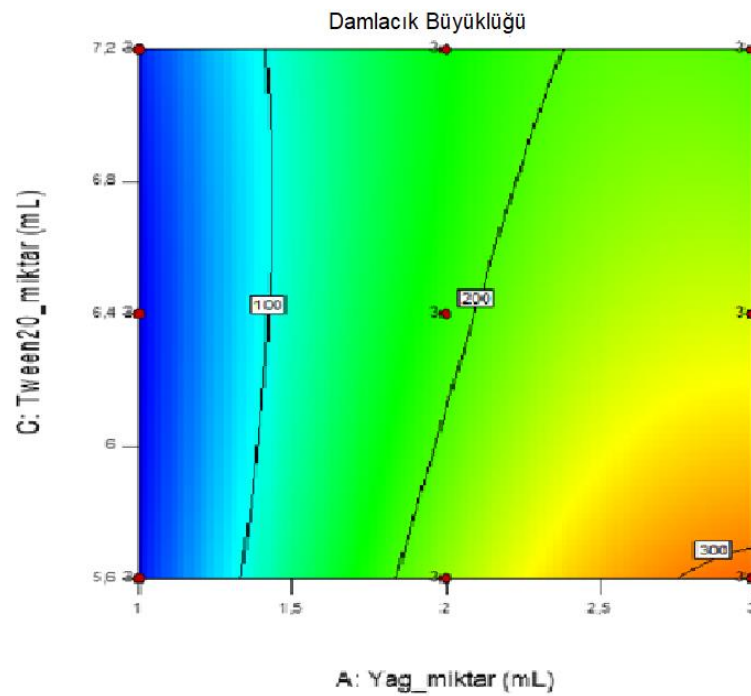
Damlacık
Büyüküğü

Design-Expert® Software

342,633
8,714

X1 = A: Yag_miktar
X2 = C: Tween20_miktar

Actual Factor
B: Crem_miktar = 1,4



Şekil 4.14. F1 formülasyonuna ait bileşen miktarlarının damlacık boyutu üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri

PDİ polinom denklemi:

$$y = +0,27 + 0,15 \cdot A + 1,222E-003 \cdot B - 0,047 \cdot C - 2,611E-003 \cdot AB - 0,042 \cdot AC + 4,500E-003 \cdot BC + 5,130E-003 \cdot A^2 + 0,028 \cdot B^2 - 0,019 \cdot C^2 - 1,000E-002 \cdot ABC$$

Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda A değeri olan yağ asidi miktarı arttıkça polidispersite indeksi artarken, B değeri YEM miktarı ve C değeri YYEM miktarı arttıkça polidispersite indeksi azalmaktadır. Çizelge 4.17'deki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yağ asidi miktarı (A) ve Tween 20 (C) miktarı polidispersite indeksini etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Ayrıca modelde A-C etkileşimi polidispersite indeksi açısından anlamlı bulunmaktadır. Yağ miktarının her bir seviyesinde kullanılan Tween 20 miktarı polidispersite indeksi üzerine anlamlı değişim sağlamaktadır.

Çizelge 4.17. F1 formülasyonu için PDİ analiz tablosu

Kaynak	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob >F
Model	1,49	10	0,15	102,28	<0,0001
A-Yağ_miktar	1,28	1	1,28	879,90	<0,0001
B-Crem_miktar	8,067E-005	1	8,067E-005	0,055	0,8145
C-Tween20_miktar	0,12	1	0,12	82,30	<0,0001
AB	2,454E-004	1	2,454E-004	0,17	0,6825
AC	0,063	1	0,063	43,58	<0,0001
BC	7,290E-004	1	7,290E-004	0,50	0,4814
A ²	4,736E-004	1	4,736E-004	0,33	0,5701
B ²	0,014	1	0,014	9,67	0,0027

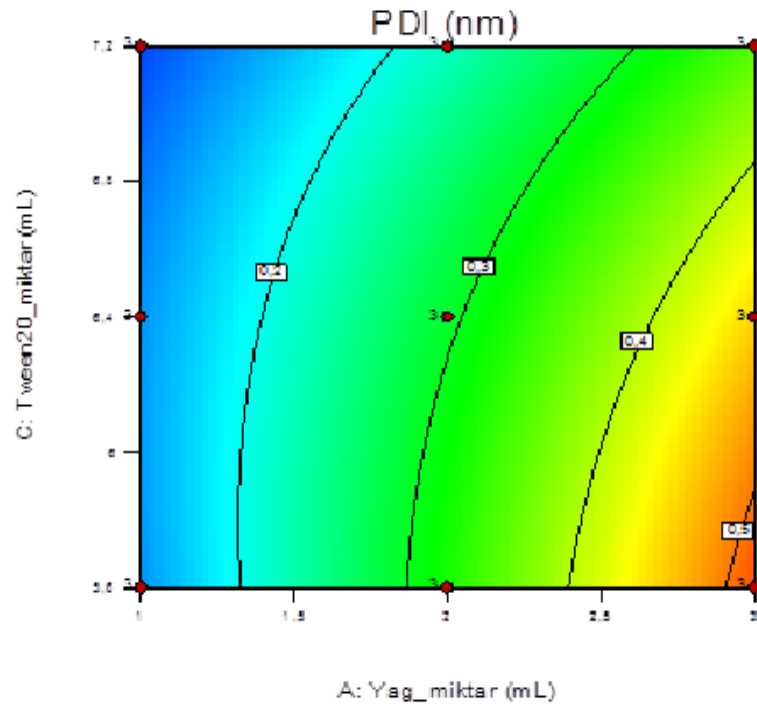
Cremophor RH 40'ın 1,4 mL olarak sabit tutulduğu Şekil 4.15'deki kontur ve yüzey grafiğinde ise yağ miktarının azalması ve Tween 20 miktarının artması polidispersite indeksini küçültmüştür.

Design-Expert® Software



X1 = A: Yag_miktar
X2 = C: Tween20_miktar

B: Crem_miktar = 1,4

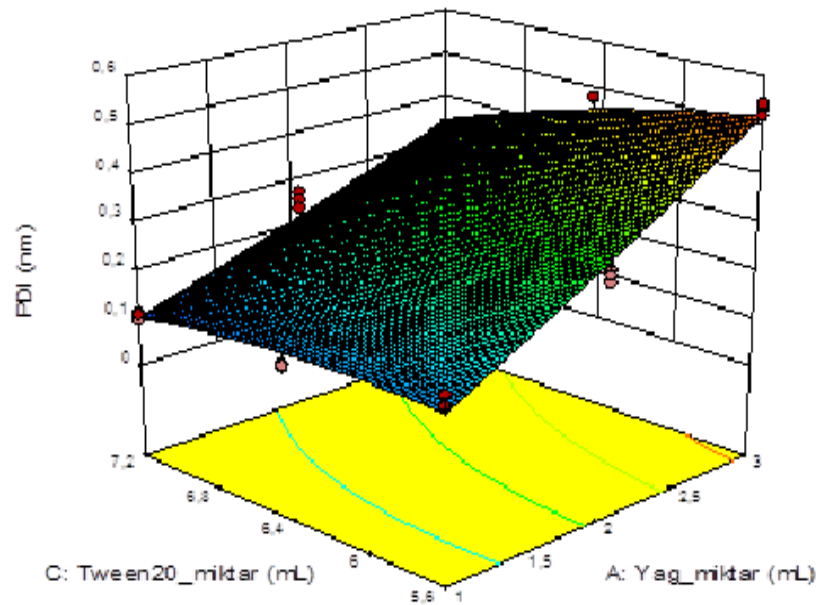


Design-Expert® Software



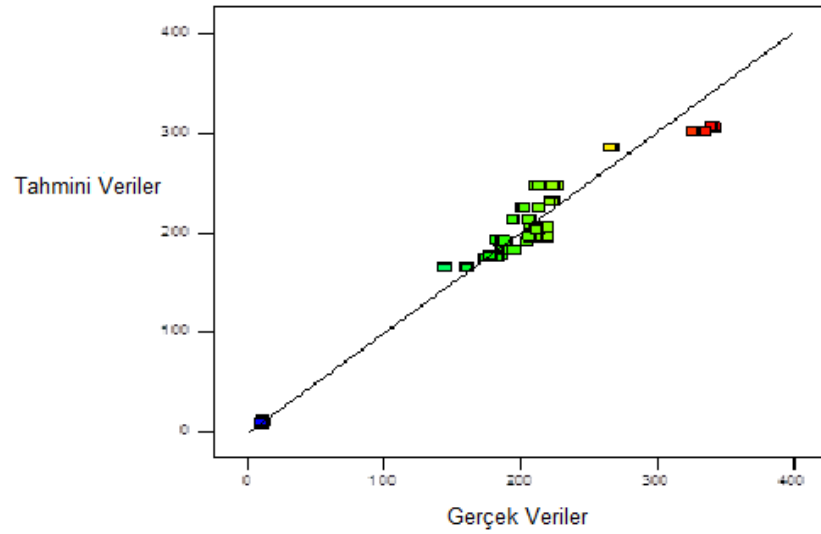
X1 = A: Yag_miktar
X2 = C: Tween20_miktar

B: Crem_miktar = 1,4

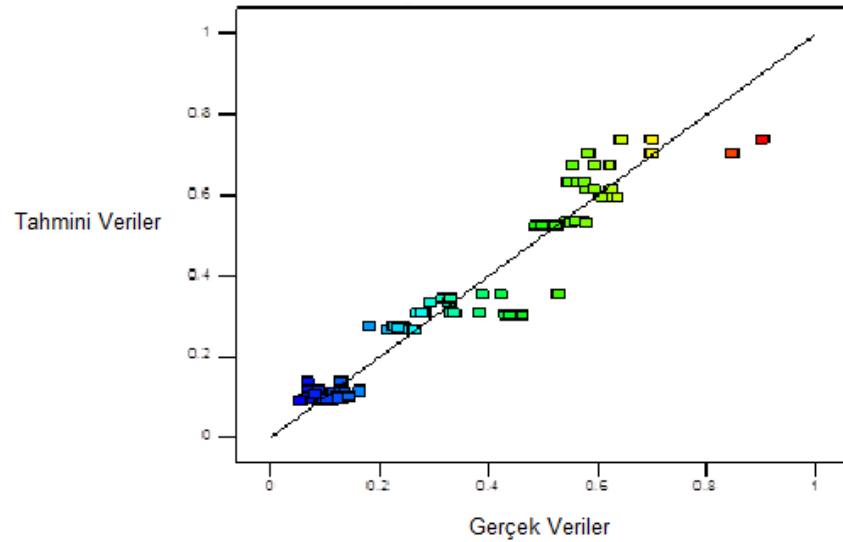


Şekil 4.15. F1 formülasyonuna ait bileşen miktarların PDI üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri

Design-Expert® Software

Damlacık Boyutu R²: 0.950:342,633
8,714

Design-Expert® Software

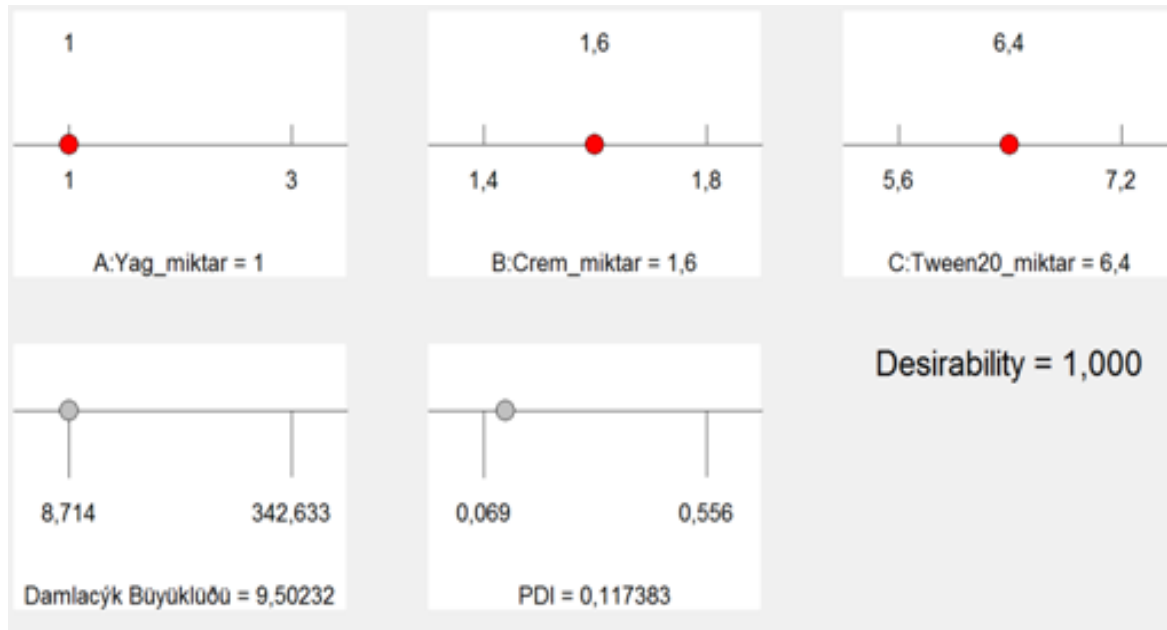
Polidispersite İndeksi R²:0,903
0,055

Şekil 4.16. F1 formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi deney verileri ile model sonucu oluşan tahmini verilerin karşılaştırılması

Damlacık büyüklüğü ve PDİ deney verileri ile matematiksel model sonucunda elde edilen tahmini veriler arasındaki ilişkinin korelasyon grafiği Şekil 4.16'da görülmektedir. 100 nm altındaki formülasyonlarda (10 nm) gerçek veriler ile tahmini değerler çok yakın iken, 100 nm üzerinde deney verileri ile tahmini veriler arasındaki ilişki azalmaktadır. PDİ ve damlacık boyutu verileri 100 nm altındaki

formülasyonlarda gerçek veriler ile model sonucu oluşan veriler yakın ve anlamlı çıkmıştır.

Geliştirilecek SNEDDS formülasyonun hedeflenen karakterizasyon özelliklerinin, damlacık boyutu $DB < 100\text{nm}$ ve polispersite indeksi ise $0 < PDI < 0,1$ olması amaçlanmaktadır. Şekil 4.17’de verilen model sonucu belirlenen yağ, solvent ve kosolvent miktarları ve formülasyonun karakterizasyon özellikleri ve Çizelge 4.18’de formülasyonun deney şartlarında, 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri olması gereken sınırlar arasında yer almaktadır.



Şekil 4.17. Hedef formülasyon bileşimi ve karakterizasyon özellikleri

Çizelge 4.18. Deneysel olarak hedef formülasyonun %95 güven aralığında beklenen karakterizasyon bulguları

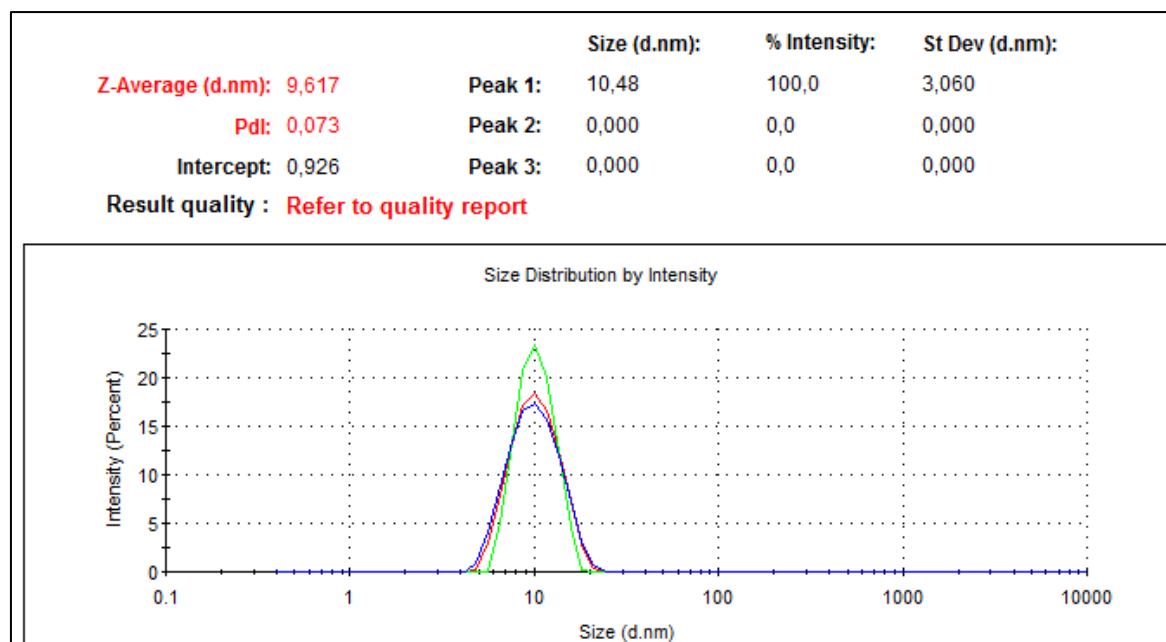
Yanıt	Mean	Median	Std Sapma	n	%95 PI	%95 PI
Damlacık Büyüklüğü (nm)	9,50232	9,46744	0,81421	1	7,92012	11,31710
PDI	0,11738	0,11738	0,03815	1	0,03808	0,19668

Şekil 4.18’de seçilen formülasyon, matematiksel model sonucu 2 yönlü %95 güven aralığı analizi sonucundaki 9,50232 damlacık boyutu değeri deneysel ortamda $7,92012 < DB < 11,31710$ arasında olması gerekirken, 0,11738 PDI sonucu da $0,03808 < PDI < 0,19668$ arasında olmalıdır (Çizelge 4.18).

Seçilen formülasyonun deney sonucu oluşan damlacık boyutu ve PDİ sonuçları (izelge 4.19, şekil 4.18) %95 güven aralığında istenilen aralıkta çıkmış ve hedef formülasyon belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Deneyssel olarak hedef formülasyonun karakterizasyon bulguları (n=3, ort±SS)

Damlacık boyutu (nm)	PDİ
9,64±0,04	0,085±0,012



şekil 4.18. Hedef formülasyona ait damlacık boyutu ve PDİ zellikleri (n=3)

4.4.7. F2 formülasyonu için deney tasarımı

F2 formülasyonun deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin faktör seviyelerinden hareketle yağ asidi, YEM ve YYEM içeren 81 adet formülasyon hazırlandı (izelge 4.20). Sonuç formülasyonlara 250 mL su eklenerek nanoemülsiyonlar oluşturuldu. Hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutu ve polidispersite indeksleri Malvern Zetasizer Nano ZS ile 25±0,5°C sıcaklıkta ölçüldü. Formülasyonların ortalama damlacık büyüklüğü ve PDİ verileri izelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. F2 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları

Formülasyon	Faktör 1 Yağ (mL)	Faktör 2 YEM (mL)	Faktör 3 YYEM (mL)	Damlacık Boyutu (nm)	PDİ
1.	2,5	0,8	3,2	222,433	0,524
2.	2,5	0,8	2	304,500	0,677
3.	0,5	0,65	2,6	8,414	0,082
4.	1,5	0,8	3,2	137,900	0,216
5.	0,5	0,5	3,2	9,204	0,144
6.	2,5	0,65	2	290,500	0,700
7.	1,5	0,5	2	159,233	0,295
8.	0,5	0,5	2	9,466	0,110
9.	2,5	0,5	3,2	266,433	0,560
10.	0,5	0,65	2,6	8,340	0,082
11.	1,5	0,8	3,2	144,100	0,263
12.	0,5	0,8	2	9,106	0,069
13.	2,5	0,5	2,6	270,300	0,576
14.	0,5	0,8	2	9,455	0,130
15.	1,5	0,5	2	158,267	0,328
16.	1,5	0,65	2	169,467	0,317
17.	2,5	0,65	3,2	224,733	0,582
18.	2,5	0,65	2,6	254,667	0,594
19.	2,5	0,8	2	315,933	0,691
20.	1,5	0,8	2,6	201,400	0,382
21.	2,5	0,65	3,2	236,500	0,549
22.	2,5	0,8	2,6	277,633	0,608
23.	0,5	0,5	3,2	8,928	0,093
24.	1,5	0,8	3,2	139,833	0,242
25.	0,5	0,8	2,6	9,049	0,165
26.	0,5	0,8	3,2	8,824	0,104
27.	1,5	0,5	3,2	20,130	0,645
28.	1,5	0,5	3,2	15,940	0,506
29.	1,5	0,65	2,6	152,900	0,280
30.	1,5	0,5	3,2	18,460	0,616
31.	0,5	0,65	3,2	8,790	0,131
32.	1,5	0,65	2,6	151,000	0,269
33.	0,5	0,65	2	9,410	0,133
34.	1,5	0,8	2,6	180,833	0,337
35.	2,5	0,65	2,6	251,933	0,579
36.	0,5	0,5	2,6	8,263	0,062
37.	2,5	0,5	3,2	262,100	0,545

Çizelge 4.20. (devam) F2 formülasyonuna ait deney tasarımı, formülasyonlar ve yanıtları

38.	1,5	0,65	2	147,367	0,328
39.	1,5	0,8	2	175,328	0,374
40.	0,5	0,5	3,2	8,925	0,104
41.	1,5	0,65	3,2	146,830	0,230
42.	2,5	0,8	3,2	206,033	0,500
43.	2,5	0,8	3,2	175,700	0,488
44.	0,5	0,8	2	8,805	0,130
45.	2,5	0,5	2,6	270,233	0,547
46.	2,5	0,65	2	294,833	0,849
47.	2,5	0,65	2,6	243,067	0,626
48.	1,5	0,65	2	170,067	0,332
49.	1,5	0,65	3,2	150,300	0,247
50.	1,5	0,65	3,2	145,900	0,234
51.	0,5	0,65	2,6	8,563	0,115
52.	2,5	0,5	2	262,167	0,643
53.	1,5	0,8	2	157,267	0,357
54.	2,5	0,8	2	290,633	0,665
55.	2,5	0,65	3,2	236,400	0,579
56.	1,5	0,5	2	159,133	0,330
57.	1,5	0,5	2,6	215,200	0,432
58.	0,5	0,65	2	9,314	0,108
59.	2,5	0,65	2	289,567	0,583
60.	2,5	0,8	2,6	273,900	0,638
61.	2,5	0,8	2,6	267,300	0,629
62.	0,5	0,5	2	9,966	0,055
63.	0,5	0,5	2,6	8,347	0,077
64.	0,5	0,5	2,6	8,334	0,098
65.	0,5	0,65	3,2	8,916	0,121
66.	0,5	0,65	2	9,276	0,116
67.	1,5	0,8	2	164,833	0,368
68.	2,5	0,5	2	275,900	0,701
69.	0,5	0,8	3,2	8,790	0,092
70.	0,5	0,8	3,2	8,793	0,104
71.	0,5	0,5	2	9,454	0,090
72.	1,5	0,65	2,6	154,500	0,284
73.	1,5	0,5	2,6	208,300	0,440
74.	2,5	0,5	2,6	272,167	0,565
75.	1,5	0,8	2,6	198,433	0,329
76.	0,5	0,8	2,6	8,656	0,090
77.	0,5	0,8	2,6	8,553	0,069
78.	1,5	0,5	2,6	212,033	0,463
79.	0,5	0,65	3,2	8,718	0,071
80.	2,5	0,5	2	257,567	0,903
81.	2,5	0,5	3,2	254,330	0,573

Çizelge 4.21. F2 formülasyonu için faktöriyel deney tasarım modeli ve yanıtları

Faktör	İsim	Birim	Minimum	Ort.	Maksimum	Standart Sapma		
A	İmwitor 742	mL	1	2	3	0,822		
B	Cremophor RH 40	mL	1,4	1,6	1,8	0,164		
C	Tween 20	mL	5,6	6,4	7,2	0,657		
Yanıtlar	İsim	Birim	Minimum	Ort.	Maksimum	Standart Sapma	Verilerin Dönüştürülmesi	Model
Y1	Damlacık Büyüklüğü	nm	8,714	39,320	342,633	106,673	Ters karekök	Kübik
Y2	PDİ		0,069	8,058	0,556	0,141	Karekök	Kübik

Yağ asidi, YEM ve YYEM oranları dikkate alınarak 81 adet formülasyona ait damlacık boyutu ve PDİ sonuç verileri normal dağılıma getirmek için dönüştürüldü. Damlacık boyutu verileri ters karekök, PDİ verileri de karekök modeliyle dönüştürüldü (Çizelge 4.21-4.22).

Çizelge 4.22. F2 formülasyonu için damlacık boyutu ve PDİ yanıt verilerinin dönüştürülmesi

	Damlacık Büyüklüğü		PDİ	
Model	Ayarlanmış R ²	Hesaplanmış R ²	Ayarlanmış R ²	Hesaplanmış R ²
Dönüştürülme yapılmadı	0,976	0,972	0,919	0,910
Karekök	0,989	0,988	0,935	0,929
Logaritmik	0,997	0,996	0,924	0,912
Ters karekök	0,998	0,998	0,888	0,867
Ters	0,997	0,997	0,821	0,786
Güç dönüşümü	0,976	0,972	0,919	0,910

Geliştirilen formülasyonların, bağımsız değişken miktarları ile polisipersite indeksi ve damlacık boyutu sonuçları arasındaki etkileşimini açıklamak için, polidispersite ve damlacık boyutu polinom modelleri oluşturuldu.

Damlacık büyüklüğü polinom denklemi:

$$y = +0,079 - 0,14 \cdot A + 8,94E-004 \cdot B + 3,142E-003 \cdot C + 5,737E-004 \cdot AB + 9,854E-004 \cdot AC + 1,591E-003 \cdot BC + 0,12 \cdot A^2 - 2,076E-003 \cdot B^2 - 1,655E-003 \cdot C^2 + 1,391E-003 \cdot ABC$$

Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda A değeri olan yağ asidi miktarı arttıkça damlacık boyutu artarken, B değeri YEM miktarı ve C değeri YYEM miktarı arttıkça damlacık boyutu azalmaktadır. Çizelge 4.23'deki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca yağ asidi miktarı (A) ve Tween 20 (C) miktarı da damlacık boyutunu etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Çizelge 4.23'e göre ikili etkileşimler anlamlı değildir.

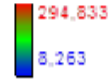
Çizelge 4.23. F2 formülasyonu için damlacık boyutu modeli analiz tablosu

Kaynak	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Model	1,27	10	0,13	4575,94	<0,0001
A-Yağ_miktari	1,00	1	1,00	36048,03	<0,0001
B-Solvent_miktari	4,319E-005	1	4,319E-005	1,56	0,2164
C-Kosolvent_miktari	5,330E-004	1	5,330E-004	19,20	<0,0001
AB	1,185E-005	1	1,185E-005	0,43	0,5157
AC	3,495E-005	1	3,495E-005	1,26	0,2657
BC	9,107E-005	1	9,107E-005	3,28	0,0744
A²	0,27	1	0,27	9679,36	<0,0001
B²	7,760E-005	1	7,760E-005	2,80	0,0990
C²	4,928E-005	1	4,928E-005	1,78	0,1871

Cremophor RH 40'ın 0,5 mL olarak sabit tutulduğu Şekil 4.19'daki kontur ve yüzey grafiğinde ise, yağ miktarının azalması ve Tween 20 miktarının artması damlacık boyutunu küçültmüştür.

Design-Expert® Software

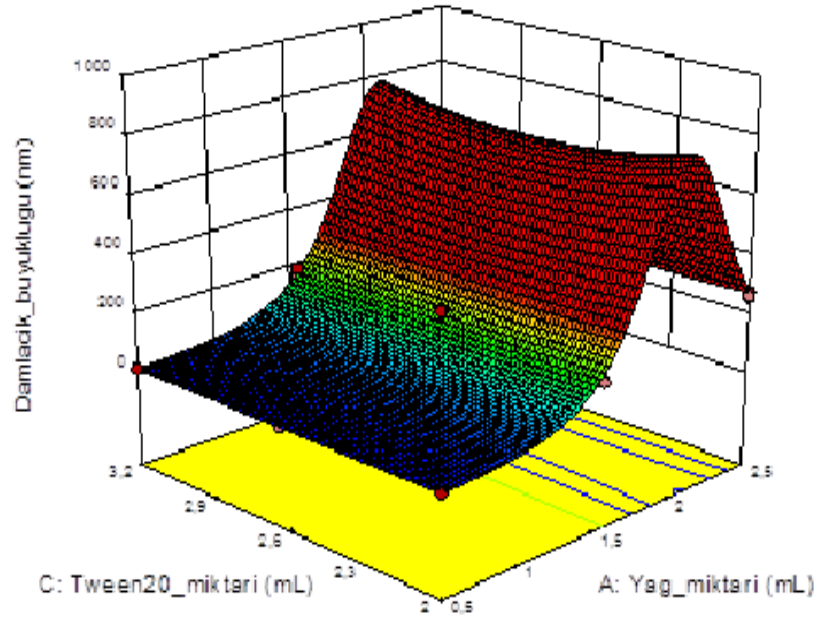
Damlacik_buyuklugu (nm)



X1 = A: Yag_miktari

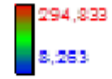
X2 = C: Kosolvent_miktari

B: Solvent_miktari = 0,5



Design-Expert® Software

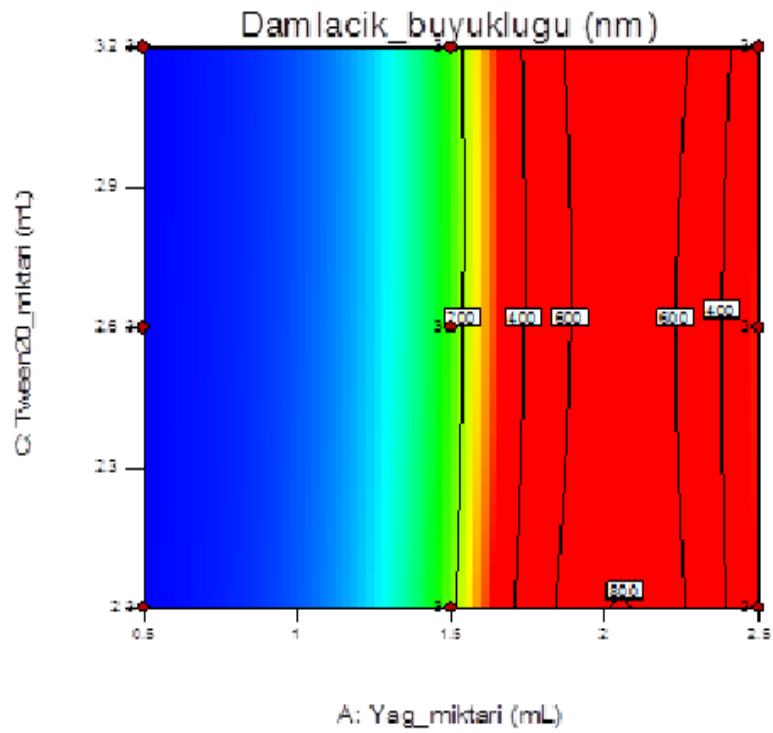
Damlacik_buyuklugu (nm)



X1 = A: Yag_miktari

X2 = C: Kosolvent_miktari

B: Solvent_miktari = 0,5



Şekil 4.19. F2 formülasyonuna ait bileşen miktarların damlacık boyutu üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri

PDİ polinom denklemi:

$$y=0,56+0,23*A+1,227E-003*B-0,033*C-0,013*AB-0,023*AC-6,745E-003*BC-0,012*A^2+4,897E-003*B^2-8,138E-003*C^2+0,014*ABC$$

Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda A değeri olan yağ asidi miktarı arttıkça polidispersite indeksi artarken, B değeri YEM miktarı ve C değeri YYEM miktarı arttıkça polidispersite indeksi azalmaktadır. Çizelge 4.24'deki verilere göre model $p<0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yağ asidi miktarı (A) ve Tween 20 (C) miktarı polidispersite indeksini etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p<0,05$).

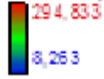
Çizelge 4.24. F2 formülasyonu için PDİ analiz tablosu

Kaynak	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Model	2,97	10	0,30	116,11	<0,0001
A-Yağ_miktari	2,88	1	2,88	1123,47	<0,0001
B-Solvent_miktari	8,126E-005	1	8,126E-005	0,032	0,8591
C-Kosolvent_miktari	0,061	1	0,061	23,63	<0,0001
AB	6,015E-003	1	6,015E-003	2,35	0,1298
AC	0,019	1	0,019	7,40	0,0082
BC	1,638E-003	1	1,638E-003	0,64	0,4265
A ²	2,463E-003	1	2,463E-003	0,96	0,3301
B ²	4,316E-004	1	4,316E-004	0,17	0,6826
C ²	1,192E-003	1	1,192E-003	0,47	0,4973
ABC	5,007E-003	1	5,007E-003	1,96	0,1664

Cremophor RH 40'ın 0,5 mL olarak sabit tutulduğu Şekil 4.20'deki kontur ve yüzey grafiğinde ise yağ miktarının azalması ve Tween 20 miktarının artması polidispersite indeksini küçültmüştür.

Design-Expert® Software

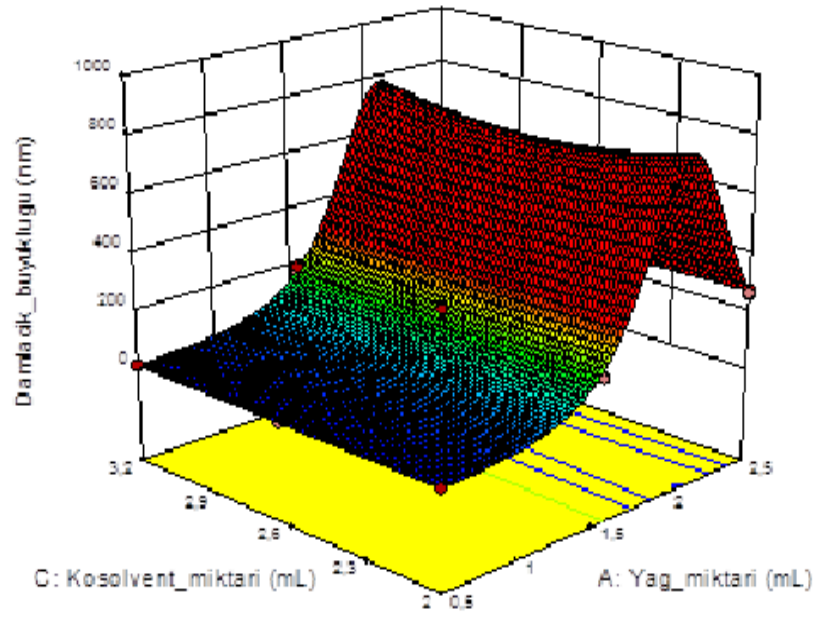
Damlacik_buyuklugu (nm)



X1 = A: Yag_miktari

X2 = C: Kosolvent_miktari

B: Solvent_miktari = 0,5



Design-Expert® Software

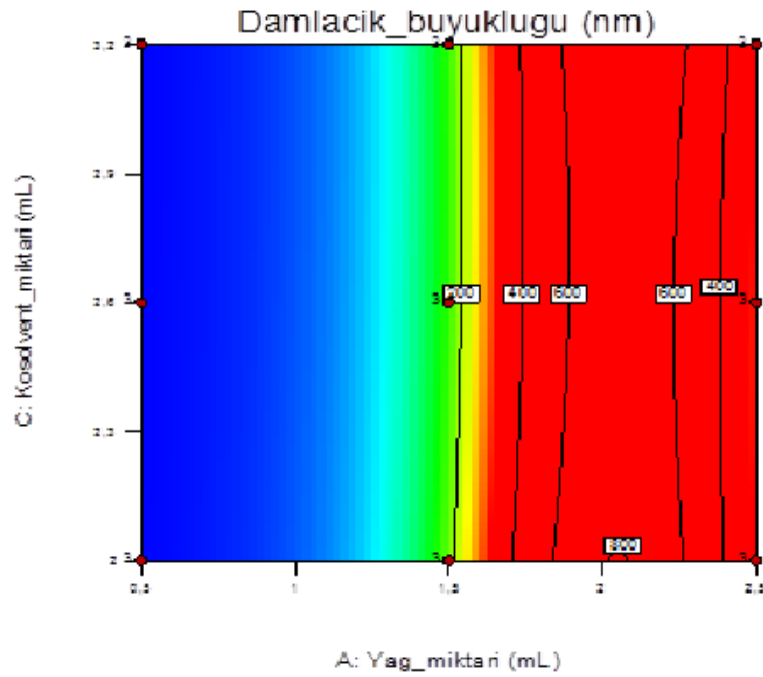
Damlacik_buyuklugu (nm)



X1 = A: Yag_miktari

X2 = C: Kosolvent_miktari

B: Solvent_miktari = 0,5



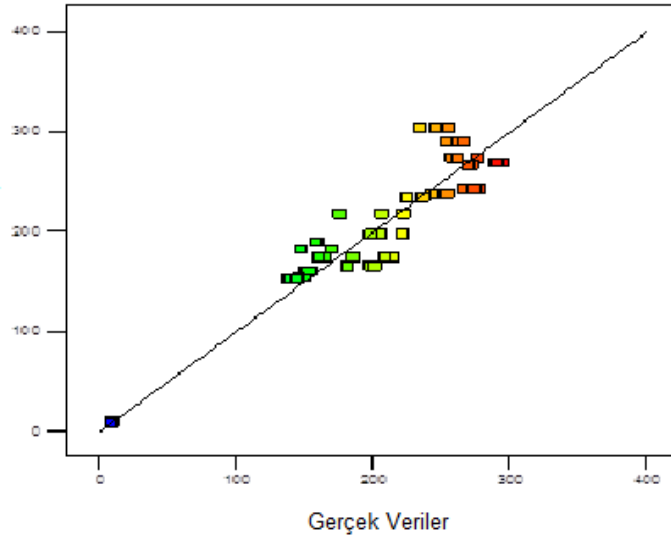
Şekil 4.20. F2 formülasyonuna ait bileşen miktarların PDİ üzerine etkisini gösteren kontur ve yüzey grafikleri

Design-Expert® Software

Damlacık_büyüklüğü:



Tahmini Veriler

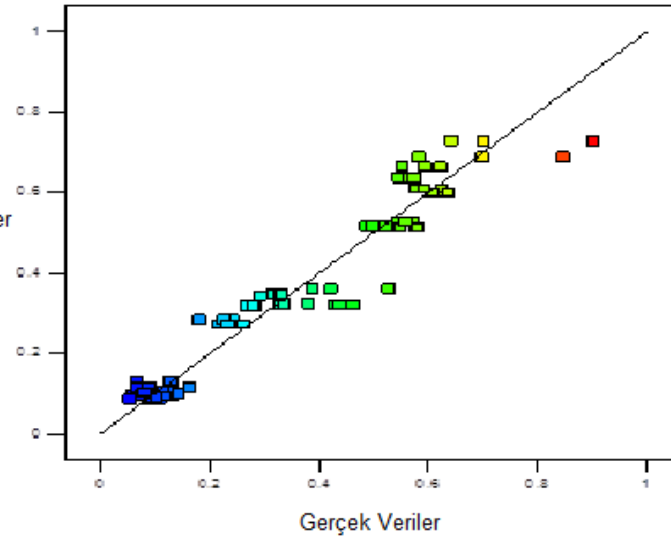


Design-Expert® Software

Polidispersite_indeksi:



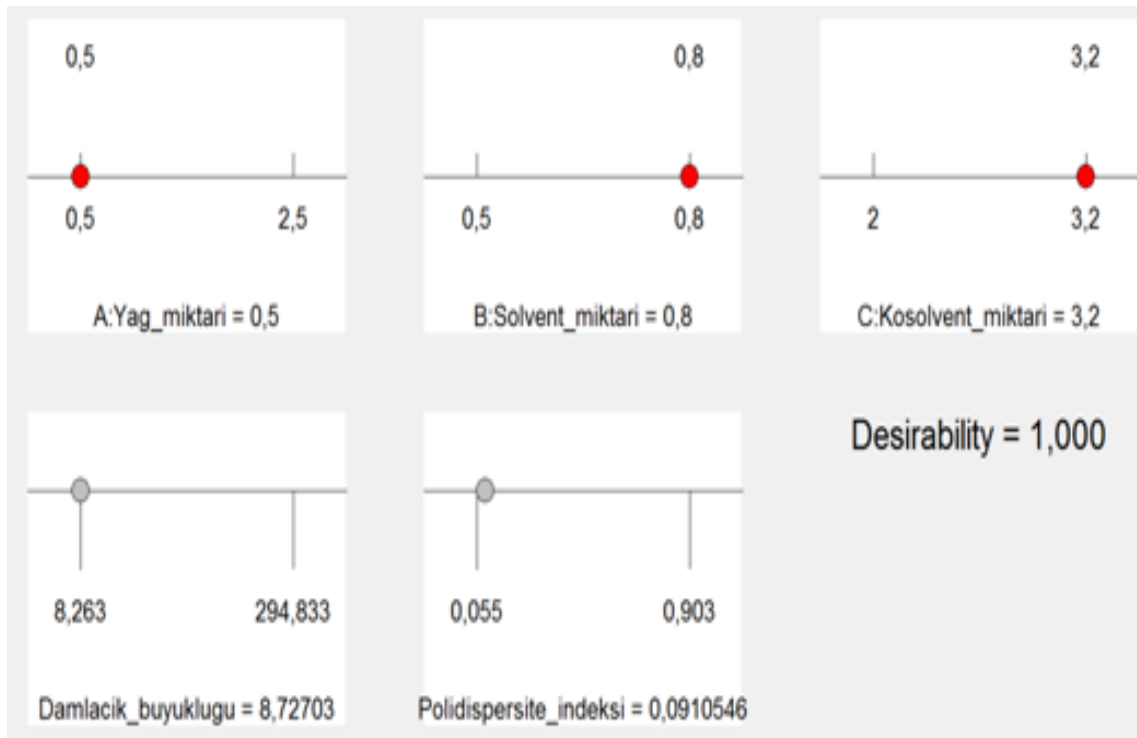
Tahmini Veriler



Şekil 4.21. F2 formülasyonuna ait, damlacık boyutu ve polidispersite indeksi yanıtlarına ait deney verileri ile model sonucu oluşan tahmini verilerin karşılaştırılmasına ait grafik

Damlacık boyutu ve PDİ deneysel veriler ile matematiksel model sonucunda elde edilen tahmini veriler arasındaki ilişkinin korelasyon grafiği Şekil 4.21'de görülmektedir. 100 nm altındaki formülasyonlarda (10 nm) gerçek veriler ile tahmini değerler çok yakın iken 100 nm üzerinde ise deney verileri ile tahmini veriler arasındaki ilişki azalmaktadır.

PDİ ve damlacık boyutu verileri 100 nm altındaki (10 nm) formülasyonlarda deneysel veriler ile model sonucu oluşan veriler yakın ve anlamlı çıkmıştır. Geliştirilecek SNEDDS formülasyonun hedeflenen karakterizasyon özelliklerinin damlacık boyutu < 100 nm ve polispersite indeksin $0 < PDİ < 0,1$ olması amaçlanmaktadır. Şekil 4.22’de model sonucu belirlenen yağ, solvent (YEM) ve kosolvent (YYEM) miktarları ve formülasyonun karakterizasyon özellikleri ve Çizelge 4.25’de formülasyonun deney şartlarında, 2 yönlü %95 güven aralığında karakterizasyon özellikleri olması gereken sınırlar arasında yer almaktadır.



Şekil 4.22. Hedef formülasyon bileşimi ve karakterizasyon özellikleri

Şekil 4.22’de seçilen formülasyon, matematik model sonucu 2 yönlü %95 güven aralığı analizi sonucundaki 8,72703 damlacık boyutu değeri deneysel ortamda $8,15417 < DB < 9,34838$ arasında olması gerekirken, 0,0910546 PDİ sonucu da $0,03475 < PDİ < 0,16970$ arasında olmalıdır (Çizelge 4.25).

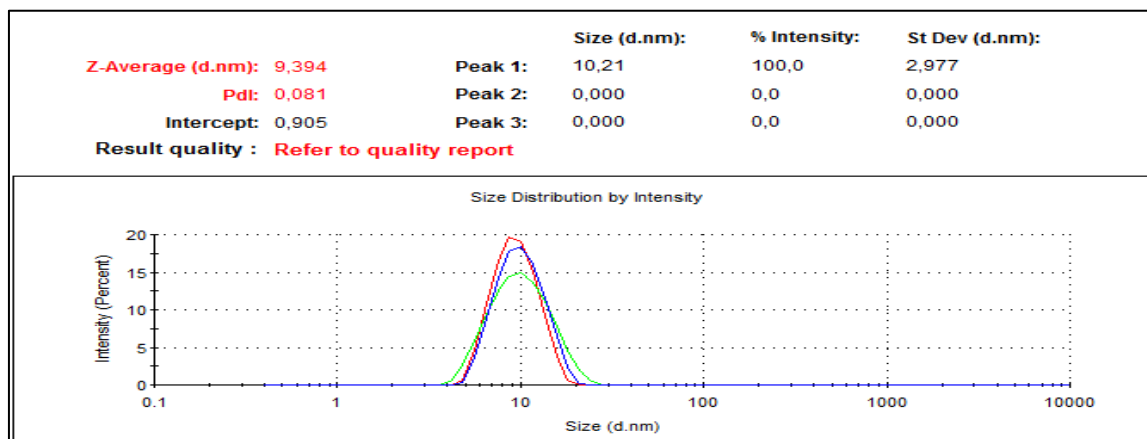
Çizelge 4.25. Deneyisel olarak hedef formülasyonun %95 güven aralığında beklenen karakterizasyon bulguları

Yanıt	Mean	Median	Standart Sapma	n	95% PI	95% PI
Damlacık büyüklüğü (nm)	8,727	8,721	0,272	1	8,154	9,348
Polidispersite indeksi	0,091	0,089	0,030	1	0,035	0,167

Seçilen formülasyonun deney sonucu oluşan damlacık boyutu ve PDİ sonuçları %95 güven aralığında istenilen aralıkta çıkmış ve hedef formülasyon belirlenmiştir (Çizelge 4.26, Şekil 4.23).

Çizelge 4.26. Deneyisel olarak hedef formülasyon karakterizasyon özellikleri (n=3, ortalama±SS)

Damlacık Boyutu (nm)	PDİ
9,21± 0,05	0,081±0,018



Şekil 4.23. Deneyisel ortamda hedef formülasyona (F2) ait damlacık boyutu ve PDİ özellikleri (n=3)

4.4.8. Etkin madde yükleme çalışmaları

Etkin madde yükleme çalışmaları sonucunda formülasyonlara en fazla 49 mg/mL derişimde tenofovir yüklendi. Formülasyonların etkin madde yükleme kapasitesini artırmak için, etkin maddenin stabil ve en fazla çözündüğü YYEM geliştirilen formülasyonlar 1:1 oranında karıştırıldı. Propilen glikol tenofoviri en fazla

         YYEM olarak seçildi. Formülasyonların dayanıklılığını görmek için, yapılan santrifüjleme ve dondurup çözme çalışmaları sonucunda formülasyona en fazla 61,25 mg/mL konsantrasyonda etkin madde yüklendi. Formülasyon tasarımımda orta ve uzun zincirli yağ asitlerinin etkisini incelemek amacıyla deney tasarımımda formülasyon bileşenleri aynı oranda olacak şekilde seçildi.

4.4.9. Geliştirilen formülasyonlarda yapılan karakterizasyon bulguları

Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonların ( izelge 4.27), damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, türbidite ve viskozite özellikleri incelenmiştir ( izelge 4.28).

Çizelge 4.27. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyon bileşenleri

Formülasyon	TNF (mg)	Ya� (%)	YEM (%)	YYEM (%)
F1	61,25	11,10	17,78	71,11
F2	61,25	11,10	17,78	71,11

Çizelge 4.28. Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonların karakterizasyonları (n=3)

Karakterizasyon	F1	F2
Damlacık boyutu (nm)	12,20�0,12	11,20�0,29
PD�	0,077� 0,012	0,097�0,008
Zeta potansiyel (mV)	0,457� 0,040	0,320�0,168
Türbidite (NTU)	3,71�0,02	2,83�0,02
Viskozite (cP,40 rpm)	78	76

Formülasyonların karakterizasyon çalışmaları sonucunda, damlacık boyutu olarak nano boyutta, iyi dağılım gösteren ($PD  < 0,1$), istenilen zeta potansiyel aralığında, pseudoplastik akış gösteren ya lı karışım ve distile su ile seyreltildi inde berrak bir görüntü elde edilen SNEDDS formülasyonları geliştirilmiştir (Resim 4.1).

A) F1 ve F2



B) F1 ve F1-seyreltilmiş emülsiyon



C) F2 ve F2-seyreltilmiş emülsiyon



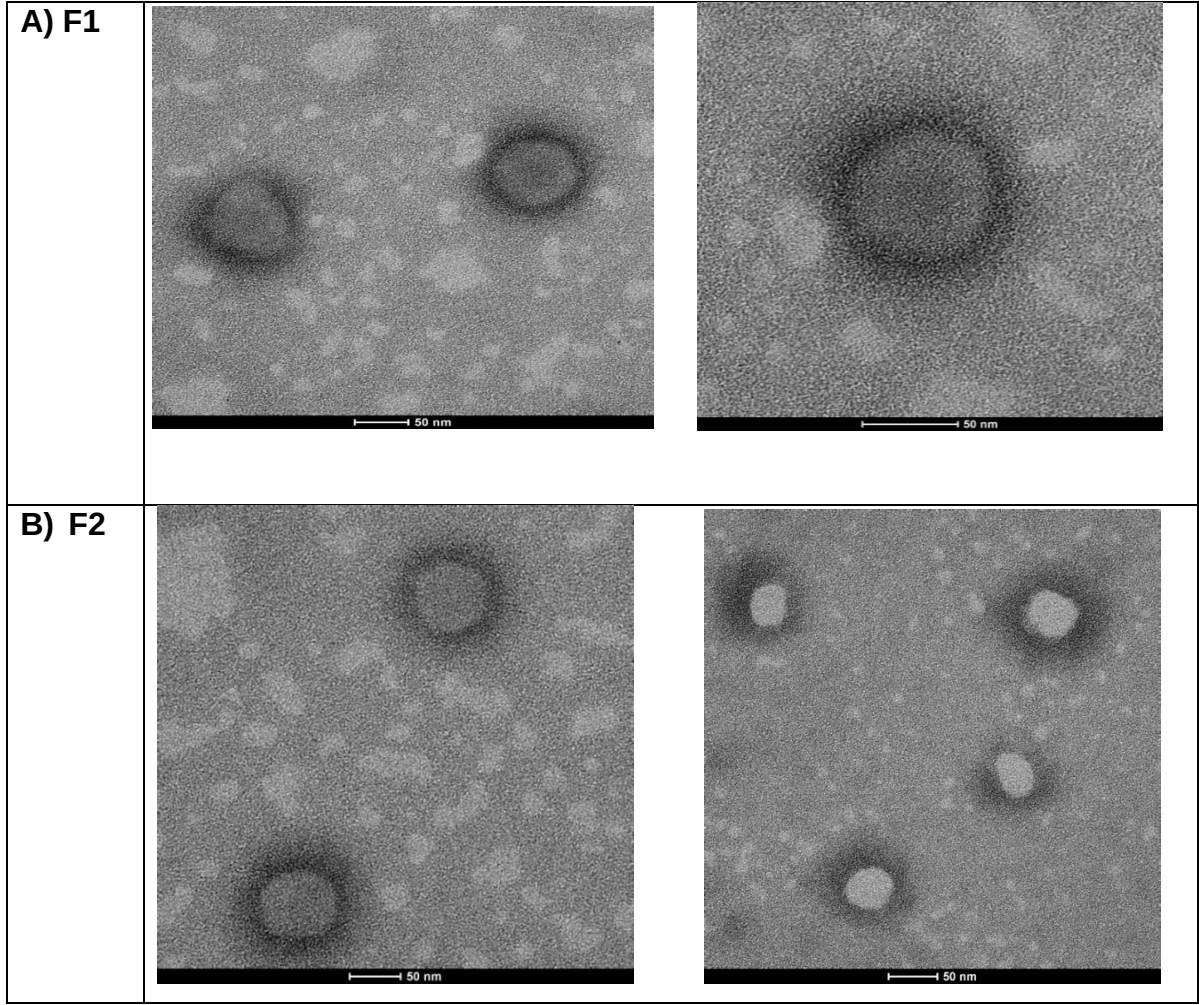
Resim 4.1. Geliştirilen formülasyonlar ve 1:250 oranında seyreltilmiş sulu emülsiyonların görünümü A)F1 ve F2, B)F1 ve F1-seyreltilmiş emülsiyon, C)F2 ve F2-seyreltilmiş emülsiyon

Emülsifikasyon zamanı

F1 ve F2 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanı sırasıyla 15 ve 13 saniye olarak ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre formülasyonlar Grade A'da yer almaktadır.

Morfolojik özellikler

Geliştirilmiş SNEDDS formülasyonların morfolojik özellikleri Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı gibi TEM ile görüntülendi. Geliştirilen formülasyonların damlacıklarının küresel ve 50 nm altında olduğu görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Formülasyonların TEM görüntüleri A)F1, B)F2

4.4.10. Çoklu emülsiyonlar

Formülasyonun geliştirilmesinde kullanılacak yağ, YEM ve YYEM'lerin çözünürlükleri hesaplandı (Çizelge 4.29). Etkin madde tenofovirin yağda çözünürlüğü suda çözünürlüğünden daha yüksek olduğu için, formülasyonun hazırlanmasında tenofovirin çözünürlüğü en yüksek yağ olan İmwitor 742 yağ fazı olarak seçildi.

Çizelge 4.29. Çoklu emülsiyona ait Yağ-YEM-YYEM çözünürlük ve HLB değerleri

Maddeler	Çözünürlük	HLB
Captex 355	0,43±0,01	4-5
Capmul MCM	48,30±0,01	4,6
İmwitor 742	64,40± 0,01	3-4
İmwitor 988	48,30±0,01	3-4
Abil Em 90	84,3±0,1	5
Tween 20	52,40±0,01	16,7
Propilen glikol	173±0,02	11,6
Arlacel 20	17±4	4-6
Span 20	Hesaplanamadı	8,6
Span 85	Hesaplanamadı	1,8

4:1, 3:2, 2:3, 1:4 oranlarında hidrofilik/lipofilik YEM karıştırılarak, oranların emülsiyon tipine olan etkisi incelendi (Çizelge 4.30). Primer emülsiyonun su alma kapasitesinin artırılması ve emülsiyonun Y/S emülsiyonuna dönüşmemesi için %20 ya da %20'nin altında hidrofilik YEM kullanılması gerekmektedir (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30. Hidrofilik-lipofilik YEM oranının emülsiyon tipine etkisi

Hidrofilik YEM (Labrafil)	Lipofilik YEM (Abil Em 90)	Emülsiyon tipi
80	20	Y/S
60	40	Y/S
40	60	Y/S
20	80	S/Y

Çalışmada Labrafil hidrofilik YEM ve Span 85, Arlacel, Abil Em 90 da lipofilik YEM olarak kullanıldı. Labrafil ile sırasıyla Span 85, Span 20, Arlacel, Abil Em 90 karıştırılarak yağ ile titre edildi. Span 85, Span 20, Arlacel ve Abil Em 90 karşılaştırılmasında en iyi karışılabilirlik Abil Em 90 ile gözlemlendi. Diğer lipofilik YEM'ler kullanıldığında formülasyon oluşturulamadı. Km oranı (hidrofilik YEM/lipofilik YEM) 1:4, 1:7, 1:9, 1:11, 1:19 ve 1:39 olarak incelendi. Km oranının (Labrafil/Abil Em 90) iç faz damlacık boyutu ve PDI üzerine etkisi incelendi (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. Primer emülsiyonun Km oranına göre damlacık boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları

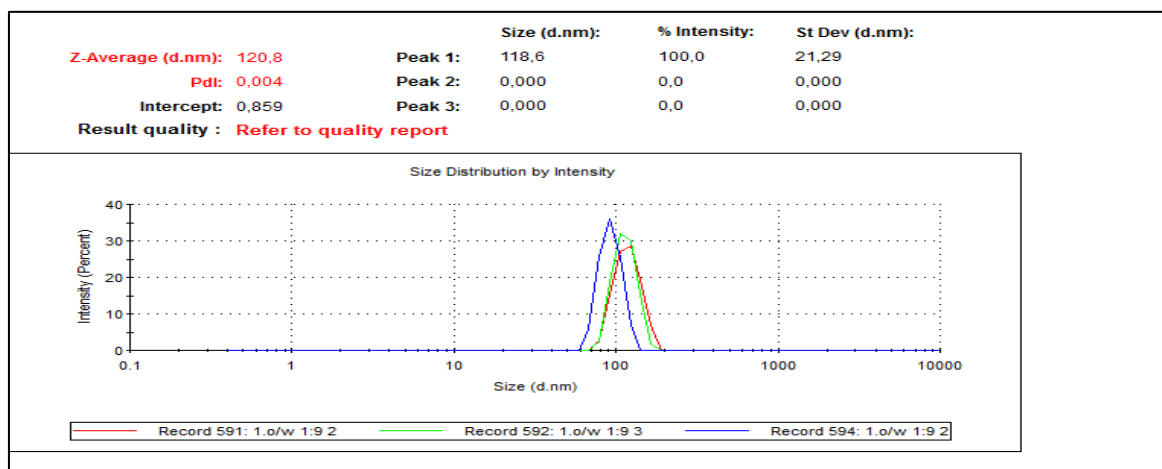
Km oranı	PDİ	Damlacık boyutu (nm)
1:4	0,3<pdi<0,7	100-200
1:7	0,5<pdi<1	100-200
1:9	0<pdi<0,3	100-200
1:11	Jelleşme gözlemlendi.	
1:19		
1:39		

Polidispersite indeksi ve damlacık boyutu olarak en iyi sonuç Km 1:9 oranında sağlandı ve Km oranı 1:9 olarak belirlendi. Formülasyonun viskozitesini artırmak için, yağ fazına kıvam artırıcı bir madde koyulmazken, su fazına %0,6 NaCl eklendi.

4.4.11. Çoklu emülsiyon formülasyonu

F3 Formülasyonu

Primer emülsiyon formülasyonunu hazırlamak için, %10 İmwitor 742, %80 YEM (Labrafil:Abil Em 90; 1:9) ve %10 distile su kullanıldı. Formülasyon 75-80°C sıcaklıkta 750 rpm'de 45 dk süresince karıştırıldı. Emülsiyonlar S/Y şeklinde olup olmadığı kontrol edildi ve 1:10 oranında İmwitor 742 ile seyreltilerek damlacık boyutu ölçüldü (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Primer emülsiyonun damlacık boyutu ve PDİ dağılımı (n=3)

Çoklu emülsiyonu hazırlamak için, etkin maddenin çözünürlüğünün en yüksek olduğu propilen glikol ikinci hidrofilik YEM olarak kullanıldı. Primer emülsiyon farklı oranlarda alınarak propilen glikol ile karıştırıldı (1:1, 2:1, 3:1). Deneylerde propilen glikol oranı arttıkça jelleşme miktarının arttığı gözlemlendi. Jelleşmenin olmaması için, propilen glikol:primer emülsiyon oranı 1:1 seçildi. Sonuç olarak İmwitor 742 (1 mL), Labrafil (0,8 mL), Abil Em 90 (7,2 mL) ve distile su (1 mL) 750 rpm'de 45 dk karıştırıldı. Primer emülsiyon oluşturuldu. Primer emülsiyon (10 mL) propilen glikolle (10 mL) 1:1 oranında karıştırılarak çoklu emülsiyon geliştirildi. Çoklu emülsiyon formülasyonu SNEDDS formülasyonlarla kıyaslamak adına 61,25 mg/mL olarak yüklendi.

4.4.12. Geliştirilen çoklu emülsiyon (S/Y/S) formülasyonunun karakterizasyon bulguları (F3)

Geliştirilen formülasyonun damlacık boyutu, PDİ, zeta potansiyel, türbidite, viskozite özellikleri tespit edildi ($25^{\circ}\text{C}\pm 0,5$) (Çizelge 4.32).

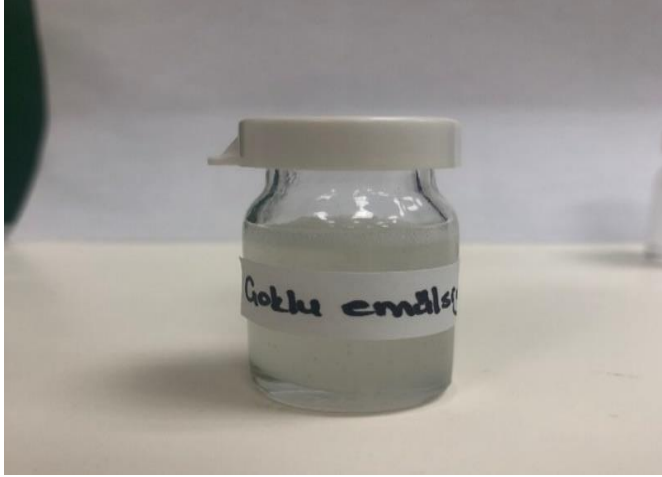
Çizelge 4.32. Geliştirilen çoklu emülsiyonun karakterizasyon özellikleri (n=3, ort $\pm$ SS)

Karakterizasyon	Çoklu emülsiyon
Primer emülsiyon damlacık boyutu (nm)	126,0 $\pm$ 4,8
Çoklu emülsiyon damlacık boyutu (nm)	1459,0 $\pm$ 58,4
Primer emülsiyon PDİ	0,053 $\pm$ 0,046
Çoklu emülsiyon PDİ	0,74 $\pm$ 0,08
Zeta Potansiyel (mV)	-3,39 $\pm$ 0,32
Türbidite (20-100 NTU)	31,3 $\pm$ 0,2
Viskozite (cP,40 rpm)	54,7 $\pm$ 0,6

Çoklu emülsiyonun, iç fazı olan S/Y emülsiyonun emülsiyon tipi dış fazı su ve yağ ile seyreltilerek kontrol edildi. S/Y emülsiyonu yağ fazı ile karışırken, su fazı ile karışmadı. S/Y/S çoklu emülsiyonun dış fazı da distile su ile seyreltilerek kontrol edildi. Çoklu emülsiyonun iç faz PDİ değeri 0,1'in altında ve anlamlı, zeta potansiyel değeri de emülsiyonlar için istenilen ± 35 aralığında çıkmıştır. 1 mL formülasyon 250

mL distile su ile karıştırıldığında bulanık bir görüntü oluşmaktadır (Resim 4.2). Emülsifikasyon zamanı 33 sn olarak ölçülmüştür. Çoklu emülsiyon şeffaf olmadığı için Grade B’de yer almaktadır.

A) F3



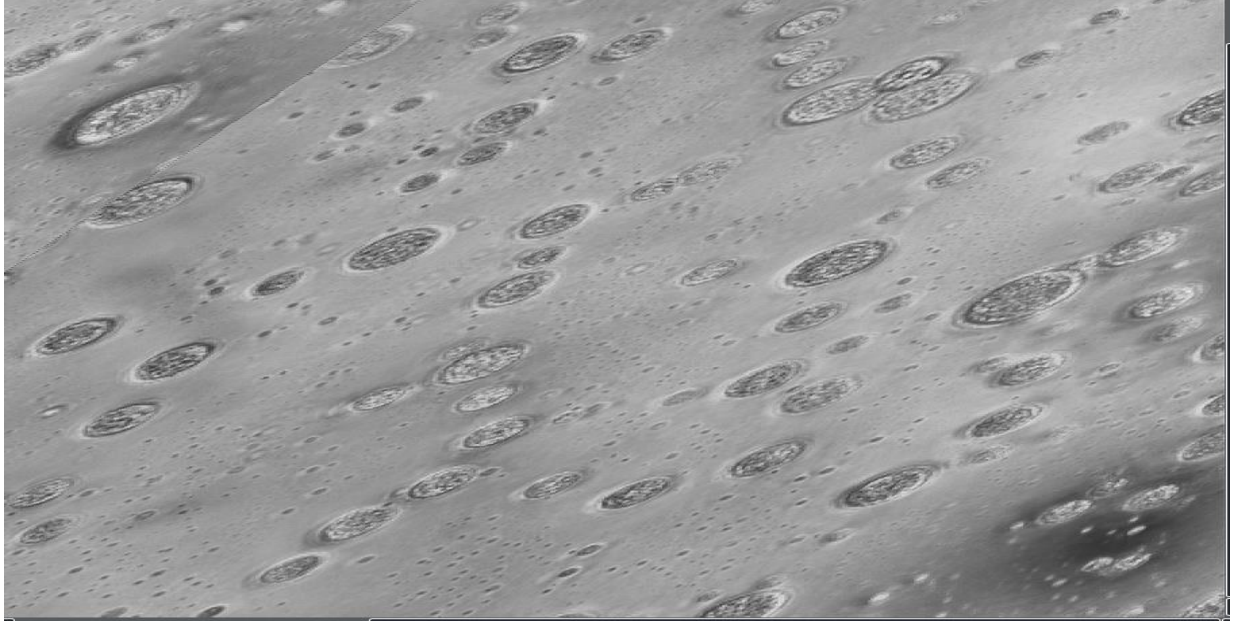
B) F3 ve F3-seyreltilmiş emülsiyon



Resim 4.2. Geliştirilen formülasyon ve 1:250 oranında seyreltilmiş sulu emülsiyonun görünümü A)F3, B) F3 ve F3-seyreltilmiş emülsiyon

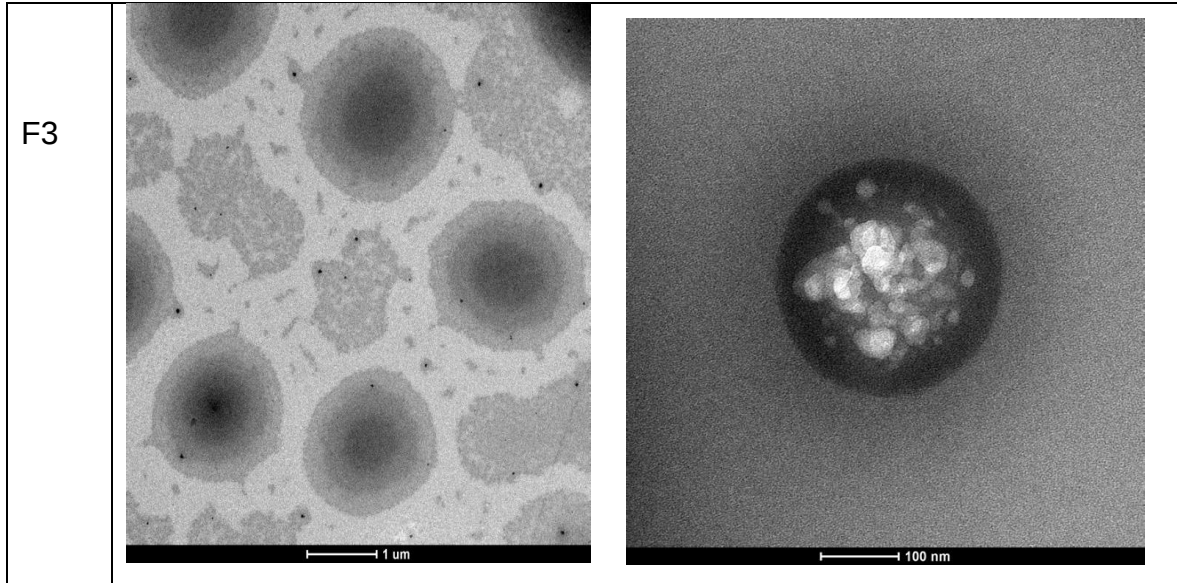
Morfolojik Özellikler

a) Formülasyonun üzerine 250 mL su eklenerek, S/Y/S formülasyonu oluşturuldu ve örnekler Leica DMEP mikroskobu ile incelendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. F3 formülasyonun polarize mikroskop görüntüsü (40x)

b) TEM görüntüsü



Şekil 4.27. F3 formülasyonun TEM analiz görüntüleri

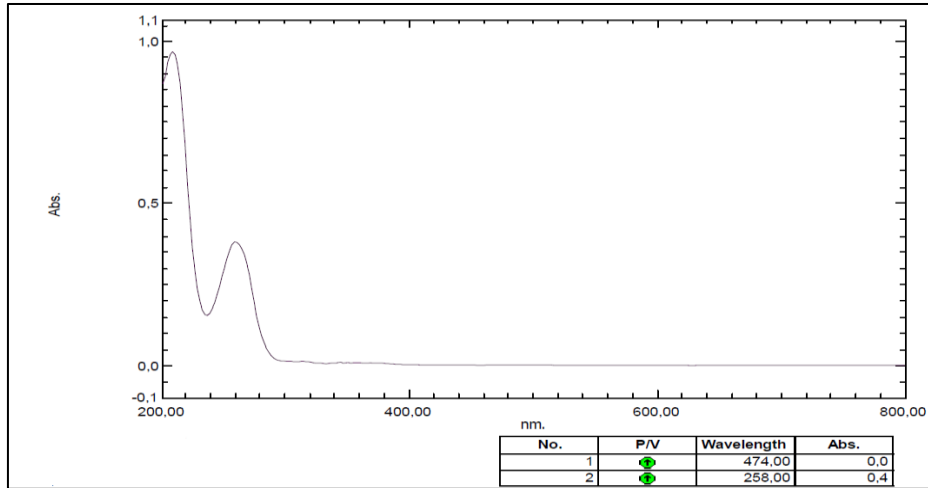
4.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları Bulguları

Oral olarak alınan tenofovirin referans ürünü ve geliştirilen formülasyonların gastrointestinal sistemdeki çözünmesini taklit etmek amacıyla, Çizelge 3.8’de verilen pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 çözünme ortamları hazırlandı ve çözünme hızı çalışmaları için öncelikle spektrofotometrik miktar tayini yöntemi geliştirildi ve yöntemin validasyonu yapıldı.

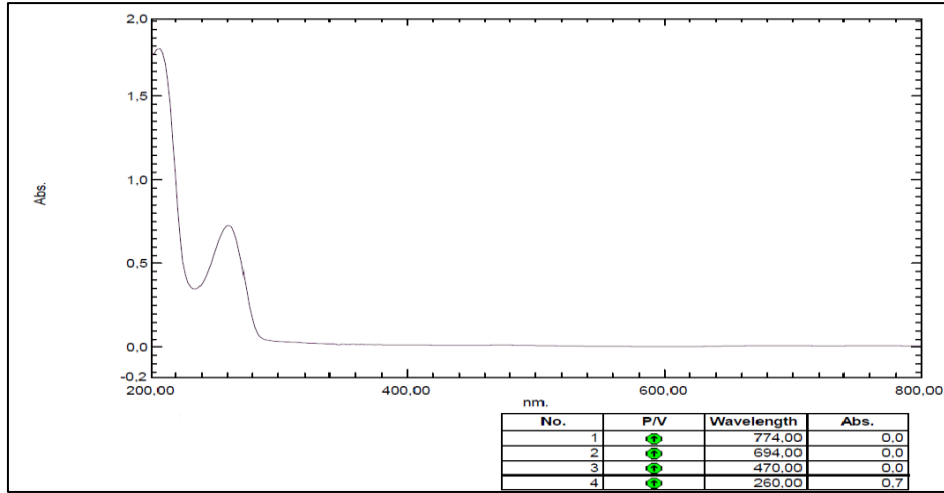
4.5.1. Tenofovirin in vitro çözünme ortamlarındaki UV spektrumu

Tenofovirin pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki λ_{maks} değerinin belirlenmesi için, çözünme ortamları kullanılarak 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 200-800 nm arasındaki absorbanslar belirlendi. Tenofovirin λ_{maks} değeri pH 1,2’de 258 nm, pH 4,5 ve pH 6,8’de 260 nm olarak saptandı (Şekil 4.28).

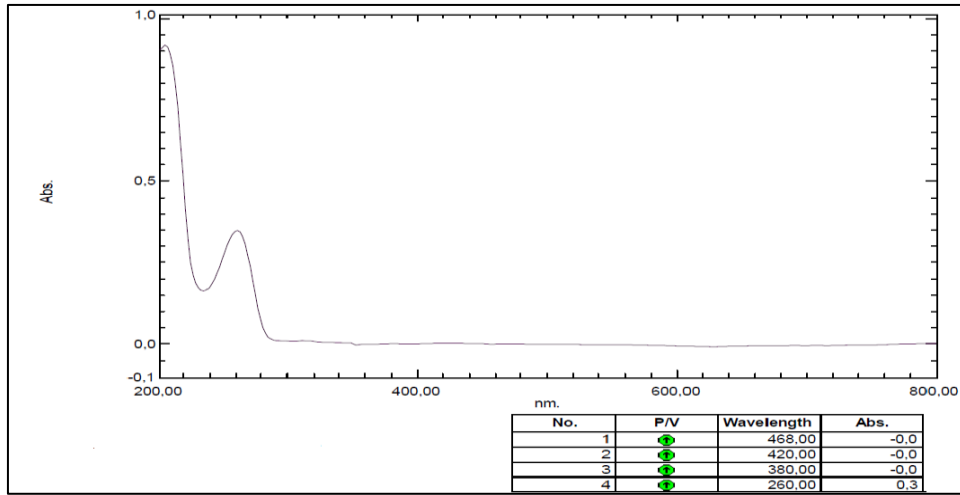
a) pH 1,2



b) pH 4,5



c) pH 6,8



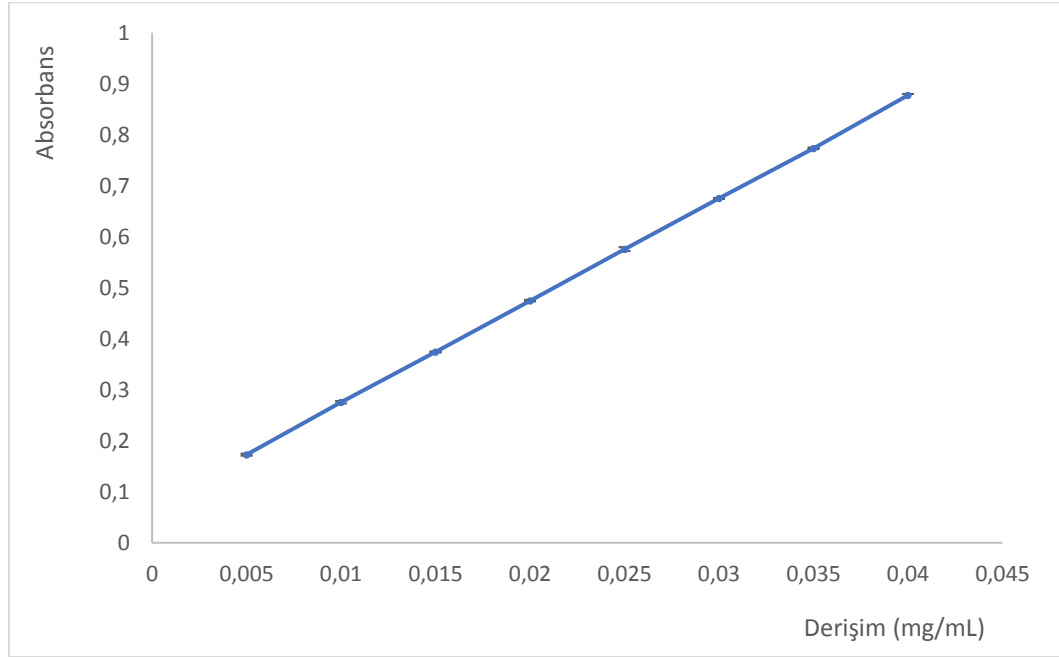
Şekil 4.28. Tenofovirin pH 1,2 (a), pH 4,5 (b) ve pH 6,8 (c) ortamlarındaki UV spektrumları

4.5.2. Spektrofotometrik miktar tayini ve kalibrasyonu

Tenofovirin standart doğru denklemini bulmak için pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 tampon çözeltiler kullanılarak 100 µg/mL stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 10-40 µg/mL arasındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Önceden belirlenen λ_{maks} değerine karşılık gelen absorbanlar okundu ve ortalama absorban değerleri hesaplandı. Doğrusal regresyon analizi yapılarak ve her bir ortam için doğru denklemleri bulundu (Çizelge 4.33-Şekil 4.29; Çizelge 4.34-Şekil 4.30; Çizelge 4.35-Şekil 4.31).

Çizelge 4.33. Tenofovirin pH 1,2'deki kalibrasyon parametreleri

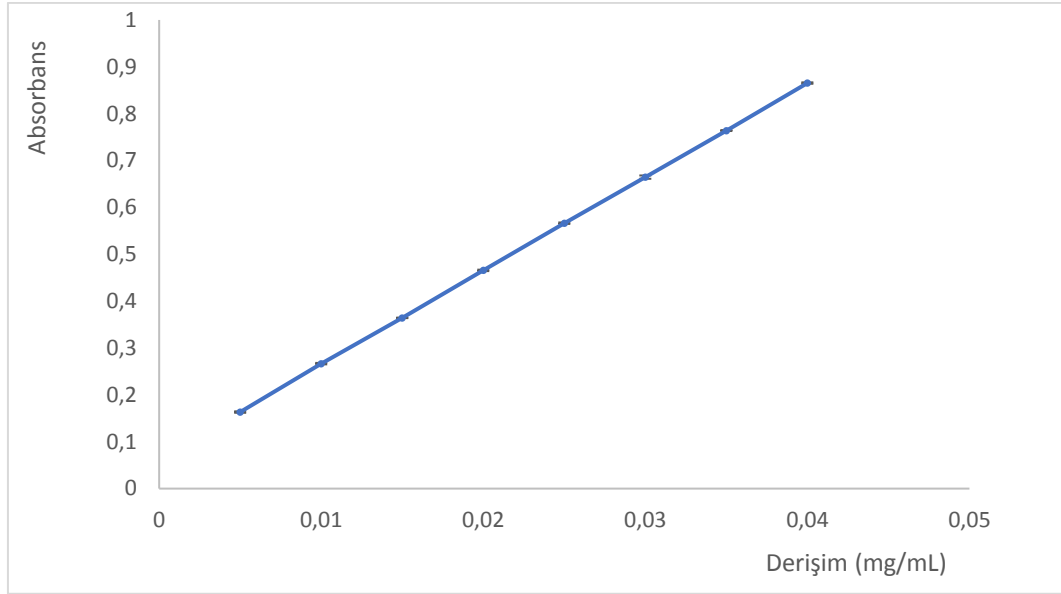
Kalibrasyon Denklemi	$y = 20,96x + 0,036$
R²	0,999
Regresyon Standart Sapması	0,0016
Gözlem Sayısı	8



Şekil 4.29. Tenofovirin pH 1,2 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3; ort±SS)

Çizelge 4.34. Tenofovirin pH 4,5'deki kalibrasyon parametreleri

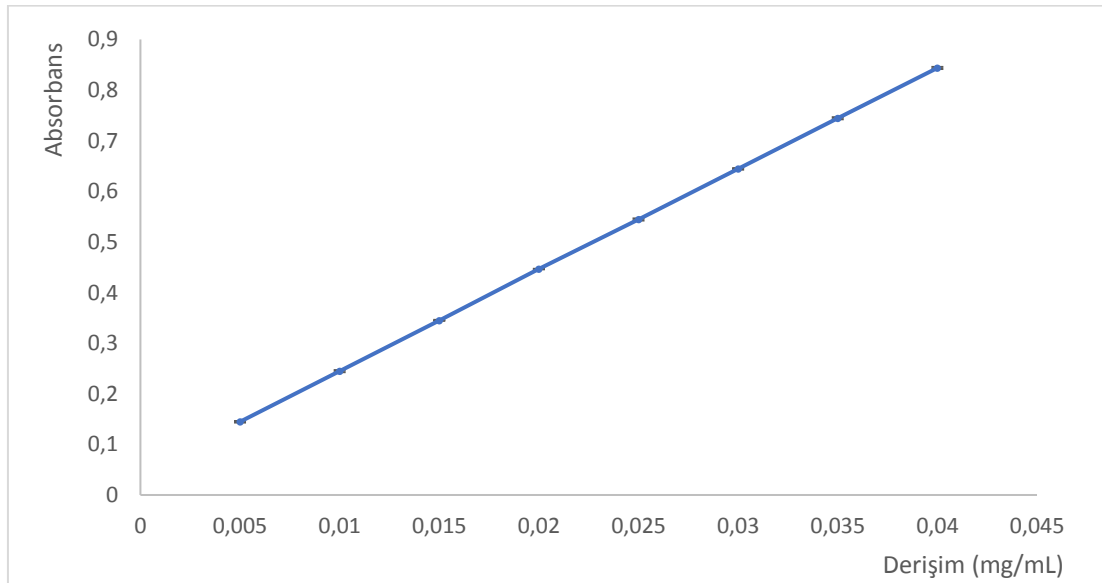
Kalibrasyon Denklemi	$y = 20,994x + 0,0354$
R²	0,999
Regresyon Standart Sapması	0,0008
Gözlem Sayısı	8



Şekil 4.30. Tenofovirin pH 4,5 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3; ort±SS)

Çizelge 4.35.Tenofovirin pH 6,8'deki kalibrasyon parametreleri

Kalibrasyon Denklemi	$y = 20,435x + 0,032$
R²	0,999
Regresyon Standart Sapması	0,0007
Gözlem Sayısı	8



Şekil 4.31. Tenofovirin pH 6,8 in vitro ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3; ort±SS)

4.5.3. Spektrofotometrik miktar tayini yöntem validasyonu

Doğruluk ve geri elde

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi doğruluk ve geri elde çalışmaları yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.36'da gösterildi. Hazırlanan pH 4,5 çözeltisinden geri elde edilen miktarlar bulundu. Bu üç sonucun ortalaması alınarak %geri elde hesaplandı. Doğruluk ve geri elde sonuçları, %BS sonuçlarının %2'den az olması ve %99-103 arasında geri elde sonuçları ile uygun bulundu.

Çizelge 4.36. Tenofovirin pH 4,5 ortamında geri elde sonuçları

0,005 mg/mL			0,02 mg/mL			0,04 mg/mL		
Absorbans	Pratik Derişim	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim	%Geri Elde
0,143	0,00512	102,5	0,458	0,0201	100,7	0,878	0,0401	100,3
0,140	0,00500	99,7	0,451	0,0198	99,0	0,875	0,0400	100,0
0,141	0,00503	100,6	0,455	0,0200	99,9	0,880	0,0402	100,6
X_{ort}	0,00504	100,9	X_{ort}	0,02040	99,9	X_{ort}	0,04010	100,3
SS	0,00042		SS	0,00010		SS	0,00010	
%BS	1,44		%BS	0,078		%BS	0,299	

Kesinlik

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi en düşük, orta ve en yüksek üç değeri kapsayan 3 ayrı derişimde örnekler alınarak çalışmalar yapıldı. Hesaplanan %BS değerleri %1'in altında olduğundan sonuçlar uygun bulundu (Çizelge 4.37).

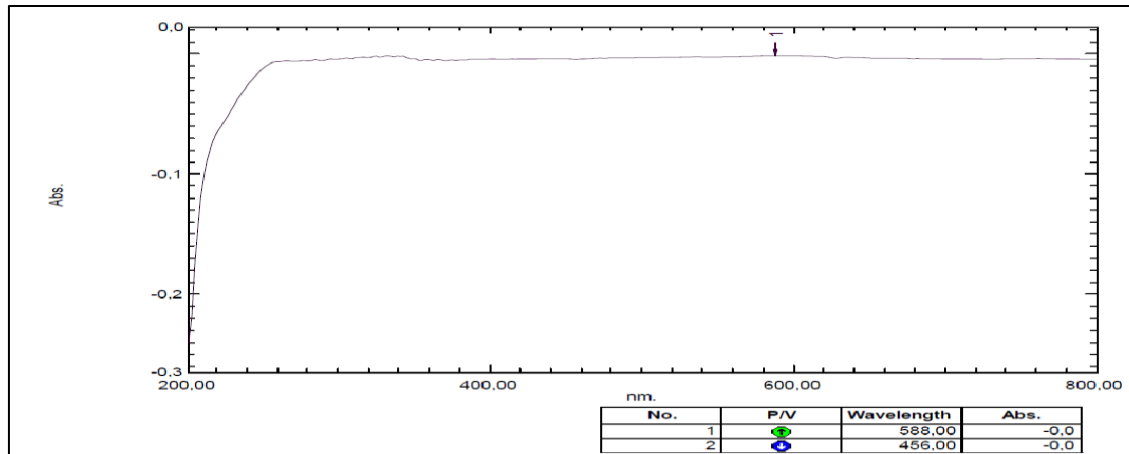
Çizelge 4.37. Tenofovirin pH 4,5 ortamında kesinlik sonuçları

Değişim	0,005 (mg/mL)	0,02 (mg/mL)	0,04 (mg/mL)
Absorbans	0,143	0,455	0,877
	0,143	0,451	0,875
	0,141	0,452	0,876
X_{ort}	0,142	0,453	0,876
SS	0,001	0,002	0,001
%BS	0,811	0,460	0,114

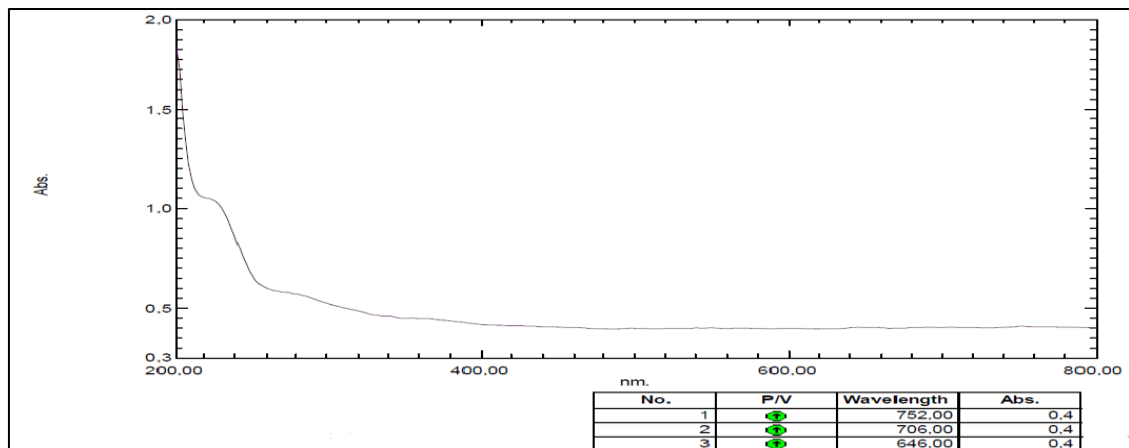
Özgünlük ve seçicilik

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi spektrofotometrik yöntemin sadece analizi istenen tenofoviri saptayabilmesi amacıyla çalışmalar yapıldı. Formülasyon bileşenleri ve çözünme ortamı tenofovir ile aynı dalga boyunda (260 nm) absorbans vermemektedir (Şekil 4.32).

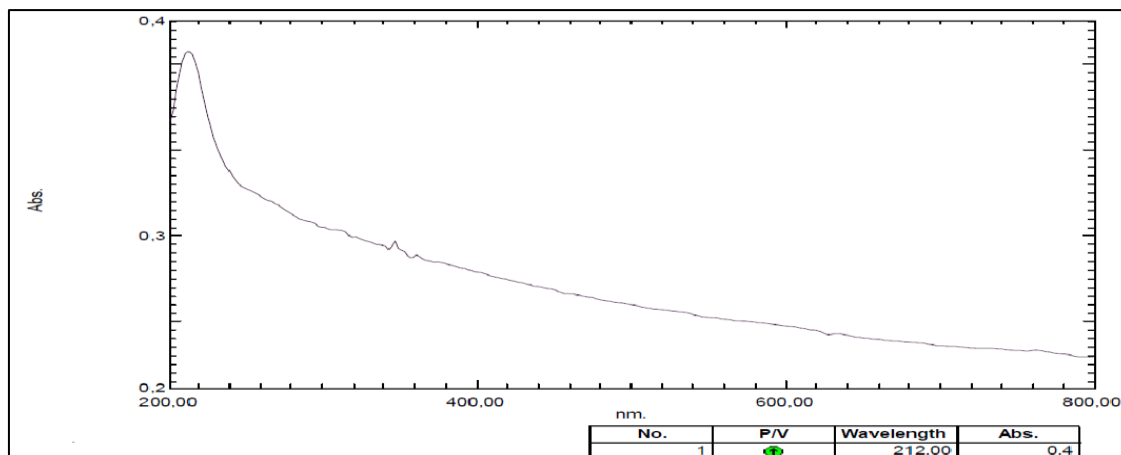
a) pH 4,5 ortamı



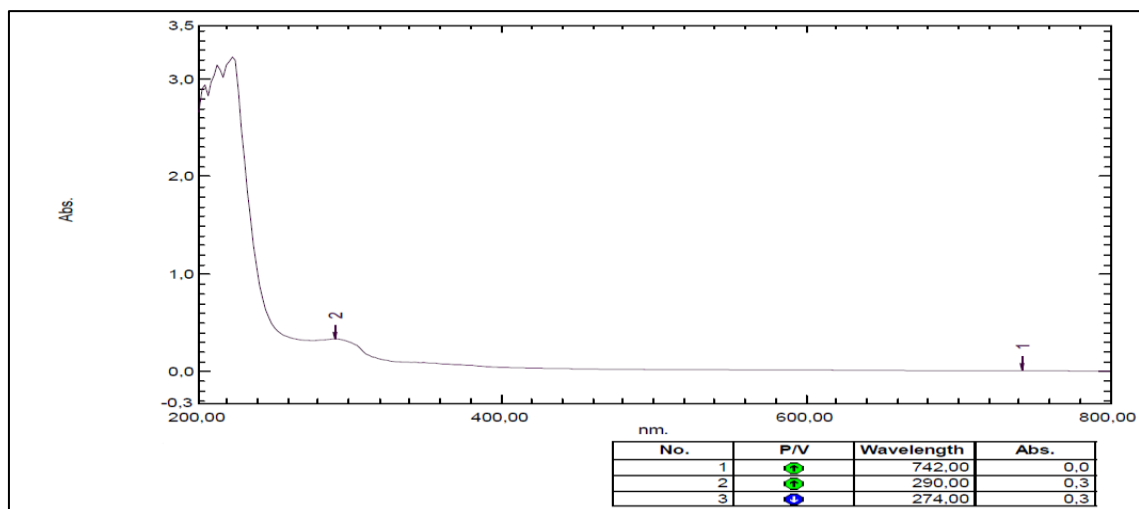
b) Oleik asit



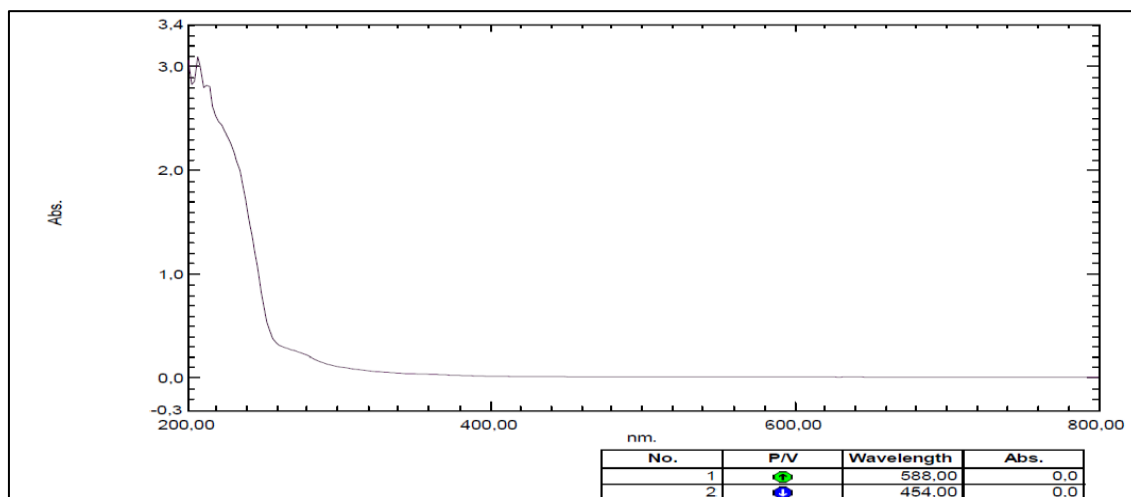
c) Imwitor 742



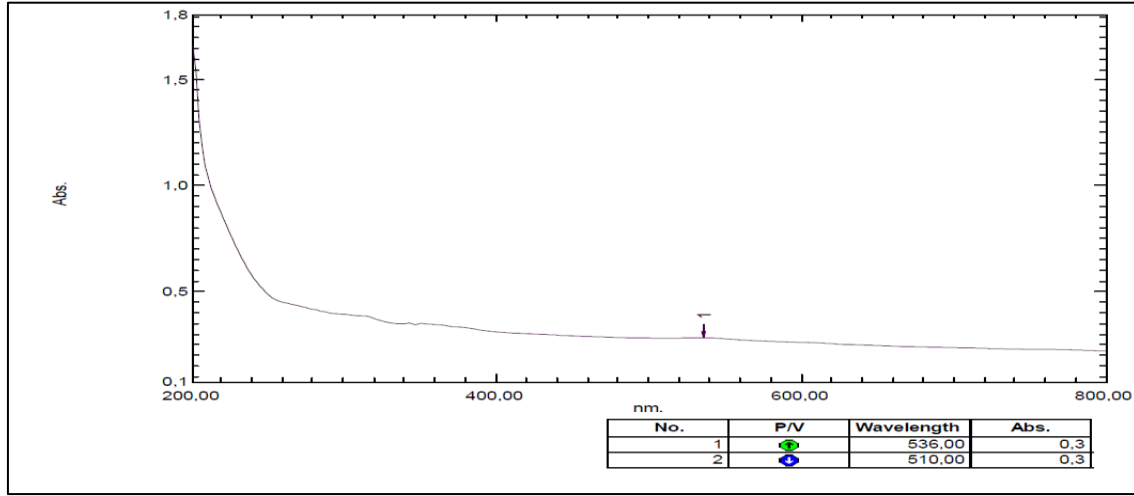
d) Cremophor RH 40



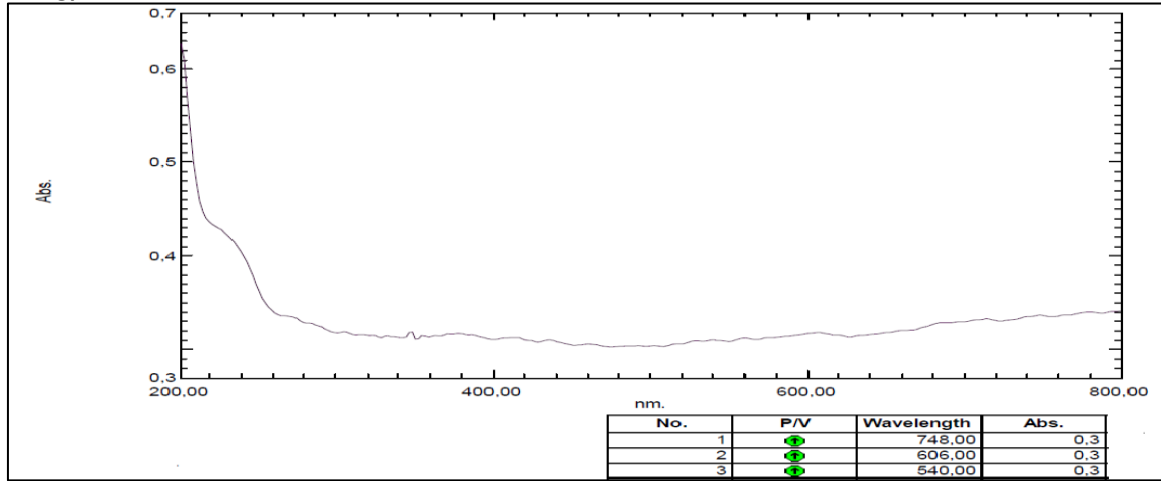
e) Tween 20



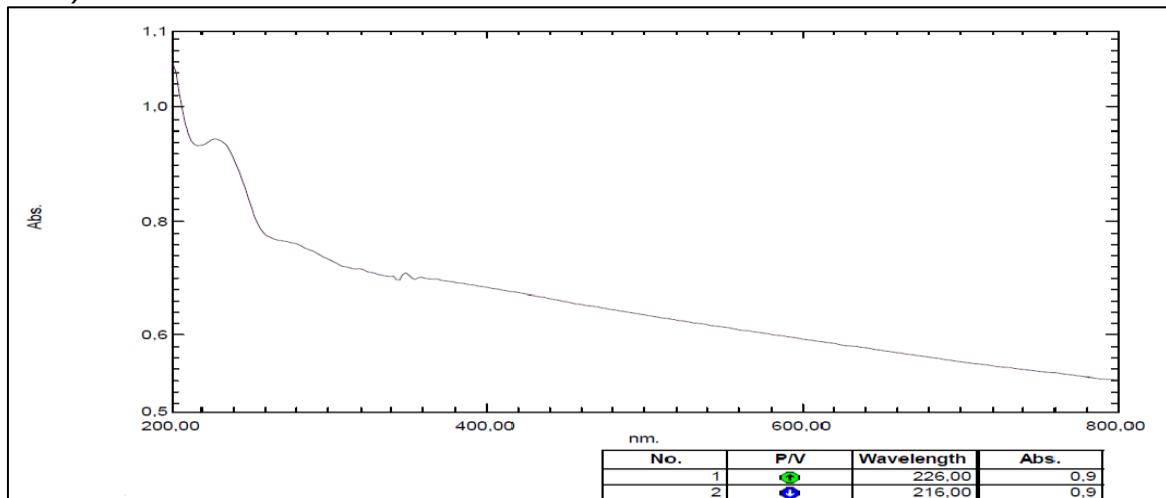
f) Propilen glikol



g) Abil Em 90



h) Labrafil



Şekil 4.32. Tenofovirin F1, F2 ve F3 formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin pH 4,5'daki UV spektrumları; a)pH 4,5 ortamı, b)Oleik asit, c)Imwitor 742, d)Cremophor RH 40, e)Tween 20, f)Propilen glikol, g)Abil Em 90, h)Labrafil

Doğrusallık

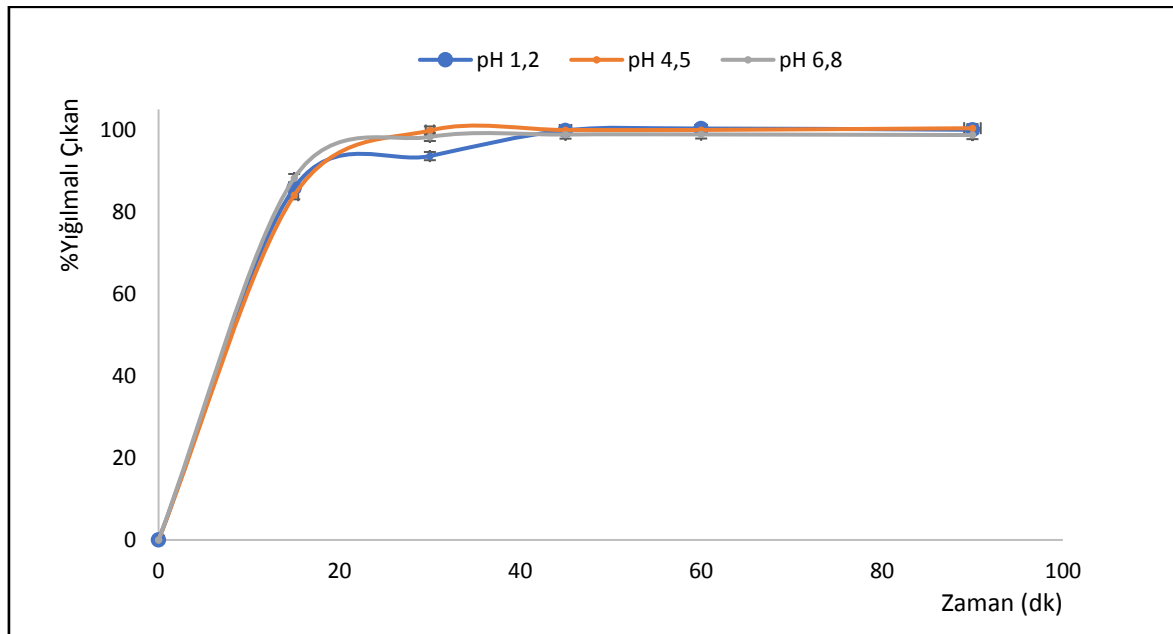
Doğrusallık absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi uygulanarak regresyon doğrusu saptandı (Şekil 4.30) ve determinasyon katsayısı 0,999 değeri ile uygun bulundu.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Analitik yöntemin pH 4,5 için sırasıyla LOD değeri 0,18 µg/mL, LOQ değeri ise 0,55 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.5.4. Ticari üründe in vitro çözünme hızı çalışmaları

Viread® tablet ile yapılan in vitro çözünme hızı sonuçları Şekil 4.33 ve Çizelge 4.38’de verilmiştir.



Şekil 4.33. Viread® tabletin pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri (n=6)

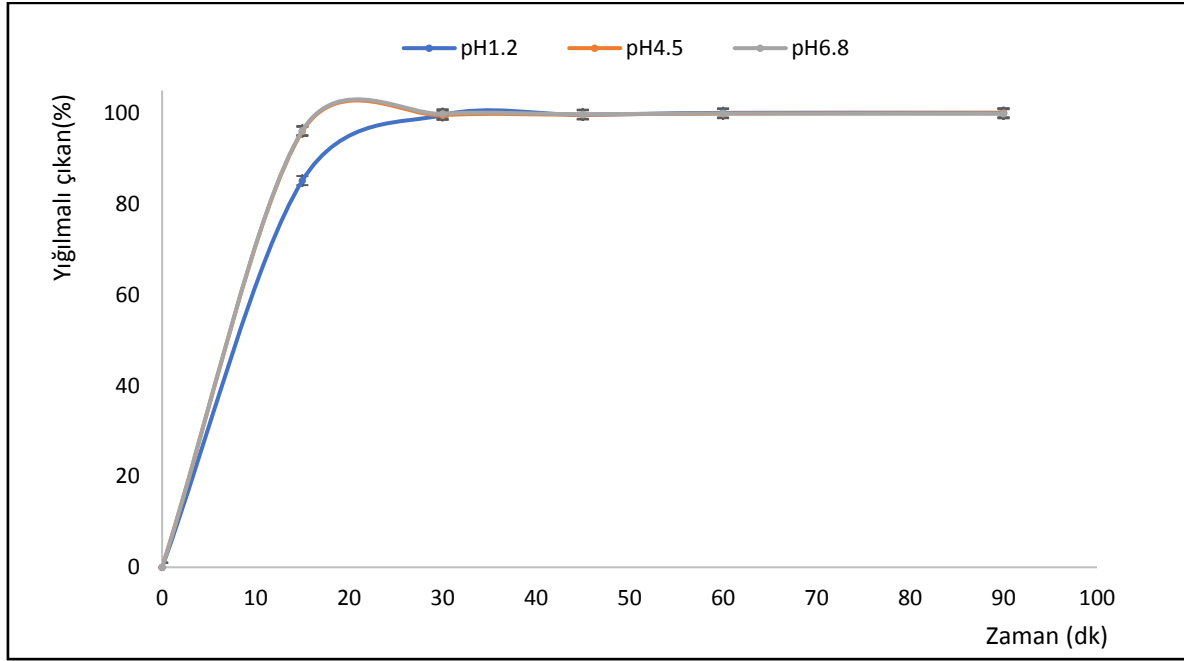
Çizelge 4.38. Referans ürünün pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki çözünme değerleri

		Zaman (dk)				
		15	30	45	60	90
pH 1,2	X _{ort} (%)	85,9	93,6	99,9	100,0	100,0
	%BS	0,832	0,642	0,687	0,976	0,573
pH 4,5	X _{ort} (%)	84,1	99,9	100,0	100,0	100,0
	%BS	1,44	0,451	0,642	0,642	0,915
pH 6,8	X _{ort} (%)	88,3	98,3	98,9	98,9	98,7
	%BS	0,701	1,01	0,054	1,05	0,817

%BS değeri %2'nin altında olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak uygun bulunmuştur. Viread® tabletin çözünme hızı çalışmaları sonucunda pH 1,2 ve pH 6,8'de çok hızlı (15 dk'da %85'den fazla), pH 4,5'da hızlı çözünme (30 dk'da %85'den fazla) görülmüştür (Çizelge 4.38).

4.5.5. F1 ve F2 formülasyonlarının çözünme hızı çalışmaları bulguları

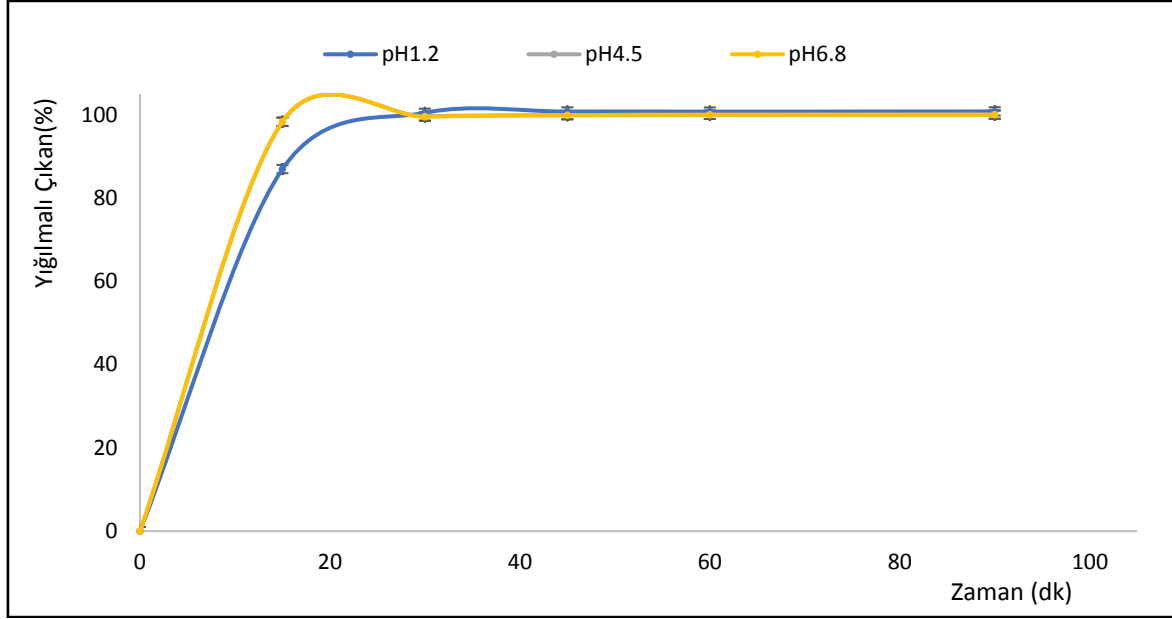
Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalarda, F1 ve F2 formülasyonları için belirli zaman aralıklarında çözünme ortamından alınan örneklerle ölçülen absorban değerleri, farklı çözünme ortamlarına ait kalibrasyon denklemleri aracılığıyla derişime çevrildi ve zamana karşı %yığılmalı çözünen tenofovir miktarları (X_{ort}) grafiğe geçirildi (Şekil 4.34; Şekil 4.35). Verilerin X_{ort} ve %BS değerleri hesaplanarak Çizelge 4.39 ve Çizelge 4.40'da verildi.



Şekil 4.34. F1 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri (n=6)

Çizelge 4.39. F1 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 'deki çözünme değerleri

		Zaman (dk)				
		15	30	45	60	90
pH 1,2	X _{ort} (%)	85,16	99,59	99,64	100,07	100,11
	%BS	0,018	0,011	0,009	0,009	0,010
pH 4,5	X _{ort} (%)	95,99	99,57	99,69	99,9	100,01
	%BS	0,007	0,005	0,004	0,003	0,004
pH 6,8	X _{ort} (%)	96,18	99,88	99,78	99,90	99,90
	%BS	0,002	0,003	0,004	0,004	0,003



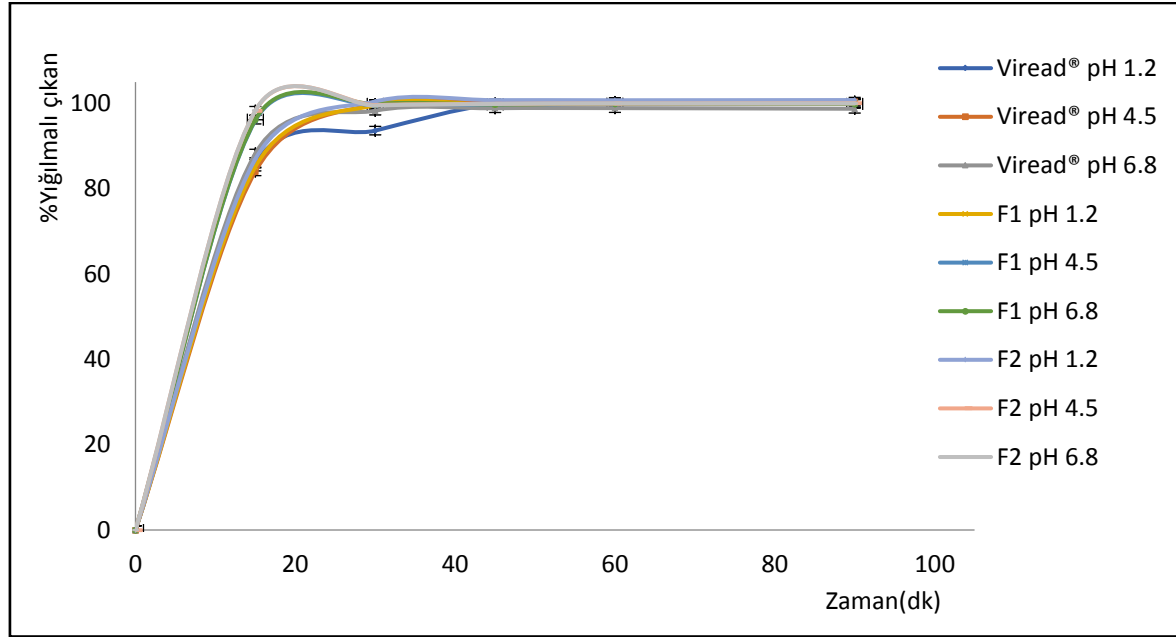
Şekil 4.35. F2 formülasyonunun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri (n=6)

Çizelge 4.40. F2 formülasyonunun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'deki çözünme değerleri

		Zaman (dk)				
		15	30	45	60	90
pH 1,2	X _{ort} (%)	86,95	100,45	100,76	100,73	100,78
	%BS	0,014	0,001	0,010	0,009	0,009
pH 4,5	X _{ort} (%)	98,28	99,61	99,9	99,97	100,04
	%BS	0,007	0,005	0,004	0,003	0,004
pH 6,8	X _{ort} (%)	98,34	99,51	99,88	100,00	100,00
	%BS	0,005	0,003	0,002	0,001	0,001

Çalışmalar sonucunda, emülsifikasyon zamanı 30 saniyenin altında olan F1 ve F2 formülasyonları pH 4,5 ve pH 6,8'de 15 dk'da %95'in üzerinde çözünmüştür. Ayrıca iki fomülasyon da pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 çözünme ortamlarında çok hızlı (15 dk'da %85'den fazla) çözünme göstermiştir (Şekil 4.34-4.35). %BS değeri %1'nin altında olup sonuçlar istatiksel olarak uygun bulunmuştur. F1 ve F2 formülasyonları pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de 15 dk'da %85'in üzerinde çözünerek, gastrointestinal sistemde hızlı salım yapan (IR) dozaj şekli gibi hızlı ve yüksek oranda çözünmüştür (Çizelge 4.39; Çizelge 4.40).

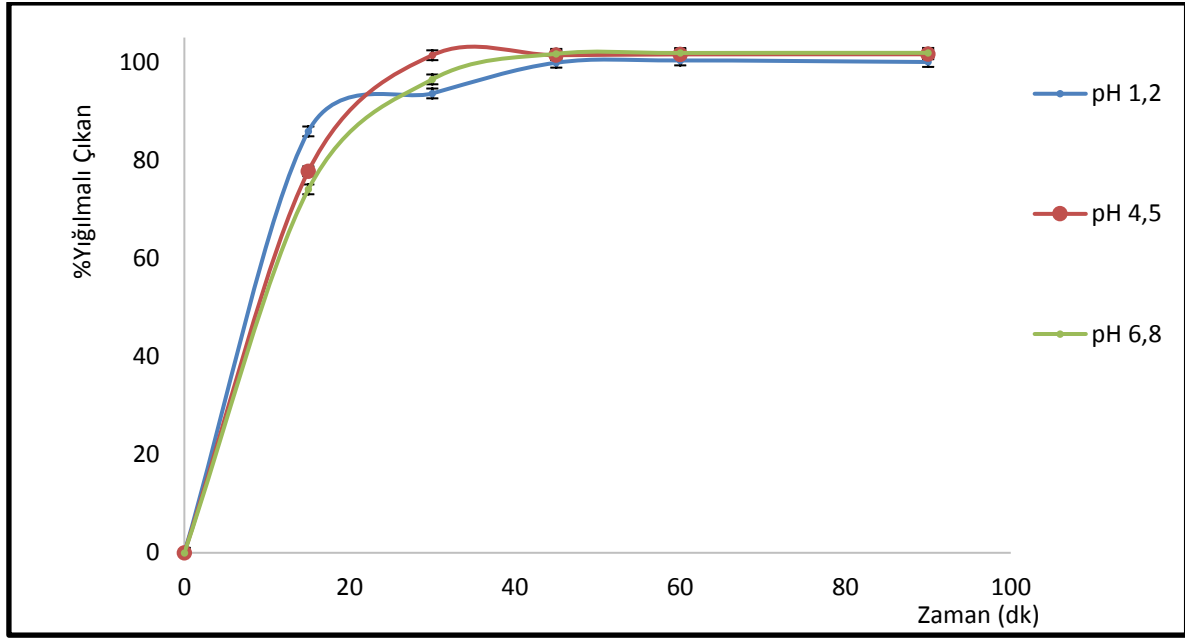
Piyasa preparatı ile yapılan karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı çalışmalarında, geliştirilen formülasyonlar arasında çözünme hızı açısından farklılık görülmemektedir. Viread® tablet, F1 ve F2 formülasyonları pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 çözünme ortamlarında 15 dk'da %85'in üzerinde çözünme göstermiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. Viread®, F1 ve F2 formülasyonun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki karşılaştırmalı in vitro çözünme hızı profilleri (n=6)

4.5.6. Çoklu emülsiyonda çözünme hızı çalışmaları bulguları

Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalarda, F3 formülasyonu için belirli zaman aralıklarında çözünme ortamından alınan örneklerle ölçülen absorbans değerleri, farklı çözünme ortamlarına ait kalibrasyon denklemleri aracılığıyla derişime çevrildi ve zamana karşı %yığılmış çözünen tenofovir miktarları grafiğe geçirildi (Şekil 4.37). Verilerin X_{ort} ve %BS değerleri hesaplanarak Çizelge 4.41'de verildi.



Şekil 4.37. F3 formülasyonunun pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki in vitro çözünme hızı profilleri (n=6)

Çizelge 4.41. F3 formülasyonunun pH1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarındaki çözünme değerleri

		Zaman (dk)				
		15	30	45	60	90
pH 1,2	X _{ort}	77,53	85,12	94,82	99,93	100,03
	%BS	0,006	0,013	0,020	0,011	0,012
pH 4,5	X _{ort}	77,76	101,40	101,40	101,60	101,60
	%BS	0,017	0,016	0,017	0,016	0,016
pH 6,8	X _{ort}	74,06	99,51	99,88	100,00	100,00
	%BS	0,005	0,003	0,012	0,012	0,012

Çözünme hızı çalışmaları sonucunda formülasyon pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de hızlı (30 dk'da %85'den fazla) çözünme görülmüştür (Şekil 4.37; Çizelge 4.41).

4.6. Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen formülasyonlarda termodinamik ve hızlandırılmış kısa süreli stabilite çalışmaları yapılmıştır.

4.6.1. Termodinamik stabilite çalışmaları

- Dondurup-çözme ve santrifüjleme çalışmaları sonrasında, formülasyonlarda faz ayrışması, kristallenme, bozunma ya da renklenme gözlenmedi.

4.6.2. Hızlandırılmış kısa süreli stabilite çalışmaları

Geliştirilen F1 ve F2 formülasyonlarına ait stabilite bulguları aşağıdaki tablolarda verilmektedir (Çizelge 4.42).

Çizelge 4.42. F1 (A) ve F2 (B) formülasyonuna ait 25°C (a), 4°C (b) ve 40°C (c) stabilite sonuçları

(İlk 4 aylık viskozite ölçümleri tek ölçüm olarak yapılmıştır.)

A) F1 formülasyonu

a) 25°C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	12,20±0,12	12,80±0,19	12,10±0,05	12,90±0,03	13,30±0,50	12,30±0,47	11,80±0,20
PDI	0,077±0,012	0,070±0,012	0,065±0,026	0,088±0,023	0,095±0,050	0,09±0,01	0,09±0,01
Zeta potansiyel (mV)	0,46±0,04	0,64±0,01	1,21±0,18	0,69±0,04	0,55±0,02	1,35±0,13	1,75±0,10
Türbidite (NTU)	3,71±0,02	1,04±0,01	1,12 ±0,01	1,06±0,01	1,02±0,01	1,04±0,03	1,28±0,02
Viskozite (cP,40rpm)	78	94	104	76,69	73,01	73,4±0,6	75,1±0,4

b) 4 °C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	12,20±0,12	13,30±0,12	12,7±0,6	13,10±0,01	13,6±0,2	12,6±0,7	12,90±0,13
PDI	0,077±0,012	0,080±0,042	0,078±0,011	0,074±0,010	0,081±0,036	0,108±0,010	0,120±0,012
Zeta potansiyel (mV)	0,457±0,040	0,647±0,252	0,463±0,097	1,11±0,33	1,82±0,17	1,25±0,19	1,71±0,29
Türbidite (NTU)	3,71±0,02	1,19±0,01	0,99±0,01	1,12±0,05	1,03±0,01	1,13±0,02	0,91±0,01
Viskozite (cP,40 rpm)	78	96	78	110,45	26,88	83,4±0,1	82,0±0,5

Çizelge 4.42. (devam) F1 (A) ve F2 (B) formülasyonuna ait 25°C (a), 4°C (b) ve 40°C (c) stabilite sonuçları

b) 40 °C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	12,20±0,12	11,40±0,09	11,8±0,4	12,50±0,15	13,50±0,01	14,20±0,35	15,9±0,7
PDI	0,077±0,012	0,105±0,060	0,075±0,007	0,980±0,220	0,109±0,030	0,239±0,040	0,281±0,014
Zeta potansiyel (mV)	0,457±0,040	0,463±0,097	0,551±0,080	0,744±0,120	-1,66±0,20	2,50±0,34	-5,52±0,92
Türbidite (NTU)	3,71±0,02	1,04±0,01	1,12±0,01	1,090±0,004	1,08±0,01	1,28±0,02	3,02±0,24
Viskozite (cP,40rpm)	78	82,6	83	68,69	71,04	108,0±0,2	125,0±0,2

B) F2 formülasyonu

a) 25 °C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	11,20±0,29	11,80±0,29	11,80±0,14	12,50±0,11	12,80±0,25	12,30±0,68	12,50±0,12
PDI	0,097±0,008	0,106±0,040	0,170±0,016	0,122±0,340	0,148±0,140	0,108±0,010	0,142±0,030
Zeta potansiyel (cV)	0,320±0,168	0,506±0,117	0,256±0,170	0,587±0,230	0,667±0,115	1,99±0,15	0,830±0,006
Türbidite (NTU)	2,83±0,02	0,94±0,01	0,92±0,01	0,88±0,01	0,78±0,02	0,99±0,02	0,87±0,01
Viskozite (cP,40 rpm)	76	77	47	64,64	62,40	76,80±0,14	81,8±0,1

b) 4 °C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	11,20±0,29	11,80±0,21	10,90±0,08	11,80±0,23	12,30±0,01	12,90±0,46	13,0±0,2
PDI	0,097±0,008	0,140±0,060	0,064±0,018	0,095±0,110	0,111±0,010	0,125±0,020	0,128±0,017
Zeta potansiyel (cV)	0,320±0,168	0,419±0,170	0,48±0,04	0,64±0,22	-3,82±0,44	1,59±0,12	1,71±0,29
Türbidite (NTU)	2,83±0,02	0,850±0,025	0,83±0,06	0,88±0,05	0,91±0,01	1,08±0,03	0,96±0,01
Viskozite (cP,40 rpm)	76	84	68	87,41	56,8	82,1±0,1	54,6±0,2

c) 40 °C stabilite sonuçları (n=3)

	0.ay	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	11,20±0,29	10,10±0,25	12,90±0,07	11,90±0,14	12,30±0,56	13,50±0,88	14,20±0,56
PDI	0,097±0,008	0,095±0,011	0,186±0,001	0,11±0,25	0,08±0,12	0,23±0,02	0,21±0,03
Zeta potansiyel (mV)	0,320±0,168	0,349±0,087	0,324±0,225	0,541±0,220	1,23±0,31	2,25±0,283	5,52±0,92
Türbidite (NTU)	2,83±0,02	0,74±0,01	0,82±0,01	0,83±0,01	0,84±0,01	1,21±0,04	1,03±0,02
Viskozite (cP,40 rpm)	76	78	52	64,90	61,76	105,0±0,2	116,0±0,4

Stabilite sonuçlarına göre; 4°C'deki formülasyonlarda etkin maddenin bir kısmı kristallenmiş olup karıştırıldığında formülasyonlar tekrar eski haline dönmüştür. 40°C'de ise formülasyonlar renk değişimine uğramış ve karakterizasyon özellikleri diğer sıcaklıklara göre daha fazla değişmiştir. F1 ve F2 formülasyonlarının zeta potansiyeli bulguları tüm sıcaklıklarda (4 °C, 25°C ve 40°C) artmıştır (Çizelge 4.42). F3 Formülasyonuna ait stabilite bulguları Çizelge 4.43'de verilmiştir:

Çizelge 4.43. F3 formülasyonun 25°C stabilite sonuçları

Karakterizasyon	0.ay	1.ay	2.ay	6.ay
Damlacık boyutu (nm)	1459,0±58,4 nm	1335±22	266,0±7,6	338,0± 28,4
PDI	0,74±0,08	0,797±0,064	0,22±0,01	0,37±0,04
Zeta potansiyel (mV)	-3,39± 0,32	-2,93±0,09	-1,38±0,05	-0,62±0,02
Türbidite (NTU)	31,3±0,2	31,4±0,1	33,9±0,1	36,40±0,95
Viskozite (cP,40 rpm)	54,7±0,6	49,3±0,8	37,5±0,1	6,90±0,09

6 ay stabilite sonuçlarına göre; 4°C'deki formülasyonlarda 1. ayda faz ayrışması görülmüştür. 40°C'de ise formülasyonlar renk değişimine uğramış ve kremalaşma gözlenmiştir. 25°C'de 1. ay karakterizasyon özellikleri çok fazla değişmemekle birlikte, 6 ayın sonunda damlacık boyutu ve diğer karakterizasyon özellikleri değişmiştir.

4.7. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

4.7.1. Lipoliz çalışmaları sonuç bulguları

Gastrik Lipoliz

Hazırlanan lipit kaynaklı kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç şekilleri için in vitro gastrointestinal lipoliz modeli oluşturuldu. Orta ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan bu formülasyonlarda lipoliz açısından farklılıklar kontrol edildi. Ayrıca uzun zincirli ve orta zincirli formülasyonlar (n=3) için FASGIF ve FESGIF ortam şartları oluşturularak açlık-tokluk enzimsel farklılığın etkisi incelendi ve deney süresince harcanan HCl (Şekil 4.38) ve NaOH (Şekil 4.39) miktarları hesaplandı (Çizelge 4.45). Gastik lipolizde 15 dk'da tokluk gastrik ortamındaki sindirim/çözünme açlık

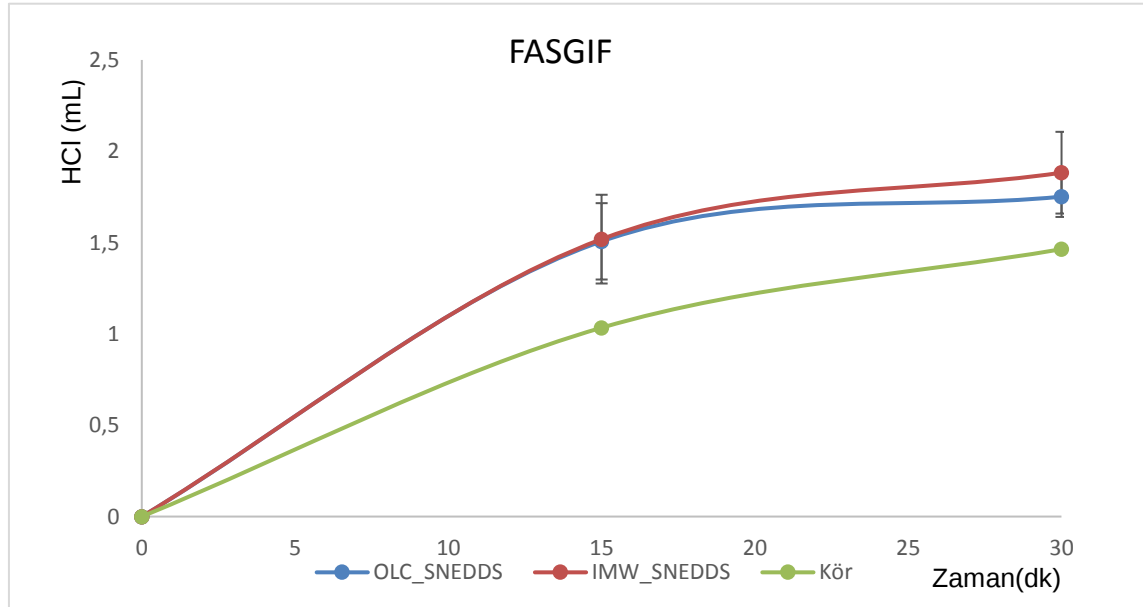
ortamındaki miktardan daha fazla çıkmıştır. Bu durumu, gastrik tokluk ortamının pH'nın açlık ortamına göre yüksek olması da etkilemiş olabilir (Çizelge 4.44).

Çizelge 4.44. Gastrik lipolizde 15. dk'da çözünen/sindirilen ortalama tenofovir miktarı (%; ortalama±SS)

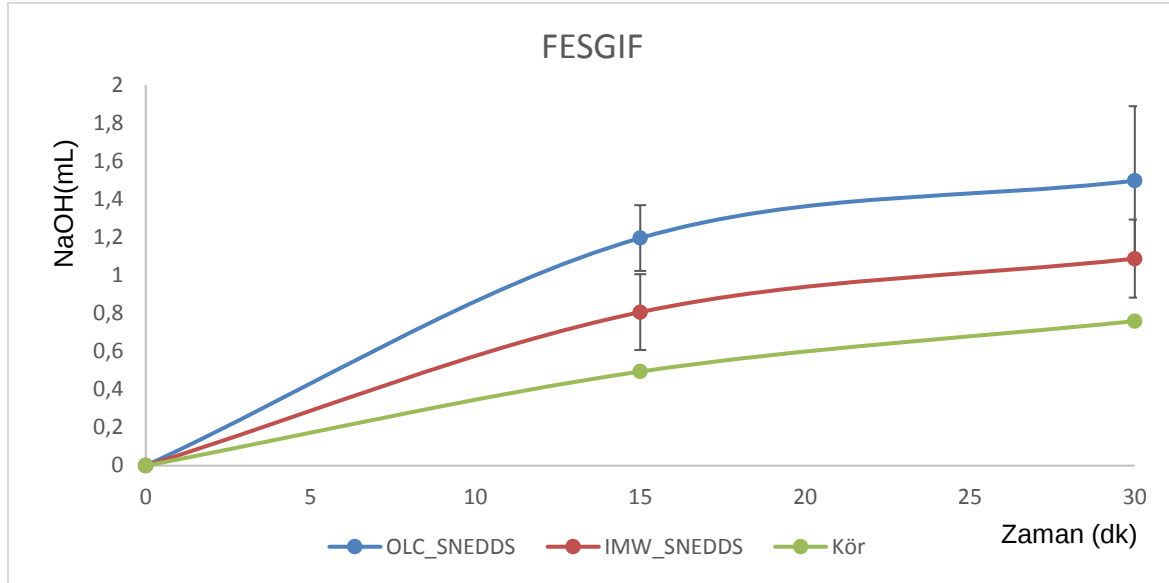
Formülasyon tipi	Açlık durumu		Tokluk durumu	
	15.	30.	15.	30.
Uzun zincirli (F1)	88,1±0,0	92,6±0,0	99,3±0,0	100±0,0
Orta zincirli (F2)	91,1±0,0	92,7±0,0	96,8±0,0	97,2±0,0

Çizelge 4.45. Gastrik lipoliz açlık-tokluk durumunda harcanan sırasıyla HCl ve NaOH miktarları (mL; ortalama±SS)

Formülasyon tipi	Açlık durumu	Tokluk durumu
Uzun zincirli (F1)	1,75±0,22	1,50±0,39
Orta zincirli (F2)	1,83±0,11	1,09±0,20



Şekil 4.38. FASGIF ortamında harcanan HCl miktarı (n=3)



Şekil 4.39. FESGIF ortamında harcanan NaOH miktarı (n=3)

Gastik lipolizde harcanan HCl (açlık) ve NaOH (tokluk) miktarları lipidlerin sindirimi hakkında kesin bilgi vermemektedir. Açlık ortamında harcanan HCl miktarı, yağ asitlerinin sindirimini göstermezken, tokluk ortamında kullanılan NaOH miktarı da, tokluk ortamında kullanılan lipid yapıdaki sütte etkilediği için formülasyonlardaki lipidlerin sindirimi hakkında net bilgi vermemektedir.

İntestinal Lipoliz

Uzun zincirli ve orta zincirli formülasyonlar (n=3) için FASSIF ve FESSIF ortam şartları oluşturularak deneyler yapıldı ve harcanan NaOH (Şekil 4.40, Şekil 4.41) miktarları hesaplandı (Çizelge 4.46). Açlık ve tokluk ortamındaki sindirimi/çözünmeyi görmek için yapılan miktar tayini analizlerinde her iki ortamda da 15 dk'da formülasyonlar arası fark azalmış ve %85 üzerinde çözünme/sindirim görülmüştür (Çizelge 4.47).

Çizelge 4.46.İntestinal lipoliz açlık-tokluk durumunda harcanan NaOH miktarı (mL; ort±SS)

Formülasyon tipi	Açlık durumu	Tokluk durumu
Uzun zincirli (F1)	1,22±0,05	1,10±0,03
Orta zincirli (F2)	1,32±0,06	1,22±0,04

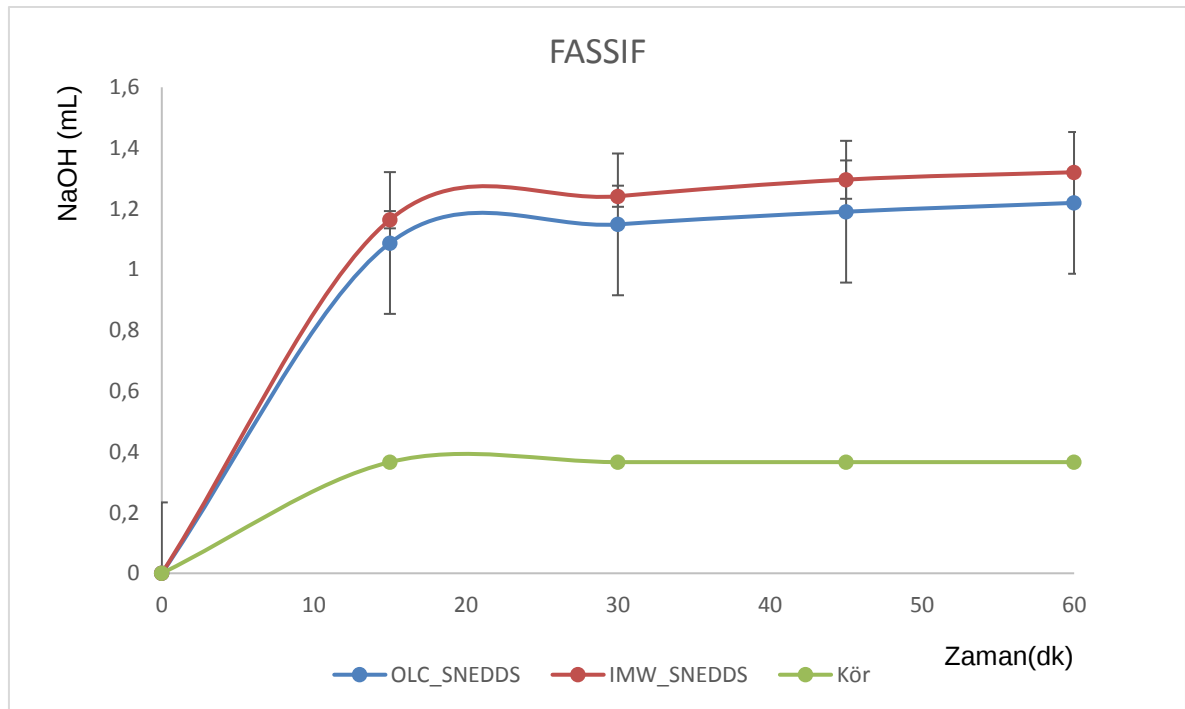
Çizelge 4.47. İntestinal lipolizde 15. dk'da çözünen/sindirilen tenofovir miktarı
a) Açlık durumu, b) Tokluk durumu (%; ortalama±SS)

a) Açlık durumu

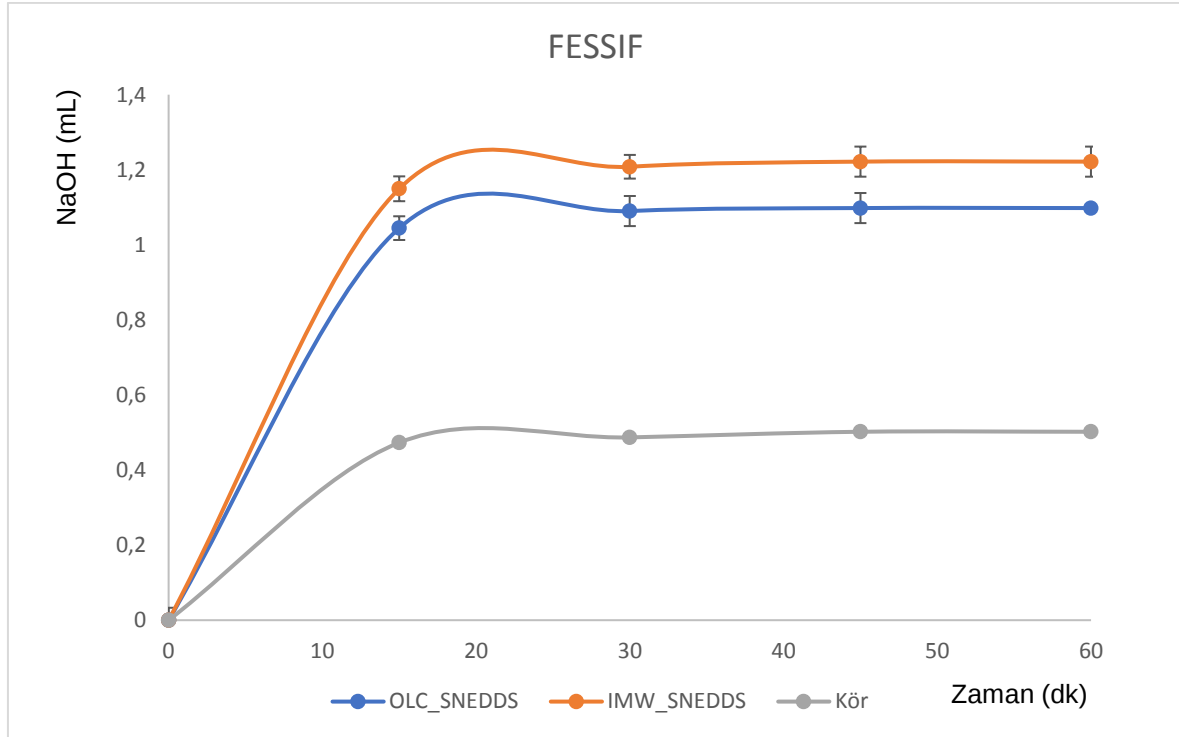
Formülasyon tipi	Açlık durumu (%)			
Zaman (dk)	15.	30.	45.	60.
F1	96,8±0,0	98,9±0,0	99,50±0,01	100,0±0,0
F2	99,0±0,0	99,2±0,0	100,0±0,0	101,0±0,0

b) Tokluk durumu

Formülasyon tipi	Tokluk durumu (%)			
Zaman (dk)	15.	30.	45.	60.
F1	97,1±0,0	99,80±0,01	100,0±0,0	100,0±0,0
F2	98,0±0,0	99,80±0,01	100,0±0,0	101,0±0,0



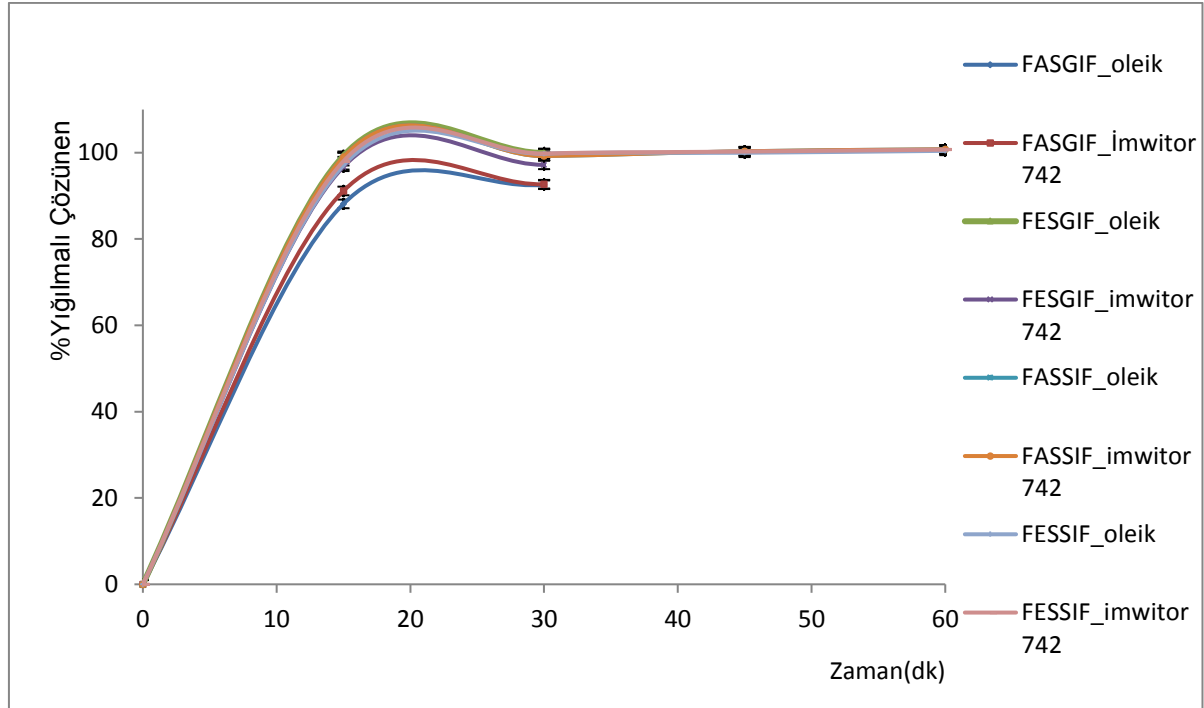
Şekil 4.40. FASSIF ortamında harcanan NaOH miktarı (n=3)



Şekil 4.41. FESSIF ortamda harcanan NaOH miktarı (n=3)

İntestinal fazda kullanılan NaOH miktarı, açığa çıkan yağ asitlerinin ortamın pH'ını değiştirmesini önlemek amacıyla kullanıldığından lipidlerin sindirimi hakkında bilgi vermektedir. Açlık ve tokluk ortamlarında, orta zincirli yağ asidi olan İmwitor 742 ile hazırlanan SNEDDS formülasyonunda, uzun zincirli yağ asidi içeren oleik asit formülasyonuna göre daha fazla NaOH harcanmış ve daha fazla sindirime uğramıştır. Sonuç olarak lipofilik ve BCS Sınıf 3 (yüksek çözünürlüklü, düşük permeabilite) bir ilaç olan, tenofovir içeren SNEDDS sistemlerin daha önce yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarında pH 6,8'de 15. dk'da %85'den fazla yani çok hızlı bir çözünme sağlanmıştır (Çizelge 4.39, Çizelge 4.40). Bu sonuç, lipoliz deney sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.47).

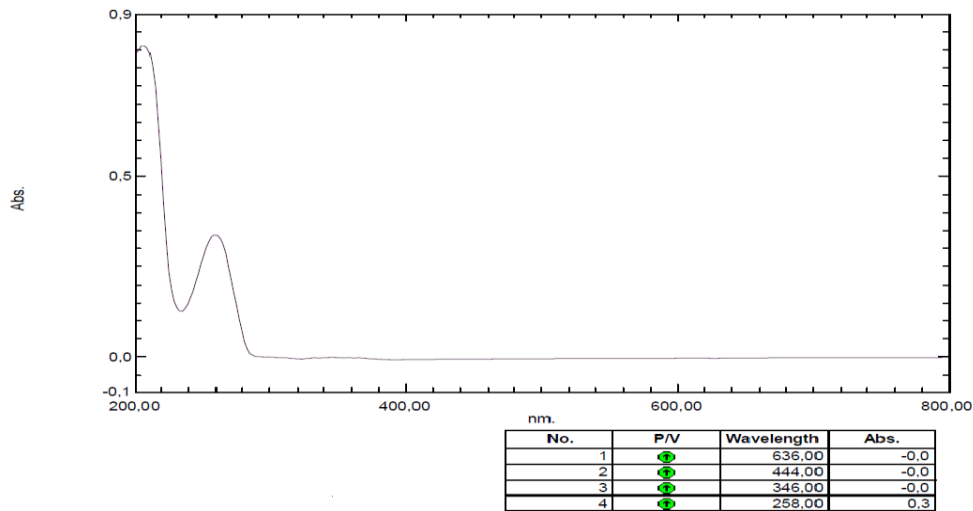
Oleik asit ve İmwitor 742 içeren formülasyonlar, gastrik lipoliz (30 dk) ve intestinal lipoliz (60 dk) süresince tenofoviri %çözünme/sindirimi değerleri Şekil 4.42'da verilmiştir.



Şekil 4.42. Geliştirilen oleik asit ve İmwitor 742 formülasyonu FASGIF, FESGIF, FASSIF, FESSIF lipoliz ortamındaki %yıgılgımlı çözünen tenofovir miktarı

4.7.2. Lipoliz örneklerinin analizi

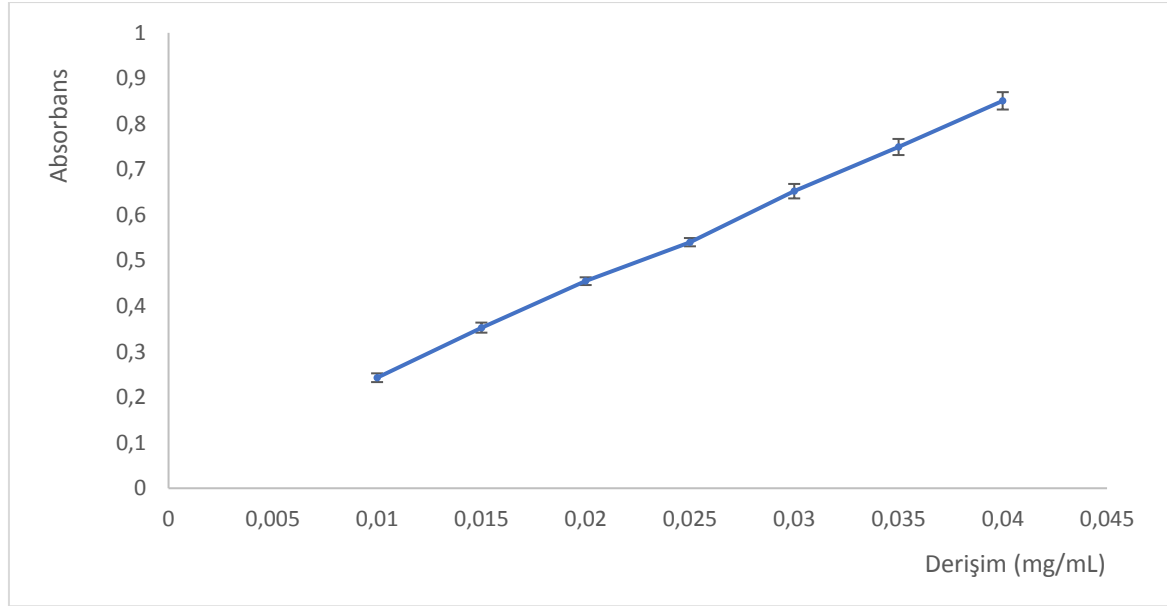
Hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 10-40 µg/mL arasındaki derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Spektrofotometrik miktar tayini yöntemi kullanıldı (Şekil 4.43). Regresyon istatistikleri ve doğru denklemi bulundu (Çizelge 4.42; Şekil 4.44).



Şekil 4.43. Tenofovirin asetonitrildeki UV spektrumu

Çizelge 4.48. Tenofovirin asetonitril ortamındaki kalibrasyon parametreleri

Kalibrasyon Denklemi	$y = 20,107x + 0,046$
R²	0,999
Regresyon standart sapması	0,006
Gözlem sayısı	7



Şekil 4.44. Tenofovirin asetonitrildeki kalibrasyon denklemi (n=3, ort ± SS)

4.7.3. Lipoliz örneklerinin analizinin yöntem validasyonu

Doğruluk ve geri elde

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. %geri elde sonuçları Çizelge 4.49’da verildi ve hesaplanan %BS değerleri %2’nin altında bulunurken, geri elde yüzdesi sonuçları da %98-103 arasında bulunarak sonuçlar uygun bulundu.

Çizelge 4.49. Tenofovirin asetonitril ortamındaki %geri elde sonuçları

0,02 mg/mL			0,025 mg/mL			0,03 mg/mL		
Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde	Absorbans	Pratik Derişim (mg/mL)	%Geri Elde
0,4580	0,0205	102,45	0,565	0,0260	103,25	0,645	0,029	99,30
0,4480	0,0199	99,96	0,548	0,0250	99,87	0,658	0,030	101,46
0,4550	0,0203	101,70	0,555	0,0250	101,26	0,660	0,031	101,79
X_{ort}	0,0202	101,37	X_{ort}	0,0250	98,98	X_{ort}	0,030	100,85
SS	0,0003		SS	0,0004		SS	0,0004	
%BS	1,26		%BS	1,68		%BS	1,33	

Kesinlik

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi kesinlik çalışmaları yapıldı ve sonuçlar Çizelge 4.50’de verildi. %BS sonuçları %2’nin altında olduğu için sonuçlar uygun bulunmuştur.

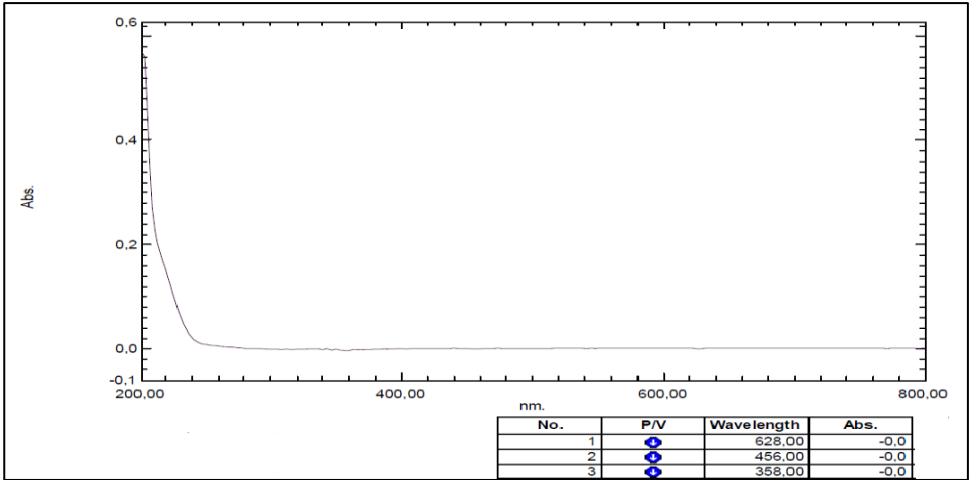
Çizelge 4.50. Tenofovirin asetonitrilde yapılan analizine ait kesinlik sonuçları

Derişim (mg/mL)	0,020	0,025	0,03
Absorbans	0,458	0,565	0,645
	0,448	0,548	0,658
	0,455	0,555	0,660
X_{ort}	0,454	0,556	0,654
SS	0,005	0,009	0,008
%BS	1,13	1,54	1,25

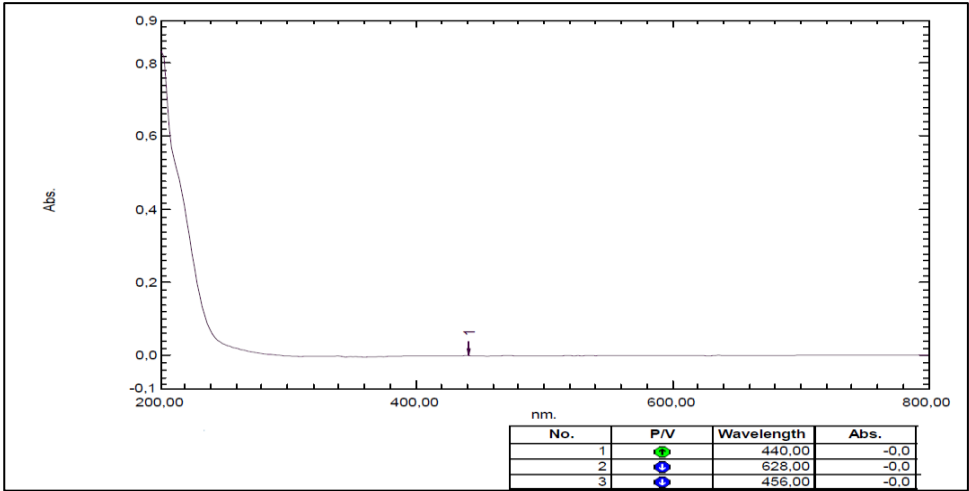
Özgünlük ve seçicilik

Spektrofotometrik yöntemin sadece analizi istenen tenofoviri saptayabilmesi amacıyla, etkin madde içermeyen ortamlarda 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrum alındı (Şekil 4.45).

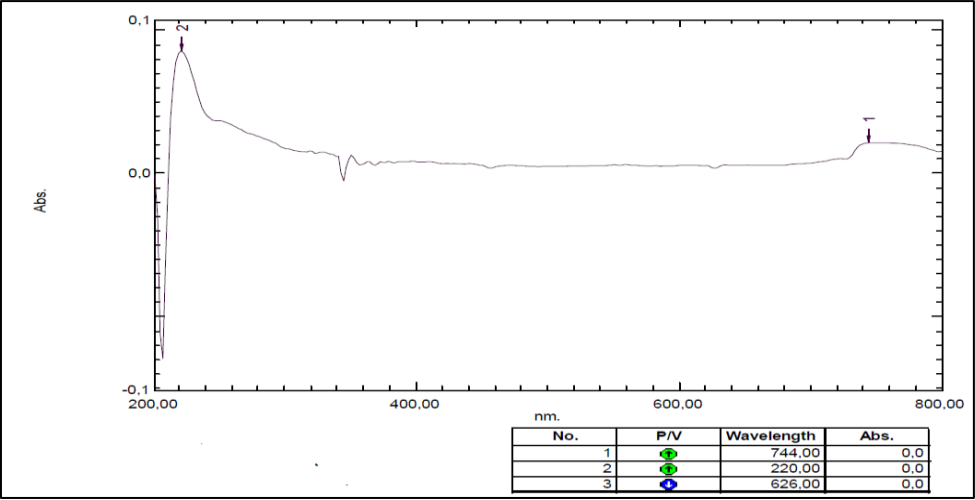
a) FASGIF



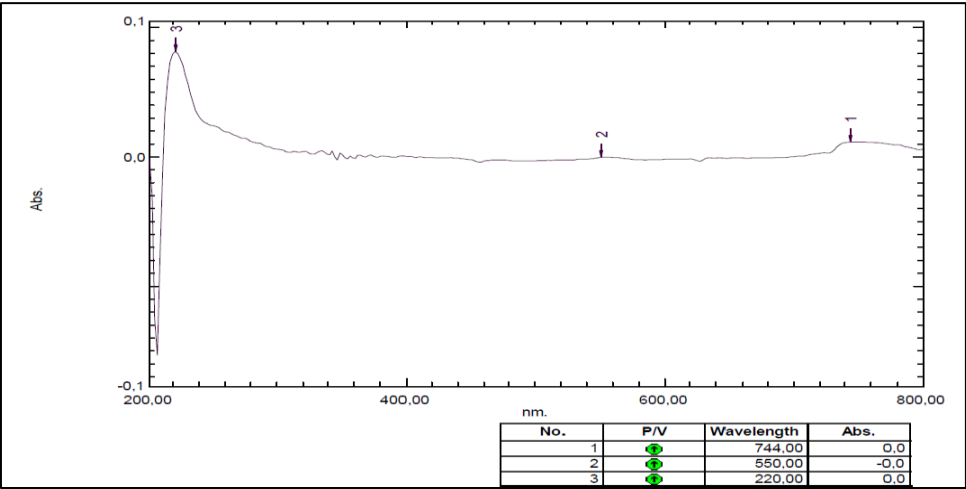
b) FESGIF



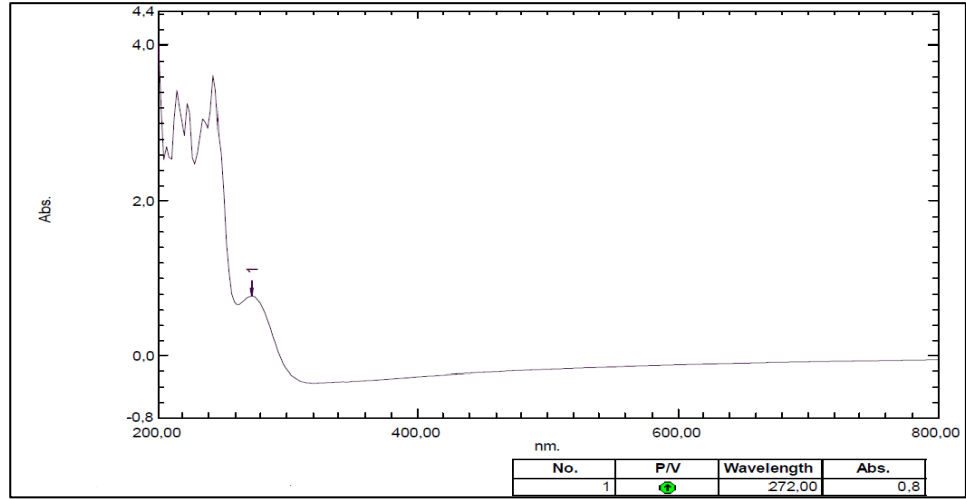
c) FASSIF



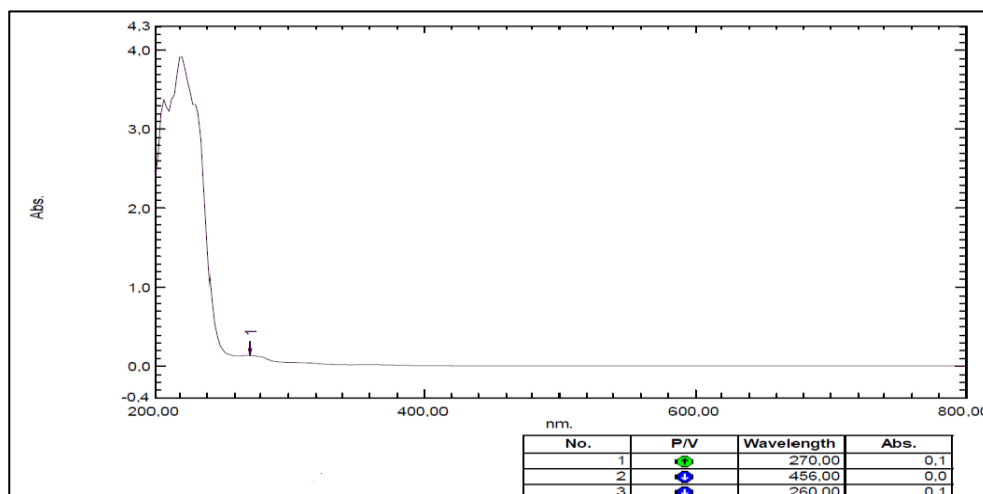
d) FESSIF



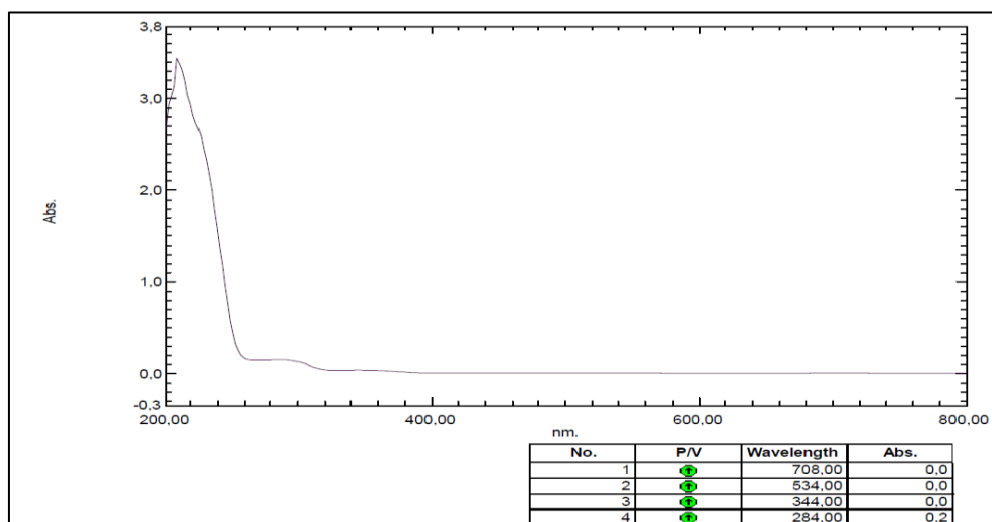
e) Oleik asit



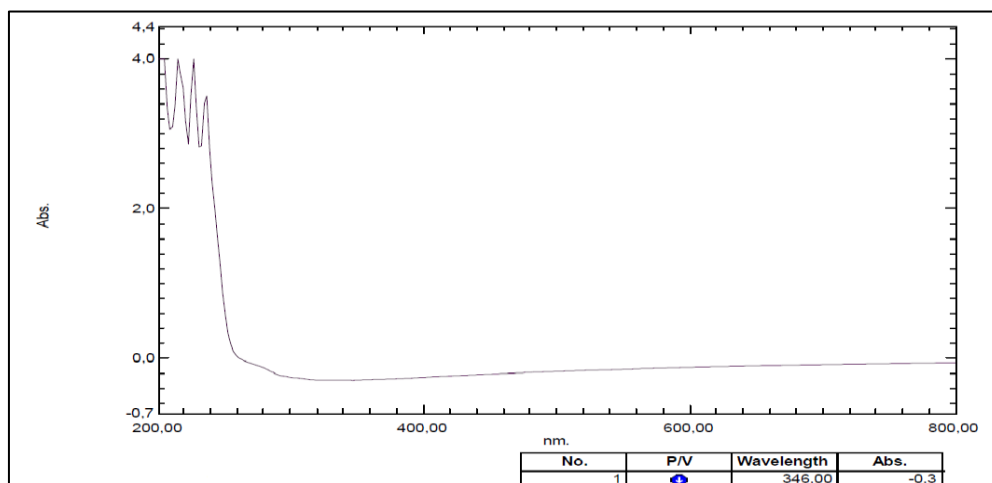
f) Imwitor 742



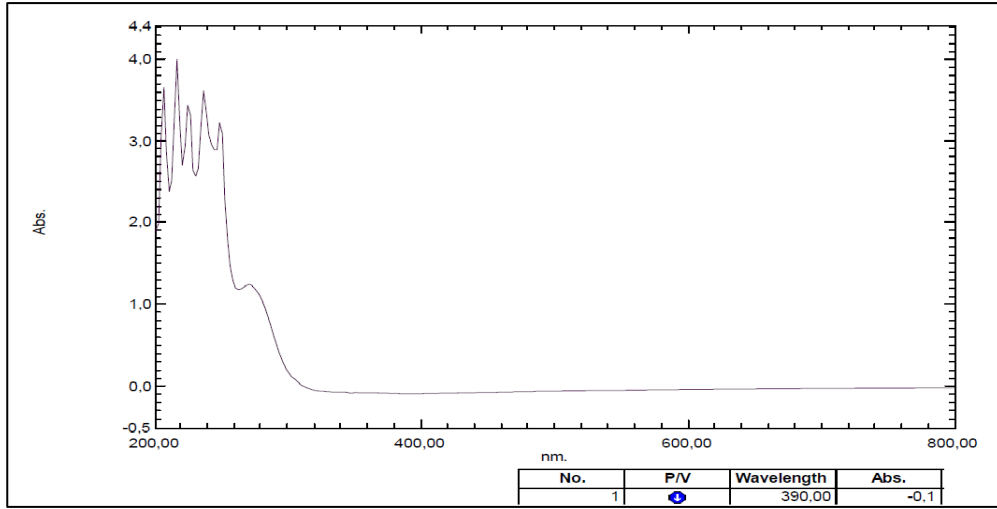
g) Cremophor RH 40



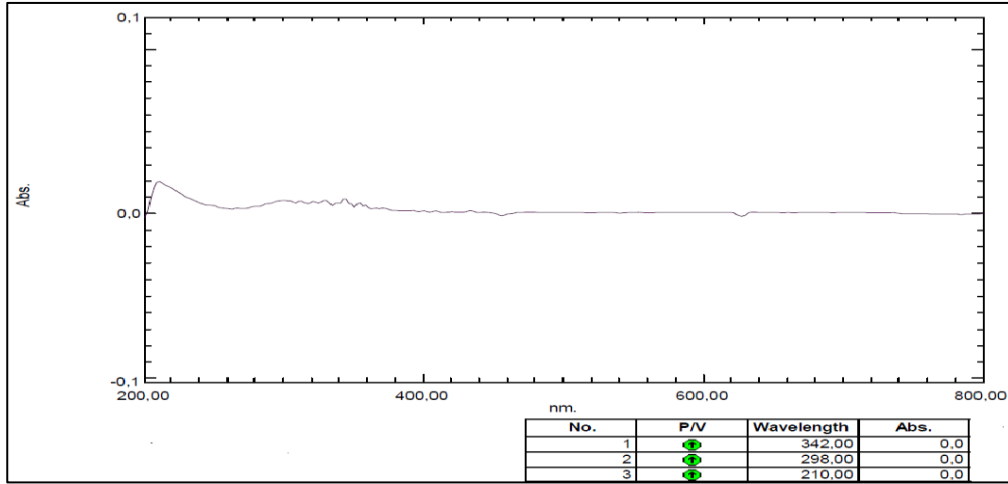
h) Tween 20



i) Propilen glikol



j) Asetonitril



Şekil 4.45. F1 ve F2 formülasyon bileşenlerinin lipoliz ortamındaki asetonitril ile oluşan UV spektrumları a)FASGIF, b)FESGIF, c)FASSIF, d)FESSIF, e)Oleik asit, f)İmwitor 742, g)Cremophor RH 40, h)Tween 20, i)Propilen glikol, j)Asetonitril

Doğrusallık

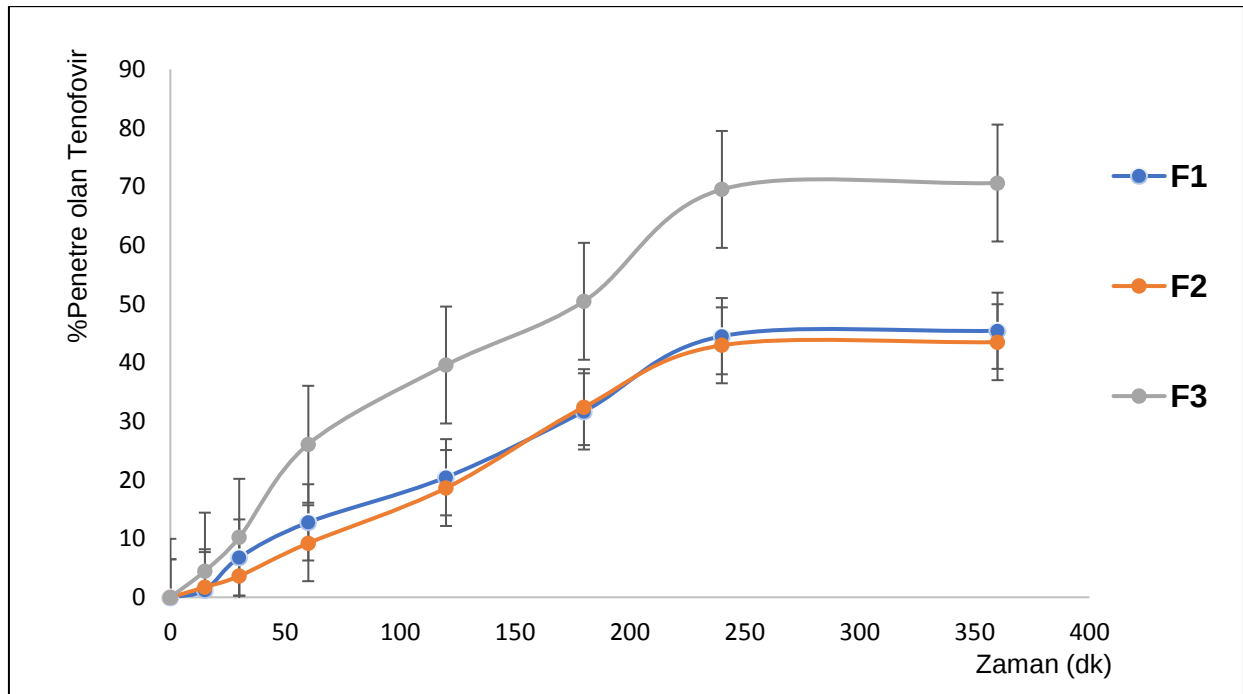
Doğrusallık absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi uygulanarak regresyon doğrusunun eldesiyle gösterildi (Şekil 4.44). Determinasyon katsayısı sonucu 1'e yakın bulunarak, doğru denkleminin doğrusallığı saptandı ($R^2= 0,999$).

Duyarlılık ve saptama sınırı

Geliştirilen analitik yöntemlerin LOD ve LOQ hesaplanmıştır. Analitik yöntemde asetonitril için LOD 0,84 µg/mL ve LOQ 2,60 µg/mL olarak bulunmuştur.

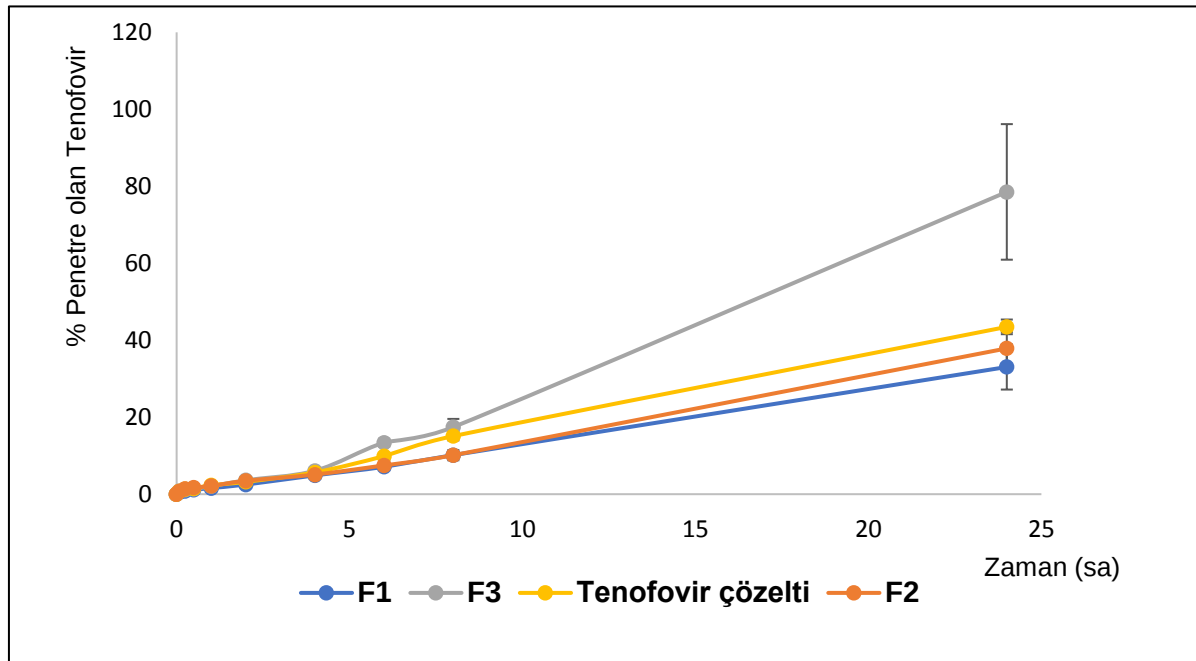
4.8. Tenofovir içeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde İn Vitro ve Ex-Vivo Olarak Geçişine Ait Bulgular

Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde pH 6,8 fosfat tamponunda yapılan, 24 000 Dalton’dan küçük moleküllere geçirgen olan membrandan emülsiyon formülasyonlarının in vitro etkin madde geçiş deneyine ait profiller Şekil 4.46’da verilmiştir. Profil incelendiğinde, pH 6,8’de 6. saatin sonunda F1 ve F2 formülasyonlarındaki tenofovirin diyaliz membrandan geçişi sırasıyla %45,4±2,50 ve %43,5±3,10 olarak bulunmuştur. Buna karşın çoklu emülsiyon şeklinde hazırlanan F3 formülasyonu içindeki tenofovirin diyaliz membrandan geçişi %70,6±4,50 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.46. F1, F2 ve F3 formülasyonların diyaliz membrandan geçen %tenofovir miktarı

Ex-vivo geçirgenlik çalışmalarında, koyun ince bağırsak dokusundan tenofovirin akı ve permeabilite değerlerinin çoklu emülsiyon formülasyonunda diğer formülasyonlara göre daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.47; Çizelge 4.51). F3 formülasyonu 24 saat sonunda $78,5 \pm 11,8$ olarak bulunurken, bu değer F1 formülasyonu için $33,1 \pm 4,90$, F2 formülasyonu için $37,9 \pm 5,70$ ve tenofovir çözeltisi için $43,5 \pm 6,50$ olarak bulunmuştur. Formülasyonların akı ve permeabilite değerleri, F3 formülasyonunda en yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.47. F1, F2 ve F3 emülsiyonların koyun doku hücresinden geçen %tenofovir miktarı

Çizelge 4.51. Tenofovir içeren emülsiyonların ve çözeltisinin akı ve permeabilite değerleri

Örnekler	Akı (Flux) ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Permeabilite Katsayısı ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
F1	$0,216 \pm 0,050$	0,014
F2	$0,256 \pm 0,027$	0,017
F3	$0,554 \pm 0,142$	0,037
Tenofovir Çözelti	$0,275 \pm 0,009$	0,018

4.9. Biyoyararlanım Çalışmaları

Biyoyararlanım çalışmalarında sıçan plazma örneklerindeki tenofovir miktarını tespit etmek için LC-MS/MS yöntemi kullanıldı. Çalışmalarda ilk olarak miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyon çalışmaları yapıldı.

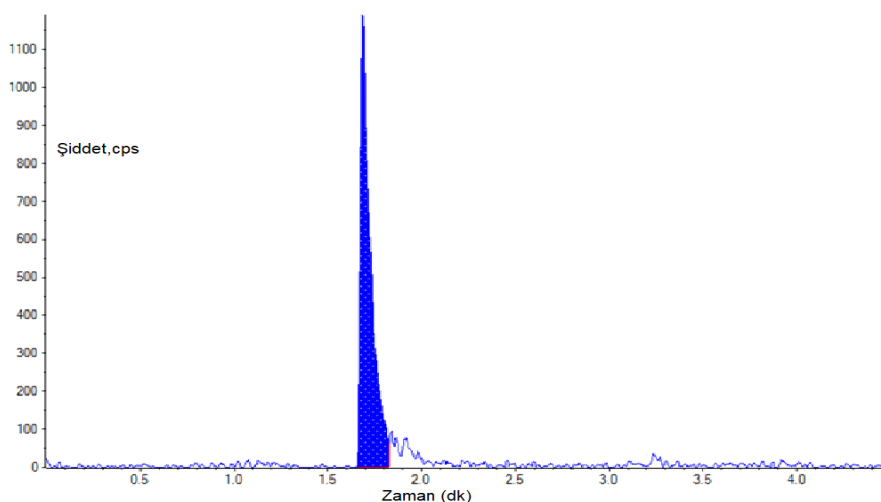
4.9.1.Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yöntem geliştirilmesine ait bulgular

Tenofoviriin sıçan plazma örneklerindeki miktarını analiz etmek için, LC-MS/MS cihazıyla analitik miktar tayini yöntemi geliştirildi (Çizelge 4.52). Şekil 4.48'de tenofovir'e ait kromatogram, Şekil 4.49'da ise kalibrasyon verileri verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi noktalarının derişimleri 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 60 ng/mL, 80 ng/mL ve 100 ng/mL'dir (Çizelge 4.53). Bulunan R^2 değeri regresyon eşitliğinin uygunluğunu göstermektedir (Şekil 4.49).

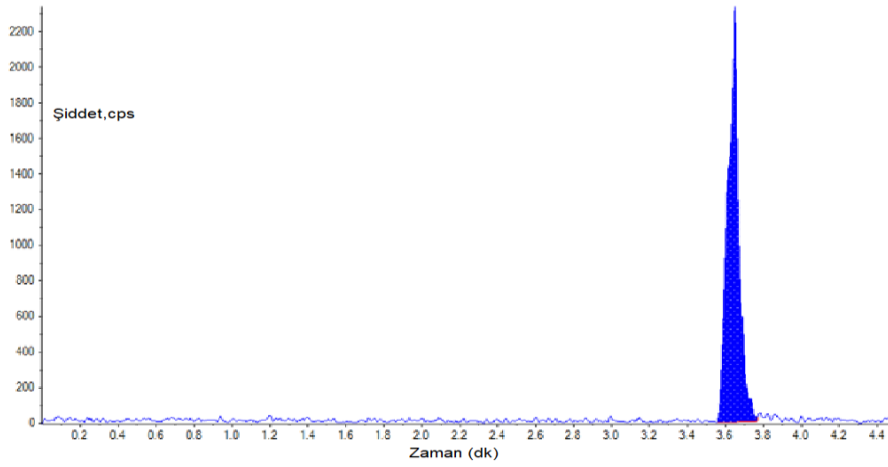
Çizelge 4.52. Tenofovir'e ait analiz veriler-tenofovir ve ornidazol

Hedef İyon	Tenofovir
Analit Tutulma Zamanı (dk)	1,78
Analit Pik Alanı	4525,764
IS Pik Alanı	9378,717

a) Tenofovir (10 ng/mL)



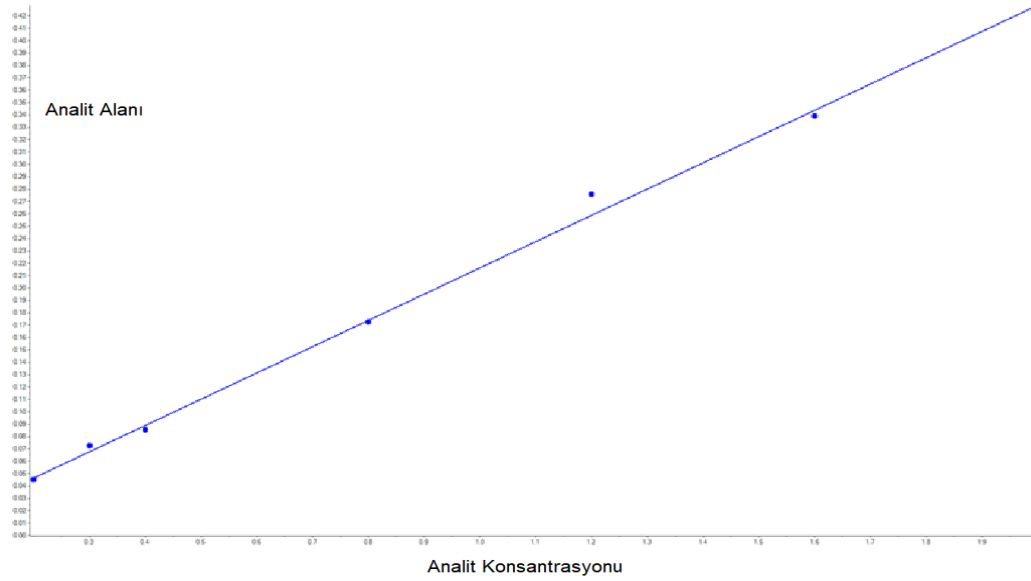
b) Ornidazol (5 ng/mL)



Şekil 4.48. Tenofovir (a) ve ornidazol (b) ait kromatogramlar

Çizelge 4.53. Tenofovir kalibrasyon konsantrasyon aralığı

Kons. (ng/mL)	Sayı	Ort.Hesaplanan Kons. (ng/mL)	%kesinlik
10	1	9,67	96,70
15	1	16,11	107,40
20	1	19,22	96,10
40	1	39,72	99,30
60	1	64,05	106,70
80	1	78,97	98,70
100	1	95,03	95,00



Şekil 4.49. Tenofovire ait kalibrasyon eğrisi (Regresyon eşitliği: $y = 0,212x + 0,00399$, $R^2=0,9942$)

4.9.2. Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yönteminin validasyonu

Stok çözelti kararlılığı

Stok çözelti kararlılığı bulguları ICH kılavuzlarına göre %RSD'nin %15'den az seviyelerinde kabul edilebildiği için sonuçlar uygun bulunmuştur (Çizelge 4.54).

Çizelge 4.54. Stok çözelti kararlılığı bulguları

	Prl	Düşük Derişim (10 ng/mL)						Yüksek Derişim (80 ng/mL)					
		Kons.	Ort.	SS	% RSD	Gerçek Değer. Sapma	% Sapma	Kons.	Ort.	SS	%RS D	Gercek Deger Sapma	% Sapma
1.Gün 0.Saat	1	25,450	29,219	3,434	11,75	-2,603	-1,051	87,095	81,39	4,992	6,133	1,735	-7,674
	2	30,037						79,235					
	3	32,170						77,834					
1.Gün 6.Saat	1	28,260	28,912	0,608	2,10	-3,627	-1,051	71,010	75,14	3,856	5,132	-6,073	-7,674
	2	29,013						78,645					
	3	29,463						75,771					
	Prl	Düşük Derişim (10 ng/mL)						Yüksek Derişim (80 ng/mL)					
		Kons.	Ort.	SS	% RSD	Gercek Deger. Sapma	%Sap ma	Kons.	Ort.	SS	%RS D	Gercek Deger. Sapma	%Sapma
1.Gün 0.Saat	1	25,450	29,219	3,434	11,75	-2,603	-0,973	87,095	81,39	4,992	6,133	1,735	4,289
	2	30,037						79,235					
	3	32,170						77,834					
3. Gün	1	25,638	28,935	3,000	10,37	-3,551	-0,973	81,435	84,88	4,255	5,013	6,098	4,289
	2	31,505						83,565					
	3	29,661						89,635					

Carry over (taşınma) bulguları

Çizelge 4.55. Carry over (taşınma) bulguları

	Anl.Std.			İç Std.		
	RT	Alan	Alan %	RT	Alan	Alan %
PELLOQ	1,683	3196,193	-	3,639	9793,526	-
PK7	1,714	27327,703	-	3,673	68008,554	-
PK	-	147,912	4,628	-	26,881	0,274

Anl.Std.: Tenofovir

İç Std.:Ornidazol

Dilüsyon doğruluğu bulguları

Miktar tayini yöntemine ait dilüsyon bulguları %5'in altındaki %RSD sonuçları ile uygun bulunmuştur (Çizelge 4.56).

Çizelge 4.56. Dilüsyon doğruluğu bulguları

	Hesaplanan Derişim (ng/mL)
Dilüsyon-1	505,839
Dilüsyon-2	487,189
Dilüsyon-3	547,620
Dilüsyon-4	509,162
Dilüsyon-5	512,731
Ortalama	512,508
SS	21,964
%RSD	4,29
%SAPMA	2,502

Gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları

Gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları Çizelge 4.57'de verilmiştir. %RSD sonuçları düşük derişimde %8'in üstünde ve yüksek derişimlerde %3'in altında olarak bulunmuştur ve istatistiksel açıdan uygundur (Çizelge 4.57).

Çizelge 4.57. Gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları

	LLOQ DERİŞİM (10 000 ng/mL Anl.Std.)		DÜŞÜK DERİŞİM (30 000 ng/mL Anl.Std.)		ORTA DERİŞİM (50 000 ng/mL Anl.Std.)		YÜKSEK DERİŞİM (80 000 ng/mL Anl.Std.)	
	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım
N 1. enjek.	10,579	105,790	31,331	104,437	58,052	116,104	90,898	113,623
N 2. enjek.	9,499	94,990	33,752	112,507	55,013	110,026	92,996	116,245
N 3. enjek.	8,880	88,800	32,062	106,873	57,006	114,012	90,095	112,619
N 4. enjek.	10,848	108,480	37,404	124,680	53,945	107,890	93,800	117,250
N 5. enjek.	10,114	101,140	30,490	101,633	56,080	112,160	86,601	108,251
Ort.	9,984	99,840	33,008	110,026	56,019	112,038	90,878	113,598
SS	0,802	8,018	2,735	9,117	1,614	3,229	2,825	3,532
%RSD	8,03	8,03	8,29	8,29	2,88	2,88	3,11	3,11
Sapma %Gün içi	-0,160	-0,160	10,026	10,026	12,038	12,038	13,598	13,598

Günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları

Günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları Çizelge 4.58’de verilmiştir. Sonuçlara ait günler arası RSD değerleri %15’in altında bulunmuştur (Çizelge 4.58)

Çizelge 4.58. Günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (1.gün, 2.gün, 3.gün ve günler arası)

1.GÜN	LLOQ DERİŞİM (10 000 ng/mL)		DÜŞÜK DERİŞİM (30 000 ng/mL)		ORTA DERİŞİM (50 000 ng/mL)		YÜKSEK DERİŞİM (80 000 ng/mL)	
	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım
N ₁ . enjek.	8,516	85,160	35,259	117,530	56,132	112,264	93,384	116,730
N ₂ . enjek.	10,667	106,670	32,681	108,937	0,000	0,000	92,156	115,195
N ₃ . enjek.	10,332	103,320	32,331	107,770	57,726	115,452	91,248	114,060
Ort.	9,838	98,383	33,424	111,412	56,929	75,905	92,263	115,328
SS	1,157	11,574	1,599	5,330	1,127	65,755	1,072	1,340
%RSD	11,8	11,8	4,78	4,78	1,98	86,6	1,16	1,16
%Sapma Gün içi Tekrar.	-1,617	-1,617	11,412	11,412	13,858	-24,095	15,328	15,328

Çizelge 4.58. (devam) Günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları (1.gün, 2.gün, 3.gün ve günler arası)

2.GÜN	LLOQ DERİŞİM (10 000 ng/mL)		DÜŞÜK DERİŞİM (30 000 ng/mL)		ORTA DERİŞİM (50 000 ng/mL)		YÜKSEK DERİŞİM (80 000 ng/mL)	
	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım
N 1. enjek.	11,343	113,430	33,844	112,813	48,269	96,538	90,829	113,536
N 2. enjek.	12,498	124,980	31,062	103,540	52,934	105,868	79,887	99,859
N 3. enjek.	11,987	119,870	31,703	105,677	52,705	105,410	98,446	123,058
Ort	11,943	119,427	32,203	107,343	51,303	102,605	89,721	112,151
SS	0,579	5,788	1,457	4,856	2,630	5,259	9,329	11,661
%RSD	4,85	4,85	4,52	4,52	5,13	5,13	10,4	10,4
%Sapma Gün içi Tekrar.	19,427	19,427	7,343	7,343	2,605	2,605	12,151	12,151

3.GÜN	LLOQ DERİŞİM (10 000 ng/mL)		DÜŞÜK DERİŞİM (30 000 ng/mL Anl.Std.)		ORTA DERİŞİM (50 000 ng/mL Anl.Std.)		YÜKSEK DERİŞİM (80 000 ng/mL Anl.Std.)	
	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım	Hesap. Derişim	%Geri Kazanım
N 1. enjek.	11,809	118,090	32,635	108,783	57,169	114,338	86,768	108,460
N 2. enjek.	0,000	0,000	33,658	112,193	51,034	102,068	83,160	103,950
N 3. enjek.	11,900	119,000	34,041	113,470	55,323	110,646	83,400	104,250
Ort	11,855	79,030	33,445	111,482	54,509	109,017	84,443	105,553
SS	0,064	68,444	0,727	2,423	3,148	6,295	2,017	2,522
%RSD	0,543	86,6	2,17	2,17	5,77	5,77	2,39	2,39
%Sapma Gün içi Tekrar.	18,545	-20,970	11,482	11,482	9,017	9,017	5,553	5,553

LLOQ bulguları

Tenofovir ait LLOQ bulguları Çizelge 4.60'da verilmiştir. Tenofovir için LLOQ ortalama değeri 0,056 ng/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.60. Tenofovir ve iç standart ornidazole ait LLOQ bulguları

	Tenofovir							İç Std -Ornidazol					
	Derisim	S Height	N Height	S/N	k	LOQ		Derisim	S Height	N Height	S/N	k	LOQ
LOQ-1	0,500	-	-	80,800	5,000	0,031	LOQ-1	5,000	-	-	177,400	5,000	0,141
LOQ-2	0,500	-	-	36,000	5,000	0,069	LOQ-2	5,000	-	-	154,400	5,000	0,162
LOQ-3	0,500	-	-	46,100	5,000	0,054	LOQ-3	5,000	-	-	168,400	5,000	0,148
LOQ-4	0,500	-	-	72,500	5,000	0,034	LOQ-4	5,000	-	-	170,400	5,000	0,147
LOQ-5	0,500	-	-	79,200	5,000	0,032	LOQ-5	5,000	-	-	156,600	5,000	0,160
LOQ-6	0,500	-	-	31,500	5,000	0,079	LOQ-6	5,000	-	-	160,500	5,000	0,156
LOQ-7	0,500	-	-	27,900	5,000	0,090	LOQ-7	5,000	-	-	175,500	5,000	0,142
LOQ ort						0,056	LOQ ort						0,151

Matriks etkisi bulguları

Düşük derişim (30 ng/mL) ve yüksek derişime (80 ng/mL) ait bulgular Çizelge 4.61'de verilmiştir. %RSD değerleri, %8'in altında bulunmuştur.

Çizelge 4.61. Matriks etkisi bulguları

	Düşük Derişim (30 ng/mL)			Yüksek Derişim (80 ng/mL)		
	Alan		Pik Alan %	Alan		Pik Alan %
	Std	İç std		Std	İç std	
KE	1182,628	189647,430	-	6043,745	184822,050	-
MF 1	12140,960	91001,412	2139,458	33241,795	85603,171	1187,524
MF 2	13551,977	85759,652	2534,069	33318,691	89892,997	1133,469
MF 3	13226,489	85589,036	2478,137	31156,253	84720,585	1124,615
MF 4	12993,778	88306,956	2359,605	33482,595	87463,424	1170,686
MF 5	13330,293	90337,416	2366,306	35029,054	84950,267	1260,989
MF 6	14449,708	87097,167	2660,442	34022,985	83272,794	1249,444
Ortalama			2423,003	Ortalama		1187,788
SS			178,541	SS		57,260
%RSD			7,37	%RSD		4,82
MF: Matrix Faktör		Anl. Std.: Tenofovir		İç std: Ornidazol		

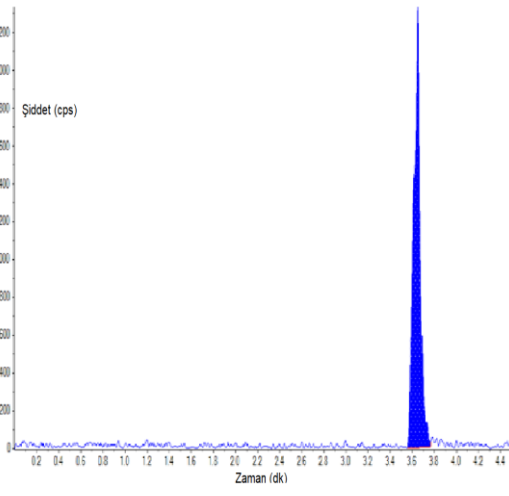
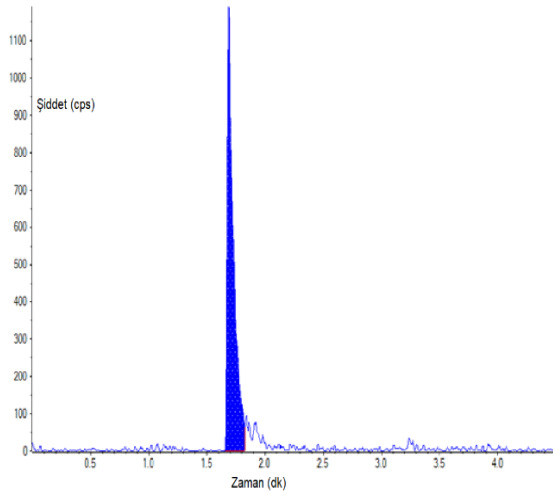
Seçicilik bulguları

Kan plazma çalışmaları miktar tayininde kullanılan krler izelge 4.62’de verilmiştir. şekil 4.50’de verilen sonuçlara göre tenofovirle kr zeltirler arasında herhangi bir etkileşim bulunmamaktadır.

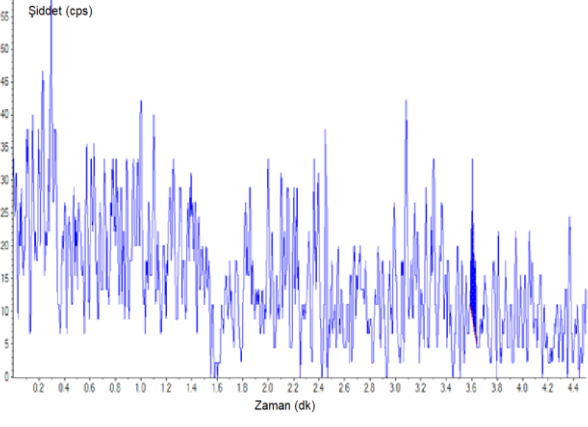
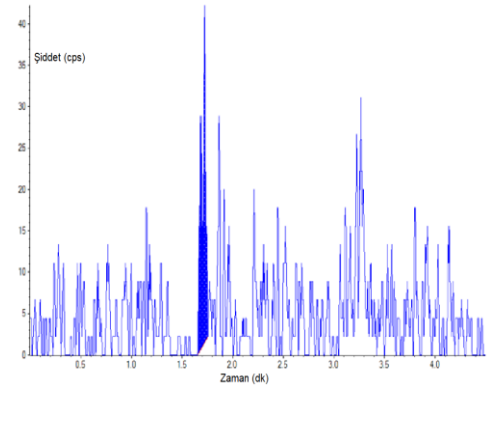
Çizelge 4.62. Yöntem seimliği bulguları

	Anl. STD			İ STD		
	RT	Alan	Alan %	RT	Alan	Alan %
LOQ	1,687	4525,764	-	3,649	9378,717	-
Kr-1	1,724	111,309	2,459	3,607	35,822	0,382
Kr-2	1,746	177,764	3,928	3,931	50,633	0,540
Kr-3	1,742	70,267	1,553	3,790	24,800	0,264
Kr-4	1,680	165,350	3,654	3,723	39,281	0,419
Kr-5	1,694	132,272	2,923	3,642	24,111	0,257
Kr-6	1,721	124,721	2,756	3,503	28,589	0,305
	Anl. Std.: Tenofovir			İ Std.: Ornidazol		

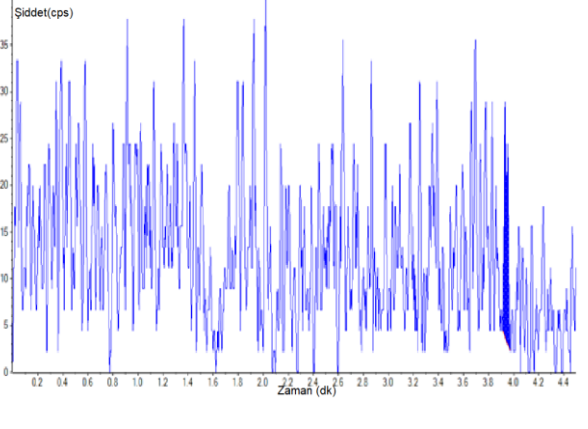
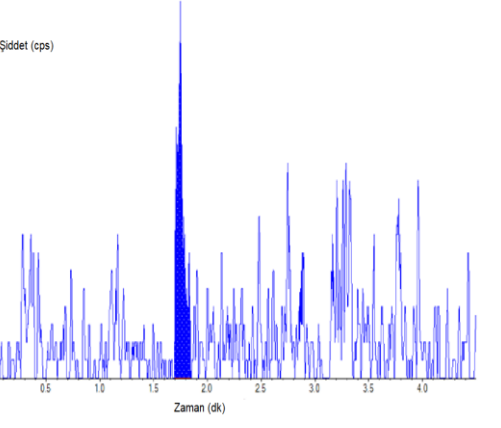
a) Tenofovir

Hedef İyon	Tenofovir
Analit Tutulma Zamanı	1,78
Analit Pik Zamanı	4525,764
IS Pik Alanı	9378,717
Hesaplanmış Konsantrasyon	0,000
	

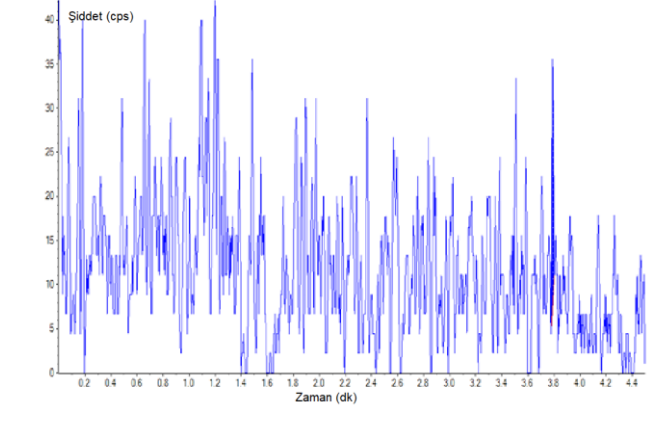
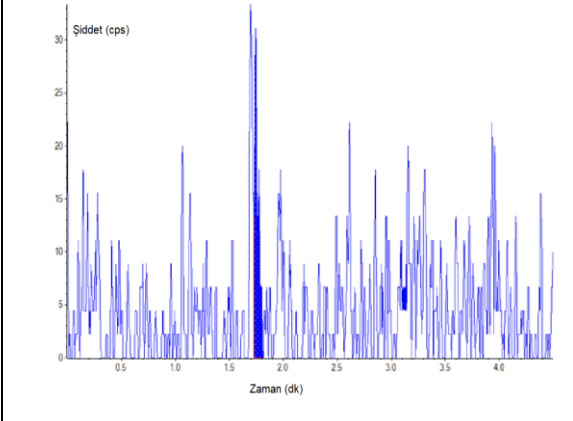
b) K r 1

Hedef İyon	Tenofovir
Analit Tutulma Zamanı	1,78
Analit Pik Zamanı	111,309
IS Pik Alanı	35,822
Hesaplanmış Konsantrasyon	0,000
	

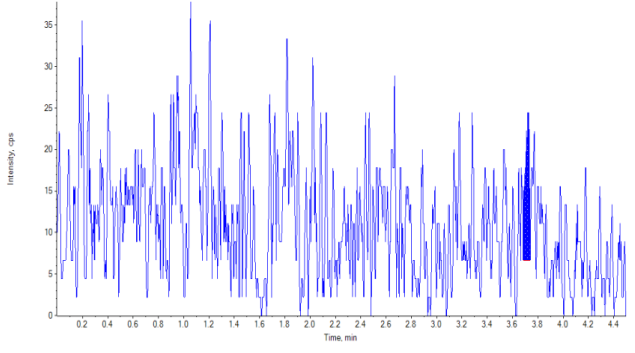
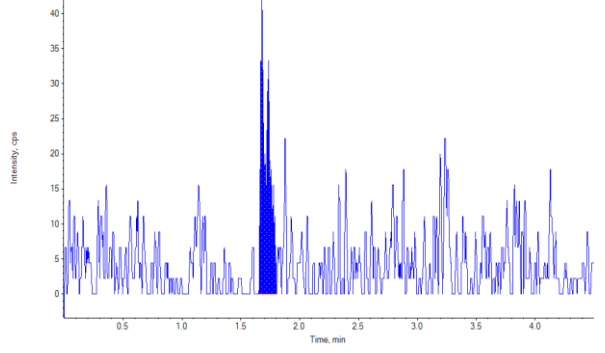
c) K r 2

Hedef İyon	Tenofovir
Analit Tutulma Zamanı	1,78
Analit Pik Alanı	177,764
IS Pik alanı	50,633
Hesaplanmış konsantrasyon	0,000
	

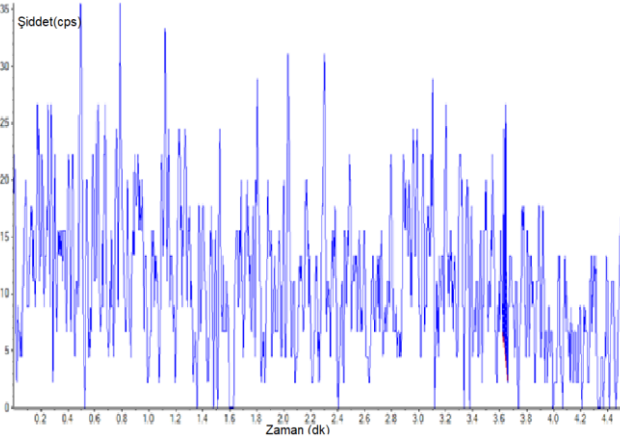
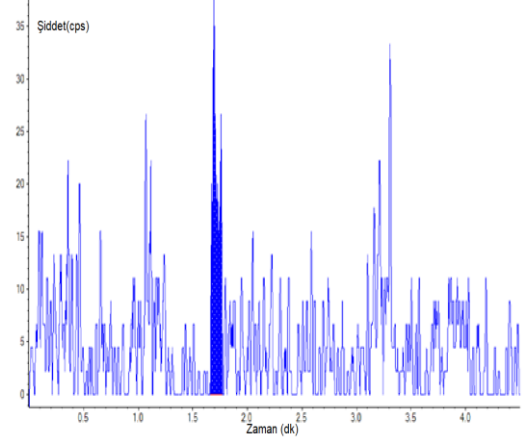
d) K r 3

Hedef İyon	Tenofovir
Analit Tutulma Zamanı	1,78
Analit Pik Alanı	70,267
IS Pik Alanı	24,800
Hesaplanmış Konsantrasyon	0,000
	

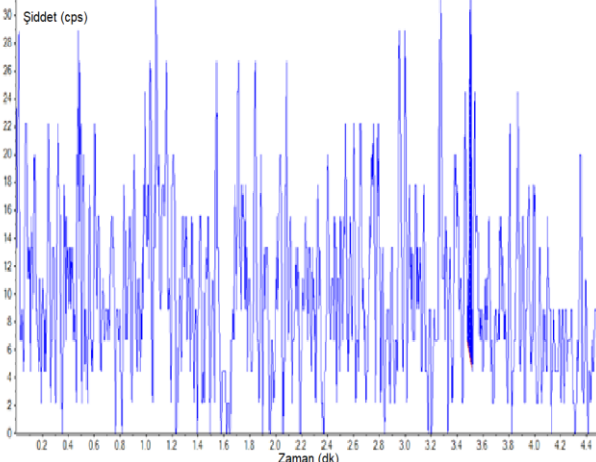
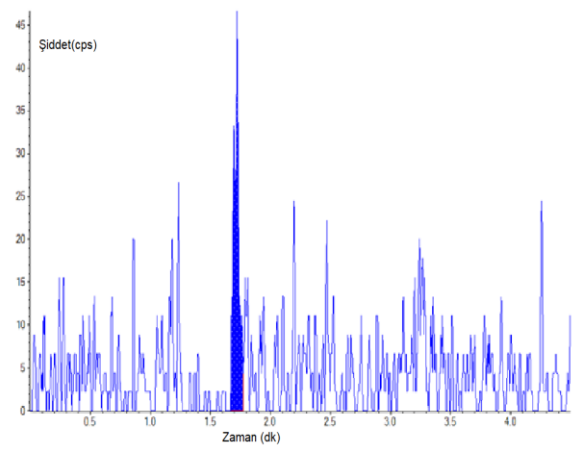
e) K r 4

Hedef İyon	Tenofovir
Analit tutulma zamanı	1,78
Analit pik zamanı	165,350
IS pik alanı	39,281
Hesaplanmış konsantrasyon	0,000
	

f) K r 5

Hedef İyon	Tenofovir
Analit tutulma zamanı	1,78
Analit pik alanı	132,272
IS Pik alanı	24,111
Hesaplanmış konsantrasyon	0,000
	

g) K r 6

Hedef İyon	Tenofovir
Analit tutulma zamanı	1,78
Analit pik alanı	124,721
IS pik alanı	28,589
Hesaplanmış konsantrasyon	0,000
	

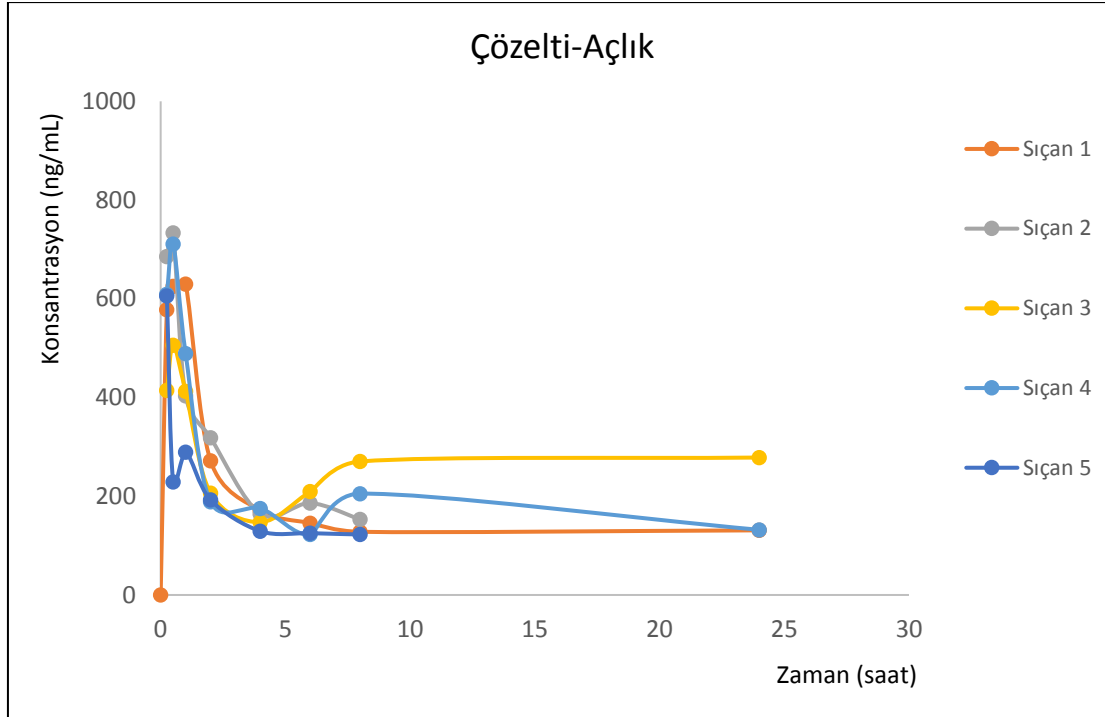
Şekil 4.50. Tenofovire ait seçicilik/seçimlilik kromotogramları a)Tenofovir, b)K r 1, c)K r 2, d) K r 3, e) K r 4, f) K r 5, g) K r 6

4.9.3. Farmakokinetik ve biyoyararlanım sonuçları

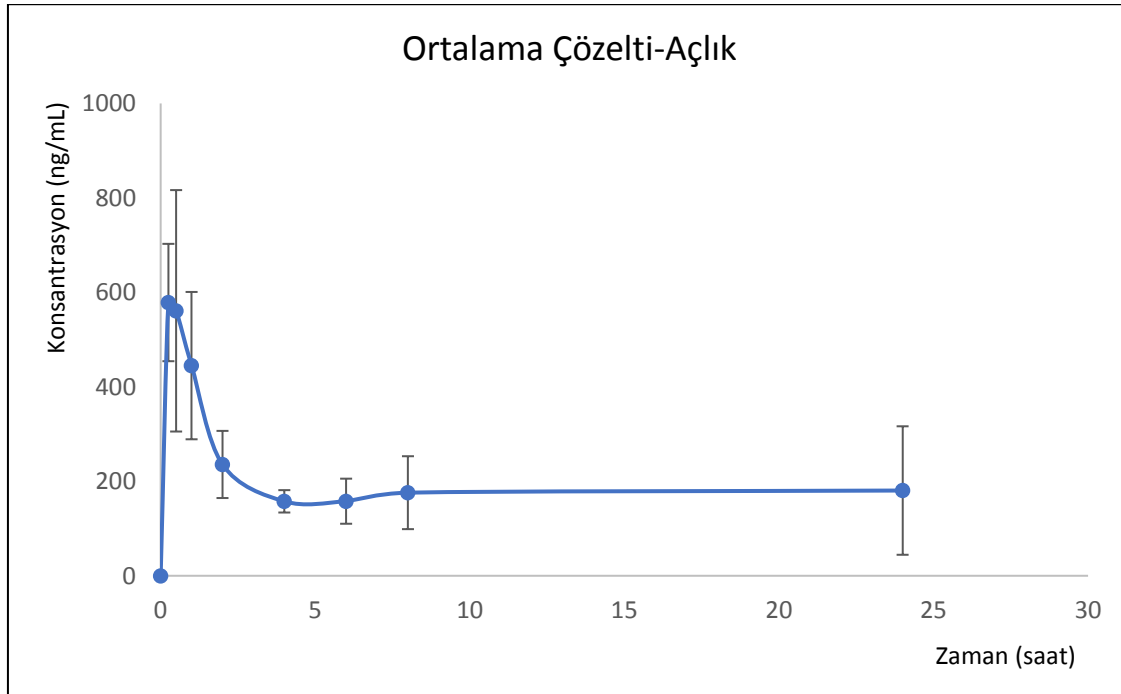
İn vivo biyoyararlanım çalışmaları Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. SNEDDS formülasyonlarının (F1 ve F2) farmakokinetik profili ilk zaman noktalarındaki konsantrasyonların saptanamaması nedeniyle tanımlanamamış, çözelti, Viread® ve çoklu emülsiyon (F3) gruplarında değerlendirmeler yapılmıştır.

Açlık ve tokluk sıçan gruplarından elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri Şekil 4.51-Şekil 4.58 arasında, verilerden hareketle WinNonlin™ programı kullanılarak hesaplanan farmakokinetik parametreler Çizelge 4.63 ve Çizelge 4.64’de verilmektedir.

A)

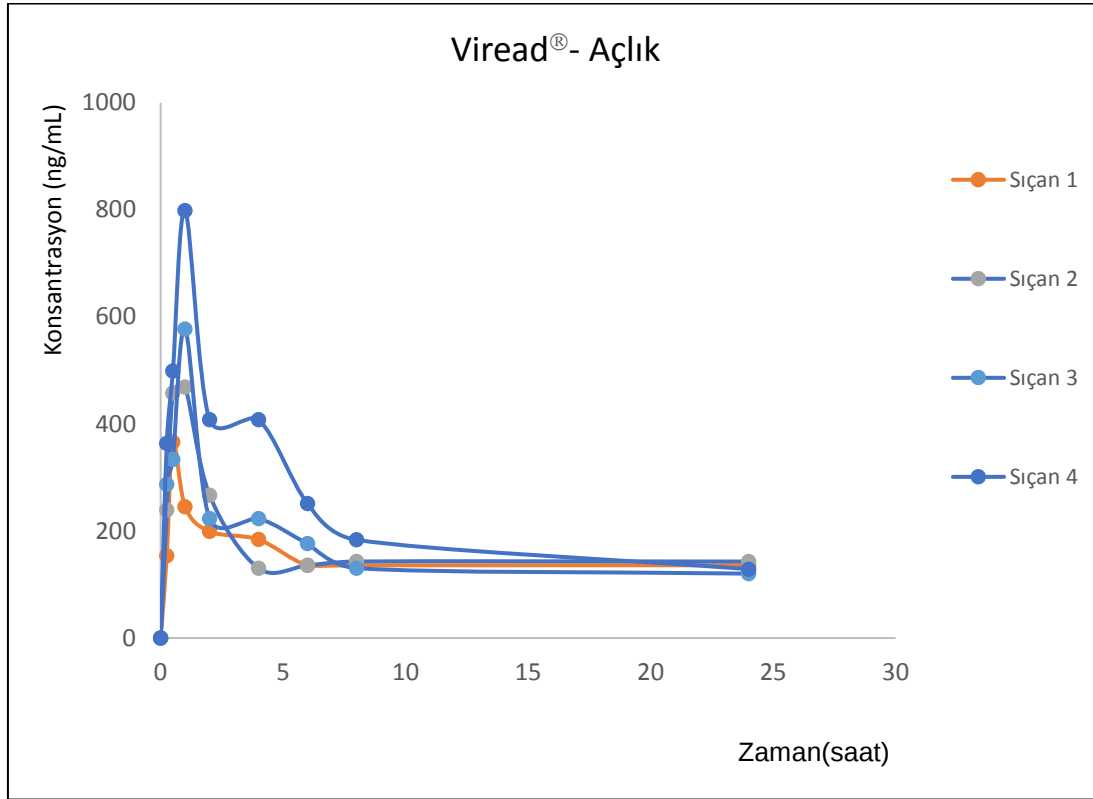


B)

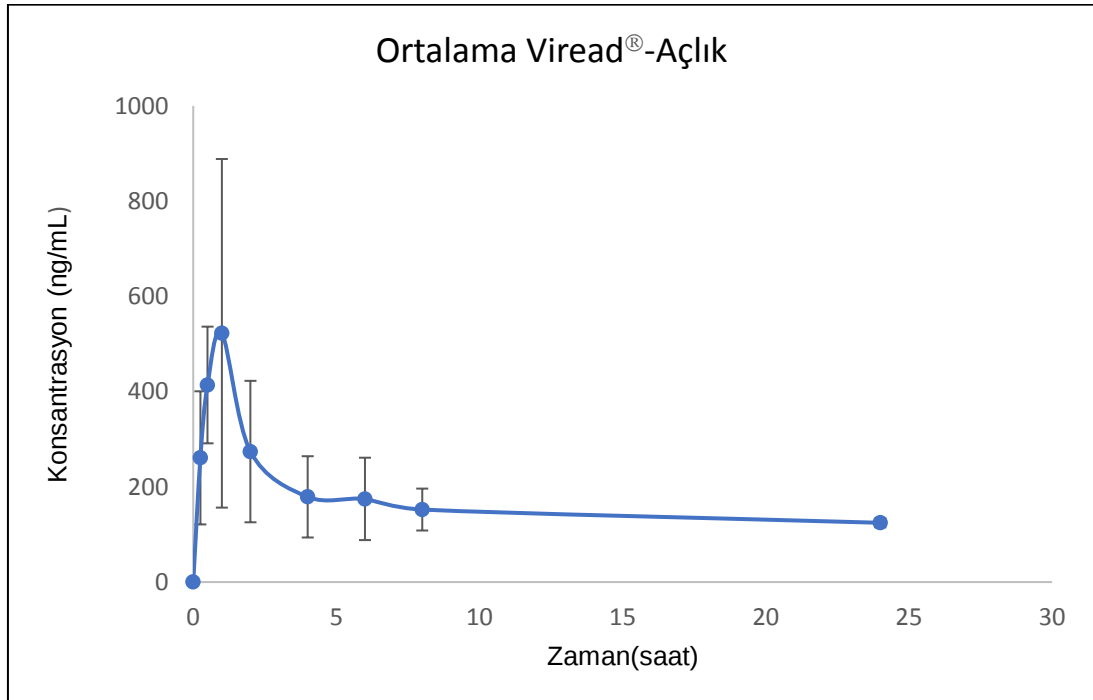


Şekil 4.51. Çözelti açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çözelti, B)Ortalama çözelti (n=5)

A)

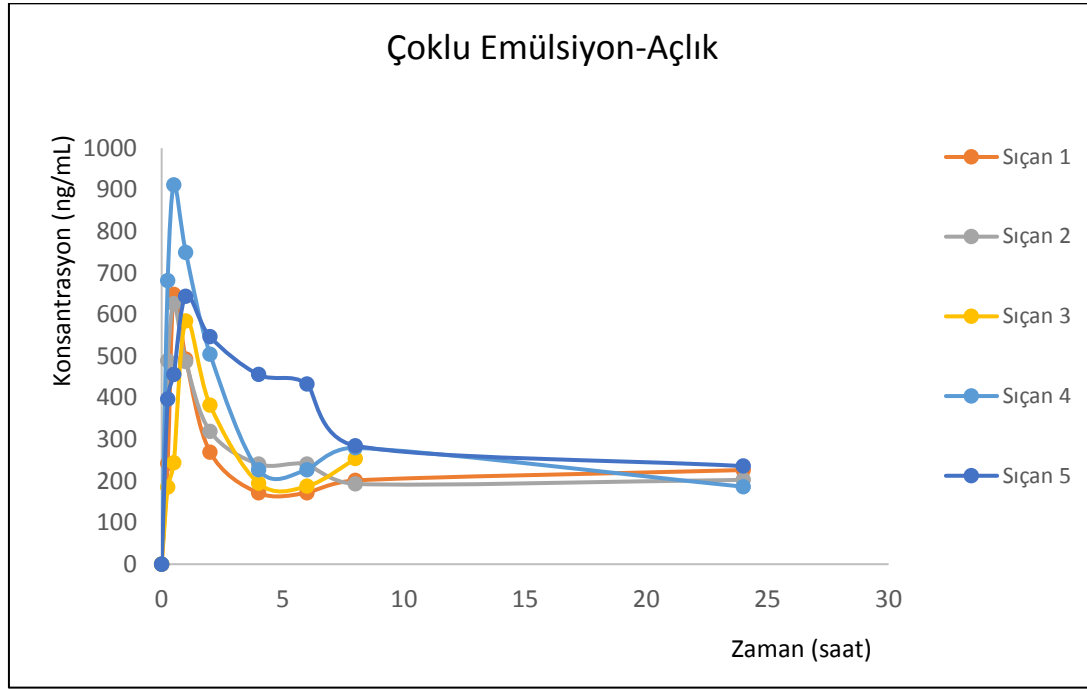


B)

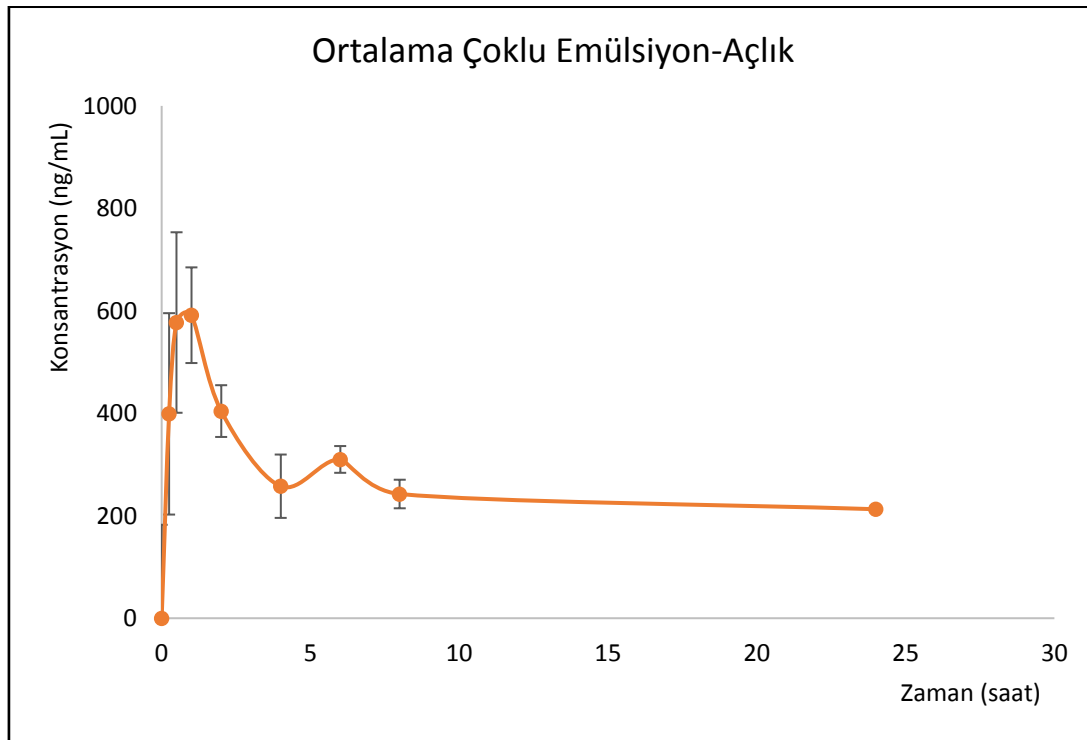


Şekil 4.52. Viread® açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Viread®, B) Ortalama Viread® (n=4)

A)

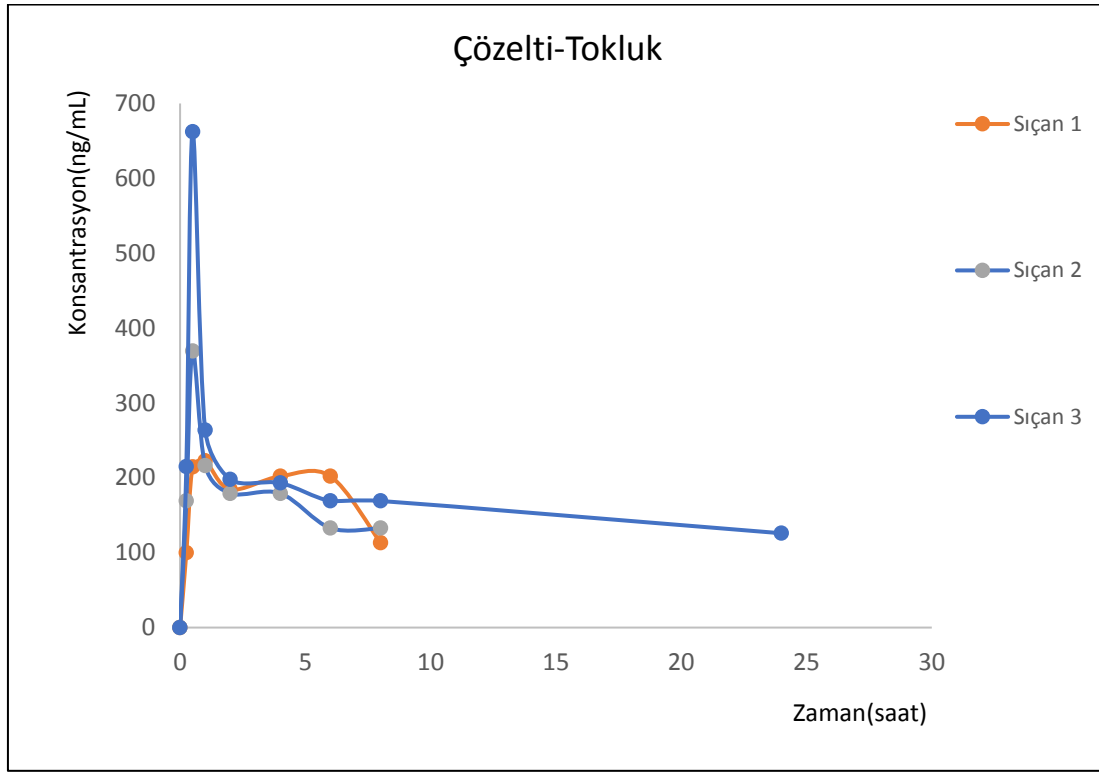


B)

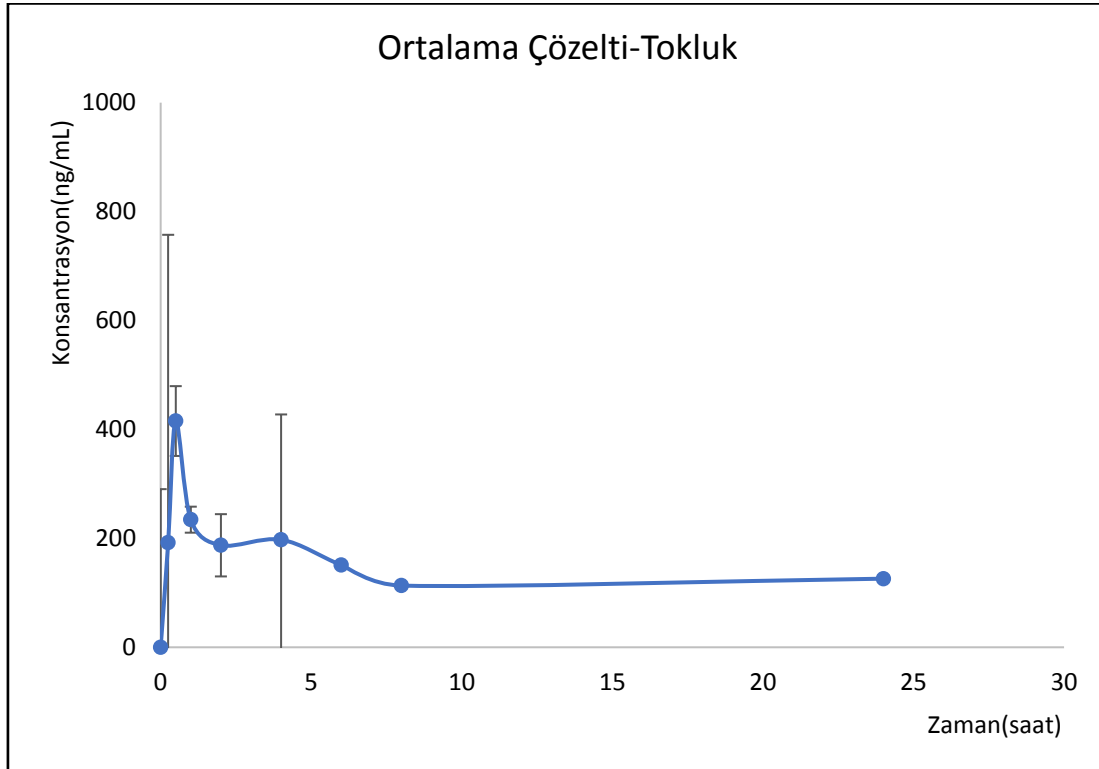


Şekil 4.53. Çoklu emülsiyon açlık grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çoklu emülsiyon, B)Ortalama çoklu emülsiyon(n=5)

A)

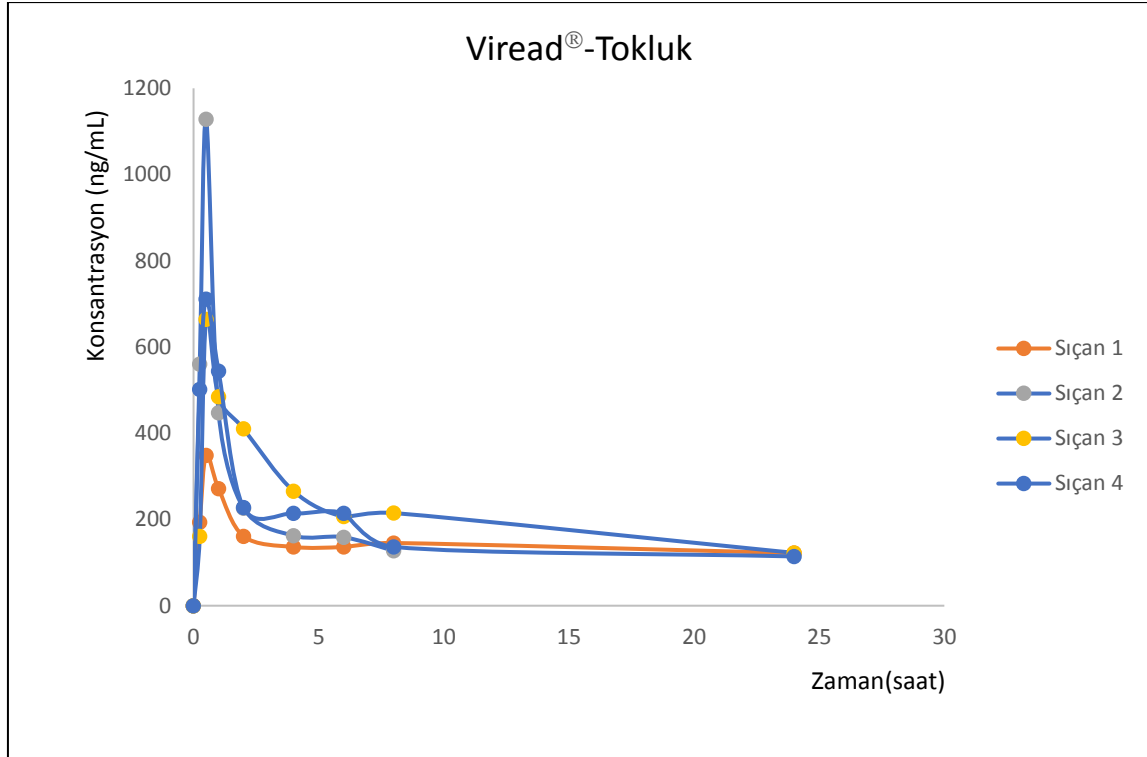


B)

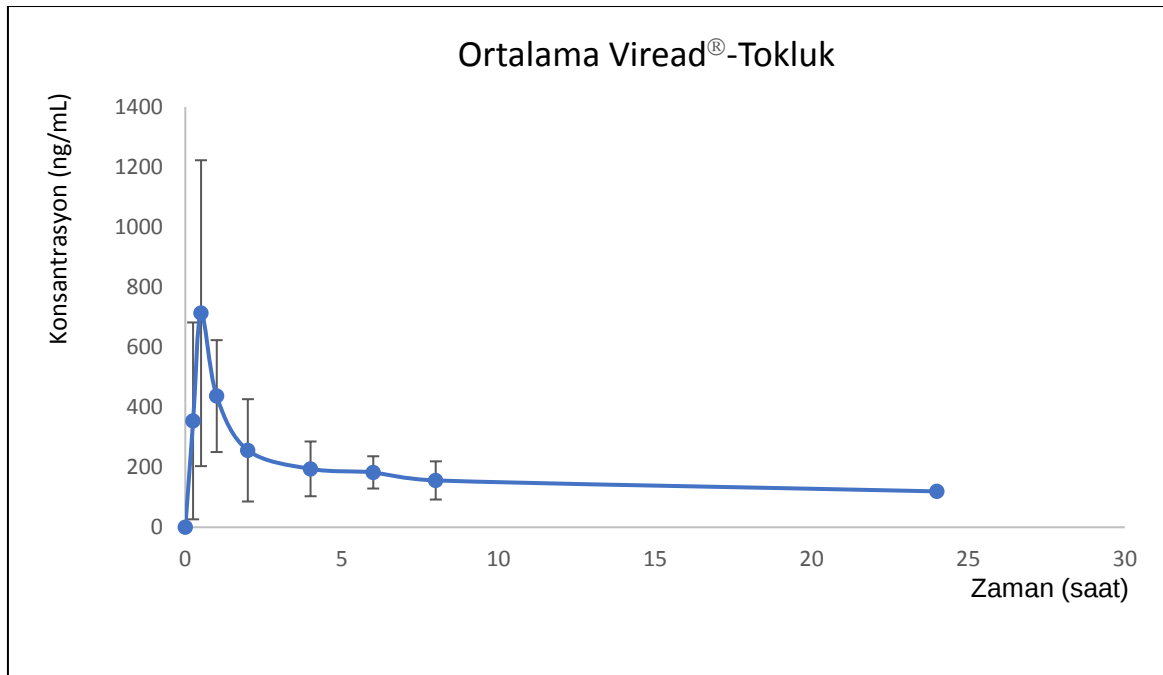


Şekil 4.54. Çözelti tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A)Çözelti, B)Ortalama çözelti (n=3)

A)

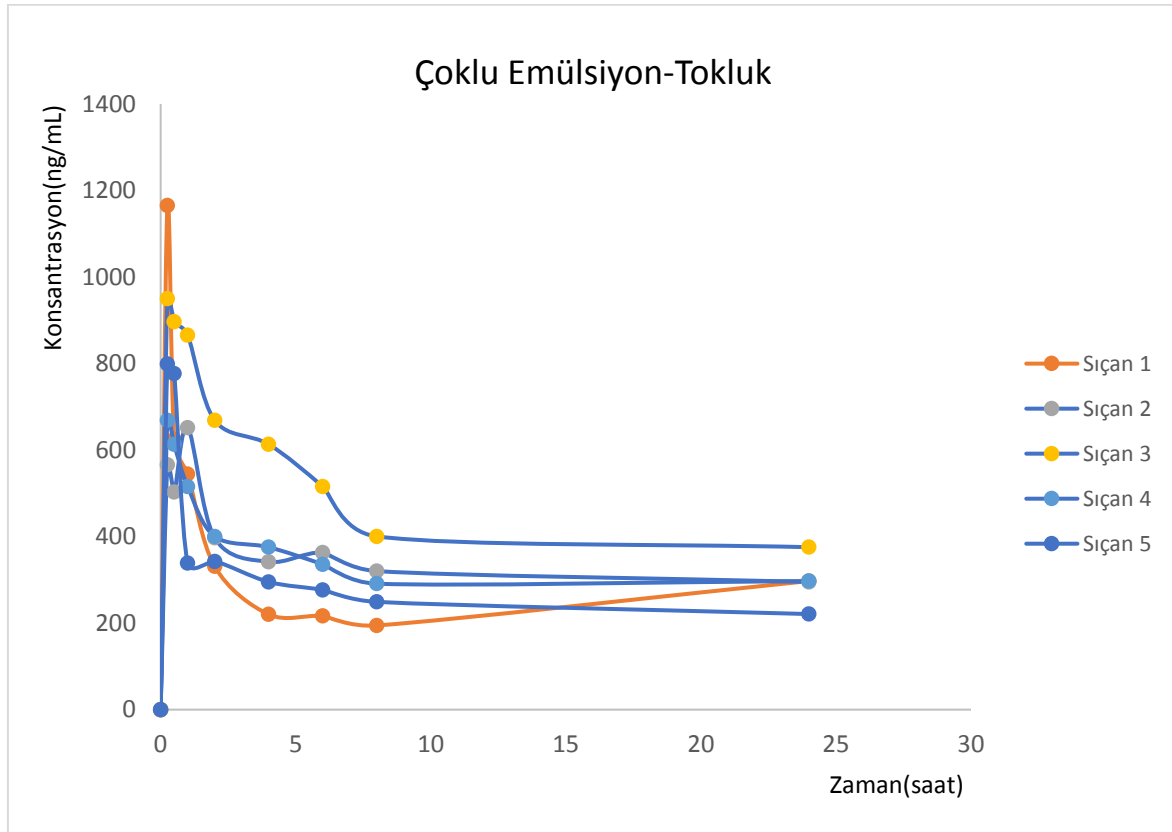


B)

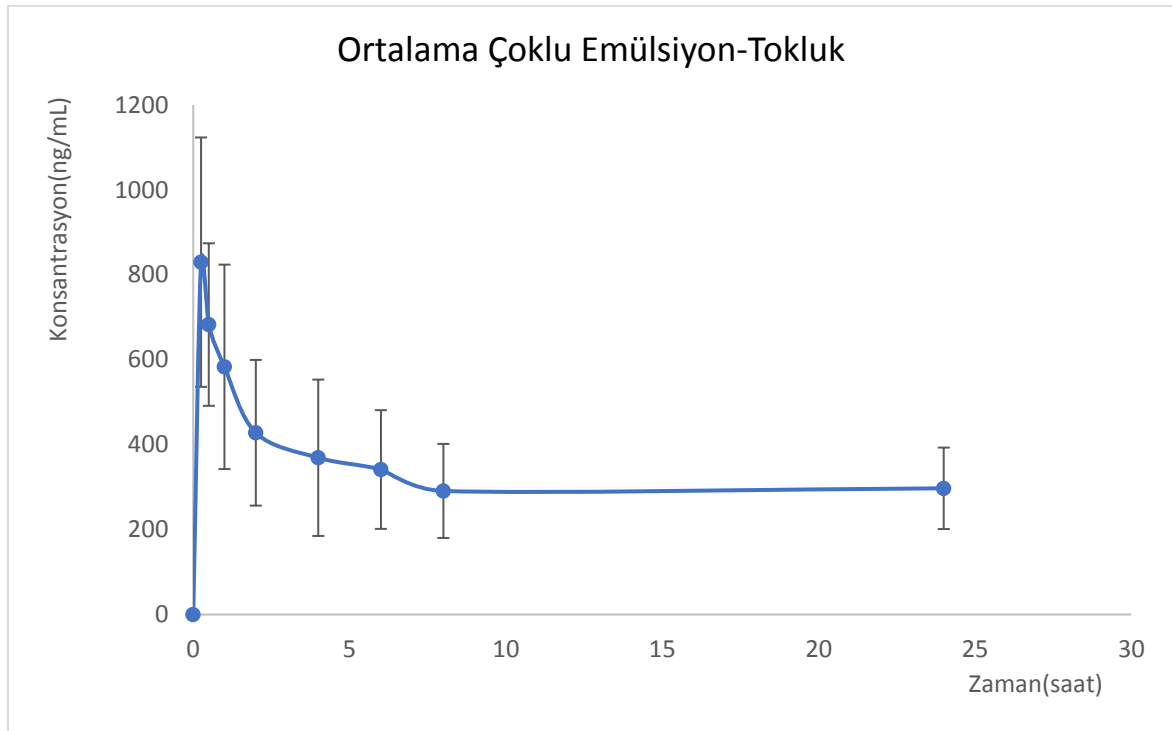


Şekil 4.55. Viread® tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Viread®, B) Ortalama Viread® (n=4)

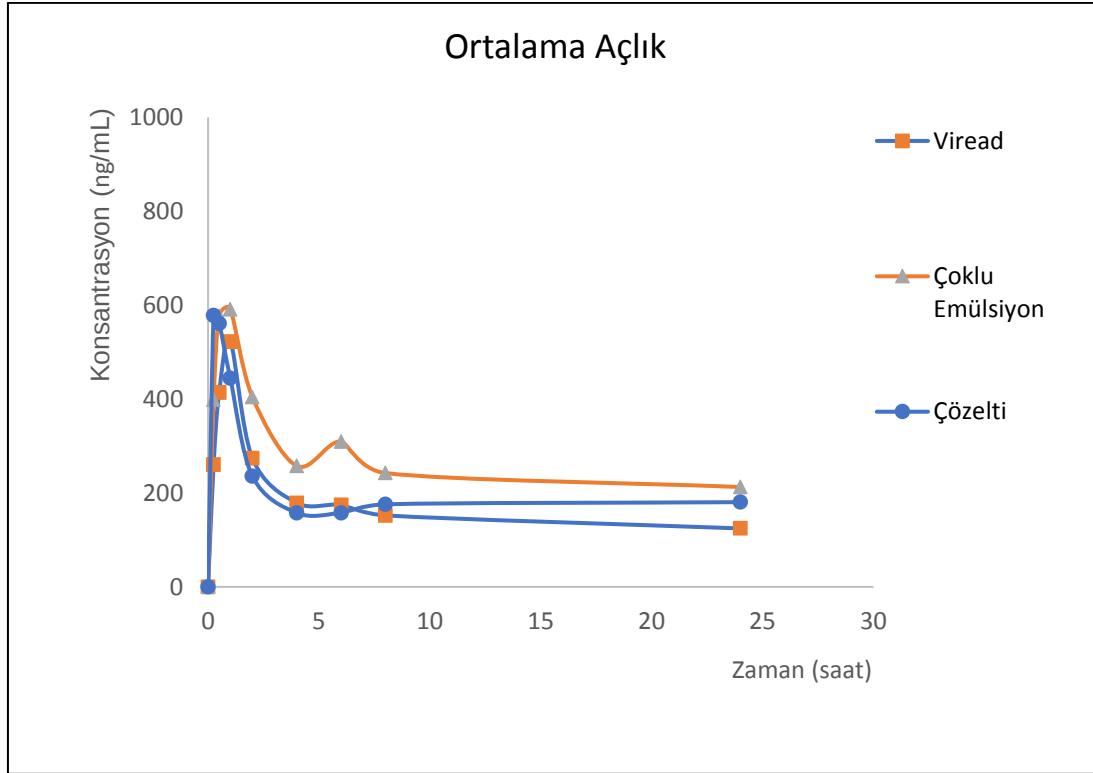
A)



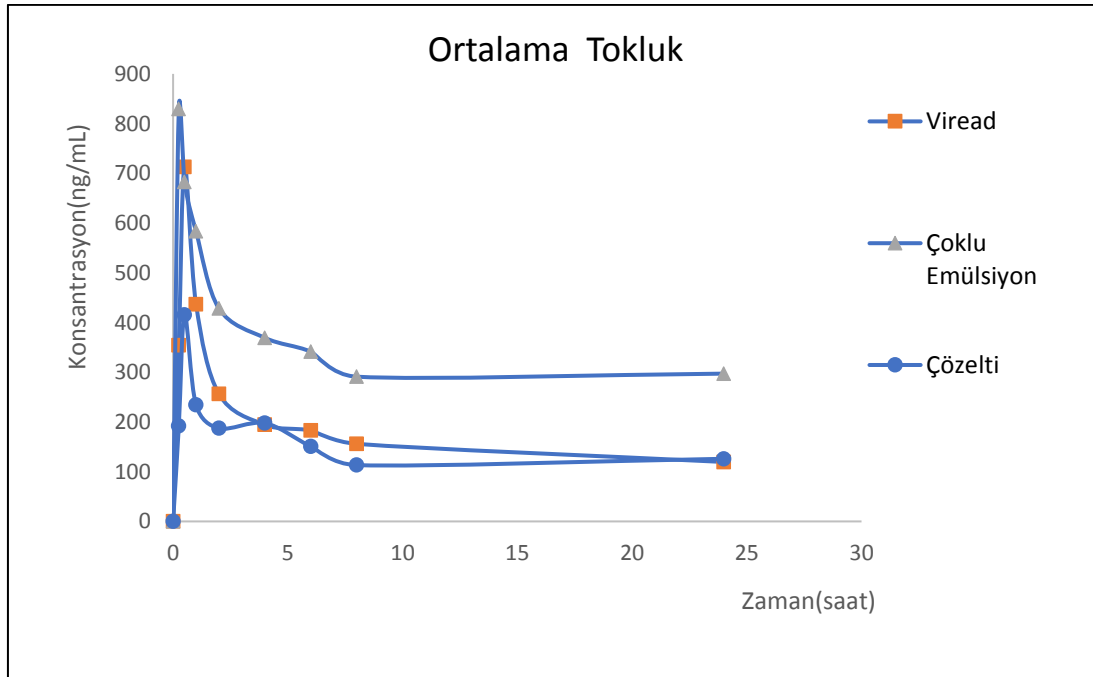
B)



Şekil 4.56. Çoklu emülsiyonun tokluk grubu sıçanlara ait plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri A) Çoklu emülsiyon, B) Ortalama çoklu emülsiyon (n=5)



Şekil 4.57. Çözelti, Viread® ve çoklu emülsiyona ait açlık sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman grafiği



Şekil 4.58. Çözelti, Viread® ve çoklu emülsiyona ait tokluk sıçan grubu ortalama plazma konsantrasyonu-zaman grafiği

Çizelge 4.63. Açlık grubuna ait farmakokinetik parametreler

Gruplar	K_d (1/dk)	$t_{1/2}$ (dk)	t_{maks} (dk)	C_{maks} (ng/mL)	AUC_{0-t} (dk.ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (dk.ng/mL)	MRT (dk)	Vd_F (mL/kg)	Cl_F (mL/dk/kg)
Çözelti	0,067±0,041	16,6±15,5	0,667±0,289	418±224	1785±837	4434±3787	26,6±25,4	31565±27269	20489±11733
Viread®	0,064±0,041	15,5±9,90	0,875±0,250	553±185	3167±1463	5700±3339	22,1±14,2	234517±27550	14631±9004
Çoklu Emülsiyon (F3)	0,037±0,019	24,0±14,1	0,700±0,274	683±130	5673±1403	12893±5240	37,0±21,7	159263±34806	5548±2650

Çizelge 4.64. Tokluk grubuna ait farmakokinetik parametreler

Gruplar	K_d (1/dk)	$t_{1/2}$ (dk)	t_{maks} (dk)	C_{maks} (ng/mL)	AUC_{0-t} (dk.ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (dk.ng/mL)	MRT (dk)	Vd_F (mL/kg)	Cl_F (mL/dk/kg)
Tenofovir Çözelti	0,050±0,056	28,1±19,7	0,550±0,274	637±90,9	4122±1473	8231±3422	39,8±27,4	270620±123581	123581±6387
Viread®	0,040±0,033	30,9±27,2	0,50± 0,00	713±320	3762±956	8905±5031	43,8±40,3	272594± 89734	9128±5965
Çoklu Emülsiyon (F3)	0,051±0,059	31,8±25,8	0,400±0,335	847±214	6486±3284	18993±12309	46,1±36,8	137485±47124	5881±6034

İn vivo biyoyararlanım çalışmaları sonucunda, çoklu emülsiyon formülasyonun (F3) açlık AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri 5673 dk.ng/mL, 683 ng/mL, tokluk AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri 6486 dk.ng/mL, 847 ng/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca çoklu emülsiyon formülasyonu ticari ürüne göre açlık durumunda 1,8 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}), tokluk durumunda ise 1,7 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}) katlık artış gösterdiği saptanmıştır. Çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk gruplarında ticari ürün Viread®'dan daha yüksek C_{maks} ve AUC_{0-t} değerleri sağladığı görülmüştür (Çizelge 4.63, Çizelge 4.64). Aynı doz oral çözelti ile karşılaştırılan çoklu emülsiyon formülasyonun bağıl biyoyararlanımı, açlık durumunda yaklaşık %290, tokluk durumunda ise %230'dur. Ayrıca, tenofovir çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasında anlamlı fark ($p>0,05$) bulunmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Tenofovir, hepatit B ve HIV/AIDS tedavisinde kullanılan nükleozid ters transkriptaz inhibitörüdür. BCS Sınıf 3'te bulunan tenofovir suda çözünürlüğü yüksek permeabilitesi zayıf lipofilik bir ilaçtır (Patil ve diğerleri, 2017). İlaç piyasasında 245 mg film kaplı tablet katı dozaj şekli olarak referans (Viread®) ve eşdeğer ürünleri bulunmaktadır. Tenofovir biyoyararlanım sorunu göstermekte olup açlık oral biyoyararlanımı %25'dir ve optimum etki için yiyeceklerle birlikte yani tok karnına kullanılması gerekmektedir. Yağ içeriği yüksek yemek, tenofovirin AUC'sinde yaklaşık %40 ve C_{maks} 'ta %14'lük bir artışla oral biyoyararlanımını artırmıştır (Kearney ve diğerleri, 2004). Lipit kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemler suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların yanı sıra, lipofilik yapıdaki ilaçların da çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak için kullanılmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarla kendiliğinden çoklu emülsiyon formülasyonu ile, tablet formülasyonuna göre absorpsiyonu ve biyoyararlanımı artırılmış, daha etkili bir dozaj şeklinin geliştirilmesiyle açlık tokluk varyasyonunun da azaldığı görülmüştür.

Bu bölümde tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir. Bu amaçla tenofovirin fizikokimyasal özellikleri, miktar tayini için geliştirilen spektrofotometrik analiz yöntemleri ve yöntem validasyonları, formülasyonların geliştirilmesi için yapılan önformülasyon, formülasyon çalışmaları ve geliştirilen formülasyonlara ait karakterizasyon/kontrol çalışmaları tartışılmıştır. Ayrıca geliştirilen SNEDDS ve SDEDDS formülasyonların sıçanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmaları ile ticari ürünün karşılaştırılması ve farmakokinetik değerlendirilmesi yapılmıştır.

5.1. Tenofovirin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

Tenofovir içeren formülasyonları geliştirmek için, öncelikle tenofovirin çözünürlük, partiyon katsayısı, erime noktası, partikül büyüklüğü ve stabilite özellikleri incelenerek önformülasyon ve formülasyon geliştirme çalışmaları yönlendirilmiştir.

Tenofovir yüksek suda çözünürlük ve düşük permeabilite özelliğine sahiptir.

Tenofovirin fizikokimyasal özelliklerinden 25°C'deki suda çözünürlüğü 13,4 mg/mL ve partisyon katsayısı 1,2 olarak verilirken (Spinks ve diğerleri, 2017; FDA, 2018), tez kapsamında yapılan çözünürlük çalışmalarda 15 mg/mL ve partisyon katsayısı da 3,55 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla, tenofovirin hidrofilik özelliğiyle birlikte lipofilik yapıda da olması (Rompay ve diğerleri, 2012; Spinks ve diğerleri, 2017; Gasselin ve diğerleri, 2009) lipit kaynaklı ilaç sistemlerin geliştirilmesinin uygun olabileceğini göstermiştir.

Erime noktası maddeleri birbirinden ayırt eden, maddenin kendine özgü özelliklerinden biridir. Tenofovir, erime noktası 112-114°C ve 114-118°C olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Piyasadaki formülasyonlarda bulunan form, 118°C erime noktasına sahip formudur (Whopar, 2010). Çalışmalar sonucunda tenofovirin erime noktası 118,73°C'dir ve tenofovir tozlarının pik endotermi, piyasadaki formülasyonlarda bulunan formun sahip olduğu 118°C değerini doğrulamaktadır (Bkz. Şekil 4.2).

Tenofovirin partikül büyüklüğü tayini için lazer ışık difraksiyonu yöntemi ile ölçümler yapılarak, tenofovirin partikül büyüklüğü ve dağılımı 171±17,8 µm olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1).

Tenofovirin distile sudaki stabilitesini değerlendirmek için hazırlanan tenofovir çözeltisi 0.gün de, 1. gün, 1. ay ve 3. ay süresince oda sıcaklığında (25°C/%60 sıcaklık/bağıl nem) ve 4°C/ortam nemi sağlayan iklim dolaplarında bekletilmiş, tenofovirin λ_{maks} 'ın (260 nm) ve spektrumlarının değişmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.3-4.4).

5.2. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Tenofovirin λ_{maks} 'ının tespit edilmesi ve miktar tayini analizi için, birçok çalışmada spektrofotometrik analiz yöntemi kullanılmıştır (Shirkhedkar ve diğerleri, 2009; Sharma ve Mehta, 2010; Choudhari ve diğerleri, 2011, Panigrahi ve diğerleri, 2018). Tez çalışmalarında da tenofovirin distile suda, yağ, YEM ve YYEM'deki

çözünürlüğünü tespit etmek için etanolde, gastrointestinal ortamları temsilen pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8'de ve lipoliz çalışmalarında kullanılmak üzere asetonitrilde spektrofotometrik miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemlerin geçerli ve güvenilir olduğunu göstermek amacıyla distile su, etanol, pH 4,5 ve asetonitrilde doğruluk-geri elde, kesinlik, özgünlük-seçicilik ve doğrusallık çalışmalarını kapsayan validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tenofovirin distile su ve etanol için geliştirilen analitik yönteme ait kalibrasyon çalışmalar sonucu regresyon istatistikleri $R^2=0,999$ bulunurken, regresyon hatası verileri 0,005'ten küçük bulunmuştur. Tenofovirin pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8 çözünme ortamlarında geliştirilen analitik yönteme ait regresyon istatistikleri ise üç ortam için de $R^2=0,999$ bulunurken, regresyon hatası verileri 0,002'den küçük bulunmuştur. Lipoliz çalışmalarında kullanılmak için asetonitril ortamında geliştirilen analitik yöntem regresyon istatistikleri ise $R^2=0,999$ bulunurken, regresyon hatası verisi de 0,006'dan küçük bulunmuştur. Veriler arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon istatistikleri değeri $R^2=0,999$ ile veriler arasındaki ilişkinin (absorbans-konsantrasyon) yüksek olduğunu ve regresyon hatası değerinin de 1'in altında bulunması analizdeki hata oranının düşük olduğunu göstermektedir. Tenofovirin miktar tayini analizi için kullanılan tüm ortamlardaki kalibrasyonuna ait veriler istatistiksel olarak uygundur.

Validasyon değerlendirmelerinde, doğruluk ve geri elde çalışma sonuçları ICH kılavuzuna göre etkin madde için %97-%103, dozaj şekli için de %95-%105 aralığında olması gerekmektedir. Kesinlik analizi minimum 3 noktada ve 3 tekrarlı olarak yapılarak, %BS sonuçları %2'nin altında bulunmalıdır (FDA, 2003). Validasyon çalışmaları sonucunda tenofovirin etanol ve distile suda bulunan %BS değerleri, distile suyun düşük konsantrasyonu dışında %2'nin altında bulunmuştur. Gastrointestinal ortamı taklit etmek amacıyla hazırlanan çözünme ortamlarını temsilen (pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8) pH 4,5 ortamı validasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda doğruluk-geri elde ve kesinlik sonuçlarının %BS değerleri %1'in altında bulunurken, asetonitril ortamındaki %BS değerleri de %2'nin altında bulunmuştur. Geri elde yüzdeleri distile suda %100-103, etanolde %98-101, pH 4,5'da %98-103 ve asetonitrilde %98-103 arasında bulunmuştur. Geri

elde yüzdelерinin ICH kılavuzuna göre istenilen aralıklarda olması, geliştirilen analitik yöntemlerin uygun olduğunu göstermektedir. Kesinlik sonuçları %BS verilerinin de %2'nin altında olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Bu veriler sonucunda; distile su, etanol, pH 4,5, ve asetonitril ortamlarında geliştirilen analitik yöntemlerle, saptanan derişimlerin istenilen doğruluk ve kesinlikte olduğu sonucuna varılmıştır. Tenofovirin konsantrasyonu ile absorbansı arasındaki ilişkinin, distile su, pH 4,5 ve asetonitrilde 10-40 µg/mL ve etanolde de 10-35 µg/mL aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur.

Çözünme ortamlarında tenofovir için saptanan λ_{maks} 'larda alınan absorbansların, formülasyon bileşenleri olan oleik asit, İmwitor 742, Cremophor RH 40, Tween 20, propilen glikol, Abil Em 90 ve Labrafil ve çözünme ortamlarından etkilenip etkilenmediği değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda distile su, etanol, pH 4,5 ve asetonitril ortamlarında geliştirilen analitik yöntemler sadece tenofoviri analiz eden özgün yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

Geliştirilen analitik yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri de hesaplanmıştır. Analitik yöntemin distile su ve etanol için sırasıyla LOD değerleri sırasıyla 0,54 µg/mL ve 0,42 µg/mL, LOQ değerleri, 1,63 mg/mL ve 1,27 µg/mL olarak bulunurken, pH 4,5 için sırasıyla LOD değeri 0,18 µg/mL, LOQ değeri 0,55 µg/mL ve asetonitril için sırasıyla LOD değeri 0,84 µg/mL ve LOQ değeri 2,60 µg/mL olarak bulunmuştur.

Distile su, etanol, pH 4,5 ve asetonitrilde geliştirilen analitik yöntemlerle yapılan kalibrasyon ve validasyon çalışmalarıyla, yöntemlerin kesin, doğru, spesifik, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır.

5.3. Tenofovir -Yardımcı Madde Etkileşim/Geçimsizlik Çalışmaları

Formülasyon geliştirilmesi aşamasında kullanılan yardımcı maddelerin tenofovirlle etkileşim içinde olup olmadığı DSC ve FT-IR analiz yöntemleri ile tespit edilmiştir.

DSC analizinde tenofovir ve geliştirilen SNEDDS (F1 ve F2) ve SDED DS (F3) formülasyon bileşenleri oleik asit, İmwitor 742, Cremophor RH 40, propilen glikol,

Abil Em 90, Labrafil ve tenofovirle 1:1 oranda karışmış bileşenlerin termogramları incelenerek, tenofovirin erime noktası piki (Bkz. Şekil 4.2) ile etkileşim içinde olmadıkları görülmüştür. Tenofovirin yağlı yapıdaki yardımcı bileşenlerle olan 1:1 karışımı, yağlı bileşenlerle toz tenofovir karışımının homojen dağılmasının güçlüğünden dolayı, bazı termogramlarda tenofovir piki daha küçük görülmüştür. DSC analiz sonuçları tenofovire ait erime noktası pikinin değişmediğini ve fiziksel karışım içerisindeki etkin maddenin özelliğini koruduğunu göstermektedir. Termogramlarda sadece tenofovirin piki görülürken, formülasyon bileşenleri ile tenofovir arasında girişim yapacak bir etkileşim görülmemiştir (Bkz. Şekil 4.10).

Geliştirilen formülasyon bileşenleri yağlı maddelerin yüksek sıcaklıkta uçuculuğu ve bozunma ihtimali düşünülerek, FT-IR analizleri yapılmıştır. Tenofovirin FT-IR spektrumu incelendiğinde karakteristik pikleri, aromatik C-H ve O-H bandı 2800-3200 cm^{-1} 'de, NH₂- bandı 1600-1800 cm^{-1} aralığında olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11).

Tenofovirle yapılan bir çalışmada, tenofovirin karakteristik pikleri 3322,75, 2985,27, 1736, 1689, 1267,97, 1103,88, 727,996, 681,22 ve 627,77 cm^{-1} görülmüştür (Lee ve diğerleri, 2010). Tenofovir ile yapılan diğer bir çalışmada ise, aromatik C-H bandı 3110 cm^{-1} 'de, zayıf şiddetteki geniş O-H bandı 3200 ve 3300 cm^{-1} 'de, 1680 cm^{-1} 'de, 1410 ve 1450 cm^{-1} çiftlerinde aromatik C=N bandı, orta C-N deformasyonu bandı 1250 cm^{-1} , -NH₂ makaslama bandının orta gerilimi 1550 ve 1570 cm^{-1} 'de, 660-900 cm^{-1} 'de çeşitli N-H salgı bantları ve 900-600 cm^{-1} 'de C-H bantları görülmüştür (Zidan ve diğerleri, 2010). Literatür çalışmalarında tenofovire ait verilen karakteristik piklerin yapılan FT-IR analiz sonuçlarında da görülmüş ve literatür bilgileri deney çalışmalarını doğrulamıştır.

5.4. Formülasyonun Geliştirme Çalışmaları

Tenofovirin lipofilik yapısı (Bkz. Çizelge 4.2) ve daha önceden tenofovir içeren SNEDDS ya da SDEDDS formülasyonların geliştirilmemiş olması nedeniyle, tenofovirin emilim ve biyoyararlanımını arttırabileceği düşüncesiyle lipid kaynaklı formülasyon geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar çeşitli yağ, YEM ve

YYEM'deki tenofovirin çözünürlüğünün tespiti, faz diyagramlarının çıkarılması, kalite tasarımı yaklaşımıyla SNEDDS formülasyonlarının ve çoklu emülsiyon formülasyonun geliştirilmesini kapsamaktadır.

5.4.1. Kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi

Tenofovirle daha önce yapılmış kendiliğinden emülsifiye sisteme ait bir çalışmanın olmaması ve BCS Sınıf 3 madde olan tenofovirin emilim ve biyoyararlanımını artırmak için SNEDDS sistemlerin kullanılabileceği literatür çalışmalarıyla desteklenerek (Rao ve diğerleri, 2008; Zhang ve diğerleri, 2015; Beg ve diğerleri, 2017; Qiao ve diğerleri, 2018) kendiliğinden emülsifiye nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Formülasyonu oluşturan yağ asidi tipinin etkisini görmek amacıyla uzun (F1) ve orta zincirli (F2) yağ asitlerinden oluşan SNEDDS formülasyonları hazırlanmıştır.

Tenofovirin yağ, YEM ve YYEM'deki çözünürlük çalışmaları ve yağ, YEM ve YYEM'nin belirlenmesi

Tenofovirin uzun zincirli (üzüm çekirdeği yağı, susam yağı, nar çekirdeği yağı, mısır yağı, çörek otu yağı, Maisine 35-1, oleik asit) ve orta zincirli yağ asidi (Miglyol 818, Labrafac, Miglyol 840, İmwitor 742, İmwitor 988, İmwitor 948, Capmul MCM, Captex 355) içeren yağlar, yüzey etkin madde (Cremophor RH 40, Cremophor EL, Labrafil, Labrasol, Abil Em 90) ve yardımcı yüzey etkin maddelerdeki (Tween 20, Tween 80, PEG 400, propilen glikol, monopropilen glikol, Transcutol P, Gelucire 44, gliserol) çözünürlükleri tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.9). Tenofovirin çözünürlüğünün en yüksek olduğu uzun zincirli yağ asidi olarak oleik asit ($113 \pm 0,004$ mg/mL) ve orta zincirli yağ asidi olarak da İmwitor 742 ($64,350 \pm 0,007$ mg/mL) bulunmuştur.

Formülasyon geliştirme çalışmalarında, tenofovirin P-gp substratı (Mallants ve diğerleri, 2005; Kiser ve diğerleri, 2008; Moss ve diğerleri, 2017; Shailender ve diğerleri, 2017a) olması göz önüne alınarak, P-gp inhibitörü olan noniyonik sürfaktan

Tween 20 (Kulsirirat ve diğerleri, 2017) ve Cremophor RH 40 (Tayrouz ve diğerleri, 2013) kullanılmıştır.

Literatürde oleik asit kullanılarak tenofovirin mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Bu çalışmada, oleik asitteki çözünürlüğü $26,69 \pm 0,30$ mg/mL ve Tween 20'deki çözünürlüğü $33,31 \pm 1,50$ mg/mL olarak tespit edilirken (Divya, 2014), tez kapsamında yapılan çözünürlük çalışmasında ise oleik asitin çözünürlüğü $113 \pm 0,004$ mg/mL ve Tween 20'nin çözünürlüğü ise $52,4 \pm 0,006$ mg/mL bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.9).

Faz diyagramları

Lipit kaynaklı sistemlerin (mikroemülsiyon, SNEDDS, SEDDS, Y/S emülsiyonu, S/Y emülsiyonu, miseller) geliştirilmesinde faz diyagramlarından yararlanılmıştır (Balakrishnan ve diğerleri, 2009; Beg ve diğerleri, 2013, Kim ve diğerleri, 2018, Tung ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında faz diyagramları, kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonun geliştirilmesi için kritik materyalleri oluşturan yağ, YEM ve YYEM miktarlarının faktöriyel tasarım için gerekli olan alt-üst değerlerini tespit etmek amacıyla kullanılmıştır.

Oleik asit (F1) ve İmwitor 742 (F2) içeren SNEDDS formülasyonlar için, titrasyon yöntemi ile Km oranı 1:4 olarak tespit edilmiştir. Yağ, YEM ve YYEM'in nanoemülsiyon oluşturma yüzdeleri hesaplanmıştır. Daha sonra optimum formülasyonun tespiti için deney tasarım modeli oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu yüzdeler, F1 formülasyonun deney tasarım modeli için alt ve üst değerler olarak, oleik asit için 1-3 mL, Cremophor RH 40 1,4-1,8 mL, Tween 20 5,6-7,2 mL olarak belirlenirken; F2 formülasyonu için, İmwitor 742 0,5-2,5 mL, Cremophor RH 40 0,5-0,8 mL ve Tween 20 miktarı da 2-3,2 mL olarak belirlenmiştir.

Kalite tasarımı yaklaşımı ile optimum formülasyonların bulunması

Literatürde kalite tasarımı yaklaşımıyla, silastazol (Pund ve diğerleri, 2014), kurkumin (Wang ve diğerleri, 2010) ve nelfinavir (Kamboj ve Rana, 2016) SNEDDS

formülasyonları geliştirilmiştir. Kalite tasarımı yaklaşımı, QTPP ve CQA tanımlamasını içerir. Sonrasında kritik kalite özelliklerini belirleyen CMA ve CPP belirlenir. Formülasyon, uygun model kullanılarak yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ve DoE kullanılarak optimize edilir (Panigrahi ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında da optimum orta ve uzun zincirli formülasyonu geliştirmek amacıyla kalite tasarımı yaklaşımı kullanılmış ve tenofovir içeren SNEDDS formülasyonlar ilk kez geliştirilmiştir.

F1 ve F2 formülasyonları için deney tasarımı

Deneysel tasarım yaklaşımı, bağımsız değişkenler arası etkileşimlerle birlikte, bağımsız değişken ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi de incelediğinden optimum formülasyona ulaşmada avantaj sağlamaktadır. Literatür çalışmaları (Beg ve diğerleri, 2015; Beg ve diğerleri, 2017; Panigrahi ve diğerleri, 2018) değerlendirilerek kalite tasarımı ve deney tasarım modeli ile SNEDDS formülasyonlar geliştirilmiştir. Üçgen faz diyagramının nanoemülsiyon oluşturma alanındaki her noktayı seçmek ve ölçümlerle denemek zor ve uzun zaman alacağı için DoE kullanılmıştır.

Çalışmada ilk olarak hedef ürün kalite profili oluşturulmuştur (Bkz. Çizelge 3.2) ve SNEDDS formülasyonları için CQA belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.3). Formülasyon geliştirilirken CMA ve CPP'den hareketle risk matrisi (Bkz. Çizelge 3.4) ve Ishikawa/Fishbone diyagramları oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 3.1). Risk matrisinde kendiliğinden emülsifiye sistemlerin geliştirilmesinde yağ asidi, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddenin son ürünü etkileyebileceği görülmüştür. Yağ asidi, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde çalışmanın bağımsız değişkenleri olarak belirlenmiştir. Hedeflenen formülasyonun belirlenmesinde bağımlı değişken olarak da damlacık boyutu ve polidispersite indeksi belirlenmiştir.

Kalite tasarımı yaklaşımıyla geliştirilen formülasyonlara ait birçok çalışmada, Design Expert Software yazılımı kullanılmıştır (Parmar ve diğerleri, 2015; Ghori ve diğerleri, 2017; Panigrahi ve diğerleri, 2018; Salem ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında da 3^3 faktöriyel tasarım kullanılarak, 3 faktörlü (alt-orta ve üst değer)-3 değişken (yağ

asidi-YEM-YYEM), 3 tekrarlı deney tasarımı ile 81 adet formülasyon Design Expert Software Version 10 yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

F1 formülasyonunu oluşturan oleik asit, Cremophor RH 40, Tween 20 bileşenlerinin damlacık büyüklüğü üzerine olan etkisi matematiksel denklem yardımıyla açıklanmıştır. Çizelge 4.16'daki verilere göre matematiksel model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda yağ asidi miktarı arttıkça damlacık büyüklüğü artarken, YEM miktarı ve YYEM miktarı arttıkça damlacık büyüklüğü azalmaktadır. Çizelge 4.16'daki verilere göre yağ asidi miktarı ve Tween 20 miktarı $p < 0,0001$ değeri ile damlacık boyutunu etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Ayrıca yağ, YEM ve YYEM'nin ikili etkileşimleri anlamlı bulunmamıştır. F1 formülasyon bileşenlerinin polidispersite indeksi üzerine olan etkisi de matematiksel denklem yardımıyla açıklanmıştır. Çizelge 4.17'deki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda yağ asidi miktarı arttıkça polidispersite indeksi artarken, YEM miktarı ve YYEM miktarı arttıkça polidispersite indeksi azalmıştır. Çizelge 4.17'deki verilere göre yağ asidi miktarı ve Tween 20 miktarı $p < 0,0001$ değeri ile damlacık boyutunu etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Ayrıca modelde oleik asit-Tween 20 ikili etkileşimi polidispersite indeksi açısından anlamlı bulunmuştur.

F2 formülasyonunu oluşturan İmwitor 742, Cremophor RH 40 ve Tween 20 bileşenlerinin damlacık büyüklüğü üzerine etkisi de matematiksel denklemlerle açıklanmıştır. Çizelge 4.23'deki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda yağ asidi miktarı arttıkça damlacık büyüklüğü artarken, YEM miktarı ve YYEM miktarı arttıkça damlacık büyüklüğü azalmıştır. Ayrıca yağ asidi miktarı ve Tween 20 miktarı da damlacık büyüklüğünü etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p < 0,05$). Çizelge 4.23'e göre yağ, YEM ve YYEM'nin ikili etkileşimleri anlamlı bulunmamıştır. F2 formülasyon bileşenlerinin polidispersite indeksi üzerine olan etkisi de matematiksel denklemlerle açıklanmıştır. Çizelge 4.24'deki verilere göre model $p < 0,0001$ değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Polinom denklemine göre, diğer faktörler sabit tutulduğunda yağ asidi miktarı

arttıkça polidispersite indeksi artarken, YEM miktarı ve YYEM miktarı arttıkça polidispersite indeksi azalmaktadır. Yağ asidi miktarı ve Tween 20 miktarı polidispersite indeksini etkileyen bağımsız değişkenlerdir ($p<0,05$).

F1 ve F2 formülasyon bileşenlerinin etkisi matematiksel modellerle birlikte 3D-yüzey ve 2D-kontur grafikleri kullanılarak da açıklanmıştır (Bkz. Şekil 4.14-4.15; Şekil 4.19-4.20). Her iki formülasyon için damlacık boyutu ve polidispersite indeksi yanıtları yağ miktarının azalması ve Tween 20 miktarının artışına bağlı olarak azalmıştır.

SNEDDS formülasyonları karakterizasyon özelliklerinin, damlacık boyutu 100 nm'nin altında ve polidispersite indeksin $0<PDI<0,1$ arasında olması hedeflenmiştir. Hedeflenen karakterizasyon özelliklerini sağlamak amacıyla program tarafından belirlenen yağ, YEM ve YYEM miktarları ile oluşan formülasyonun karakterizasyon özellikleri, Design Expert yazılımı kullanılarak %95 güven aralığında olması gereken karakterizasyon sınırları belirlenmiştir. Deney şartlarında oluşturulan formülasyonların karakterizasyon özellikleri de bu sınırlar içerisinde bulunmuş ve optimum formülasyonlar olarak belirlenmiştir.

5.4.2. Etkin madde yükleme çalışmaları

Formülasyonların etkin madde yükleme kapasitesini artırmak için, tenofovirin en fazla çözündüğü YYEM olan propilen glikol ($173\pm0,020$ mg/mL) ile geliştirilen formülasyonlar 1:1 oranında karıştırılmıştır. YYEM seçiminin formülasyonun stabilitesine olan etkisi kontrol edilmiştir. Bu amaçla santrifüj ve dondurup-çözme çalışmaları yapılmıştır. Formülasyon bileşenleri Cremophor RH 40 ve propilen glikol sıcaklıkla çözünürlüğü etkilenen yardımcı maddeler olduğu için, stabilite sorunu (etkin maddenin çökmesi) oluşmadan formülasyonlara en fazla 61,25 mg/mL konsantrasyonda etkin madde yüklenmiştir.

5.4.3. Geliştirilen formülasyonlarda yapılan kontroller

Geliştirilen orta ve uzun zincirli formülasyonun damlacık boyutu ve dağılımı, viskozite, türbidite, zeta potansiyel, kendiliğinden emülsifikasyon zamanı ve morfolojik özellikleri kontrol edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.28).

Formülasyonun çözünürlük, çözünme hızı ve emilimini etkileyebilecek özelliklerinden biri damlacık boyutudur. Damlacık boyutu F1 formülasyonunda $12,2 \pm 0,120$ nm, F2 formülasyonunda ise $11,2 \pm 0,290$ nm olarak tespit edilmiştir. Damlacık büyüklüğü 100 nm'nin altında olan formülasyonlar nanoemülsiyon olarak tanımlanmıştır (Patel ve diğerleri, 2014; Ke ve diğerleri, 2016). F1 ve F2 formülasyonları nano boyutta geliştirilmiştir.

Formülasyonlara (yağ-YEM-YYEM) çıplak gözle bakıldığında berrak bir şekilde görünmekle birlikte, distile su ile seyreltildiğinde de (250 mL) şeffaf bir görüntü elde edilmiştir. 0–20 NTU aralığında yapılan türbidite ölçümlerinde F1 formülasyonu $3,71 \pm 0,02$ NTU ölçülürken, F2 formülasyonu $2,83 \pm 0,02$ NTU olarak bulunmuştur. Formülasyonların türbidite özellikleri, damlacık büyüklüğü sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. İki formülasyon da distile su ile seyreltildiğinde şeffaf bir görüntü oluştururken, damlacık büyüklüğü daha büyük olan F1 formülasyonun türbidite ölçüm sonuçları F2 formülasyonuna göre daha yüksek çıkmıştır.

F1 ve F2 formülasyonlarının zeta potansiyelleri de ölçülmüştür. Emülsiyonların zeta potansiyeli ± 35 arasında olması beklenmektedir (Çelebi, 2009). Zeta potansiyel, emülsiyonların stabilitesini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Ölçülen zeta potansiyel değerlerinin sıfıra yakın olması damlacıkların elektriksel açıdan yüksüz olduğunu göstermektedir. Geliştirilen formülasyonlarda da tenofovir ve formülasyon bileşenleri yüksüzdür. F1 ve F2 formülasyonlarının zeta potansiyelleri sırasıyla $0,45 \pm 0,04$ ve $0,32 \pm 0,19$ değerleriyle yüksüz olan formülasyonlardır.

Misel boyutuna yakın olan formülasyonların, TEM ile elde edilen görüntüleri küresel olup damlacık büyüklüğü tayinini desteklemektedir (Bkz. Şekil 4.24). Formülasyonun çözünme hızı ve stabilitesini etkileyebilecek olan PDİ verilerinin 0,1'in altında olmasıyla iyi bir dağılım gösterdiği görülmüştür. F1 formülasyonu için PDİ sonuçları $0,077 \pm 0,012$, F2 formülasyonu için de $0,097 \pm 0,008$ olarak bulunmuştur.

Formülasyonların kendiliğinden emülsifiye olma özelliklerini tespit etmek amacıyla emülsifikasyon testi yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda F1 formülasyonu 13

sn, F2 formülasyonu da 11 sn'de emülsifiye olmuştur. Formülasyonlar iyi emülsifiye olma özelliği göstermekte ve Grade A'da yer almaktadır.

Sonuç olarak, orta ve uzun zincirli yağlardan oluşan F1 ve F2 formülasyonları stabil, damlacık boyutu ve dağılımı iyi, zeta potansiyel ve viskozite açısından uygun, hızlı emülsifiye olan sistemlerdir.

5.4.4. Çoklu emülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi

Dış fazı su olan (S/Y/S) emülsiyonlar, kendiliğinden çoklu emülsifiye sistemler olarak da adlandırılmaktadır (Qi, 2011). Yüksek çözünürlük ve düşük permeabiliteye sahip (BCS Sınıf 3) olan ilaçların emilim ve biyoyararlanımını artırmak için, çoklu emülsiyonlar kullanılmıştır (Zhu ve Zhang, 2011; Chourasia ve Khutle, 2015; Wang ve diğerleri, 2015; Hu ve diğerleri, 2016). Tez kapsamında yapılan çalışmalarla, tenofovirin ilk kez çoklu emülsiyonu (S/Y/S) geliştirilmiştir.

Tenofovirin formülasyonda kullanılacak olan yağ (Captex 355, Capmul MCM, İmwitor 742, İmwitor 988), yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerdeki (Abil Eoptim-90, Tween 20, mono propilen glikol, Labrafil, propilen glikol, Arlacel 20, Span 20, Span 85) çözünürlükleri saptanarak (Bkz. Çizelge 4.29) yağ fazı olarak İmwitor 742 ($64,40 \pm 0,01$ mg/mL) seçilmiştir.

Literatür çalışmalarına göre, iki adımda emülsifikasyon yöntemi çoklu emülsiyonları geliştirmek amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden birisidir (Florence ve Whitehill, 1982; Okochi ve Nakano, 1996; Ito ve diğerleri, 2012; Allouche ve diğerleri, 2003; Matos ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında da S/Y/S emülsiyonunu geliştirmek için, bazı modifikasyonlarla iki adımda emülsifikasyon yöntemi kullanılmıştır (Bkz. Şekil 3.2). Abil Em 90 S/Y emülsiyonu geliştirmek amacıyla lipofilik YEM olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Courtois ve diğerleri, 2009; Vasiljevic ve diğerleri, 2009; Choi ve diğerleri, 2009). S/Y emülsiyonu hazırlamak için de hidrofilik YEM %20'nin altındaki oranlarda kullanılmıştır (Matos ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında da iki adımda emülsifikasyon yönteminin ilk adımı primer emülsiyonu hazırlamak için, hidrofilik YEM olarak %20'nin altındaki oranlarda Labrafil ve lipofilik

YEM olarak da Abil Em 90 kullanılmıştır. Km oranının iç faz damlacık boyutu ve polidispersite indeksi üzerine olan etkisi incelenmiş Km oranı 1:9 olarak belirlenmiştir. Primer emülsiyon için sıcaklığın genellikle 70°C, sekonder (çoklu emülsiyon) emülsiyon için ise 25°C olması beklenmektedir (Çelebi, 2009). Formülasyon geliştirme aşamasında, primer emülsiyon 75°C, sekonder (çoklu emülsiyon) emülsiyon için ise 25°C'deki sıcaklıklar kullanılmıştır. Ayrıca çoklu emülsiyonlarda, primer emülsiyon hazırlanırken genellikle yüksek hızda (>10 000 rpm) karıştırılarak emülsiyonlar oluşturulmuştur (Okochi ve diğerleri, 1996; Allouche ve diğerleri, 2003; Matos ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında da S/Y emülsiyonu daha uzun sürede (45 dk) ve daha yavaş (750 rpm) karıştırılarak geliştirilmiştir. Elektrolitlerin emülsiyonların stabilitesini artırdığı çalışmalarda bildirilmiştir (Ali ve diğerleri, 2010; Jiang ve diğerleri, 2013). Bu amaçla formülasyona, S/Y primer emülsiyonun viskozitesini ve stabilitesini artırmak için %0,6 oranında NaCl ilave edilmiştir.

S/Y/S emülsiyonlarını geliştirmek için yapılan çalışmaların ikinci adımında primer emülsiyon karıştırma hızına göre daha düşük hızda içerisinde hidrofilik YEM içeren sulu faza eklenerek oluşturulmaktadır (Okochi ve Nakano, 1996; Matos ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında ise hidrofilik YEM olarak propilen glikol primer emülsiyonla 1:1 oranında karıştırılmış ve tenofovir içeren S/Y/S çoklu emülsiyon ilk kez geliştirilmiştir.

Çoklu emülsiyonun karakterizasyon özellikleri

Primer emülsiyonun damlacık boyutu $126,3 \pm 4,8$ nm, PDİ değeri $0,053 \pm 0,046$, çoklu emülsiyonun ise $1459,0 \pm 58,4$ nm, PDİ değeri $0,74 \pm 0,08$ olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda genellikle daha büyük damlacık boyutuna sahip (>10 µm) çoklu emülsiyonlar geliştirilirken (Okochi ve Nakano, 1996; Ito ve diğerleri, 2012), çalışmada farklı boyutlarda ve 1,5 µm'den küçük çoklu emülsiyon elde edilmiştir.

Formülasyonun viskozitesindeki değişim formülasyonun stabilitesini etkilemektedir. Geliştirilen çoklu emülsiyonun 40 rpm'deki viskozite sonucu $54,7 \pm 0,6$ rpm olarak saptanmıştır ve formülasyon pseudoplastik akış göstermektedir.

Yağlı emülsiyon çıplak gözle sütsü kıvamda görünürken, 250 mL distile su eklenerek seyreltilmesiyle oluşan emülsiyon bulanıktır. Çoklu emülsiyonların seyreltilmesiyle oluşan görüntü, SNEDDS emülsiyonlar gibi berrak değildir. Emülsiyonların damlacık boyutu arttıkça bulanıklıkları da artmaktadır (Bkz. Çizelge 4.32, Resim 4.2).

Farklı boyutlarda damlacıklara sahip çoklu emülsiyon formülasyonu, emülsifikasyon zamanı sınıflandırma sistemine göre Grade B'de yer almaktadır.

Çoklu emülsiyonun zeta potansiyel ölçümleri $-3,39 \pm 0,32$ olarak saptanmıştır. Zeta potansiyel ölçüm değeri emülsiyonların stabil olması için istenilen ± 35 aralığında çıkmıştır (Çelebi, 2009).

Literatür çalışmalarında geliştirilen çoklu emülsiyonların morfolojisi genellikle TEM mikroskobu ya da optik mikroskopla incelenmektedir (Wang ve diğerleri, 2015; Matos ve diğerleri, 2018; Qi ve diğerleri, 2011). Geliştirilen çoklu emülsiyon da optik mikroskop ve TEM ile incelenmiş ve morfolojik olarak çoklu emülsiyonun olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.26-4.27).

Etkin madde yükleme çalışmalarında, geliştirilen SNEDDS formülasyonlarla kıyaslamak adına çoklu emülsiyona da 61,25 mg/mL tenofovir yüklenmiştir.

5.5. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

Tenofovir içeren F1, F2 ve F3 formülasyonları ve piyasa preparatı ile pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de çözünme hızı çalışmaları yapılmış ve çözünme hızı profilleri çıkarılmıştır. Viread® için FDA veri tabanında bulunan pH 1,2'de yapılan çalışmaların yanı sıra pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında da çözünme hızı çalışmaları yapılarak çözünme hızı profilleri elde edilmiştir.

SNEDDS ya da çoklu emülsiyonlarla yapılan çözünme hızı çalışmalarında, formülasyonlar çözünme ortamına eklenirken sert jelatin kapsül (Hong ve diğerleri, 2006; Syukri ve diğerleri, 2018) kullanılmaktadır. Tez çalışmasında da geliştirilen

F1, F2 ve F3 formülasyonu sert jelatin kapsül (00, Coni-snap®) kullanılarak çözünme ortamlarına eklenmiştir.

Tenofovirin mikroemülsiyon formülasyonunda yapılan in vitro çözünme hızı çalışmasında, sadece pH 1,2 ortamı kullanılmış ve çalışmalar sonucunda 2. saatin sonunda %87 oranında çözünme göstermiştir (Divya ve diğerleri, 2014). Tez çalışmalarında ise pH 1,2'de yapılan çözünme hızı çalışmalarında Viread®, F1, F2 ve F3 formülasyonlarında 15. dk'da çözünen %tenofovir miktarları sırasıyla %86, %85, %87 ve %78 olarak bulunmuştur. Geliştirilen F1, F2 ve F3 formülasyonlarında yapılan çözünme hızı çalışmalarında 90. dk'da %100'e ulaşmıştır.

Viread®, F1, F2 ve F3 formülasyonlarının 15 dk'da %çözünen tenofovir miktarı pH 4,5 ortamında sırasıyla %84, %96, %98 ve %78 bulunurken, pH 6,8 ortamında sırasıyla %88, %96, %98 ve %74 olarak bulunmuştur. Geliştirilen formülasyonların piyasa preparatı ile yapılan karşılaştırmalı çözünme hızı çalışma sonuçları benzerlik göstermiştir (Bkz. Şekil 4.36).

F1, F2 ve F3 formülasyonlarında, çözünme hızı %BS değerleri sonuçları %1'in altında çıkmış ve istatistiksel olarak uygun bulunmuştur. F1 ve F2 formülasyonları, pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de çok hızlı çözünme göstermiştir (Bkz.Çizelge 4.39-4.40). Çoklu emülsiyon formülasyonu ise üç pH ortamında da hızlı çözünme göstermiştir (Çizelge 4.41).

5.6. Geliştirilen Formülasyonlarda Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen F1, F2 ve F3 formülasyonlarının dayanıklılığını incelemek için öncelikle termodinamik stabilite çalışmaları yapılmıştır. Dondurup-çözme çalışmaları sonucunda formülasyonlarda faz ayrışması, kristallenme, bozunma ya da renk değişikliği gözlenmemiş ve santrifüjleme çalışmalarına geçilmiştir. Santrifüjleme çalışması sonrası formülasyonlarda kistallenme ya da faz ayrışması da gözlenmemiştir.

Kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarıyla F1 ve F2 formülasyonları 0, 1, 2, 3, 4 ve 6 aylarda damlacık büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel, viskozite ve türbidite tayini ile formülasyonların karakterizasyon özellikleri değerlendirilmiştir. Örneklerin hiçbirinde faz ayrımı görülmemiştir. 4°C'de gerçekleşen kristallenmenin, formülasyonların oda sıcaklığına getirilip karıştırılmasıyla ortadan kalktığı görülmüştür. 25°C'de etkin maddede çökme ya da renk değişikliği gözlenmemiştir. 40°C'de ise renk değişimi gözlenmiştir. F1 ve F2 formülasyonlarının 4°C ve 40°C'de damlacık büyüklüğü, zeta potansiyeli, viskozite ve türbidite özellikleri değişmiştir. F1 formülasyonu için damlacık boyutu $12,2 \pm 0,120$ nm, F2 formülasyonun damlacık boyutu ise $11,2 \pm 0,290$ nm olarak saptanmıştır. Formülasyonlarda 25°C'de yapılan 6.ay ölçümlerinde F1 ve F2 formülasyonlarının damlacık boyutu sırasıyla $11,8 \pm 0,200$ ve $12,5 \pm 0,120$ nm olarak bulunmuş ve formülasyonların damlacık boyutu açısından stabil olduğu kanıtlanmıştır. F1 ve F2 formülasyonları için PDI sonuçları başlangıçta sırasıyla $0,077 \pm 0,012$ ve $0,097 \pm 0,008$ bulunurken, 6.ayın ölçümlerinde $0,092 \pm 0,010$ ve $0,142 \pm 0,030$ olarak saptanmıştır. 25°C'de yapılan stabilite çalışmaları sonucunda F1 ve F2 formülasyonları damlacık boyutu ve PDI açısından stabil bulunurken, zeta potansiyeli ve viskozitesi değişmiştir.

Çoklu emülsiyonda 4°C, 25°C/%60 sıcaklık/bağıl nem ve 40°C/%75 sıcaklık/bağıl nemde gerçekleştirilen 6 aylık stabilite çalışmaları sonucunda formülasyonlar, 25°C'de 1. ayın sonunda damlacık büyüklüğü stabil kalırken, 40°C ve 4°C'de damlacık büyüklüğü değişmiş ve formülasyonlarda faz ayrışması gözlenmiştir. 25°C'de yapılan stabilite çalışmalarında ise 2. ayda formülasyonun damlacık büyüklüğü değişmiştir. Çoklu emülsiyonların dezavantajlarından biri, farklı boyutlarda damlacık büyüklüğüne sahip olmasıdır (Bkz. Şekil 4.26-4.27). Florence and Whitehill tarafından 3 tip olarak sınıflandırılan (Bkz Şekil 2.5) çoklu emülsiyonlardan, geliştirilen formülasyonun daha çok A ve B tipi damlacıklardan oluştuğu düşünülmektedir. Formülasyonun zamanla damlacık boyutunun değişmesi, C tipi (birden fazla damlacığı içeren) ve kinetik enerjisi daha yüksek olan damlacıkların zamanla bozulması olarak düşünülebilir. 2. aydan itibaren kontrol edildiğinde damlacık boyutunun daha az değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çoklu emülsiyonlar için beklendiği gibi stabil sonuçlar elde edilememiştir. Çoklu emülsiyonların stabilitelerini artırmak için, iç ve dış faza viskozite artırıcı maddeler

eklenebileceği belirtilmektedir (Çelebi, 2009). Geliştirilen çoklu emülsiyonun stabilitesini artırmak için de formülasyona viskozite artırıcı yardımcı maddelerin ilavesi düşünülebilir.

5.7. İn Vitro Lipoliz Çalışmaları

Formülasyon geliştirilmesi sırasında, ilaçların in vivo performansını tahmin etmek amacıyla in vitro testler kullanılmaktadır. İn vitro çözünme hızı testleri lipit kaynaklı sistemlerin değerlendirilmesinde yeterli değildir. Formülasyonda kullanılan orta ve uzun zincirli trigliserit ve digliseritler duodenumda safra tuzunun etkisiyle yüzey alanları artar ve pankreatik lipaz ile de yağ asitlerine parçalanırlar. Bu aşamada, in vitro çözünme hızı testleri, lipitlerin sindirimi ve emilen kısım olan misel karışımları ve bunların çözünmeleri hakkında bir bilgi vermez. Bu nedenle, in vivo'ya daha yakın bir model oluşturup, oral lipit formülasyonlarındaki çözünmeyi ve sindirimi görmek için gastrointestinal lipoliz testi geliştirilmiştir.

5.7.1. Analiz yönteminin geliştirilmesi

İn vitro lipoliz deney ortamlarındaki tenofovir miktarını saptamak için yapılan çalışmalarda örneklerin analizinde çözücü olarak etanol (Dahan ve Hoffman, 2006), metanol (Daniela ve diğerleri, 2018) ya da asetonitril (Christophersen ve diğerleri, 2014) kullanılmıştır. Tez çalışmasında da lipoliz örneklerinin analizi için çözücü olarak asetonitril kullanılmıştır. Bu amaçla tenofoviri asetonitril spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiş, kalibrasyon ve validasyonu yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin uygunluğu Bölüm 5.2'de tartışılmış ve asetonitril çözücü ortamı kullanılarak geliştirilen analitik yöntemle tenofoviri istenilen doğruluk, kesinlik, doğrusallık ve seçicilikte elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

5.7.2. İn vitro lipoliz deney modeli

Lipoliz çalışmalarında uzun zincirli (F1) ve orta zincirli (F2) yağ asitleri, yüzey etkin madde (Cremophor RH 40), yardımcı yüzey etkin maddelerden (Tween 20 ve propilen glikol) oluşan ve tenofovir içeren SNEDDS formülasyonları değerlendirilmiştir.

Literatürde in vitro lipoliz deney çalışmalarının büyük bir kısmı, dinamik lipoliz modeli kullanılarak potansiyometrik titrasyon yöntemi ile yapılmıştır (Larsen ve diğerleri, 2012; Tran ve diğerleri, 2017; Daniela ve diğerleri, 2018; Siqueira ve diğerleri, 2017; Bakala-N'Goma ve diğerleri, 2015; Sassane ve diğerleri, 2014). Tez çalışması kapsamında da yapılan deneylerde dinamik lipoliz modeli ve potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır.

Dahan ve Hoffman'ın yaptığı lipoliz deney çalışması örneğinde, 40 mL deney ortamı, pH 6,8-7,4 aralığında, 1 000 IU domuz pankreatin çözeltisi ilave edilip, Ca deney başlangıcında 5 mM kullanılarak dinamik lipoliz deney koşulları oluşturulmuştur (Dahan ve Hoffman; 2006,2007). Yapılan dinamik lipoliz çalışmaları genel olarak açlık ortam şartlarına göre tasarlanırken (MacGregor ve diğerleri, 1997; Zangenberg ve diğerleri, 2001a; Dahan ve Hoffman; 2006,2007), yapılan bir diğer çalışmada ise açlık-tokluk gastrointestinal model geliştirilmiştir (Christophersen ve diğerleri, 2014). Tez kapsamında in vitro lipoliz deney modeli koşulları oluşturulurken, deney ortamı 40 mL olarak belirlenmiş, Ca deney başlangıcında 5 mM olarak eklenmiştir. Sonuç olarak açlık-tokluk gastrointestinal lipoliz modeli SNEDDS sistemler için ilk kez geliştirilmiştir. Çalışmalarda açlık-tokluk GI sistemi taklit eden FASGIF, FESGIF, FASSIF ve FESSIF ortamlar hazırlanmış ve pH farklılıkları dikkate alınarak lipoliz yöntemi tasarlanmıştır.

Yapılan gastrik lipoliz çalışmalarında insan gastrik lipazı temsilen genellikle Candida antartica lipaz (Christophersen ve diğerleri, 2014; Thomas ve diğerleri, 2014) kullanılmıştır. İntestinal lipoliz çalışmalarında ise insan intestinal lipazı temsilen domuz pankreatin çözeltisi kullanılmış ve pankreatin çözeltileri deney ortamına, 800 USP (Daniela ve diğerleri, 2018), 1000 USP (Guine ve diğerleri, 2008; Kaukonen ve diğerleri, 2004; Porter ve diğerleri, 2004; Sek ve diğerleri, 2001), 300-800 USP (Larsen ve diğerleri, 2008; Fatouros ve diğerleri, 2007), 1000 TBU (Guine ve diğerleri, 2008; Kaukonen ve diğerleri, 2004) gibi lipaz aktivitelerinde eklenmiştir. Tez çalışmalarında da gastrik lipazı temsilen Candida antartica lipaz kullanılırken, intestinal lipazı temsilen de domuz pankreatin lipaz çözeltisi 1000 USP olarak kullanılmıştır.

Çalışmalar sonucunda hazırlanan lipit kaynaklı kendiliğinden nanoemülsifiye dozaj şekli için in vitro gastrointestinal lipoliz deney modeli oluşturularak, orta ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan bu formülasyonlarda lipoliz açısından farklılıklar incelenmiştir.

Yapılan gastrik lipoliz çalışmalarında harcanan HCl (açlık) ve NaOH (tokluk) miktarlarının lipitlerin sindirimi hakkında kesin bilgi vermediği görülmüştür. Gastrik açlık ve tokluk ortamlarındaki sindirilen/çözünen tenofovir miktarı 15. dk'da tokluk ortamında daha yüksek bulunmuştur.

İntestinal lipoliz çalışmalarında açığa çıkan yağ asitlerinin ortamın pH'ını düşürmesini engellemek amacıyla kullanılan NaOH miktarı lipitlerin sindirimi hakkında bilgi vermektedir. Açlık ve tokluk ortamlarında, orta zincirli yağ asidi olan İmwitor 742 ile hazırlanan F2 formülasyonunda, uzun zincirli yağ asidi olan oleik asit içeren F1 formülasyonuna göre daha fazla NaOH harcanmış ve formülasyonun daha fazla sindirime uğradığı bulunmuştur. Açlık ve tokluk ortamlarındaki sindirilen/çözünen tenofovir miktarı 15. dk'da %85'in üzerinde bulunmuş ve formülasyonlar arası fark görülmemiştir. SNEDDS sistemlerle yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarında pH 6,8'de 15 dk'da %85'den fazla yani çok hızlı bir çözünme sağlanmıştır ve bu sonuç intestinal lipoliz (pH 6,5) deney sonuçlarıyla da benzerlik göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.47).

Literatür değerlendirmelerine göre şu ana kadar in vitro lipoliz modeline ait standardize bir yöntem bulunmamaktadır. Bazı literatür çalışmalarında lipoliz sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin, pH'ı değiştirmemesi için ortama eklenen NaOH yağ asitleriyle birlikte etkin maddenin de çöktüğü görülmüştür. İn vitro lipoliz deney modeli şartları insanlarda bulunan enzimsel farklılıklar ve miktarlar dikkate alınarak oluşturulmaktadır. Fakat sıçan ve farelerde safra tuzu miktarının daha fazla olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada safra tuzu miktarının farklılığına bağlı olarak in vitro lipoliz çalışmaları ve sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalarla ilişkilendirilirken, insanlardaki korelasyon değerlendirmeleri açısından farklılık görüldüğü belirtilmektedir (Siqueira ve diğerleri, 2018). İn vitro lipoliz deney koşullarını

oluşturmak için, lipaz kaynağı, pH, safra tuzu, fosfolipit miktar ve kaynakları açısından yapılan çalışmalar devam etmektedir.

5.8. Tenofovir İçeren Emülsiyonların Franz Difüzyon Hücresinde Geçişinin İncelenmesi

BCS Sınıf 3 bir madde olan tenofovirin permeabilite özelliklerini tespit etmek amacıyla “Franz difüzyon hücresi yöntemi” kullanılmıştır (Franz,1975). Tenofovirin F1, F2 ve F3 emülsiyonlarından diyaliz membran ve koyun ince bağırsak dokusundan geçişi incelenmiştir. Sıçan ince bağırsak dokuları, Franz difüzyon hücrelerine büyüklük açısından uygun olmadığı için sıçan dokusu yerine koyun ince bağırsak dokusu kullanılmıştır.

Ex-vivo permeabilite çalışmalarında, koyun ince bağırsak dokusundan tenofovirin akı ve permeabilite değerleri, F3 formülasyonunda diğer formülasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.51). F3 formülasyonunda tenofovirin 24. saatin sonunda koyun dokusundan geçişi $78,5 \pm 11,8$ olarak bulunurken, F1 formülasyonu için $33,1 \pm 4,90$, F2 formülasyonu için $37,9 \pm 5,70$ ve tenofovir çözeltisi için $43,5 \pm 6,50$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, F3 formülasyonunda akı ve permeabilite değeri en yüksek bulunmuştur.

Tenofovir ile yapılan permeabilite çalışmasında, keçi ince bağırsak dokusu kullanılmış ve tenofovir süspansiyonun 10. saatin sonunda permeabilite yüzdesi $38,0 \pm 1,50$ olarak bulunmuştur (Patil ve diğerleri, 2017). Tez çalışması kapsamında koyun doku hücresi kullanılarak yapılan permeabilite çalışmalarında 24. saatin sonunda tenofovir çözeltisinin permeabilite yüzdesi $43,5 \pm 6,50$ olarak bulunmuştur.

BCS Sınıf 3 ilaçlar için, çoklu emülsiyonların ilaçların permeabilite ve biyoyararlanımını artırabilecek alternatif bir dozaj şekli olduğu çalışmalarla bildirilmiştir (Chourasia ve Khutle, 2015; Zhu ve Zhang, 2011; Hu ve diğerleri, 2016). Çoklu emülsiyonlar, disperse bir faz içerisinde dış faz ile aynı yapıya sahip daha küçük damlacıklar olan, emülsiyon olarak tanımlanmaktadır. Çoklu emülsiyonların salım ve emilim mekanizması kesin olarak bilinmemektedir (Soytürk ve Tarımcı,

2000). Fakat, sistemin taşıdığı etkin maddenin yapısına bağlı olarak, üç çeşit salım mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmalar; iyonize olmayan, yağda çözünen etkin maddenin yağ tabakasından pasif difüzyon ile salınması, yağlı membranın şişmesi ve kırılması yolu ile etkin maddenin serbestleşmesi, iyonize olan ve olmayan maddelerin lipofilik yüzey aktif madde ile kolaylaştırılmış transportudur (Soytürk ve Tarımcı, 2000). Çalışmada tenofovir SNEDDS sistemlerde yağ fazına yüklenirken, çoklu emülsiyonda yağ fazı ve su fazına yüklenmiştir. Bu durum çoklu emülsiyonla BCS Sınıf 3 ilaç olan tenofovirin, çözünme ortamına/vücut sıvılarına kaçmadan daha fazla taşınmasına sebep olmuş olabilir. Ayrıca çoklu emülsiyonların yapısında bulunan birden fazla damlacıkla membranın geçirgenliğini artırarak tenofovirin emilimini de artırmış olabileceği düşünülmektedir.

5.9. İn Vivo Çalışmalar

5.9.1. Tenofovir LC-MS/MS miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Tenofovir ile yapılmış in vivo çalışmalarda insan plazmasındaki tenofovir tayininde RP-HPLC (Onah ve Ajima, 2011) ve LC-MS-MS (Delahunty ve diğerleri, 2009) yöntemleri kullanılmıştır.

ARGEFAR'da geliştirilen LC-MS/MS yönteminde Shimadzu HPLC Sistemi & AB Sciex API 4000 cihazı kullanılmıştır. Sıçanlarda LC-MS/MS yöntemi kullanılarak yapılan bir biyoyararlanım çalışmasında, Polar-RP kolonu (4 µm, 2.1x150 mm), mobil faz olarak 3/1/96 asetonitril/asetik asit/su ile kullanılmış, akış hızı da 0,6 mL/dk olarak verilmiştir. Tenofovirin Q1/Q3 iyonları sırasıyla 288,1/176,1 Da bulunmuştur (Watkins ve diğerleri, 2017). Tez kapsamında da LC-MS/MS yöntemi kullanılarak geliştirilen analiz yönteminde, C8 kolonu (4,6 x100 mm 3,5 µm), mobil faz olarak %0,1'lik formik asitli su (mobil faz A) ve %0,1'lik formik asitli asetonitril (mobil faz B) kullanılmıştır. Akış hızı 0,9 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL gerçekleştirilmiştir. Tenofovir için Q1 ve Q3 iyonları sırasıyla 288,1/176,1 Da olarak bulunmuştur.

Tenofovir için geliştirilen in vivo analiz yönteminin kalibrasyon sonuçlarının determinasyon katsayısı $R^2=0,9942$ olarak yüksek bulunmuştur. Sıçan plazma örnekleri için doğrusal aralık değeri 10-100 ng/mL'dir. Validasyon çalışmalarında

matriks etkisi ve proses etkinliği, stok çözelti kararlılığı, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, kısa süreli oda sıcaklığı kararlılık bulguları çalışmaları %RSD değerleri %15'dan küçük bulunmuştur. Tenofovir için LLOQ değeri 0,056 olarak hesaplanırken, seçicilik çalışmasında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Validasyon sonuçları uluslararası kabul kriterleri ile uyumludur.

5.9.2. Biyoyararlanım çalışmaları

İn vivo çalışmalar kapsamında yapılan bağıl biyoyararlanım çalışlarında, 70 adet 200-300 gr erkek Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Çalışma grupları temel olarak açlık ve tokluk olmak üzere iki gruba ve her iki grup kendi arasında tenofovir-çözelti, Viread®, oleik asit, İmwitor 742 formülasyonu ve çoklu emülsiyon olmak üzere 5 alt gruba ayrılmıştır (Bkz. Çizelge 3.14).

Tenofovir biyoyararlanım sorunu göstermekte olup açlık oral biyoyararlanımı %25'dir ve optimum etki için yiyeceklerle birlikte yani tok karnına kullanılması gerekmektedir. Yağ içeriği yüksek yemek, tenofoviri AUC'sinde yaklaşık %40 ve C_{maks} 'ta %14'lük bir artışla oral biyoyararlanımını artırmıştır (Kearney ve diğeri, 2004). Tenofoviri biyoyararlanımında açlık-tokluk durumu varyasyonu olduğu ve geliştirilen lipid kaynaklı emülsiyonların bu varyasyonu azaltması hedeflendiği için, biyoyararlanım çalışması açlık-tokluk çalışması olarak yapılmıştır.

Uzun zincirli yağ asidi olan oleik asitle yapılan bir çalışmada, oleik asitin sistemik dolaşıma katılırken lenfatik sistemi tercih ettiği görölmüştür (Hyun ve diğeri, 1967). Lipid kaynaklı sistemlerin lenfatik sistemle emilimini artırarak, intestinal permeability artırabileceği literatürlerde bildirilmiştir (Dahan ve Hofman, 2008; Porter ve Charman, 2001; Balakrishnan ve diğeri, 2009). Tez çalışmasında uzun zincirli yağ asidi oleik asit ve orta zincirli yağ asidi İmwitor 742 içeren SNEDDS formülasyonların, yağ asidi içeriği farklılığının biyoyararlanım üzerine olan etkisini incelemek amacıyla, in vivo çalışmalarda oleik asit ve İmwitor 742 SNEDDS formülasyonları kıyaslanması amaçlanmıştır. Ayrıca geliştirilen formülasyonlar, çoklu emülsiyon, tenofovir çözeltisi ve ticari ürün ile farmakokinetik değerlendirme açısından karşılaştırılması planlanarak in vivo çalışmalar yapılmıştır. Ancak, in vivo

alışmalar sonucunda, oleik asit (F1) ve İmwitor 742 (F2) formülasyonlarının erken zaman noktalarında plazmadaki tenofovir miktarına ait analiz sonuçları elde edilememiştir. Erken zaman noktalarında analiz sonuçlarının alınamamasının nedeni, damlacık boyutu yaklaşık 10 nm olan uzun (F1) ve orta zincirli (F2) formülasyonlarının pasif hedeflendirme ile karaciğere yönelerek daha hızlı metabolizasyonu olabilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada Caco-2 hücre kültüründe tenofoviri ABCB1 ilaç effluks transportu tarafından intestinal membrandan elimine edildiğ i bildirilmiştir. Fakat sıçanlarda yapılan in situ perfüzyon çalışmalarında ise ABCB1 effluks inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Tenofoviri insanlarda sıçanlara göre ileum ve duodenumda bulunan enterositlerde daha hızlı bozunmasının bu duruma sebep olabileceğ i bildirilmiştir (Moss ve diğ erleri, 2017). Sonuç olarak, tenofoviri sıçanlardaki intestinal davranış ının, insanlardan farklı olabileceğ i gösterilmiştir. Ayrıca tenofoviri metabolizmasının artması lipofilik karakterinin azalmasına sebep olmakta ve bu durum permeabilitesini de etkilemektedir (Kearney ve diğ erleri, 2004). SNEDDS ile yapılan in vivo çalışmalarda domuzların kulllanıld ığ ı da görülmüştür (Fatouros ve diğ erleri, 2008; Nielsen ve diğ erleri, 2008). Van Gelder ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığ ı bir çalışmada ise tenofoviri metabolize olma hız ı sıçanlar>insanlar>domuzlar>Caco-2 hücreleri sıralamas ı şekl inde olduğ u bildirilmiştir (Gelder ve diğ erleri, 2000).

Biyoyararlanım çalışmasında orta ve uzun zincirli formülasyonların, erken zaman noktalarında (15 dk, 30 dk, 1 sa, 2 sa) analiz sonuçlarının alınamamasından dolayı farmakokinetik ve biyoyararlanım değ erlendirmeleri yapılamamıştır. Sonuç olarak tenofovir zeltisi, Viread® tablet ve gelişt irilen çoklu emülsiyonun bağı l biyoyararlanım sonuçları tez kapsamında değ erlendirilmiştir.

Tenofovir zeltisi, Viread® tablet ve gelişt irilen çoklu emülsiyonun in vivo analizler sonucunda elde edilen zamana bağı l konsantrasyon değ erlerinden hareketle WinNonlin™ program ı kullanılarak farmakokinetik verilerin değ erlendirilmesi yapılmıştır. Tenofovir zeltisinin açlık ve tokluk durumlarındaki AUC_{0-t} değ erleri sırasıyla, 1785 ng.dk/mL ve 4122 ng.dk/mL olarak bulunmuştur. C_{maks} değ erleri sırasıyla 418 ng/mL ve 637 ng/mL bulunurken, tenofoviri yarı ömrü açlık durumunda 16 dk ve tokluk durumunda ise 28 dk bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.63-

4.64). Ticari ürünün biyolojik yarı ömrü açlık durumunda 18 dk, tokluk durumunda ise 30 dk olarak bulunmuştur.

Çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk durumlarındaki AUC_{0-t} değeri, 5673 ng.dk/mL ve 6486 ng.dk/mL olarak bulunmuştur. Çoklu emülsiyon açlık ve tokluk gruplarında Viread®'dan daha yüksek C_{maks} ve AUC_{0-t} değerlerinin elde edildiği görülmüştür. (Bkz. Çizelge 4.63-4.64). Ticari ürüne göre biyoyararlanım parametrelerinde açlık durumunda 1,8 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}), tokluk durumunda ise 1,7 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}) katlık artış görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, tenofovirin çoklu emülsiyon formülasyonunun açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasında anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmadığı da görülmüştür.

5.10. İn Vitro- İn Vivo Korelasyon Değerlendirmeleri

Tez çalışmaları kapsamında IVIVC değerlendirmesinde hedeflenen amaç, geliştirilen formülasyonların in vitro çözünme hızı (%çözünen miktar), in vitro lipoliz deney sonuçları (%sindirilen miktar) ve in vivo deney sonuçları (%emilen miktar) arasında ilişki kurmaktır. Ancak, in vivo çalışmalarda SNEDDS formülasyonlarının erken zaman noktalarında analiz sonuçlarının alınamaması ve konsantrasyon-zaman profillerinin elde edilememesi sonucunda in vitro çözünme hızı/lipoliz sonuçları ile in vivo sonuçlar arasında korelasyon kurulması mümkün olmamıştır.

İn vitro-in vivo farmakokinetik korelasyon çalışmalarında, in vitro veri olarak genellikle çözünme hızı verileri kullanılmakla birlikte, bazı çalışmalarda permabilite verileri ile in vivo veriler korele edilmiştir (Gómez ve Valencia, 2015; Cucullo ve diğerleri, 2007). Tez çalışmasında çoklu emülsiyon formülasyonu ile tenofovir çözeltisinin ex-vivo ve in vivo değerlendirilmesi yapılmıştır. Ex-vivo permeabilite çalışmalarında koyun ince bağırsak dokusundan tenofovirin permeabilite değerleri, çoklu emülsiyon formülasyonunda 24. saatin sonunda $78,5 \pm 11,8$ olarak bulunurken, tenofovir çözeltisi için $43,5 \pm 6,50$ olarak bulunmuştur. Biyoyararlanım sonuçları da permeabilite çalışmaları ile benzerlik göstermiş olup, çoklu emülsiyon formülasyonunun açlık AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri sırasıyla 5673 dk.ng/mL, 683 ng/mL, tokluk AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri 6486 dk.ng/mL, 847 ng/mL olarak

bulunurken, tenofovirin çözeltisi açlık AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri 1784 dk.ng/mL, 418 ng/mL, tokluk AUC_{0-t} ve C_{maks} değerleri 4123 dk.ng/mL, 637 ng/mL olarak bulunmuştur. Çoklu emülsiyonun biyoyararlanım sonuçları, tenofovirin çözelti şekline göre permeabilite sonuçlarıyla benzer bir şekilde daha yüksek çıkmıştır.

SNEDDS sistemlerin çözünme hızı çalışmalarında pH 6,8'de 15 dk'da %85'den fazla yani çok hızlı bir çözünme sağlandığı görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.39, Çizelge 4.40). Açlık ve tokluk ortamındaki sindirimi/çözünmeyi görmek için yapılan intestinal lipoliz çalışmalarında her iki ortamda da 15 dk'da %85'in üzerinde çözünme/sindirim görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.47). Sonuç olarak, intestinal lipoliz (pH 6,5) deney sonuçları ile in vitro çözünme hızı (pH 6,8) sonuçlarının benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak IVIVC açısından, tenofovir çözeltisi ile geliştirilen çoklu emülsiyon formülasyonunun ex-vivo-in vivo çalışma sonuçları ile geliştirilen SNEDDS formülasyonlarının intestinal lipoliz-in vitro çözünme hızı sonuçları değerlendirilmiştir.

6.SONUÇ

Hepatit B tedavisinde kullanılan BCS Sınıf 3 etkin madde olan tenofovirin lipit kaynaklı formülasyonlarının geliştirilmesini amaçlayan tez kapsamındaki deneysel çalışmalardan aşağıda özetlenen sonuçlar elde edilmiştir:

1. Önformülasyon çalışmaları sonucunda uzun zincirli yağ asidi olarak oleik asit ve orta zincirli yağ asidi olarak İmwitor 742, Cremophor RH 40 (yüzey etkin madde) ve Tween 20 (yardımcı yüzey etkin madde) içeren SNEDDS formülasyonları kalite tasarımı (QbD) yaklaşımı kullanılarak geliştirildi.
2. QbD yaklaşımıyla, CQA etkileyen CMA belirlenerek, deney tasarımıyla formülasyon optimizasyonu sağlandı. CMA parametreleri yağ, YEM, YYEM ve etkin maddedir. CMA parametreleri miktarındaki değişimin etkisi, polidispersite indeksi ve damlacık büyüklüğünün sonuçları incelenerek optimum formülasyon bulundu.
3. CQA parametreleri açısından; görünüşü şeffaf ve saydam, damlacık büyüklüğü 100 nm'nin altında, polidispersite indeksi 0-0,08 aralığında, zeta potansiyel ± 30 mV, çözünme hızı 15 dk.'da %85'in üzerinde olarak hedeflenen kalite özelliklerinde tenofovir içeren SNEDDS formülasyonlar geliştirildi.
4. Kalite tasarımı yaklaşımında QTPP oluşturuldu ancak SNEDDS formülasyonlar için hedeflenen ürün profiline, çalışmalarda az sayıda deney hayvanı kullanılması (n=7), sıçanlarda olası hızlı metabolizasyon gibi nedenlerle beklenen biyoyararlanım sonucuna ulaşılamadı.
5. Tenofovirin BCS 3 ilaç olması nedeniyle suda çözünürlüğünün fazla olması göz önüne alınarak ve kendiliğinden emülsifiye sistemleri karşılaştırma adına, son zamanlarda BCS 3 ilaçlar için tercih edilen çoklu emülsiyon (S/Y/S) formülasyonu ilk kez geliştirildi.
6. Dinamik in vitro lipoliz modeli kullanılarak sıcaklık, hacim, pH, tampon, yağların sindiriminde rol oynayan gastrik ve intestinal lipaz enziminin etkisi, safra tuzları, kalsiyum tuzu, NaOH etkisi, lipoliz testinin süresinin belirlenmesi ile in vitro lipoliz test koşullarının optimizasyonu sağlandı ve in vitro lipoliz şartlarında açlık-tokluk ortam farklılığının etkisi incelendi. İntestinal lipoliz deney boyunca harcanan NaOH miktarları ile formülasyonu oluşturan yağ tipinin formülasyonun sindirime olan etkisi incelendi. Ayrıca tenofovirin açlık-tokluk ortamlarında miktar tayini yapılarak

%çözünen/sindirilen tenofovir miktarları bulundu. Tenofovir içeren SNEDDS formülasyonlar için ilk kez in vitro lipoliz testlerinin sonuçları değerlendirildi.

7. BCS Sınıf 3 bir madde olan tenofovirin permeabilite özellikleri tespit edildi. Etkin madde içeren emülsiyonların (F1, F2 ve F3), diyaliz membran ve koyun ince bağırsak doku hücresinden geçişi incelendi. Geliştirilen çoklu emülsiyonun, tenofovirin permeabilitesini artırdığı görüldü.
8. Çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk gruplarında ticari üründen (Viread®) daha yüksek C_{maks} ve AUC_{0-t} değeri sağladığı görüldü. Ticari ürüne göre açlık durumunda 1,8 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}), tokluk durumunda ise 1,7 (AUC_{0-t}) ve 1,2 (C_{maks}) katlık artış gösterdiği saptandı.
9. Tez çalışmasının ana hedefi kapsamında geliştirilen çoklu emülsiyon formülasyonunun ticari ürüne göre tenofovirin permeabilitesini ve biyoyararlanımını artırdığı bulundu.
10. Tenofovirin çoklu emülsiyonun açlık ve tokluk biyoyararlanımları arasında anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmadığı görüldü. Çoklu emülsiyon formülasyonu ile açlık-tokluk biyoyararlanımı arasındaki fark azaldı.

Sonuç olarak, tez çalışmasında tenofovirin oral biyoyararlanımının artırılması ve açlık-tokluk varyasyonunun azaltılması hedefine ulaşılmıştır. Geliştirilen çoklu emülsiyon formülasyonu hepatit B tedavisinde yeni bir dozaj şekli olarak düşünülebilir. Bu amaçla, çoklu emülsiyon formülasyonun uzun süreli stabilite çalışmalarının ve daha fazla sayıda deney hayvanıyla karşılaştırmalı biyoyararlanım değerlendirilmelerinin yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abrahamse, E., Minekus, M., George, A., Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., Oozeer, R., Beek, E. M. and Ludwig, T. (2012). Development of the Digestive System- Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Digestion*, 3(1-3), 63–77.
- Aksu, B. (2013). İlaçta Kalite Tasarımı (QbD) ve İlgili Yasal Düzenlemeler. İstanbul. *Neta Reklam Tanıtım Matbaacılık*, s.1-256.
- Alayoubi, A., Sabir, M., Aqueel, N., Muhammad, C., Ahmed, A. and Zidan, E. M. (2018). Application of in vitro lipolysis for the development of oral self-emulsified delivery system of nimodipine. *International Journal of Pharmaceutics*, 553 (1–2), 441-453.
- Ali, H., Nazzal, M., Zaghloul, A.-AA. and Nazzal, S. (2008). Comparison between lipolysis and compendial dissolution as alternative techniques for the in vitro characterization of α -tocopherol self-emulsified drug delivery systems (SEDDS). *International Journal of Pharmacy*, 352 (1-2), 104-114.
- Ali, H., Siddiqui, A. and Nazzal, S. (2010). The effect of media composition, pH, and formulation excipients on the in vitro lipolysis of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(2), 226-232.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L. and Salager J. L. (2003). Single- and Two-Step Emulsification To Prepare a Persistent Multiple Emulsion with a Surfactant-Polymer Mixture. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 42(17), 3982-3988.
- Alvarez, F. J. and Stella, V. J. (1989). The role of calcium ions and bile salts on the pancreatic lipase-catalyzed hydrolysis of triglyceride emulsions stabilized with lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 449-457.
- Anderson, P. L., Kiser, J. J. and Gardner, E. M. (2011). Pharmacological considerations for tenofovir and emtricitabine to prevent HIV infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), 240-250.
- Armand, M., Hamosh, M., DiPalma, JS., Gallagher, J., Benjamin, SB., Philpott, JR., Lairon, D. and Hamosh P. (1995). Dietary fat modulates gastric lipase activity in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(1), 74-80.
- Arslan, Ş. A. (2013). *Kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü A.B.D., Ankara, 1-39.
- Aşçı, Z., Tünay, H. ve Demirtürk N. (2015). Tenofovir Disoproksil Fumarata Bağlı Nadir Bir Yan Etki: Kaşıntı. *Klinik Dergisi*, 28(3), 126-128.

- Bakala-N'Goma, J.C., Williams, H.D., Sassene, P.J., Kleberg, K., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Müllertz, A., Pouton, C.W., Porter, C.J. And Carrière, F. (2015). Toward the Establishment of Standardized InVitro Tests for Lipid-Based Formulations5. Lipolysis of Representative Formulations by Gastric Lipase. *Pharmaceutical Research*, 32(4), 1279-1287.
- Balakrishnan, P., Lee, B. J., Oh, H. D., Kim, J. O., Hong, M. J., Jee, J. P., Kim, A. J., Yoo, B. K., Woo, J. S., Yong, C. S. and Choi, H. C. (2009). Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(3), 539–545.
- Balakumar, K., Raghavan, C V., Selvan, N. T., Prasad, R. H. and Abdu, S. (2013(a)). Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of rosuvastatin calcium: Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 337-343.
- Balakumar, K., Chellan, V. R., Natarajan, T. S., Rahman, S. M. H. (2013(b)). Self emulsifying drug delivery system: Optimization and its prototype for various compositions of oils, surfactants and co-surfactants. *Journal of Pharmacy Research*, 6(5), 510–514.
- Bates, T. R. and Carrigan, P. J. (1975). 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. *Journal of Pharmacy Science*, 64(9), 1475–1481.
- Beg, S., Katare, O. P and Singh, B. (2017). Formulation by design approach for development of ultrafine self-nanoemulsifying systems of rosuvastatin calcium containing long-chain lipophiles for hyperlipidemia management. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 869-879.
- Beg, S., Jena, S. S., Patra, C. N., Rizwan, M., Swain, S., Sruti, J., Rao, M. E. and Singh, B. (2013). Development of solid self-nanoemulsifying granules (SSNEGs) of ondansetron hydrochloride with enhanced bioavailability potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 414-423.
- Beg, S., Sandhu, P. S., Batra, R. S., Khurana, R. K., Singh, B. (2015). QbD based systematic development of novel optimized solid self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of lovastatin with enhanced biopharmaceutical performance. *Journal of Drug Delivery*, 22(6), 765-84.
- Benichou, A., Aserin, A. and Garti, N. (2007). O/W/O double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide conjugates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical 1-3 and Engineering Aspects*, 297(1-3), 211-220.

- Benito-Gallo P., Franceschetto A., Wong J.C.M., Marlow M., Zann V., Scholes P., Gershkovich P., (2015). Chain length affects pancreatic lipase activity and the extent and pH–time profile of triglyceride lipolysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 353-362.
- Bhat N., Yelsangikar A., (2009). Tenofovir for HBV: The beginning of the end or the end of the beginning? *Hepatitis B Annual*, 6(1), 41-54.
- Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R. and Laugier, R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, 105(3), 876–888.
- Charan, K., Jayashree, P., Goutam, J., JenaCh, K., Patra, M. E. and Rao, B. M. (2018). QBD-based systematic development of Bosentan SNEDDS: Formulation, characterization and pharmacokinetic assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 31-42.
- Charman, S. A., Charman, W. N., Rogge, M. C., Wilson, T. D., Dutko, F. J. and Pouton, C. W. (1992). Self-emulsifying drug delivery systems formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharmaceutical Research*, 9(1), 87-93.
- Choi, M. H., Jeong, S., Nam, S. I., Shim, S. E. and Chang, Y. H. (2009). Rheology of Decamethylcycllopentasiloxane (cyclomethicone) W/O Emulsion System. *Macromolecular Research*, 17(12), 943-949.
- Choi, S. U., Bui, T. and Ho, R. J. Y. (2008). pH-dependent interactions of indinavir and lipids in nanoparticles and their ability to entrap a solute. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 931–943.
- Chourasia, K. J. and Khutle, N. M. (2015). Self Double Emulsifying Drug Delivery System: A comprehensive review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 433-447.
- Choudhari V.P., Ingale S., Gite S.R., Tajane D.D., Modak V.G., and Ambekar A. (2011). Spectrophotometric simultaneous determination of Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in combined tablet dosage form by ratio derivative, first order derivative and absorbance corrected methods and its application to dissolution study. *Pharmaceutical Methods*, 2(1), 47–52.
- Christophersen, P. C., Christiansen, M. L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B. and Müllertz, A. (2014). Fed and Fasted statü gastrointestinal in vitro lipolysis: in vitro in vivo relations of a conventional tablet, a SNEDDS and a solidified SNEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 232-239.
- Chudasama, A. S., Patel, V. V., Nivsarkar, M., Vasu, K. K. and Shishoo, C. J. (2014). In vivo Evaluation of Self Emulsifying Drug Delivery System for Oral Delivery of Nevirapine. *Indian Journal of Pharmacy Science*, 76(3), 218-224.

- Cole, M. L. and Whataley, M. L. (1997). Release rate profiles of theophylline and insulin from stable multiple w/o/w emulsions. *Journal of Controlled Release*, 49(1), 51-58.
- Constantinides, P. P. and Wasan K. M. (2007). Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(2), 235-248.
- Corstens, M., Claire, C., Carabin, B., Schroën, K., Viau, M. and Meynier, A. (2018). Emulsion encapsulation in calcium-alginate beads delays lipolysis during dynamic *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 46, 394-402.
- Courtois, F., Luis, F. Olguin, Whyte G., Theberge A.B., Huck W.T.S., Hollfelder F. and Abell C., (2009). Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for Use in Cell-Based Assays. *Analytical Chemistry*, 81(8), 3008–3016.
- Cucullo, L., Hossain, M., Rapp, E., Manders, T., Marchi, N., Janigro, D., (2007). Development of a Humanized In Vitro Blood–Brain Barrier Model to Screen for Brain Penetration of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*, 48(3), 505–516.
- Çelebi N. 2009. Emülsiyonlar., F. Acartürk, İ. Ağabeyoğlu, N. Çelebi, F. Tırnaksız, Z. Değim, T. Değim. (Editörler). *Modern Farmasötik Teknoloji*. İkinci baskı. Mattek Matbaacılık, s. 277-299.
- Dahan, A. and Hoffman, A. (2005). Evaluation of a chylomicron flow blocking approach to investigate the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(4), 381–388.
- Dahan, A. and Hoffman, A. (2006). Use of a dynamic in vitro lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: correlation with in vivo data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. *Pharmaceutical Research*, 23(9), 2165-2174.
- Dahan, A. and Hoffman, A. (2007). The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of in vitro lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), 96-105.
- Dahan, A. and Hoffman, A. (2008). Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 129(1), 1-10.
- Dahan, A., Miller, J.M. and Amidon, G.L., (2009). Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs, *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 11(4), 740-746.

- Daniela, S., Jorgensen, S., Sawaf, M., Graeser, K., Mu, H., Müllertz, A. and Rades, T. (2018). The ability of two *in vitro* lipolysis models reflecting the human and rat gastro-intestinal conditions to predict the *in vivo* performance of SNEDDS dosing regimens. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 124, 116-124.
- Delahunty, T., Bushman, L., Robbins, B. And Fletcher, C. V. (2009). The simultaneous assay of tenofovir and emtricitabine in plasma using LC/MS/MS and isotopically labeled internal standards. *Journal of Chromatography B Technology Biomed Life Science*, 877(20-21), 1907-1914.
- Demirtürk, N. ve Demirdal, T. (2011). Yüksek genetik bariyerli antivirallerle tedavi edilen kronik hepatit B hastalarında gözlenen yan etkiler. *Yeni Tıp Dergisi*, 28(3), 146-149.
- Divya, A. C. H., Kumar P., Gnanaprakash K., Gobinath M., (2014). Design, Formulation and Characterization of Tenofovir Microemulsion as Oral Drug Delivery. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, 4(1), 1-5.
- Elnaggar, Y. S. R., El-Massik, A. M. and Abdallah, O. Y. (2009). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 380(1-2), 133-141.
- Fatouros, D. G., Nielsen, F. S., Douroumis, D., Hadjileontiadis, L. J. and Mullertz, A. (2008). In vitro–in vivo correlations of self-emulsifying drug delivery systems combining the dynamic lipolysis model and neuro-fuzzy networks. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 887–98.
- Fatouros, D. G., Bergenstahl, B. and Mullertz, A. (2007). Morphological observations on a lipidbased drug delivery system during in vitro digestion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(2), 85-94.
- Fidan Y. (2011). *Kozmetik Amaçla Kullanılacak Niasinamid İçeren Su/Yağ/Su Tipi Çoklu Emülsiyon Formülasyonun Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.B.D., Ankara, 1-26.
- Fleisher, D., Li, C., Zhou, Y., Pao, L.H. and Karim, A. (1999). Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(3), 233-254.
- Florence, A. T. and Whitehill, D. (1982). The formulation and stability of multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 11(4), 277-308.
- Florence, A. T. and Whitehill, D. (1981). Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 79(1), 243-256.
- Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195.

- Frenkel, M., Shwartz, R. and Garti, N. (1983). Multiple emulsions: I. Stability: Inversion, apparent and weighted HLB. *Journal of Colloid and Interface Science*, 94(1), 174-178.
- Feeney M. O., Crum M. F., McEvoy C. L., Trevaskis N., L., Williams H. D., Pouton C. W., Charman W. N., Bergström C. A. S. and Porter C. J. H. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101,167-194.
- Fung, H.B., Stone, E.A., Piacenti, F.J., (2002). Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical Therapeutics*, 24(10),1515–1548.
- Galia, E., Nicolaides, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C. and Dressman, J.B. (1998). Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical Research*, 15(5), 698-705.
- Gallarate, M., Carlotti, M. E., Trotta, M. and Bovo, S. (1999). On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*, 188(2), 233-241.
- Gasselin, L. D., Rompay, K.KAV., Vela, J. E., Henne, I. N., Lee, W. A., Rhodes, G. R. and Ray, A. S. (2009). Nucleotide Analog Prodrug, Tenofovir Disoproxil, Enhances Lymphoid Cell Loading Following Oral Administration in Monkeys, *Molecular Pharmaceutics*, 6(4), 1145-1151.
- Gelder, J. V., Deferme, S., Naesens, L., Clercq, E. D., Mooter, G. V. D., Kinget, R. and Augustijns, P. (2002). Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. *Drug Metabolism And Disposition Journal*, 30(8), 924-930.
- Ghori, V. L., Patel, D. M. and Omri, A. (2017). Formulation and optimization of self nanoemulsifying drug delivery system of lercanidipine hydrochloride using response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bioscience*, 6(4), 162-176.
- Groves, M. J. And Galindez, D. A. (1976). The self-emulsifying action of mixed surfactants in oil. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 13(4), 361-372.
- Groves, M. J. and Mustafa, R. M. A. (1974). Measurement of the 'spontaneity' of self-emulsifiable oils. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 26(9), 671-681.
- Gómez, R., R. and Valencia, P., R., (2015). In vitro-in vivo Pharmacokinetic correlation model for quality assurance of antiretroviral drugs, *Colombia Medica*, 46(3), 109-116.

- Guine, J. F., Claire, L., Charman, W. N., Puton, C. W., Edwards, G. A. and Benameur, H. (2008). Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulation to dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 995-1012.
- Gurpreet K. and Singh S.K., (2018). Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5):781-789.
- Gursoy, N. and Benita, S. (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for oral improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(3), 173-82.
- Gursoy, N. Ve Çevik, Ö. (2011). Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Farmasötik Alanda Uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 151-170.
- Hazra, R., Balis, F. M., Tullio, A.N., DeCarlo, E., Worrell, C. J. and Steinberg, S. M. (2004). Single-dose and steadystate pharmacokinetics of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virusinfected children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 124-9.
- Hong, J. Y., Kim, J. K., Song, Y. K., Park, J. S. and Kim, C. K. (2006). A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *Journal of Controlled Release*, 110(2), 332-338.
- Hu, C., Wang, Q., Ma, C. and Xia, Q. (2016). Non-aqueous self-double-emulsifying drug delivery system: A new approach to enhance resveratrol solubility for effective transdermal deliver. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 489, 360-369.
- HyuckPark, J., ShikKim, D., Mustapha, O., Yousaf, A. M., SukKim, J., WukKim, D., Yong, C. S., SeokYoun, Y., TaekOh, K., Lim, S. J., OhKim, J. And Choi, H. O. (2018). Comparison of a revaprazan-loaded solid dispersion, solid SNEDDS and inclusion compound: Physicochemical characterisation and pharmacokinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 420-426.
- Hyun, S. A., Treadwell, C. R. and Vahouny, V. (1967). Portal absorption of fatty acids in lymph- and portal vein-cannulated rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 137(2), 296-305.
- Im-Emsap, W. and Siepmann, J. (2002). Disperse systems. G.S Banker, C.T Rhodes (Eds.), *Modern Pharmaceutics*. New York. Marcel Dekker Inc, pp. 237-285.
- Inugala, S., Eedara, B. B., Sunkavalli, S., Dhurke, R., Kandadi, P., Jukanti, R. and Bandari, S. (2015). Solid self-nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS) of darunavir for improved dissolution and oral bioavailability: In vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 1-10.

- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H. and Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 173-190.
- Ito, T., Tsuji, Y., Aramaki, K. and Tonooka, N. (2012). Two-step emulsification process for water-in-oil-in-water multiple emulsions stabilized by lamellar liquid crystals. *Journal of Oleo Science*, 61(8), 413-420.
- İnternet: FDA, Food and Drug Administration (2003), URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fdownloads%2Fscicenceresearch%2Ffieldscience%2Flaboratorymanual%2Fucm292774.pdf&date=2019-01-07>, Erişim Tarihi: 7 Ocak 2019
- İnternet: FDA, Food and Drug Administration (2007), URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.accessdata.fda.gov%2Fdrugsatfda_docs%2Flabel%2F2007%2F021356s021%2C021752s011lbl.pdf&date=2019-01-06, Erişim Tarihi: 6 Ocak 2019
- İnternet: FDA, Food and Drug Administration (2012), URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.accessdata.fda.gov%2Fdrugsatfda_docs%2Fnda%2F2012%2F022577Orig1s000ClinPharmR.pdf&date=2019-01-07, Erişim Tarihi: 7 Ocak 2019
- İnternet: EMEA, European Medicines Agency, URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ema.europa.eu%2Fdocuments%2Fscientific-guideline%2Fich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-2b-first-version_en.pdf&date=2019-01-25, Erişim tarihi: 25 Ocak 2019
- İnternet: Rxlist, The Internet Drug Index for prescription drug information, interactions, and side effects, URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.rxlist.com%2Fviread-drug.htm&date=2019-02-06>, Erişim tarihi: 6 Şubat 2019
- İnternet: Tenoviral. (2019). Highlights of Prescribing Information. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ilacrehberi.com%2Fv%2Ftenoviral-245-mg-30-film-kapli-tabletca22%2Fkub%2Ffarmakolojik-ozellikler%2F&date=2019-01-06>, Son Erişim Tarihi: 6 Ocak 2019
- İnternet: Whopar, WHO Public Assessment Reports, (2010). URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fextranet.who.int%2Fprequal%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Fdocuments%2FHA414part6v1.pdf+&date=2019-01-06>, Son Erişim Tarihi: 6 Ocak 2019
- Jantratid E. and Dressman J. (2009). Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update, *Dissolution Technologies*, 25(7),1663-76.

- Jenh, A. M. and Pham, P. A. (2010). Tenofovir disoproxil fumarate in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(10), 1079-1092.
- Jiang, J., Mei, Z., Xu, J. and Sun, D. (2013). Effect of inorganic electrolytes on the formation and stability of water-in-oil (W/O) emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 429, 82-90.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B. and Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, 23(1), 165-176.
- Kalepu, S., Manthina, M. and Padavala, V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems-an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(6), 361-372.
- Kamal, M. M. and Nazza, S. (2018). Development of a new class of sulforaphane-enabled self-emulsifying drug delivery systems (SFN-SEDDS) by high throughput screening: A case study with curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 539(1-2), 147-156.
- Kamboj, S., Saini, V. And Bala, S. (2014). Formulation and characterization of drug loaded nonionic surfactant vesicles (niosomes) for oral bioavailability enhancement. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal*, 2014, 741-959.
- Kamboj, S. and Rana, V. (2016). Quality-by-design based development of a self-microemulsifying drug delivery system to reduce food effect of Nelfinavir mesylate. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1-2), 311-325.
- Kang, B. K., Lee, J. S., Chon, S. K., Jeong, S. Y., Yuk, S. H., Khang, G., Lee, H. B. and Cho, S. H. (2004). Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274(1-2), 65-73.
- Kansara, H., Panola, R. and Mishra, A. (2015). Techniques used to enhance bioavailability of BCS Class II drugs: A review. *International Journal of Drug Development & Research*, 7(1), 82-93.
- Kassem, A. A., Mohsen, A. M., Ahmed, R. S. and Essam, M. T. (2016). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 218, 219-232.
- Kaukonen, A. M., Boyd, B. J., Charman, W. N. and Porter, C. J. H. (2004). Drug solubilization behaviour during in vitro digestion of suspension formulations of poorly water-soluble drugs in triglyceride lipids. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 254-60.

- Ke, Z., Hou, X. and Jia, X. (2016). Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems for improved bioavailability of cyclovirobuxine D. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 2049-2060.
- Kearney, B. P., Flaherty, J. F. and Shah, J. (2004). Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(9), 595-612.
- Khan, A. W., Kotta, S., Ansari, S. H., Sharma, R. K. and Ali, J. (2012). Potentials and challenges in self-nanoemulsifying drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(10), 1305-1317.
- Khoo, S. M., Humberstone, A. J., Porter, C. J. H., Edwards, G. A. and Charman W. N. (1998). Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *International Journal of Pharmaceutics*, 167(1-2), 155-164.
- Kim, H. J., Cho, J. Y. and Kim, Y. J. (2015). Long-term efficacy of tenofovir disoproxil fumarate therapy after multiple nucleoside analogue failure in chronic hepatitis B patients. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 30(1), 32-41.
- Kim, R. M., Jang, D. J., Kim, Y. J., Yoon, J. H., Min, K. A., Maeng, H. J. and Cho, K. H. (2018). Flurbiprofen-Loaded Solid SNEDDS Preconcentrate for the Enhanced Solubility, In-Vitro Dissolution and Bioavailability in Rats. *Pharmaceutics*, 10(4), E247.
- Kim, Y. J. and Ku, Y. S. (2000). Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self emulsifying system containing indomethacin to rats, *International Journal Pharmacy*, 194(1), 81-89.
- Kiser, J. J., Carten, M. L. and Aquilante, C. L. (2008). The effect of lopinavir/ritonavir on the renal clearance of tenofovir in HIV-infected patients. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 33(2), 265-72.
- Kleberg, K., Jacobsen, F., Fatouros, D.G. and Mullertz, A. (2010). Biorelevant media simulating fed state intestinal fluids: colloid phase characterization and impact on solubilization capacity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(8), 3522-3532.
- Kollipara, S. and Gandhi, R. K. (2014). Pharmacokinetic aspects and in vitro-in vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(5), 333-349.
- Kovarik, J. M., Mueller, E. A., van Bree, J. B., Tetzloff, W. and Kutz, K. (1994). Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(3), 444-446.

- Kulsirirat, T., Rukthong, P., Dechwongya, P. and Sathirakul, K. (2017). The Potential of Non-Ionic Surfactant Against P-Glycoprotein Efflux Transporters for Drug Development System. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 9(5), 528-529.
- Kurt, K., Dönbak, L. and Kayrayıldız, A. (2015). AIDS Tedavisinde Tenofovir Disoprosil Fumarat. *Archives Medical Review Journal*, 24(1), 119-134.
- Larsen, A., Holm, R., Pedersen, M. and Müllertz, A. (2008). Lipid based formulations for danazol containing a digestible surfactant, labrafil M2125CS:in vivo bioavailability and dynamic in vitro lipolysis. *Pharmaceutical Research*, 25 (12), 2769-2777.
- Larsen A.T., Sassene P. and Müllertz A. (2011). In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1-2), 245-55.
- Larsen, A. T., Ogbonna, A., Abu-Rmaileh, R., Abrahamsson, B., Ostergaard, J. and Müllertz, A. (2012). SNEDDS Containing Poorly Water Soluble Cinnarizine; Development and in Vitro Characterization of Dispersion, Digestion and Solubilization. *Pharmaceutics*, 4(4), 641-665.
- Laugel, C., Rafidison, P., Potard, G., Aguadisch, L. and Baillet, A. (2000). Modulated release of triterpenic compounds from a O/W/O multiple emulsion formulated with dimethicones: infrared spectrophotometric and differential calorimetric approaches. *Journal of Controlled Release*, 63(1-2), 7-17.
- Lawrence, M. J. and Rees, G. D. (2001). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1), 89-121.
- Leal-Calderon, F. and Bibette, J. (2007). Emulsification. *Emulsion Science, Basic Principles, Second Edition*, New York, Springer, pp. 5-51.
- Lee, D. H., Yeom, D. W., Song, Y. S., Cho, H. R., Choi, Y. S., Kang, M. J. and Choi, Y. W. (2014). Improved oral absorption of dutasteride via Soluplus1-based supersaturable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 341-347.
- Lee E., Smith D., Fanwick P., Byrn S. (2010). Characterization and anisotropic lattice expansion/contraction of polymorphs of tenofovir disoproxil fumarate. *Crystal Growth & Design*, 10(5), 2314-2322.
- Lu, Y., Kim, S., Park, K., (2011). In vitro-In vivo Correlation: Perspectives on Model Development. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1),142-148.
- Li, Q., Huang, W., Yang, J. , Wang, J. , Hu, M. , Mo, J., Cheng, J., Ou, Z. and Guan, S. (2018). Gastric retention pellets of edaravone with enhanced oral bioavailability: Absorption mechanism, development, and in vitro/in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(119), 62-69.

- Li, Y. and McClements, D. J. (2010). New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: Impact of Lipid droplet characteristics on in vitro digestibility'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8085-8092.
- Li, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., Wu, W., (2013). Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 23–32.
- Li, Z., Zhang, M., Liu, C., Zhou, S., Zhang, W., Wang, T., Zhou, M., Liu, X., Wang, Y., Sun, Y. and Sun, J. (2017). Development of Liposome containing sodium deoxycholate to enhance oral bioavailability of itraconazole. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 157-164.
- Ma, S. (in press). Engineering inverse opals with enclosed voids via Bottom-up assembly of double emulsions. *Chemical Engineering Science*, 9, 2509.
- MacGregor, K. J., Embleton, J. K., Lacy, J. E., Perry, E. A., Solomon, L. J., Seager, H. and Pouton, C. W. (1997). Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25, 33-46.
- MacLachlan J.H., Cowie B. C., (2015). Hepatitis B Virus Epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(5), a021410.
- Mahmoud, D. B., Shukr, M. H. and Bendas, E. R. (2014). In vitro and in vivo evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral and parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 476 (1-2), 60-9.
- Mallants, R., Van Oosterwyck, K. and Van Vaeck, L. (2005). Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) affects hepatobiliary elimination but not the intestinal disposition of tenofovir disoproxil fumarate and its metabolites. *Xenobiotica*, 35(10-11), 1055-1066.
- Matos, M., Gutiérrez, G., Martínez-Rey, L., Iglesias, O. and Pazos, C. and (2018). Encapsulation of resveratrol using food-grade concentrated double emulsions: Emulsion characterization and rheological behaviour. *Journal of Food Engineering*, 226, 73-81.
- Matsumoto, S., Inoue, T., Kohda, M. and Ikura, K. (1980). Water permeability of oil layers in W/O/W emulsions under osmotic pressure gradients. *Journal of Colloid and Interface Science*, 77(2), 555-563.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Riviere, M., Carriere, F., de Caro, A., Cambillau, C. and Verger, R. (2000). Digestive lipases: from three dimensional structure to physiology. *Biochimie*, 82(11), 973-986.

- Mohsin, K., Shabba, A. A. and Alanazi, F. K. (2012). Lipid based self-emulsifying formulations for poorly water soluble drugs- An excellent opportunity. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 46(2), 88-96.
- Moss, D. M., Domanico, P., Watkins, M., Park, S., Randolph, R., Wring, S., Rajoli, R. K. R., Hobson, J., Rannard, S., Siccardi, M. and Owen, A. (2017). Simulating Intestinal Transporter and Enzyme Activity in a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Tenofovir Disoproxil Fumarate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), 105-117.
- Mu, H., Holm, R. and Mullertz, A. (2013). Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 215-224.
- Mueller, E. A., Kovarik, J. M., Van Bree, J. B., Tetzloff, W. and Kutz, K. (1994). Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharmaceutical Research*, 11(2), 301-304.
- Mullertz, A., Ogbonna, A., Ren, S. and Rades, T. (2010). New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1622-1636.
- Murakami, E., Wang, T. and Park, Y. (2015). Implications of efficient hepatic delivery by tenofovir alafenamide (GS-7340) for Hepatitis B virus therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3563-3569.
- Müllertz, A., Ren, S., Ogbonna, A. and Rades, T. (2010). New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1622-1636.
- Naggadi, P. M., Patil, S. L. and Tiwari, S. S. (2012). Self-emulsifying drug delivery System (SEDDS) Review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2(2), 42-52.
- Nair, A. B. and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27-31.
- Nakhare, S. and Vyas, S. P. (1995). Prolonged release multiple emulsion based system bearing rifampicin: In vitro characterisation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21(7), 869-878.
- Nekkanti, V. and Sandeep, K. (2012). Development of novel lipid based drug delivery system for raloxifene hydrochloride. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(9), 166-173.
- Nicolaos, G., Crauste-Manciet, S., Farinotti, R. and Brossard, D. (2003). Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion. *International Journal of Pharmacy*, 263(1-2), 165-171.

- Nielsen, F. S., Petersen, K. B. and Müllertz, A. (2008). Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: influence of droplet size and dietary state. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 553-562.
- Okochi, H. and Nakano, M. (1996). Basic studies on formulation, method of preparation and characterization of water-in-oil-water type multiple emulsions containing vancomycin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44(1), 181-186.
- Onah, J. and Ajima, U. (2011). Quantitative Analysis of Tenofovir by Titrimetric, Extractive Ion pair Spectrophotometric and Charge-Transfer Complexation Methods. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 89-96.
- Özer, Ö. and Özyapıcı M. (2007). W/O/W multiple emulsions containing nitroimidazole derivatives for vaginal delivery. *Drug Delivery*, 14(3), 139-145.
- Palacín, P., Melendo, S., Noguera-Julian, A., Fortuny, C., Navarro, M. L., Mellado, M. J., Garcia, L., Uriona, S., Martín-Nalda, A. and Figueras, C. (2001). Prospective study of renal function in HIV-infected pediatric patients receiving tenofovir-containing HAART regimens. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 25(2), 171-176.
- Panigrahi, K. C., Goutam, J. J., KumarJena, C. NiranjanaPatra, M. E. and Rao B. (2018). QBD-based systematic development of Bosentan SNEDDS: Formulation, characterization and pharmacokinetic assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 31-42.
- Parmar, K., Patel, J. and Sheth, N. (2015). Self nano-emulsifying drug delivery system for Embelin: Design, characterization and *in-vitro* studies. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(5), 396-404.
- Patel, J., Dhingani, A., Garala, K., Raval, M. and Sheth, N. (2014). Quality by design approach for oral bioavailability enhancement of irbesartan by self-nanoemulsifying tablets. *Drug Delivery*, 21(6), 412-435.
- Patil, S., Kadam, C. and Pokharkar, V. (2017). QbD based approach for optimization of Tenofovir disoproxil fumarate loaded liquid crystal precursor with improved permeability. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 607-616.
- Patton, J. S. and Carey, M. C. (1979). Watching fat digestion. *Science*, 204(4389), 145-148.
- Patton, J. S. and Carey, M. C. (1981). Inhibition of human pancreatic lipase-colipase activity by mixed bile salt-phospholipid micelles. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 241(4), 328-336.

- Persson, E. M., Gustafsson, A. S., Carlsson, A. S., Nilsson, R. G., Knutson, L., Forsell, P., Hanisch, G., Lennernas, H. and Abrahamsson, B. (2005). The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharmaceutical Research*, 22(12), 2141-2151.
- Persson, E. M., Nilsson, R. G., Hansson, G. I., Lofgren, L. J., Liback, F., Knutson, L., Abrahamsson, B. and Lennernas, H. (2006). A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory response to a dietary meal in human proximal small intestine. *Pharmaceutical Research*, 23(4), 742-751.
- Peterson, L., Taylor, D., Roddy, R., Belai, G., Phillips, P., Nanda, K., Grant, R., Clarke, E.E.K., Doh, A.S., Ridzon, R., Jaffe H.S., Cates, W., (2007). Tenofovir Disoproxil Fumarate for Prevention of HIV Infection in Women: A Phase 2, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Public Library of Science Clinical Trial*, 2(5), 1-9.
- Pokharkar, V. B., Jolly, M. R. and Kumbhar, D. D. (2015). Engineering of a hybrid polymer–lipid nanocarrier for the nasal delivery of tenofovir disoproxil fumarate: Physicochemical, molecular, microstructural, and stability evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71, 99-111.
- Porter, C. J. H. and Charman, W. N. (2001). Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 61-80.
- Porter, C. J., Kaukonen, A. M., Boyd, B. J., Edwards, G. A. and Charman, W. N. (2004). Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium chain lipid-based microemulsion formulation. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1405-1412.
- Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F. and Charman, W. N. (2008 (b)). Enhancing intestinal drug solubilization using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 673-691.
- Porter, C. J. H., Trevaskis, N. L. and Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(3), 231-48.
- Pouton, C. W. (1985). Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 27(2,3), 335-348.
- Pouton, C. W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, selfemulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 93-98.
- Pouton, C. W. (2007). Properties and uses of common formulation lipids, surfactants and cosolvents. Victorian College of Pharmacy, Monash University, Melbourne: *American Association Pharmaceutical Scientists Workshop*, ABD.

- Pouton, C. W. and Porter, C. J. H. (2008(a)). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, method and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 625-637.
- Prathipati, P. K., Mandal, S. and Destache, C. J. (2016). Simultaneous quantification of tenofovir, emtricitabine, rilpivirine, elvitegravir and dolutegravir in mouse biological matrices by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 473-481.
- Pund, S., Shete, Y., Jagadale, S. (2014). Multivariate analysis of physicochemical characteristics of lipid based nanoemulsifying cilostazol-quality by Design. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 29-36.
- Qi, X., Wang, L., Zhu, J., Hu, Z. and Zhang, J. (2011). Self-double-emulsifying drug delivery system (SDEDDS): A new way for oral delivery of drugs with high solubility and low permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1-2), 245-251.
- Qiao, J., Ji, D., Sun, S., Zhang, G., Liu, X., Sun, B. and Guan, Q. (2018). Oral Bioavailability and Lymphatic Transport of Pueraria Flavone-Loaded Self-Emulsifying Drug-Delivery Systems Containing Sodium Taurocholate in Rats. *Pharmaceutics*, 10(3), 147-160.
- Rambharose, S., Kalhapure, R. S. and Govender, T. (2017). Nanoemulgel using a bicephalous heterolipid as a novel approach to enhance transdermal permeation of tenofovir. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 154, 221-227.
- Rao, R. S. V., Yajurvedi, R. K. and Shao, J. (2008). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs: III. *In vivo* oral absorption study. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1-2), 16-19.
- Rehman, F. U., Shah, K. U., Shah, S. U., Khan, I. U., Khan, G. M. and Khan, A. (2017). From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(11), 1325-1340.
- Reymond, J. P. and Sucker, H. (1988). In vitro model for ciclosporin intestinal-absorption in lipid vehicles. *Pharmaceutical Research*, 5(10), 673-676.
- Rieger, M.M. (1986). Emulsions. L. Lachman, H. Lieberman and J. Kanig (Eds.), *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Third edition, Philadelphia, Lea and Febiger, pp. 502-553
- Rompay, K. K. A. V., Babusis, D., Abbott, Z., Geng, Y., Jayashankar, K., Johnson, J. A., Lipscomb, J., Abel, J. K. and Ray, A. S. (2012). Compared to Subcutaneous Tenofovir, Oral Tenofovir Disoproxyl Fumarate Administration Preferentially Concentrates the Drug into Gut-Associated Lymphoid Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4980-4984.

- Shirkhedkar A. A., Bhirud C. H. and Sanjay S. J. (2009). Application of UV-spectrophotometric methods for estimation of tenofovir disoproxil fumarate in tablets. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 27-9.
- Safwat, S. M., Kasem, M. A., Attia, M. A., Mahdy, M. E. (1994). The formulation performance relationship of multiple emulsions and ocular activity. *Journal of Controlled Release*, 32(3), 259-268.
- Sakai, K., Maeda, H., Yoshimori, T., Obata, K. and Ogawa, Y. (2009). High-throughput formulation screening system for self-microemulsifying drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(6), 746-755.
- Salem, H. F., Kharshoum, R. M., Sayed, O. M. and Abdel Hakim, L. F (2018). Formulation design and optimization of novel soft glycerosomes for enhanced topical delivery of celecoxib and cupferron by Box-Behnken statistical design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(11), 1871-1884.
- Sassene, P., Kleberg, K., Williams, H. D., Bakala-N'Goma, J. C., Carrière, F., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Porter, C. J., Pouton, C. W. and Müllertz, A. (2014). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 6: effects of varying pancreatin and calcium levels. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 16(6), 1344-1357.
- Sassene, P. J., Knopp, M. M., Hesselkilde, J. Z., Koradia, V., Larsen, A., Rades, T. and Müllertz, A. (2010). Precipitation of a poorly soluble model drug during in vitro lipolysis: characterization and dissolution of the precipitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12), 4982-4991.
- Sek, L., Porter, C. J. H. and Charman, W. N. (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3-4), 651-661.
- Senapati, P. C., Sunit, K., Sahoo, A. and Sahu, N. (2016). Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz for enhancement of oral bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 80, 42-51.
- Seo, Y. G., Kim, D. W., Cho, K. H., Yousaf, A. M., Kim, D. S., Kim, J. H., Kim, J. O., Yong, C. S. and Choi, H. G. (2015). Preparation and pharmaceutical evaluation of new tacrolimus loaded solid self-emulsifying drug delivery System. *Archives of Pharmacal Research*, 38(2), 223-228.
- Shailender, J., Ravi, P. R., Saha, P. and Myneni, S. (2017(a)). Oral pharmacokinetic interaction of ester rich fruit juices and pharmaceutical excipients with tenofovir disoproxil fumarate in male Wistar rats. *Xenobiotica*, 47(12), 1104-1111.

- Shailender, J., Ravi, P. R., Saha, P., Dalvi, A. and Myneni, S. (2017(b)). Tenofovir disoproxil fumarate loaded PLGA nanoparticles for enhanced oral absorption: Effect of experimental variables and in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 610-619.
- Shailender, J., Ravi, P. R., Reddy, S. M., Dalvi, A. and Keerthi, P. O. (2018). Chitosan nanoparticles for the oral delivery of tenofovir disoproxil fumarate: formulation optimization, characterization and ex vivo and in vivo evaluation for uptake mechanism in rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(7), 1109-1119.
- Sharma R. ve Mehta K. (2010). Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Lamivudine in Three Component Tablet Formulation Containing Efavirenz. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(4), 527–530.
- Siqueira, S. D. V. S., Müllertz, A., Gräeser, K., Kasten, G., Mu, H. and Rades, T. (2017). Influence of drug load and physical form of cinnarizine in new SNEDDS dosing regimens: in vivo and in vitro evaluations. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 19(2), 587-594.
- Siqueira J.S.D., Al Sawaf M., Graeser K., Mu H., Müllertz A., Rades T. (2018). The ability of two in vitro lipolysis models reflecting the human and rat gastrointestinal conditions to predict the in vivo performance of SNEDDS dosing regimens, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 124, 116-124.
- Sjögren, E., Abrahamsson, B., Augustijns, P., Becker, D., Bolger, M. B., Brewster, M., Brouwers, J., Flanagan, T., Harwood, M., Heinen, C., Holm, R., Juretschke, H. P., Kubbinga, M., Lindahlm, A., Lukacova, V., Münster, U., Neuhoff, S., Nguyen, M. A., Peer, A., Reppas, C., Hodjegan, A. R., Tannergren, C., Weitschies, W., Wilson, C., Zane, P., Lennernäs, H. and Langguth, P. (2014). In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 99-151.
- SM, K., Humberstone, A. J., Porter, C. J. H., Edwards, G. A. and Charman, W. N. (1998). Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *International Journal of Pharmaceutics*, 167(1-2), 155-164.
- Shukla, J. B., Koli A. R., Ranch K. M., Parikh R. K., (2010). Self Micro Emulsifying Drug Delivery System, *Pharma Science Monitor an International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 0976-7908.
- Soytürk, E. B. ve Tarımcı, N. (2000). Çoklu Emülsiyonlar ve Kozmetiklerde Kullanımı. *FABAD Journal of Pharmacy Science*, 25, 11-20.

- Spinks, C. B., Zidan, A. S., Khan, M. A., Habib, M. J. and Faustino, P. J. (2017). Pharmaceutical characterization of novel tenofovir liposomal formulations for enhanced oral drug delivery: in vitro pharmaceutics and Caco-2 permeability investigations. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 9, 29-38.
- Syukri, Y., Martien, R., Lukitaningsih, E. and Nugroho, A. E. (2018). Novel Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* Nees: Characterization, in-vitro and in-vivo assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 514-520.
- Tayrouz, Y., Ding, R., Burhenne, J., Riedel, K. D., Weiss, J., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W. E. and Mikus, G. (2003). Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH 40. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 73(5), 397-405.
- Thanki, K., Gangwal, R. P., Sangamwar, A. T. and Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 170(1), 15-40.
- Thomas, N., Holm, R., Rades, T. and Mullertz, A. (2012). Characterising lipid lipolysis and its implication in lipid-based formulation development. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 14(4), 860-871.
- Thomas, N., Richter, K., Pedersen, T. B., Holm, R., Müllertz, A. and Rades, T. (2014). In vitro lipolysis data not adequately predict the in vivo performance of lipid –based drug delivery systems containing fenofibrate. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 16(3), 539-549.
- Tirnaksız, F. and Kalsın, O. (2005). A topical w/o/w multiple emulsions prepared with Tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: Formulation, characterization and release study. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 299-331.
- Tran, T., Rades, T. and Müllertz, A. (2017). Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine and Kolliphor® RH 40 using experimental design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(6), 536-545.
- Tung, N. T., Tran, C. S., Nguyen, H. A., Nguyen, T. D., CheolChi, S., Pham, D. V., Bui, Q. D. and Ho, X. H. (2018). Formulation and biopharmaceutical evaluation of supersaturatable self nanoemulsifying drug delivery systems containing silymarin. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 63-76.
- Ursica, L. D., Tita, B. and Vlaia, V. (2005). Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(5), 931-936.
- USP30/NF21, 2003. United States Pharmacopeial Convention Inc. Rockville, MD.

- Valli, P. B., Santha, K. M., Ramu, G., Vijaya, B. R. T. and Ramachandran, D. (2016). Stability indicating UV-Spectrophotometric method for simultaneous determination of emtricitabine and tenofovir desoproxil fumarate in Truvada. *Der Pharmacia Lettre*, 8(17), 185-195.
- Van Gelder, J., Deferme, S., Naesens, L., De Clercq, E., van den Mooter, G., Kinget, R. and Augustijns, P. (2002). Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(8), 924-930.
- Van Gelder, J., Shafiee, M. and De Clercq, E. (2000). Species-dependent and site-specific intestinal metabolism of ester prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 205(1-2), 93-100.
- Varga, A., Grácz, E., Chaloin, L., Liliom, K., Závorszky, P., Lionne, C. and Vas, M. (2013). Selectivity of kinases on the activation of tenofovir, an anti-HIV agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1-2), 307-315.
- Vasiljevic, D. D., Parojcic, J. V., Primorac, M. M. and Vuleta, G. M. (2009). Rheological and droplet size analysis of W/O/W multiple emulsions containing low concentrations of polymeric emulsifiers. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(7), 801-816.
- Vatsraj, S., Chauhan, K. and Pathak, H. (2014). Formulation of a Novel Nanoemulsion System for Enhanced Solubility of a Sparingly Water Soluble Antibiotic, Clarithromycin. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanoscience*, 2014, 1-7.
- Wakerly, M. G., Pouton, C. W., Meakin, B. J. and Morton, F. S. (1986). Self-emulsification of vegetable oil-nonionic surfactant mixtures—a proposed mechanism of action. *American Chemical Society Symposium Series*, 311, 242-255.
- Wang, X., Jiang, S., Wang, X., Liao, J. and Yin, Z. (2015). Preparation and evaluation of nattoxinase-loaded self-double-emulsifying drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(5), 386-395.
- Wang, Y. H., Wang, S. H., Yang, R. P. and Ma, X. J. (2010). Design, optimization and quality evaluation of curcumin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 33(12), 1933-1937.
- Watkins, M. E., Wring, S., Randolph, R., Park, S., Powell, K., Lutz, L. and Domanico, P. L. (2017). Development of a Novel Formulation That Improves Preclinical Bioavailability of Tenofovir Disoproxil Fumarate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(3), 906-919.

- Weerapol, Y., Limmatvapirat, S., Kumpugdee, V. M. and Sriamornsak, P. (2014). Spontaneous Emulsification of Nifedipine-Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal Pharmacy Sciences Technology*, 16(2), 435-443.
- Wei, L., Sun, P., Nie, S. and Pan, W. (2005). Preparation and evaluation of SEDDS and SMEDDS containing carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8), 785-794.
- Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-NG, J. C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Carrière, F., Müllertz, A., Porter, C. J. and Pouton, C. W. (2012(a)). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(9), 3360-3380.
- Williams, H. D., Anby, M. U., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-NG, J. C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Carrière, F., Müllertz, A., Pouton, C. W. and Porter, C. J. (2012(b)). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during in vitro digestion. *Molecular Pharmaceutics*, 9(11), 3286-3300.
- Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Calderone, M., Igonin, A., Jule, E., Vertommen, J., Blundell, R., Benameur, H., Müllertz, A., Pouton, C. W. and Porter, C. J. (2013). LFCS Consortium Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid based formulations, part 3: understanding supersaturation versus precipitation potential during the in vitro digestion of type I, II, IIIA, IIIB and IV lipid based formulations. *Pharmaceutical Research*, 30(12), 3059-3076.
- Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Calderone, M., Igonin, A., Jule, E., Vertommen, J., Blundell, R., Benameur, H., Müllertz, A., Porter, C. J. and Pouton, C. W. (2014). Communicated on Behalf of the LFCS Consortium Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 4: proposing a new lipid formulation performance classification system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(8), 2441-2455.
- Yener, G., Dal, Ö. and Üner, M. (2009). Effect of vehicles on release of meloxicam from various topical formulations. *The Open Drug Delivery Journal*, 3(5), 19-23.
- Yılmaz, M. (2017). *Jwh-122 ve Jwh-122 N-(4-Hidroksipentil) metabolitinin LC-MS/MS ile kanda tayini*, Yüksek lisans tez, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, Tekirdağ, 1-40.

- Yoshigae, Y., Imai, T. and Horita, A. (1998). Species differences in stereoselective hydrolase activity in intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*, 15(4), 626-631.
- Yuan, L. C., Dahl, T. C. and Oliyai, R. (2001). Degradation kinetics of oxycarbonyloxymethyl prodrugs of phosphonates in solution. *Pharmaceutical Research*, 18(2), 234-237.
- Zampino R., Boemio A., Sagnelli C., Alessio L., Adinolfi L.E., Sagnelli E. and Coppola N., (2015). "Hepatitis B virus burden in developing countries". *World Journal Gastroenterology*, 21(42),11941-11953.
- Zangenberg, N. H., Mullertz, A., Kristensen, H. G. and Hovgaard, L. (2001(a)). A dynamic in vitro lipolysis model I. controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 115-122.
- Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Gjelstrup, K. H. and Hovgaard, L. (2001(b)). A dynamic in vitro lipolysis model: II: evaluation of the model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 237-244.
- Zhang, J., Li, J., Ju, Y., Fu, Y., Gong, T. and Zhang, Z. (2015). Mechanism of enhanced oral absorption of morin by phospholipid complex based self-nanoemulsifying drug delivery system. *Molecular Pharmaceutics*, 12(2), 504-513.
- Zhu, J. and Zhang, J. (2011). Self-double-emulsifying drug delivery system (SDEDDS): A new way for oral delivery of drugs with high solubility and low permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1-2), 245-251.
- Zidan A.S., Spinks C., Fortunak J., Habib M. and Khan M.A., (2010). Near-Infrared Investigations of Novel Anti-HIV Tenofovir Liposomes. *The American Association Pharmaceutical Scientists Journal*, 12(2), 202-214.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/03/2015-27705



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zeynep ŞAFAK TEKSİN ve Derya BEKTAŞ'tan oluşan, G.Ü.ET-15.010 kod numaralı ve "Telaprevir İçeren Lipid Kaynaklı Kendiliğinden Nano Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro -İn Vivo Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.010 and entitled "*Development and In Vitro-In Vivo Evaluation of Lipid-Base Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Telaprevir*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
E-Posta :hadyek@gazi.edu.tr Web Adresi :http://dhek.gazi.edu.tr/

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

EK-2. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 02/08/2018-E.109319



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 05/03/2015 tarih ve 27705 sayılı yazımız ile onay alan araştırmacı grubu Zeynep Şafak TEKSİN, Derya BEKTAŞ'tan oluşan G.Ü.ET-15.010 kod numaralı "*Telaprevir İçeren Lipid Kaynaklı Kendiliğinden Nano Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi*" başlıklı çalışmanız ile ilgili alınan 02/07/2018 tarihli dilekçe konusu Başkanlığımız tarafından incelenmiş olup,

Daha önce 84 sıçana telaprevir uygulanarak kan örneklerinin alınması şeklinde planlanan çalışmamızın, 70 sıçana aynı şekilde uygulama yapılması ve 14 sıçanda da aynı çalışma kapsamında barsak ve derilerinin çıkarılmasıyla sadece tenofovir geçişi için kör çalışma yapılması ile ilgili talebinizin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste



Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

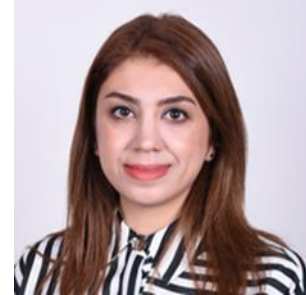
Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BEKTAŞ, Derya
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 19/07/1988 Kırıkkale
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0(312) 282 83 12
 e-posta : deryabektas11@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/Farmasötik Teknoloji A.B.D.	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Kırıkkale Anadolu Öğretmen Lisesi	2006

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2014- devam ediyor	Derya Bektaş Eczanesi	Sahibi ve mesul müdürü

Yabancı Dili

İngilizce

Uluslararası Sempozyum, Kongre veya Konferans Bildirileri

1. Yaşın Sarısaltık D, Bektaş D, Uslu A, Ökçelik C, Temel H, Teksin ZŞ "Evaluation Of In Vitro Dissolution Characteristics Of Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs In The Turkish Drug Market-2:Ibuprofen, A BCS Class IIa Drug", International Gazi Pharma Symposium Series, Antalya, Turkey, November 12-15, 2015.
2. Derya BEKTAŞ, Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ, Zeynep Şafak TEKSİN, "Development of Validated UV Spectrophotometric Assay of Tenofovir", 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS), 11-13 November 2017, Ankara, Turkey
3. Derya BEKTAŞ, Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ, Zeynep Şafak TEKSİN, "Development and In Vitro Evaluation of Lipid-Base Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Tenofovir", 11th World Meeting on Pharmaceutics,

Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (PBP), 19-22 March 2018, Granada, Spain.

4. Derya BEKTAŞ, Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ, Zeynep Şafak TEKSİN, “The Gastrointestinal Lipolysis Model For Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Tenofovir”, 25th Annual Meeting on European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) 24-26 May 2018, Athens, Greece.
5. Derya BEKTAŞ, Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ, Zeynep Şafak TEKSİN, “Preparation and Characterization of W/O/W Double Emulsion containing Tenofovir”, 12th Annual Meeting on International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 June 2018, Ankara, Turkey.

Hobiler

Fotoğraf çekmek, Spor yapmak , Kitap okumak, Seyahat etmek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

