

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**TOPIKAL FARMAKOKİNETİK ve BİYOEŞDEĞERLİK ÇALIŞMALARINDA
BANTLA SOYMA ve MİKRODİYALİZ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuba İNCEÇAYIR

Tez Danışmanı
Prof.Dr.İlbeyi AĞABEYOĞLU

ANKARA
Temmuz 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**TOPIKAL FARMAKOKİNETİK ve BİYOEŞDEĞERLİK ÇALIŞMALARINDA
BANTLA SOYMA ve MİKRODİYALİZ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuba İNCEÇAYIR

Tez Danışmanı

Prof.Dr.İlbeyi AĞABEYOĞLU

Bu tez TÜBİTAK tarafından 107S177 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Temmuz 2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	XI
Resimler	XV
Tablolar	XV
Kısaltmalar	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikrodiyaliz	3
2.1.1. Mikrodiyalizin Prensibi	4
2.1.2. Mikrodiyaliz Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları	6
2.1.2.1. Avantajları	6
2.1.2.2. Dezavantajları	7
2.1.3. Mikrodiyaliz Yönteminin Genel Özellikleri	8
2.1.3.1. Mikrodiyaliz Proplarının Özellikleri	8
2.1.3.2. Mikrodiyaliz Yönteminde Prop İmplantasyonu ve Doku Hasarı	9
2.1.3.3. Analiz Yaklaşımları	10
2.1.4. Mikrodiyaliz Proplarının Kalibrasyonu	11
2.1.5. Gerielde ve Gerieldeye Etki Eden Etkenler	11
2.1.6. Mikrodiyaliz Proplarının Kalibrasyon Yöntemleri	15
2.1.6.1. Akış Debisi Değişimi Yöntemi	15
2.1.6.2. Denge Yöntemi (No-net-flux Yöntemi) (Zero-net flux Yöntemi)	15
2.1.6.3. Retrodiyaliz	16
2.1.6.4. Endojen Referans Bileşiği Yöntemi	17
2.1.6.5. Diğer Kalibrasyon Yöntemleri	18
2.2. Dermal (Kütan) Mikrodiyaliz	18
2.2.1. Dermal Mikrodiyaliz Yöntemi ile İnsanlarda Yapılan Çalışmalar	20
2.2.2. Dermal Mikrodiyaliz Yöntemi ile Biyoeşdeğerlik/Biyoyararlanım	

Çalışmaları	22
2.3. Deri	22
2.3.1. Derinin Yapısı	22
2.3.2. Epidermis	24
2.3.3. Epidermiste Yer Alan Diğer Hücreler	26
2.3.3.1. Melanositler	26
2.3.3.2. Langerhans Adacıkları	26
2.3.3.3. Merkel Hücreleri	26
2.3.4. Dermis	26
2.3.5. Subkütan Doku	27
2.3.6. Yağ Bezleri	27
2.3.7. Ter Bezleri	27
2.3.8. Kıllar	28
2.3.9. Tırnaklar	28
2.3.10. Derinin Damar ve Sinirleri	28
2.4. Perkütan Emilim	29
2.5. Bant ile Soyma (Tape Stripping)	31
2.5.1. Bant ile Soyma Yönteminin Prensibi	31
2.5.2. Bant ile Soyma Yönteminin Özellikleri ve Basamakları	32
2.5.2.1. Uygulama Bölgesi	32
2.5.2.2. Bantın Cinsi	32
2.5.2.3. Bantın Uygulanışı	32
2.5.3. Stratum Korneum Miktarının Saptanma Yöntemleri	32
2.5.3.1. Tartma Yöntemi	33
2.5.3.2. Protein İçeriğinin Saptanması Yöntemi	33
2.5.3.3. Optik Spektroskopi Yöntemi	33
2.5.3.4. Mikroskop Yöntemi	33
2.5.3.5. Transepidermal Su Kaybının (TEWL) Ölçülmesi	34
2.5.4. İn Vivo İnsan Çalışmalarında Bant ile Soyma Yönteminin Kullanılması	34
2.6. Oksitetrasiklin	35

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri	35
2.6.2. Oksitetrasiklinin Miktar Tayin Yöntemleri	36
2.6.3. Farmakolojik Özellikleri	36
2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri	38
2.6.5. Yan Etkiler	39
2.7. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhemi	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. GEREÇ	40
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	40
3.2. YÖNTEM	42
3.2.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR	42
3.2.1.1.Oksitetrasiklin Hidroklorürün UV Spektrumu	42
3.2.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilitesi	42
3.2.1.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler	43
3.2.1.3.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini	43
3.2.1.3.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi	44
3.2.1.3.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi	44
3.2.1.3.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi	44
3.2.1.3.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi	44
3.2.1.4. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi	45
3.2.1.4.1. Kullanılan Yöntem	45
3.2.1.5. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin	

Validasyonu	46
3.2.1.5.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	46
3.2.1.5.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	46
3.2.1.5.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	46
3.2.1.5.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	47
3.2.1.5.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	47
3.2.1.6. İn Vitro Mikrodiyaliz Deneyleri	47
3.2.1.6.1. İn Vitro Gerielde Deneyleri	48
3.2.1.6.1.1. İn Vitro Gerielde Üzerine Akış Debisinin Etkisi	49
3.2.1.6.1.2. İn Vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi	50
3.2.1.6.2. İn Vitro % Kayıp Deneyleri	51
3.2.1.7. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Merhemden Mikrodiyaliz Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi	52
3.2.1.8. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini	55
3.2.1.8.1. Kullanılan Yöntem	55
3.2.1.8.2. MS Akordu (Tuning)	55
3.2.1.8.3. MS En İyileştirilmesi (Optimizasyonu)	56
3.2.1.9. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu	57
3.2.1.9.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	57
3.2.1.9.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	57
3.2.1.9.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	57
3.2.1.9.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	57
3.2.1.9.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	57
3.2.1.10. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi	58
3.2.1.10.1. Kullanılan Yöntem	58
3.2.1.11. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu	58

3.2.1.11.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	58
3.2.1.11.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	59
3.2.1.11.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	59
3.2.1.11.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	59
3.2.1.11.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	59
3.2.1.12. İstatistiksel Analiz	59
3.2.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR	60
3.2.2.1. Mikrodiyaliz Çalışması	60
3.2.2.1.1. Çalışma İçin Etik Kurul İzni	60
3.2.2.1.2. Çalışma Protokollerinin Tasarımı	60
3.2.2.1.3. Deneklere Ait Bilgiler	60
3.2.2.1.4. Deneyin Yapılışı	61
3.2.2.1.5. Mikrodiyaliz Örneklerinin Analizi	63
3.2.2.1.6. Verilerin Değerlendirilmesi	63
3.2.2.1.7. Mikrodiyaliz için İn Vivo Gerieldenin Saptanması	65
3.2.2.1.8. Yüzeysel Doku Ultrasonografisi ile Mikrodiyaliz Membranının Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi	66
3.2.2.2. Bant ile Soyma (Tape-stripping) Çalışması	66
3.2.2.2.1. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi Deneyi	66
3.2.2.2.2. Bant ile Soyma Deneyinin Yapılışı	67
3.2.2.2.3. Bant ile Soyma Örneklerinin Analizi	70
3.2.2.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi	70
4. BULGULAR	71
4.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR	71
4.1.1. Oksitetrasiklin Hidroklorürün UV Spektrumu	71
4.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilesi	71
4.1.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler	73
4.1.3.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini	73

4.1.3.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi	74
4.1.3.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi	75
4.1.3.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi	75
4.1.3.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi	75
4.1.4. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi	77
4.1.5. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu	78
4.1.5.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	78
4.1.5.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	80
4.1.5.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	81
4.1.5.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	82
4.1.5.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	84
4.1.6. İn Vitro Gerielde Deneyleri	84
4.1.6.1. İn Vitro Gerielde Üzerine Akış Devisinin Etkisi	84
4.1.6.2. İn Vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi	86
4.1.7. İn Vitro % Kayıp Deneyleri	89
4.1.8. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Merhemden Mikrodializ Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi	91
4.1.9. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini	94
4.1.10. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu	96
4.1.10.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	96
4.1.10.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	97
4.1.10.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	98

4.1.10.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	99
4.1.10.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	101
4.1.11. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi	101
4.1.12. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu	102
4.1.12.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı	102
4.1.12.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde	103
4.1.12.3. Analitik Yöntemin Kesinliği	104
4.1.12.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği	105
4.1.12.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı	106
4.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR	106
4.2.1. Dermal Mikrodiyaliz Çalışması	106
4.2.2. Mikrodiyaliz için İn Vivo Gerieldenin Saptanması	114
4.2.3. Yüzeyel Doku Ultrasonografisi ile Mikrodiyaliz Membranının Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi	115
4.2.4. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi Deneyi	116
4.2.5. Bant ile Soyma (Tape-stripping) Çalışması	117
5. TARTIŞMA	124
5.1. İn Vitro Çalışmaların Değerlendirilmesi	124
5.1.1. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilitésinin Değerlendirilmesi	124
5.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler	124
5.1.2.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini	124
5.1.2.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi	124
5.1.2.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi	124

5.1.2.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi	125
5.1.2.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi	125
5.1.3. İn Vitro Mikrodiyaliz Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi ve Validasyonu	126
5.1.4. İn Vitro Gerielde ve % Kayıp Deneyleri	127
5.1.4.1. İn Vitro Gerielde Üzerine Akış Debisinin Etkisi	127
5.1.4.2. İn Vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi	128
5.1.4.3. İn Vitro % Kayıp Deneyleri	128
5.1.5. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merheminden Mikrodiyaliz Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi	129
5.1.6. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	130
5.1.7. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi ve Validasyonu	131
5.2. İn Vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi	132
5.2.1. Mikrodiyaliz Çalışması	132
5.2.2. Mikrodiyalizde Modelleme	136
5.2.2.1. Merhemden Deriye Geçiş	136
5.2.2.2. Mikrodiyaliz Deneyi Modellemesi	136
5.2.2.3. Mikrodiyaliz ile Çıkışın Modellenmesi	140
5.2.3. Mikrodiyaliz için İn Vivo Gerieldenin Saptanması	143
5.2.4. Yüzeyel Ultrasonografi ile Mikrodiyaliz Membranın Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi	144
5.2.5. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi	144
5.2.6. Bant ile Soyma Çalışması	144
6. SONUÇ	154

7. ÖZET	157
8. SUMMARY	159
9. KAYNAKLAR	161
10. EKLER	183
11. TEŞEKKÜR	201
12. ÖZGEÇMİŞ	202

ŞEKİLLER

Şekil 1. Mikrodiyaliz prosesinin şematik prensibi. A: bileşik, P-A: proteine bağlı bileşik	5
Şekil 2. Mikrodiyaliz problemleri (a) Beyine implantasyon için kullanılan iğne şeklinde kanül prob (b) Deri, kas veya karaciğer gibi periferel dokular için tasarlanmış lineer prob (c) Sıçanda safra kanalından örnek almak için kullanılan büyük bir boru içerisine yerleştirilmiş lineer prob: shunt (bypass) prob	8
Şekil 3. Dermal mikrodiyalizin prensibi	20
Şekil 4. Derinin yapısı	23
Şekil 5. Epiderminin yapısı	24
Şekil 6. Deriden penetrasyon yolları	30
Şekil 7. Oksitetrasiklinin kimyasal yapısı	35
Şekil 8. Yatay difüzyon hücresi	45
Şekil 9. CMA 66 Lineer mikrodiyaliz katateri ve introducer iğne	48
Şekil 10. İn vitro gerielde üzerine akış debisinin etkisi deneyi	50
Şekil 11. İn vitro % kayıp deney düzeneği	52
Şekil 12. Mikrodiyaliz katater membranında merhemden oksitetrasiklin HCl'ün in vitro difüzyon deneyi	54
Şekil 13. Bant ile soyma (Tape-stripping) yönteminin şematik uygulaması	68
Şekil 14. Oksitetrasiklin HCl'ün bidistile sudaki (24 µg/mL) UV spektrumu	71
Şekil 15. Oksitetrasiklin HCl'ün merhem formülasyonlarının akış reogramı	74
Şekil 16. Oksitetrasiklin HCl'ün merhem formülasyonlarından salım profili (n=4)	76
Şekil 17. Oksitetrasiklin HCl'ün merhem formülasyonlarından salım profili (n=4)	76
Şekil 18. Oksitetrasiklin HCl'ün (0.250 µg/mL) HPLC kromatogramı	78

Şekil 19. Oksitetrasiklin HCl'ün HPLC kalibrasyon grafiği	80
Şekil 20. Polimiksin B sülfatın bidistile sudaki (300 µg/mL) UV spektrumu	82
Şekil 21. Polimiksin B sülfatın metanoldeki (100 µg/mL) UV spektrumu	83
Şekil 22. Özgünlüğe ilişkin kromatogram: 1. Boş serum fizyolojik kromatogramı 2. Polimiksin B sülfat (300 µg/mL) enjeksiyonuna ait kromatogram	83
Şekil 23. 1, 2 ve 5 µL/dak olmak üzere üç farklı akış debisine ait zamana karşı in vitro gerielde	85
Şekil 24. Akış debisine karşı % gerielde grafiği	85
Şekil 25. 2 µL/dak akış debisinde zamana karşı % gerielde grafiği	87
Şekil 26. Derişime karşı % gerielde grafiği	88
Şekil 27. Ortam derişimine karşı dializat derişimi korelasyonu	88
Şekil 28. 1.00, 5.00, 10.0 µg/mL derişimde ve 2 µL/dak akış debisinde zamana karşı in vitro % kayıp grafiği	90
Şekil 29. C_{Perfusat} ile $(C_{\text{perfusat}} - C_{\text{dializat}})$ arasındaki korelasyon	90
Şekil 30. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-derişim profili	91
Şekil 31. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-derişim profili	91
Şekil 32. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-yığılmalı atılan miktar profili	92
Şekil 33. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-yığılmalı atılan miktar profili	92
Şekil 34. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans	

formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-atılma hızı profili	93
Şekil 35. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-atılma hızı profili	93
Şekil 36. Oksitetrasiklin HCl'ün (2.50 ng/mL) UPLC-MS-MS kromatogramı	94
Şekil 37. Oksitetrasiklin HCl'ün (40.0 ng/mL) UPLC-MS-MS kromatogramı	95
Şekil 38. Test preparatı uygulanan bir deneğin 30-60. dakikadaki mikrodializ örneğine ait oksitetrasiklin HCl UPLC-MS-MS kromatogramı	95
Şekil 39. Referans preparatı uygulanan bir deneğin 30-60. dakikadaki mikrodializ örneğine ait oksitetrasiklin HCl UPLC-MSMS kromatogramı	96
Şekil 40. Oksitetrasiklin HCl'ün kalibrasyon grafiği	97
Şekil 41. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kütle kromatogramı: Metanol kromatogramı	99
Şekil 42. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kütle kromatogramı: Boş serum fizyolojik örneği	100
Şekil 43. Oksitetrasiklin HCl'ün(4.00 µg/mL) kromatogramı	101
Şekil 44. Oksitetrasiklin HCl'ün HPLC kalibrasyon grafiği	103
Şekil 45. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kromatogram: 1. Boş metanol kromatogramı 2. Boş bantın metanolde ekstre edilmesinden elde edilen örneğe ait kromatogram	105
Şekil 46. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl dermis derişimi-zaman profilleri	108
Şekil 47. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl ortalama dermis derişimi- zaman profili	111

Şekil 48. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl ortalama dermis derişimi-zaman profili (yarı-logaritmik grafik)	112
Şekil 49. Zamana karşı in vivo % gerielde grafiğı	114
Şekil 50. Mikrodiyaliz membranının deri altında yüzeyel ultrasonografi görüntüsü	115
Şekil 51. Bantın adhezyon kuvveti	116
Şekil 52. 12 sağlıklı gönüllüde Referans preparatı için Stratum Korneumdaki zamana karşı oksitetrasiklin HCl miktarı	119
Şekil 53. 12 sağlıklı gönüllüde Test preparatı için Stratum Korneumdaki zamana karşı oksitetrasiklin HCl miktarı	119
Şekil 54. 12 sağlıklı gönüllüde Referans preparatı için zamana karşı Stratum Korneumdaki yığılmalı oksitetrasiklin HCl miktarları	120
Şekil 55. 12 sağlıklı gönüllüde Test preparatı için zamana karşı Stratum Korneumdaki yığılmalı oksitetrasiklin HCl miktarları	120
Şekil 56. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki ortalama oksitetrasiklin HCl miktarları (12 denek ortalaması)	121
Şekil 57. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki ortalama oksitetrasiklin HCl miktarları yarı-logaritmik grafiğı (12 denek ortalaması)	121
Şekil 58. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki oksitetrasiklin HCl yığılmalı miktarı (12 denek ortalaması)	122
Şekil 59. Mikrodiyaliz deneyinin modeli	136
Şekil 60. 1 nolu denekte referans formülasyonu için zamana karşı MD ile dışarı alınan ilaç ekstraksiyon hızına($t^*-\Delta M/\Delta t$) ve modellemesine ait profiller	142
Şekil 61. Mikrodiyaliz ve dermatofarmakokinetik verileri arasındaki korelasyon	151

RESİMLER

Resim 1. CMA 107 mikrodializ pompası	50
Resim 2. Sağlıklı gönüllü ön kolunda dermis içine CMA 66 Lineer mikrodializ kataterinin implantasyonu	63
Resim 3. Sağlıklı gönüllü ön kolu üzerine oksitetrasiklin HCl merheminin uygulanışı	69
Resim 4. Sağlıklı gönüllü ön kolu üzerinde bant ile soyma işlemi	69

TABLolar

Tablo 1. Tetrasiklin alt grupları	36
Tablo 2. Deneklere ait bilgiler	61
Tablo 3. Oksitetrasiklin HCl'ün serum fizyolojikte -70 °C'deki stabilitesi	72
Tablo 4. Oksitetrasiklin HCl'ün serum fizyolojikte +4 °C'deki stabilitesi	72
Tablo 5. Birinci dondurma-çözme periyodu	73
Tablo 6. İkinci dondurma-çözme periyodu	73
Tablo 7. Referans ve Test deri merheminde oksitetrasiklin HCl miktar tayini	73
Tablo 8. Referans ve Test deri merheminin viskoziteleri	74
Tablo 9. Referans ve Test deri merheminin ağırlık denetimi sonuçları	75
Tablo 10. Oksitetrasiklin HCl'ün Referans ve Test formülasyonlarının meme derisinden salım kinetikleri	77
Tablo 11. Analitik yöntemin doğrusallığına ait bulgular	79
Tablo 12. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri	79
Tablo 13. Analitik yöntemin doğruluğu ve gerielde	80
Tablo 14. Sistemin kesinliğine ait bulgular	81
Tablo 15. Yöntemin kesinliğine ait bulgular	81

Tablo 16. Yöntemin tekrar edilebilirliğine ait bulgular	82
Tablo 17. İn vitro gerielde deneyine ait sonuçlar	84
Tablo 18. 0.250, 0.500, 1.00 µg/mL derişime ait in vitro gerielde sonuçları	86
Tablo 19. 10.0, 20.0, 50.0 µg/mL derişime ait in vitro gerielde sonuçları	87
Tablo 20. 1.00, 5.00 ve 10.0 µg/mL derişimlerine ait in vitro % kayıp deney sonuçları	89
Tablo 21. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri	97
Tablo 22. Analitik yöntemin doğruluğu ve gerielde	98
Tablo 23. Analitik yöntemin kesinliği	98
Tablo 24. Analitik yöntemin doğrusallığına ait bulgular	102
Tablo 25. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri	102
Tablo 26. Analitik yöntemin doğruluğu ve gerielde	103
Tablo 27. Sistemin kesinliğine ait bulgular	104
Tablo 28. Yöntemin kesinliğine ait bulgular	104
Tablo 29. Yöntemin tekrar edilebilirliğine ait bulgular	105
Tablo 30. Sağlıklı gönüllülerde Test (T) ve Referans (R) için oksitetrasiklin HCl dermis derişimleri	107
Tablo 31. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans formülasyonlarına ait biyoyararlanım ölçütleri	113
Tablo 32. İn vivo gerielde sonuçları	114
Tablo 33. Mikrodializ membranının deri altındaki derinliği	115
Tablo 34. Crystal Clear Tape 3M Scotch® bantın adhezyon kuvvetinin ölçülmesi	116
Tablo 35. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans için oksitetrasiklin HCl'ün zamana karşı Stratum Korneumdaki miktarları	118
Tablo 36. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans formülasyonlarına ait biyoyararlanım ölçütleri	123

Tablo 37. DMD yöntemi ile logaritmik transformasyon sonucu elde edilen BE parametrelerinin % 90 olasılıklı alt ve üst yüzde değerleri	133
Tablo 38. Test ve Referansa ait optimize k_d , k_1 ve V_d değerleri	141
Tablo 39. 1 nolu denekte referans formülasyonu için elde edilen mikrodializ ile çıkış modeline ait uyum ölçütleri	142
Tablo 40. Bant ile soyma yöntemi ile logaritmik transformasyon sonucu elde edilen BE parametrelerinin % 90 olasılıklı alt ve üst yüzde değerleri	146
Tablo 41. Testin tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri	148
Tablo 42. Referansın tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri	149
Tablo 43. Test ve Referans için ortalama verilerin tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri	150

KISALTMALAR

AIC:	Akaike Bilgi Ölçütü
ASKT:	Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı
AUC:	Eğri altında kalan alan
BE:	Biyoeşdeğerlik
BS:	Bağıl sapma
BY:	Biyoyararlanım
C_{dializat}:	Dializat derişimi
CL:	Klirens
C_{maks}:	Maksimum derişim
C_{perfüzat}:	Perfüzyon sıvısındaki derişim
DFK:	Dermatofarmakokinetik
DMD:	Dermal mikrodializ
FK:	Farmakokinetik
GA:	Güven aralığı
GİK:	Gastro intestinal kanal
KASKT:	Kare Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı
k_d:	Uzaklaşma hız değışmezi
k₁:	Formülasyondan ekstrasellüler sıvıya geçiş hızı
k₂:	Mikrodializ ile uzaklaştırma hızı
LOD:	Analitik yöntemin saptama sınırı
LOQ:	Analitik yöntemin kantitatif tayin sınırı
MD:	Mikrodializ
MS:	Kütle spektrometresi
OTC:	Oksitetrasiklin
r²:	Determinasyon katsayısı
sc:	Subkütan
SC:	Stratum corneum
SKT:	Sapma Kareleri Toplamı
S_r:	Regresyonun standart sapması

SS:	Standart sapma
$t_{1/2}$:	Biyolojik yarıömür
t_{maks}:	Maksimum derişime ulaşmak için geçen süre
UPLC:	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
V_d:	Sanal dağılım hacmi

1. GİRİŞ

Dozaj şekillerinin biyoeşdeğerliğinin (BE) değerlendirilmesi, hem klinik, hem de yasal düzenlemeler açısından önemlidir. Topikal dermatolojik ürünlerde ise, sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarı çok azdır. Dolayısıyla, oral uygulanan ilaç ürünlerinin BE'nin saptanmasında kullanılan farmakokinetik (FK) ölçüm yöntemleri topikal ilaç ürünlerine uygulanamaz. Bu yüzden topikal ilaç ürünlerinin BE'nin saptanması için özel yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim vardır. Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (Food and Drug Administration) (FDA) umut verici iki yöntem üzerinde durmaktadır: Bunlar, Dermatofarmakokinetik (DFK) olarak adlandırılan Bant ile Soyma (Tape-stripping) ve Dermal Mikrodiyaliz (DMD) yöntemleridir.

Bant ile Soyma yöntemi, uygulama bölgesinde derinin en dış tabakası olan Stratum Korneum (SC) içindeki ilaç derişimlerini noninvazif olarak ölçebilen bir yöntemdir. Birçok çalışma DFK'in BE'in saptanmasında güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir ve tüm topikal ilaç ürünlerine uygulanabileceğini belirtmiştir. Fakat bu yöntemin, özellikle klinik ilaç etkinliği ile ilgili olarak güvenilir olduğunun gösterilmesine gereksinim duyulmaktadır.

Mikrodiyaliz (MD) yöntemi ise, in vivo olarak dokulararası (interstisyel) vücut sıvısında bulunan etkin maddelerin, metabolitlerinin veya endojen bileşiklerin ölçülmesinde kullanılan bir yöntemdir. Son 10 yıl içinde MD yöntemi, topikal uygulama sonrasında dermal ilaç seviyelerini izlemek için kullanılmaya başlanmıştır. DMD'in kullanımı ile topik ilaç penetrasyonu devamlı olarak zamana karşı izlenebilir ve çok detaylı FK veri sağlanabilir. Fakat bu yarı-invazif yöntem ile topikal formülasyonların BE'ni değerlendiren insan çalışmaları sınırlı sayıdadır. FDA, MD'in topik dermatolojik dozaj formlarının BE'nin değerlendirilmesi için düzenleyici bir

yöntem olabilecek potansiyele sahip olduğunu belirtmektedir. Bu alanda yeni çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Bu araştırmada, DMD ve Bant ile Soyma yöntemleri kullanılarak topikal BE değerlendirilmiştir. Model madde olarak seçilen tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan oksitetrasiklin hidroklorürün, iki ticari preparatı (Terramycin® Deri Merhemi (Pfizer) ve Polimisin® Deri Merhemi (Koçak Farma)) kullanılmıştır. Sağlıklı gönüllüler üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, DMD yönteminin topikal bir BE çalışmasında kullanılabilirliği incelenmiş ve bu yöntemin Bant ile Soyma yöntemi ile karşılaştırılması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrodiyaliz

Mikrodiyaliz (MD) terimi ilk olarak, 1950'li yılların sonlarında, hacmi 1 mL'den fazla olmayan kan plazmasından polar steroidlerin diyalizini ve ekstraksiyonunu sağlayan bir yöntemi tanımlamak için kullanılmıştır¹. Fakat, bugün için bilinen MD örnekleme yöntemi, sıçan beyinde nörotransmitter derişimlerinin ölçülmesi için, bu yöntemi kullanan nöro bilim alanından ortaya çıkmıştır. Zamanla bu yöntem, prelinik nöro bilimlerde standart bir uygulama haline gelmiştir^{2, 3}.

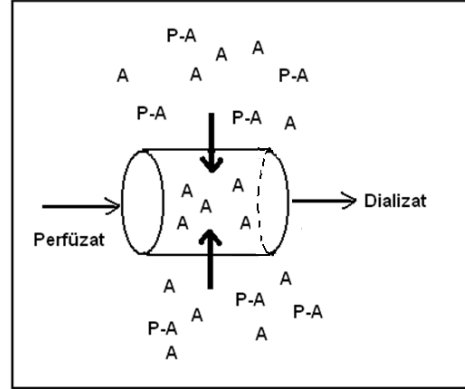
İn vivo MD, farmakokinetik (FK) ve metabolizma araştırmalarında, deney hayvanları ve insanlar üzerinde gerçekleştirilen birçok uygulama ile önem kazanmıştır. Bu yöntem biyopsi ile, ya da deney hayvanlarını öldürerek tüm doku örneklerinin alınmasından farklı olarak, belirli bir dokuda ekstrasellüler sıvıdaki endojen ve ekzojen bileşiklerin seviyelerinin devamlı bir şekilde izlenmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, MD örnekleme, örnek alınan bölgede belirli bir zaman aralığında, zamana karşı derişimleri veren ve devamlılığı olan bir proses olduğundan önemlidir⁴. Deney hayvanları üzerinde MD ile gerçekleştirilen FK çalışmalar arasında, beyinde ilaç dağılımının ve kan-beyin bariyerinden ilaçların penetrasyonunun incelenmesi⁵⁻⁸, intranazal uygulama ile beyine hedefleme⁹, kas¹⁰, kan^{11, 12}, karaciğer^{13, 14}, safra¹⁵, böbrek¹⁶, akciğer¹⁷, göz¹⁸, subkütan (sc) doku¹⁹⁻²⁴, deri^{25, 26} ve peritoneal örnekleme²⁷ üzerine yapılan araştırmalar yer almaktadır. Ayrıca, ilaçların plazma proteinlerine bağlanması²⁸, böbrek transplantasyonu sonrası böbrek fonksiyonlarını test etmek amacıyla, böbrek dokusunda endojen bileşiklerin ölçülmesi^{29, 30} ve çeşitli araştırma amaçları için kalp³¹, beyin^{32, 33}, karaciğer³⁴, ve böbrek³⁵ gibi dokularda endojen bileşiklerin ölçülmesi ve onkolojik uygulamada kanserli dokuda ilaç dağılımının izlenmesi³⁶ gibi araştırmalar bulunmaktadır.

MD yönteminin, insanda ilk uygulaması ise, 1987 yılında sağlıklı gönüllülerde interstisyel glukoz derişimlerinin ölçülmesi ile olmuştur³⁷. Adipoz doku ile sınırlı bu ilk uygulamanın ardından, MD kullanımı klinik uygulamalarda giderek artmıştır. İnsanlar üzerinde kas dokusunda ve sc yağ dokusunda gerçekleştirilen, valproik asitin³⁸, çeşitli antibiyotiklerin³⁹⁻⁴⁹, nonsteroidal anti enflamatuar ilaçların^{50, 51} doku farmakokinetiği çalışmaları ve deride⁵²⁻⁵⁵ sistemik ya da topikal uygulanan ilaç derişimlerinin ölçülmesi ile, yöntem önem kazanmıştır. Profilaktik olarak antibiyotik tedavisi alan nörocerrahi yoğun bakım hastalarında, beyinde fosfomisin farmakokineğinin incelenmesi⁵⁶, cerrahi operasyona giren hastalarda, valproatın serebrospinal sıvıdaki dağılımının incelenmesi⁵⁷ ve antikanser ilaçların tümör içine penetrasyonu ve ilaç seviyelerinin ölçülmesi⁵⁸ gibi MD yönteminin uygulandığı araştırmalar bulunmaktadır. Ayrıca, beyin iskemisinin bir göstergesi olan glutamat ve aspartat gibi aminoasitlerin beyinde salımının izlenmesi⁵⁹, kalp ameliyatı geçiren hastalarda kardiyak troponin ve aspartat aminotransferaz seviyelerinin izlenmesi⁶⁰, instestinal iskemisinin ve plastik cerrahide miyokütan flap iskemisinin izlenmesi⁶¹, sc dokuda metabolizmanın incelemesi için, endojen bileşiklerin izlenmesi⁶² ve meme dokusunda glutatyon gibi endojen bileşiklerin incelenmesi⁶³ MD yöntemi ile insanda gerçekleştirilen diğer klinik çalışmalardandır.

2.1.1. Mikrodiyalizin Prensibi

MD, organ ve dokulardaki serbest ilaç etkin maddesi, metabolit veya endojen bileşiklerin derişimlerinin ölçülmesi için uygun bir yöntemdir. Hem hayvan, hem de insan çalışmalarına uygulanabilir. MD sistemi, bir MD pompası, katater (prob), ve örneklerin toplandığı mikrotüplerden oluşur. Ana prensibi, doku içine implante edilen ince membranın fizyolojik bir sıvı ile perfüze edilmesi ile kapiller kan damarının fonksiyonunu taklit etmesine dayanır. MD probu, membran boyunca derişim gradientinin bir fonksiyonu olarak prob içine ve dışına kütle transferinin olduğu yapay bir kan damarı gibi düşünülebilir (Şekil 1). Bu nedenle, prob implante edildiği

lokal alan içinde ekstrasellüler sıvıdan bileşikleri hem geri alabilir, hem de ekstrasellüler sıvıya bileşikleri verebilir (taşıyabilir). Böylece, MD hem bir bileşiği dializattan toplamak, hem de bileşiği dokuya taşımak (retrodiyaliz) için kullanılabilir⁶⁴⁻⁶⁷.



Şekil 1. Mikrodiyaliz prosesinin şematik prensibi. A: bileşik, P-A: proteine bağlı bileşik

Organ veya biyolojik sıvı içine implante edilen fiber diyaliz membranı (0.2-0.5 mm, çap), sadece membranın moleküler cut-off (en son tutulan molekül ağırlığı) (20-100 kD) değerinden daha küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerin geçişine izin verir. Böylece, membran büyük molekülleri doku içinde alıkoyar. Bu nedenle, dializat örnekleri protein içermez ve temizdir. Prob tasarımına bağlı olarak, kısa diyaliz fiberi, bir ucuyla impermeabl kılcal bir boru vasıtasıyla mikro pompaya, diğer ucuyla da örnek tüpüne bağlanır.

Perfüzat adı verilen çözelti prob boyunca çok düşük akış debisinde (0.5-5 $\mu\text{L}/\text{dak}$) pompalanır. Probu çevreleyen sıvının veya dokunun pH'sı ve iyonik bileşimi ile benzer sulu bir çözelti perfüzat olarak kullanılır. Böylece membran boyunca net iyon değişiminin sıfır olması sağlanır. Bu, osmotik basınç farkını ve de sıvı kaybının olmasını engeller. Ayrıca, perfüzyon sıvısının akış debisi çok düşük (0.5-5 $\mu\text{L}/\text{dak}$) tutulduğu için, basınç oluşmadığından ultrafiltrasyon minimum seviyede tutulmuş olur. Bu düşük akış debisinde membran boyunca net sıvı transportu olmamaktadır. Sonuç olarak, MD membranında iyon veya su değişimi olmaz^{64, 65, 68, 69}.

MD, difüzyon kontrollü bir prosestir ve ekstrasellüler sıvı ile prob lümenindeki sıvı arasındaki derişim gradienti nedeniyle kütle transferi gerçekleşir. Bu geçiş Fick'in Difüzyon yasasına göre olur (Eşitlik 1). Bu yasaya göre akı, derişim gradienti ile orantılıdır. Düşük molekül ağırlıklı bileşikler prob lümeninin içine veya dışına doğru difüze olurlar (Şekil 1). Lümene geçen bu moleküller probtan çıkan perfüzyon sıvısı ile sürüklenir ve dializat olarak analiz için toplanır. Dializat, kimyasal olarak analiz edilir ve bileşiğin membran boyunca ileri geri difüzyonuna bağlı olarak, zamana karşı ekstrasellüler sıvıdaki derişimleri yansıtır. MD'in en önemli özelliği, ekstrasellüler sıvının örneklenmesini sağlayabilmesidir⁶⁴⁻⁶⁹.

Fick'in 1. Difüzyon Yasası:

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx}$$

Eşitlik 1

J: Akı ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{saniye}^{-1}$)

D: Difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2/\text{saniye}$)

C: Derişim (g/cm^3)

x: molekülün yüzeye paralel olarak katettiği mesafe (cm)

dC/dx: derişim gradienti ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-4}$)

2.1.2. Mikrodializ Yönteminin Avantajları ve Dezavantajları

2.1.2.1. Avantajları

- Bu yöntem ile in vivo olarak örnek alma, sıvı kaybı olmadan devamlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Böylece, ilaçların ve metabolitlerin yüksek rezolüsyonda derişim profilleri sağlanabilir.

- Bu uygulama FK araştırmalarda gerekli deney hayvanı sayısını azaltır. Seçilen doku içine yerleştirilen prob sayesinde, dializat derişimleri, belirli bir bölgedeki ekstrasellüler derişimleri yansıtır.
- İlaçların lokal metabolizmasının izlenmesini sağlar.
- MD örnekleri, diyaliz prensibi gereği, protein içermeyen örneklerdir. Bu yüzden, ex vivo da potansiyel enzimatik bozunma önlenmiş olur ve analiz için ön temizleme yöntemlerine gereksinim ortadan kalkar^{69, 70}.

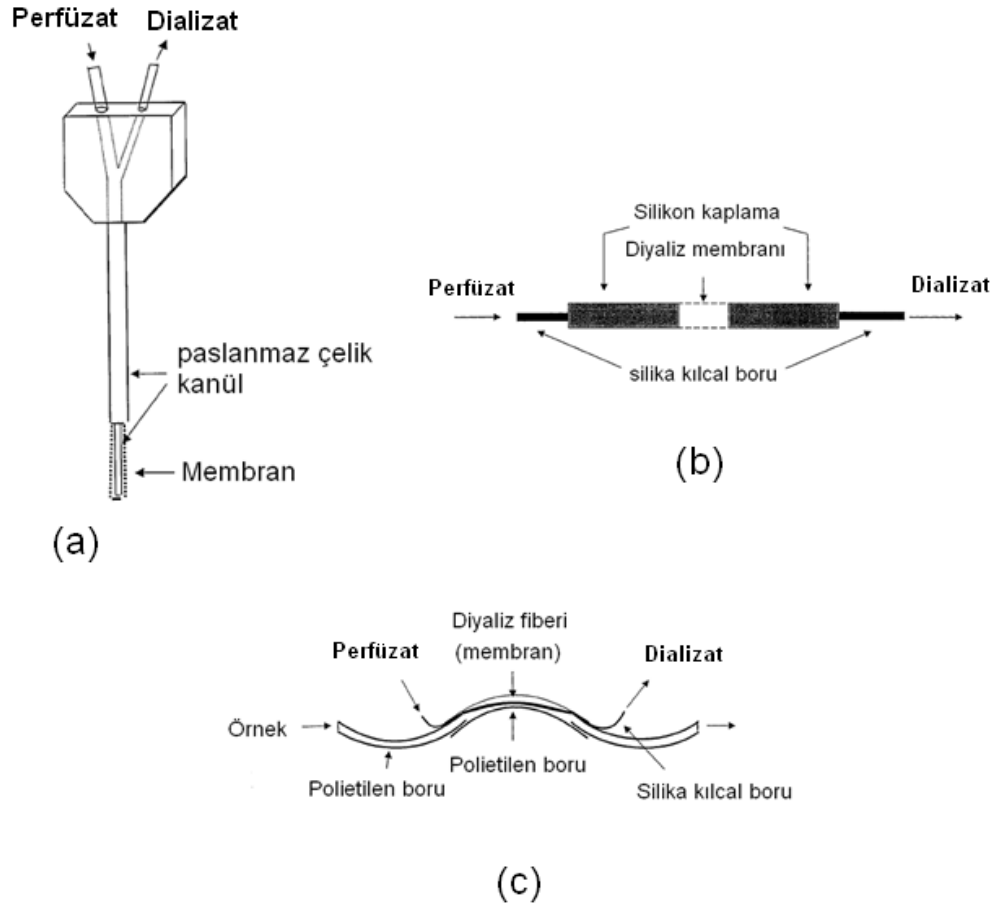
2.1.2.2. Dezavantajları

- Probun implantasyonu ile oluşan doku reaksiyonu incelenecek sistem ile etkileşim yaratabilir.
- MD örnekleri diyaliz prensibi gereği, düşük derişimlerde örneklerdir. Dolayısıyla, duyarlılığı yüksek hassas analiz yöntemlerine gereksinim duyar.
- MD membranları hidrofilik ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklere geçirgen olduğundan, bu bileşikler, MD yöntemi için ideal adaylardır. Çok hidrofobik, proteine bağlanması yüksek, membran cut-off değerinden büyük MA'lı bileşiklerin MD ile çalışılması uygun değildir.
- Lipofilik ilaçlar kılcal borulara ve prob bileşenlerine yapışarak, dializat ve ekstrasellüler derişimler arasındaki ilişkiyi karmaşık hale getirir.
- Dermis ve iskelet kasına prob implantasyonu, beyin yada jugular damara implantasyona göre daha az invaziftir. Hayvan çalışmalarında karaciğer, safra kanalı, beyin gibi bölgeler en invasif olan MD uygulama alanlarıdır.
- Dokuyu çevreleyen ekstrasellüler sıvıdaki gerçek derişimleri hesaplayabilmek için, ilacın in vivo gerieldesini saptamak gereklidir^{61, 69, 70}.

2.1.3. Mikrodializ Yönteminin Genel Özellikleri

2.1.3.1. Mikrodializ Problarının Özellikleri

MD problemleri kullanılacağı doku veya vücut sıvısına göre, çok farklı geometrik şekillerde bulunur (Şekil 2). Genel olarak, ince uzun çubuk, yarı dairesel ya da iğne şeklindedir. Kas, deri, karaciğer, tümör, kan, safra gibi yumuşak periferik dokularda, esnek problemler kullanılabilir. Problemler özel araştırma amaçlarını karşılayacak şekilde özel olarak da yapılabilir. Ticari olarak satılan prob çeşitleri ve aksesuar ürünleri bulunmaktadır^{65, 70}.



Şekil 2. Mikrodializ problemleri (a) Beyine implantasyon için kullanılan iğne şeklinde kanül prob (b) Deri, kas veya karaciğer gibi periferik dokular için tasarlanmış lineer prob (c) Sıçanda safra kanalından örnek almak için kullanılan büyük bir boru içerisine yerleştirilmiş lineer prob: shunt (bypass) prob⁶⁴

MD problemleri, değişik iç ve dış çaplarda (150-500 µm), moleküler kütle cut-off değerlerinde (5-50 kDa), inert ve bileşiklere geçirgen şekilde, çeşitli materyallerden (selüloz, poliasetonitril/sodyum metalil sülfonat, polisülfon, polikarbonat/polieter ve akrilik gibi kopolimerler) yapılır^{2, 71, 72}. Özel uygulamalar için en uygun prob araştırması ve membran türünün seçilmesi çok önemlidir. Böbrek diyaliz fiberleri, bu amaçla kullanılmaktadır. Diyaliz derişimlerini ve dolayısıyla prob çevresindeki sıvı derişimlerini açıkça etkileyeceğinden, membranın ve probun diğer bağlantılarını oluşturan materyallerin ilaç ile etkileşime geçmemesi gerekir. Probun kılcal boru bağlantılarının çapı, sıvı basıncı oluşturmaları ve yarı geçirgen membran üzerinden sıvı kaybına neden olması sebebiyle önemlidir⁷⁰.

2.1.3.2. Mikrodializ Yönteminde Prob İmplantasyonu ve Doku Hasarı

MD yönteminde prob boyutu çok küçük olduğundan, doku içinde minimum bir hasara neden olur. İmplantasyonun, incelenen sistem üzerine etkisinin önceden saptanması önemlidir^{68, 70}. Aslında probun kendisi olmasa da implantasyon işlemi doku hasarı oluşturur. Fakat doku hasarının boyutu, probun kullandığı bölgeye göre değişir. Örneğin karaciğer veya safra kanalındaki bir MD deneyi, sc olarak gerçekleştirilen bir çalışmadan daha fazla travma yaratır⁶⁵. Çeşitli çalışmalarda, dermis, kas ve tümör gibi periferel dokularda prob implantasyonuna karşı verilen cevaplar incelenmiştir^{26, 70}. Dermis, kas ve karaciğer için, nötrofil infiltrasyonunu takiben makrofaj saptanmıştır. Tümörler için, prob implantasyonundan 72 saat sonrasına kadar enflamasyon ile ilgili bir belirti bulunamamıştır.

Prob implantasyonunu takiben, deride yapılan histolojik incelemelerde, ani bir ödem ya da doku hasarı gözlenmemiştir. Fakat uzun sürede yapılan araştırmalarda, implantasyondan altı saat sonra, lenfosit infiltrasyonu ve sekiz gün sonra ise, membran çevresinde fibrozis

gözlenmiştir. Fakat periferik MD deneylerinde, lenfosit infiltrasyonunun, MD probunun davranışı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da görülmüştür²⁶. Çalışmalarda, genellikle prob implantasyonu sonrasında, dokunun dengeye gelebilmesi için, fizyolojik sıvı ile yarım saatten fazla perfüzyon gerçekleştirilir⁷³. İnsan ve hayvanlarda çeşitli dokularda yapılan çalışmalarda, doku hasarı belirleyici maddelerin (marker) (Tromboksan B2, Adenozin trifosfat, Adenozin, K⁺, glukoz, laktat, laktat/piruvat oranı) yaklaşık 30 dakika sonra dengeye geldiği görülmüştür⁷³. Prob implantasyonundan sonra lokal deri sirkülasyonundaki değişiklik laser Doppler ile incelenmiş ve 40 dakika içinde histamin seviyelerindeki değişikliklerin başlangıç seviyelerine indiği gözlenmiştir⁷⁴.

Kan-beyin bariyeri transportu ile ilgili intraserebral MD deneylerinin tekrarlanabilirliği üzerine yapılan histolojik ve fonksiyonel çalışmalar, ilk iki gün prob çevresindeki dokuda önemli bir histolojik değişikliğin olmadığını, 3. ve 4. günlerde doku reaksiyonunun önemli olduğunu, ancak prob çevresindeki çok küçük bir alanla sınırlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, intraserebral MD deneylerinin gerçekleştirileceği optimum zaman periyodunun, prob implantasyonundan sonraki 1-2 gün arası olduğu belirtilir. Bu aralık, ilk doku reaksiyonlarının geçtiği ve uzun vadede ortaya çıkacak reaksiyonların henüz başlamadığı dönemdir^{75, 76}.

2.1.3.3. Analiz Yaklaşımları

MD yönteminin güvenli bir şekilde kullanımı, büyük ölçüde MD örneklerindeki ilacı analiz etmek için duyarlı analiz yöntemlerinin varlığına bağlıdır. Bu yöntemler, çok küçük hacimlerdeki örneklerin (nano/mikrolitre gibi) analizini gerçekleştirebilmelidir. Bu yüzden mikroanaliz alanındaki gelişmeler, MD uygulamasının da önünü açmıştır. Sıvı kromatografisi gibi hassas analitik yöntemlerdeki gelişmeler ve kütle spektrometresi (MS), biyosensörler gibi duyarlılığı yüksek dedektörler bu konuda başarı sağlamaktadır⁷³.

MD örnekleri suda çözünürlüğü orta veya iyi derecede olan, genellikle küçük molekül ağırlıklı moleküller içerir. Dializatta, lipit ve protein gibi analiz yöntemi ile karışabilecek endojen bileşikler bulunmaz. Bu yüzden, ek bir örnek hazırlama yöntemi gerekmez. Değişik perfüzyon akış debilerinde (0.1-5 $\mu\text{L}/\text{dak}$) toplanan örnek hacmi, yaklaşık olarak 1-50 μL arasındadır. Online analiz ile örnek kaybı en aza indirilebilir⁷⁷⁻⁷⁹.

MD çalışmalarında hidrofilik ilaçların ölçümleri, lipofilik ilaçlara göre genellikle daha kolaydır. Lipofilik ilaçlar için, kılcal borulara, proba yada analiz cihazının herhangi bir parçasına yapışma görülebilir. Ayrıca, lipofilik ilaçlar intrasellüler kompartmanı tercih edeceğinden, ekstrasellüler sıvıda ve dializatta düşük derişimdedirler. Topikal olarak uygulanan fusidik asit, betametazon gibi yüksek oranda proteine bağlanan veya lipofilik özellikteki bileşiklerin ölçülmesine yönelik yapılan MD çalışmalarında başarı sağlanamamıştır^{80, 81}.

2.1.4. Mikrodiyaliz Problarının Kalibrasyonu

Doku içine implante edilen MD probu belirli bir akış debisinde fizyolojik sıvı ile perfüze edilir. Böylece interstisyel sıvıda bulunan moleküller membrandan prob içindeki perfüzyon ortamına difüze olurlar. Birçok bileşik için, interstisyum ve perfüzyon ortamı arasında denge tam kurulamaz. MD örnekleme, çoğunlukla denge koşullarında gerçekleşmez. Bu nedenle, dializattaki derişim, ekstrasellüler sıvıdaki derişimin bir kesridir. FK uygulamalarda, ekstrasellüler sıvıdaki gerçek derişimleri bulabilmek için, MD problemlerini kalibre etmek gereklidir^{61, 69}.

2.1.5. Gerielde ve Gerieldeye Etki Eden Etkenler

MD yönteminde *bağıl gerielde (relative recovery)* terimi, bir bileşiğin dializattaki derişiminin, prob çevresindeki sıvıda bulunan

derişimine oranı olarak tanımlanır. Bağlı gerielde aşğıdaki etkenlere bağıdır^{65, 70, 82}:

1. Membran boyunca difüzyon prosesinin hızı: Sıcaklık, membran cut-off değeri, membran alanı ve derişim gradienti
2. Membran yapısı ve bileşimi
3. Perfüzet bileşimi
4. Perfüzyon sıvısının akış debisi
5. Örnek matriksinin eğri-büğürlüğü (tortuosity)
6. Bileşğin fizikokimyasal özelliğı, yükü ve molekül büyüklüğü
7. Dokudaki klirens, kan akımı ve metabolizma gibi fizyolojik etkenler

Membran boyunca difüzyon prosesinin hızı: Sıcaklık etkisi

Bağılı gerieldenin, bileşiklerin difüzyon katsayılarına göre göstermiş olduğı farklılık, Stokes-Einstein eşitliğı ile ifade edilir (Eşitlik 2)⁸³:

$$D = \frac{k_b \cdot T}{6\pi\eta\sigma} \quad \text{Eşitlik 2}$$

D: Difüzyon katsayısı (m².saniye⁻¹)

k_b: Boltzman değışmezi (1.38066x10⁻²³ J.K⁻¹)

T: Mutlak sıcaklık (K)

η: Çevre sıvısının viskozitesi (kg.saniye⁻¹.m⁻¹)

σ: Partikül çapı (m)

Difüzyon prosesi, sıcaklık ile doğrudan orantılıdır. Bu nedenle, tüm MD deneyleri sabit sıcaklıkta; tercihen vücut sıcaklığında yapılmalıdır. Ayrıca, molekülün büyüklüğü de difüzyon prosesini etkiler⁶⁵.

Membran boyunca difüzyon prosesinin hızı: Membranın cut-off değeri ve membran alanı

İnterstisyel sıvıdan dializat ortamına sadece membran cut-off değerinden daha düşük molar ağırlığa sahip bileşikler geçebilir. Bununla birlikte, MD membranın özelliği de bağıl gerieldeyi etkileyen etkenlerden biridir⁸³.

Fick'in difüzyon yasasına göre, membran boyunca difüzyon hızı membran alanı ile orantılıdır. Bu nedenle, MD membran uzunluğunun ve dolayısıyla alanının artması, bağıl gerielde de artışa neden olur⁶⁵.

Derişim gradienti ve perfüzat bileşimi

Fick'in difüzyon yasasına göre difüzyon, derişim gradientine bağlıdır.

İdeal perfüzat bileşimi, ekstrasellüler sıvıya yakın bileşimde, iyon şiddeti, osmotik değer ve pH'da olmalıdır⁷⁰. Perfüzat bileşimindeki değişiklik, difüzyon prosesi boyunca, bağıl gerielde üzerine etki eder. Bu özellik MD membranından transportu artırmak için kullanılabilir. İbuprofen ile yapılan bir çalışmada, perfüzat sıvısına 2-hidroksi β -siklodekstrin ilavesinin gerieldeyi anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir⁸⁴.

Bağıl gerieldeyi artırmak için bir seçenek de pH değişimi ile bileşiğin çözünürlüğünü değiştirmektir. Vankomisin ile yapılan bir çalışmada, in vitro MD deneylerinde bağıl gerielde nin pH'ya bağımlı olduğu gösterilmiştir⁸⁵.

Ekstrasellüler sıvı düşük protein derişimine sahiptir. Fakat bazı durumlarda, ilacın MD probuna ve kılcal boru bağlantılarına yapışmasını engellemek için, perfüzat ortamına protein ilave edilir⁷⁰. Yapılan çalışmalarda, perfüzatın iyon bileşimi değiştirilerek, beyin diyalizatındaki nörotransmitter ve ilaç seviyelerinin değiştiği gözlenmiştir⁷⁰. Kan-beyin permeabilitesinin ölçüldüğü bir çalışmada, hipotonik perfüzyon ortamı

kullanılması ile, hidrofilik bir ilaç olan atenolol'ün dializat seviyelerini ve kan-beyin bariyeri permeabilitesinin arttığı gözlenmiştir⁷⁵.

Perfüzyon sıvısının akış debisi

Bağıl gerieldeyi etkileyen bir diğer etken de akış hızıdır. Düşük akış debisi, yüksek; yüksek akış debisi, düşük gerieldeler verir. Bu ilişki Eşitlik 3 ile açıklanabilir⁶⁵:

$$RR = \left(1 - e^{-rA/F}\right) 100 \quad \text{Eşitlik 3}$$

RR: bağıl gerielde (boyutsuz)

r : kütle transfer katsayısı (cm/dak)

A : mikrodializ membranı yüzey alanı (cm²)

F : akış debisi (cm³/dak)

Fakat bu varsayımdan sapmalar görülmüştür. Leukotriene ile gerçekleştirilen bir çalışmada 1 µL/dak'nın altındaki akış debilerinde bağıl gerieldenin azaldığı gösterilmiştir⁸⁶. Bu bulgu, membrana adsorpsiyon prosesi ile açıklanmıştır.

MD çalışmalarında, düşük perfüzyon debileri, düşük örnek hacmi verir ve analitik yöntemin kantitatif saptama sınırında sorunları beraberinde getirir. Bu nedenle, örnek toplama aralıklarını artırması ve sonuç olarak zamana karşı kötü bir ayırım (resolution) elde edilmesi nedeniyle, düşük akış debileri tavsiye edilmez. Diğer taraftan, 10 µL/dak ve üzeri akış debileri de tavsiye edilmez; çünkü yüksek akış debisi, MD kılcal borusu boyunca yaratacağı basınç nedeniyle ultrafiltrasyona ve de prob dışına akışa neden olur⁶⁵.

Örnek matriksinin eğri-büğürlülüğü(tortuosity)

İn vivo gerielde, in vitro deneylerden elde edilen gerieldeden örnek matriksindeki (interstisyel hücre sıvısı) eğri-büğürlük etkeni nedeniyle, in vivo koşulların tam olarak taklit edilmesi olanaksız olduğu için farklıdır.

Sellüler yapılar ve ekstrasellüler sıvı boşlukları ile ifade edilen eğri-büğürlük etkeni, difüzyon mesafesini artırarak bileşiğin dokuda difüzyon katsayısını azaltır⁸³.

2.1.6. Mikrodiyaliz Problarının Kalibrasyon Yöntemleri

2.1.6.1. Akış Debisi Değişimi Yöntemi

Değişik perfüzyon akış debilerinde gerçekleştirilen bu kalibrasyon yöntemi 1985 yılında geliştirilmiştir⁸⁷. Bağlı gerielde akış debisine bağlıdır. Akış debisi sıfır olduğunda, MD için denge koşulu sağlanır ve gerçek örnek derişimleri elde edilir. Farklı akış debilerine karşı ölçülen derişimler grafiğe geçirilerek, sıfır akış debisine ekstrapole edilirse, sıfır akış debisindeki derişim kestirilebilir ve böylece probun bağlı gerieldesi kestirilir. Bu yöntemin dezavantajı, çok düşük akış debilerinde, örnek toplama zamanının uzun olması ve buna bağlı olarak zamana bağlı ayırımın kötüleşmesidir. Ayrıca sıfır akış debisine ekstrapole etmek, gerçek gerieldenin sadece bir kestirimidir ve gerçek değeri saptamak olası değildir. Bununla birlikte, sıfır akış debisindeki hatayı en aza indirebilmek için, deney tasarımına çok düşük akış debisindeki ölçümleri dahil etmek gereklidir^{65, 87}.

2.1.6.2. Denge Yöntemi (No-net-flux Yöntemi) (Zero-net flux Yöntemi)

Bu yöntemde farklı perfüzet derişimleri kullanılır. Yöntem, denge koşullarında problemlerin in vivo kalibrasyonu için Lönnroth ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir³⁷. Bu kalibrasyon yönteminde, farklı derişimlerde bileşik içeren perfüzet ile perfüzyon gerçekleştirilir. Eğer perfüzet derişimi, prob çevresindeki derişimden düşük ise; bileşik membrandan perfüzata doğru difüze olur ve dializat derişimi, perfüzet derişiminden yüksek olur. Eğer tam tersi ise, perfüzet derişimi, prob çevresindeki derişimden yüksek ise dializat derişimi, perfüzet derişiminden daha düşük olur. Perfüzet derişimi dializat derişimine eşit olduğunda özel bir durum ortaya çıkar. Bu

durumda prob çevresindeki derişim, perfüzet derişimi ile aynı olacaktır ve bu durum net akışın sıfır olması ile sonuçlanacaktır.

Farklı perfüzet derişimleri, perfüzet ile ilişkili olarak dializattaki bileşik kazancı veya kaybına ($C_{\text{dializat}} - C_{\text{perfüzet}}$) karşı grafiğe geçirilir. Apsisin kesişimi, prob sıvısındaki derişimi verir. İn vivo prob gerieldesini ise, regresyon doğrusunun eğiminden hesaplanır. Yöntemin dezavantajı, farklı perfüzet derişimleri ile kalibrasyon yapılması gerektiğinden, çok zaman alması ve bu zaman boyunca da denge koşuluna gereksinim duymasıdır. Bu nedenle bu yöntem, klinik çalışmalarda uygun bir kalibrasyon yöntemi değildir^{65, 73}.

2.1.6.3. Retrodializ

Retrodializ, diğer kalibrasyon yöntemlerinin zaman alıcı olması ve farklı hayvan/insanların kullanılmasına gereksinim duyması ve bu nedenle de klinik çalışmalarda uygulanabilir olamaması nedeniyle önem taşımaktadır^{65, 73}. Retrodializ, insan FK çalışmaları için en uygun yöntem olarak Stahle ve ark. tarafından önerilmiştir⁸⁸. Ayrıca yöntem, hasta veya gönüllünün fazladan bir strese maruz kalmasını da engellemektedir. Retrodializ, çalışmalarda yüksek tekrarlanabilirliği olan, daha az zaman isteyen, en pratik kalibrasyon yöntemidir⁶⁸. MD yöntemi ile insanlar üzerinde yapılan FK çalışmalarda, ekzojen ve endojen bileşiklerin dağılımı çalışmalarında, bu yöntem ile uygun prob kalibrasyonu sağlanabileceği ispatlanmıştır⁸⁹⁻⁹¹.

Bu yöntemin prensibi difüzyon prosesinin membranın her iki yönünde de eşit olduğu varsayımına dayanır. Bileşik bilinen bir derişimde perfüzyon ortamına eklenir ($C_{\text{perfüzet}}$), ve membran boyunca kayboluş hızı (gerielde) saptanır. Bileşiğin membrandan kaybı, in vivo gerieldeye eşittir. İn vivo gerielde değeri, Eşitlik 4 ile hesaplanır⁹².

$$\% \text{ Gerielde} = 100 \left(1 - \frac{C_{\text{dializat}}}{C_{\text{perfüzet}}}} \right)$$

Eşitlik 4

Retrodializ, ilaç derişimlerini ölçmek için kullanılacağı zaman, gerielde deneyleri, ilacın ilk uygulanmasından önce yapılmalıdır. İlaç derişimleri in vivo gerielde için düzeltilerek, zamana karşı derişim profilleri oluşturulur^{67, 73}.

Bağıl gerieldenin tam olarak doğru saptanabilmesi olanaksızdır. Fakat klinik uygulamalarda yakın bir kestirim yeterlidir. Çünkü MD ile interstisyel derişim ölçümleri için bireyleriçi varyasyonun, bileşiğe bağlı olarak % 10-20 kadar olduğu gösterilmiştir⁹³.

Retrodializ yönteminin bir başka uygulaması da, in vivo gerieldeyi saptamada internal standart kullanılmasıdır⁹⁴. Bileşik ile aynı özelliklere sahip olan bir internal standart perfüzet ortamına eklenir. Deney boyunca hem bileşiğin, hem de internal standartın derişimleri saptanır. Böylece MD membranından internal standartın kaybı, bileşiğin bağlı gerieldesini kestirmek için kullanılır. Bu yaklaşım, deney boyunca gerieldedeki değişimleri saptama avantajını sunar. Fakat in vitro gerieldeleri aynı olsa bile, internal standart ve bileşiğin in vivo sonuçları farklı olabilir⁹⁵.

2.1.6.4. Endojen Referans Bileşiği Yöntemi

Bağıl gerieldenin saptanabilmesi için endojen bileşiklerin referans olarak kullanılması bir diğer yaklaşımdır. Ürenin kolay difüze olabilen bir molekül olmasından dolayı, gerieldenin belirlenmesinde endojen bir bileşik olarak kullanılabileceği belirtilmektedir⁹⁶. Fakat bu yöneme yönelik sonuçlar çelişkilidir^{97,98}. Glukoz ve parasetamol için, üre endojen bileşiğinin kullanıldığı kalibrasyon çalışmasında, üre kalibrasyonu, denge ve retrodializ yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Glukoz için yöntemin, denge ve retrodializ yöntemlerinden farklı sonuçlar verdiği bulunmuştur. Parasetamol için ise, gerielde değerleri açısından yöntemler arasında

anlamalı bir fark bulunamamıştır⁹⁷. Ürenin internal standart olarak MD kalibrasyonunda kullanıldığı başka bir çalışmada, glukoz, laktat ve gliserol için, endojen referans yönteminin denge ve internal referans (retrodiyaliz) yöntemleri ile anlamalı korelasyon gösterdiği bulunmuş ve ürenin endojen referans olarak kullanılabileceği gösterilmiştir⁹⁸. Yapılan bir çalışmada, böbrek yetmezliği olan hastalarda, kan üre seviyelerinin bir göstergesi olarak, ters iyontoforez yöntemi ile, deriden üre seviyelerinin ölçülebileceği de bildirilmiştir⁹⁹.

2.1.6.5. Diğer Kalibrasyon Yöntemleri

İn vitro gerielde bir bileşiğin bağıl gerieldesini ile ilgili ön bir bilgi almayı sağlamaktadır. İn vitro gerielde için, hem diyaliz, hem de retrodiyaliz yöntemleri kullanılabilir, çünkü difüzyon prosesi her iki yönde de eşit olarak kabul edilir. Fakat in vitro sonuçlardan in vivo gerieldenin ekstrapolasyonu olası değildir. Örneklenen dokunun yapısı ve bileşik ile etkileşimi gerieldeyi etkiler^{71,100}. Genellikle, in vitro gerielde, in vivo gerielden daha yüksektir. İn vivo koşullarda bağıl gerielde, ekstrasellüler boşluğun hacmi, eğrilik bükürlüğü, ilaç salımı ve alımı (uptake) ve klirens prosesleri gibi etkenlerden etkilenir⁶⁵.

2.2. Dermal (Kütan) Mikrodiyaliz

Son yıllarda, kütan ve perkütan ilaç verilmesine yönelik avantajlar yeni ilaç formülasyonları için önem kazanmıştır. Çünkü, düşük oral biyoyararlanım (BY), sistemik klirens ve dar terapötik pencereye sahip çok potent ilaçlarla sistemik etki elde etmek için, karaciğerden ilk geçiş metabolizmasından kaçınılması ve uzun süre kontrollü salım sağlanması avantajlı olabilir. Bununla birlikte topikal uygulamanın en önemli kullanılışı, lokal etki için ilacı deriye taşımaktır. Sistemik etki ile karşılaştırılırsa, deri/plazma oranları çok anlamalı bir şekilde yüksektir. Bu nedenle, topikal

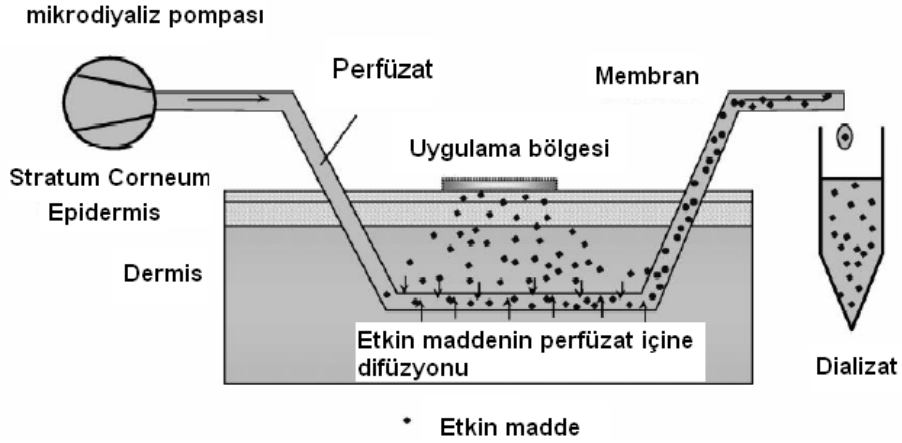
uygulama, yüksek sistemik maruziyet nedeniyle oluşan yan etkiler olmaksızın, hedef organda terapötik etkin ilaç derişimleri sağlar¹⁰¹.

Perkütan ilaç uygulamasında, topik formülasyonların in vivo etkinliğini, dolayısıyla biyoeşdeğerlik ve biyoyararlanımlarını (BE/BY), plazma derişimlerini ölçerek değerlendirmek olası değildir. Kütan ilaç uygulamasının değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın yöntem, hayvan/insan derisi, ya da yapay membrandan difüzyonun, Franz Difüzyon hücrelerinde incelenmesidir¹⁰². İn vitro sistem, topikal BE/BY'ın erken dönemde kestirimini sağlayacak kaba bir yöntemdir. Fakat yöntemin, vasküler sistem yoluyla atılımı ve metabolize edici enzimlerin olmaması, stratum korneum (SC) yapısındaki değişiklikler ve yöntemin aslında kütan penetrasyon yerine perkütan permeasyonu saptaması gibi sınırlamaları vardır¹⁰¹.

Deride FK profillerin klinik olarak saptanması için, in vivo yöntemler kullanılmalıdır. Kütan ilaç uygulamasını değerlendirmek için, sıklıkla kullanılan bir yöntem, SC içine ilaç penetrasyonunu değerlendiren bant ile soyma [Dermatofarmakokinetik (DPK)] yöntemidir. Bu yöntem tüm dermatolojik ürünlere uygulanabilir. Fakat klinik etkinliği kurulamamıştır¹⁰³.

Dermal mikrodializ (DMD) yöntemi, dermatoloji alanında, deride ilaç penetrasyonu ve dağılımını devamlı bir şekilde izlemeyi sağlayan bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Şekil 3). DMD, DPK'e göre invazif bir yöntemdir, fakat DPK için önemli bilgiler sağlayabilir. Son yıllarda, DMD yönteminin kütan ilaç uygulamasında topikal BE'i değerlendirmek için çok umut verici bir yöntem olduğu belirtilmektedir^{103, 104}.

Bunun dışında, topikal dozaj formlarında BE'in saptanması için kullanılan yöntemlerden, karşılaştırmalı klinik çalışmalar, çok miktarda hasta popülasyonuna gereksinim duyması nedeniyle hantal, zaman alıcı, pahalı ve düşük duyarlılıktadır. Farmakodinamik çalışmalar ise, şimdilik sadece kortikosteroidler için geliştirilmiştir¹⁰⁵.



Şekil 3. Dermal mikrodiyalizin prensibi

2.2.1. Dermal Mikrodiyaliz Yöntemi ile İnsanlarda Yapılan Çalışmalar

İnsanda DMD ile yapılan ilk çalışmalarda, organik solvanların (etanol ve izopropanol) perkütan emilimleri incelenmiştir¹⁰⁶.

Daha sonraki yıllarda ise, çeşitli etkin maddelerin perkütan emilimleri, dozaj şekillerinin ve uygulama yollarının dermis, sc doku, adipoz doku ve iskelet kasındaki etkin madde seviyelerine etkilerinin incelendiği çalışmalar yapılmıştır.

Benfeldt ve arkadaşları, MD yöntemi ile in vivo olarak insan derisinden salisilik asidin geçişini inceleyerek, bulmuş oldukları sonuçları salisilik asit ile sıçanlar üzerinde yapmış oldukları MD çalışması ile karşılaştırmışlardır¹⁰⁷.

Başka bir çalışmada, iyontoforez ile insan dermisine uygulanan propranololün, DMD ile dermisteki derişimleri ölçülerek, FK değerlendirilmesi yapılmıştır¹⁰⁸.

Hegemann ve arkadaşları ise, dokuz sağlıklı gönüllü üzerinde nikotinin ticari patch formülasyonunu (Nicotinell TTS 20, Ciba-Geigy) uygulayarak, nikotinin dermisteki FK profilini incelemişlerdir¹⁰⁹.

Östradiolün patch formülasyonu (TTS 100 µg/24 saat) üzerine yapılan bir diğer çalışmada, östradiolün transdermal permeasyonu MD yöntemi ile incelenmiştir; fakat bu çalışmada derinin 1.5-10 mm altından toplanan dializat örneklerinde östradiol saptanamamıştır¹¹⁰.

Yine, başka bir çalışmada, 10 dakika boyunca topikal olarak, metilnikotinatın patch formülasyonu uygulanan üç kişiden ikisinde dermal ilaç derişimleri saptanırken, formülasyonun 1 dakika uygulanması sonucunda dermal olarak metilnikotinat saptanamamıştır¹¹¹

Diklofenakın sc dokuda transdermal uygulaması, Müller ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada, MD problemleri 3.9 ± 0.3 ve 9.3 ± 0.5 mm derinlikte olmak üzere, iki doku tabakasına yerleştirilmiştir ve 20 kişiden sadece 11'inde diklofenak saptanabilmiştir¹¹².

Diklofenak ile yapılan başka bir çalışmada ise, topikal (MIKA Diclofenac Spray Gel % 4)) ve oral (Voltaren® 50 mg enterik kaplı tablet) uygulama sonrasında, plazma, sc adipoz doku ve iskelet kasında MD yöntemi ile diklofenak derişimleri ölçülmüştür. Bu çalışmada, yumuşak doku enflamasyonlarının tedavisi için, topikal yolun oral uygulamaya alternatif olduğu sonucuna ulaşılmıştır¹¹³.

Sağlıklı gönüllülerde, ticari salisilat esterleri ve tuzlarının topikal penetrasyonunun incelendiği bir diğer çalışmada, metil salisilat formülasyonunun deriye uygulanmasından sonra, dermis ve sc dokuda salisilat saptanırken, trietanolamin salisilat formülasyonu uygulandığında dermis ve sc dokudan alınan dializat örneklerinde salisilat saptanamamıştır¹¹⁴.

2.2.2. Dermal Mikrodializ Yöntemi ile Biyoeşdeğerlik/Biyoyararlanım Çalışmaları

DMD yönteminin topikal ürünlerin BE'lerinin değerlendirilmesinde umut verici ve potansiyel bir yöntem olduğu FDA tarafından bildirilmiştir¹⁰³. Bugüne kadar, insanlar üzerinde gerçekleştirilen topikal BE/BY ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan biri, lidokainin dermal emilim hızı ve gecikme süresini bir mikroemülsiyon taşıyıcıda ve ticari bir Y/S emülsiyonunda (Xylocain % 5) sekiz sağlıklı gönüllüde karşılaştırmıştır. Kompartmansal FK modelleme ile saptanan mikroemülsiyonun emilim katsayılarının, Y/S emülsiyonuna oranla 2.9 olduğu bulunmuştur¹¹⁵. Diğer bir BY çalışmasında, 8-metoksipsoralenin doku ve plazma seviyeleri, oral (0.6 veya 1 mg/kg) ve topikal banyo (3 mg/L) veya krem (% 0.1) olarak uygulanmasından sonra karşılaştırılmıştır. DMD, deri/plazma oranlarının topik uygulamalarda, oral uygulamaya oranla yüksek olduğunu göstermiştir. Sistemik yan etkilerden dolayı, topikal uygulamanın sistemik uygulamadan daha avantajlı olduğu FK açıdan önerilmiştir¹¹⁶. Benfeldt ve arkadaşları, DMD ve DPK yöntemleri ile sekiz sağlıklı gönüllüde lidokainin krem ve merhem formülasyonlarının topikal BE'ni değerlendirmişlerdir. Her iki yönteme göre, merhem formülasyonuna oranla, krem formülasyonunda lidokain penetrasyonun 3-5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir¹¹⁷. 18 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir DMD çalışmasında, aynı ketoprofen jel formülasyonunun farklı uygulama alanlarında BE'i değerlendirilmiş ve bölgesel farklılığın olmadığı bulunmuştur¹¹⁸.

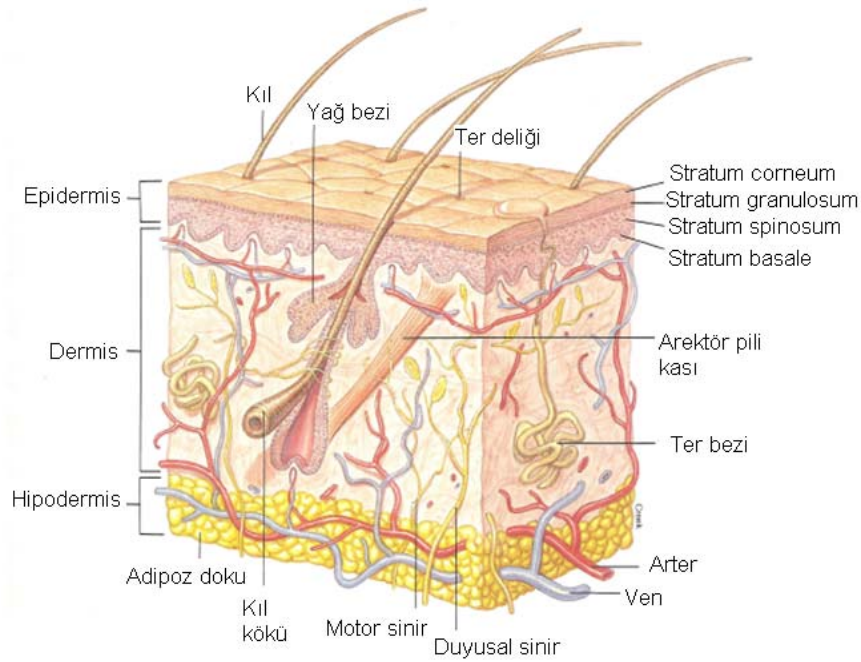
2.3. Deri

2.3.1. Derinin Yapısı

Deri, vücudun tek başına en ağır organıdır, toplam vücut ağırlığının yaklaşık % 16'sını oluşturur ve erişkinde 1.2-2.3 m²'lik bir yüzey kaplar. Deri ektodermal kökenli bir epitel tabakası olan epidermis ile mezodermal

kökenli bir bağ dokusu tabakası olan dermisten meydana gelir. Bazal tabaka, epidermal ve dermal bağlantıları oluşturarak, epidermis ve dermisi ayırır. Saçlar, tırnaklar, yağ ve ter bezleri epidermisten türerler. Dermisin altında hipodermis ya da sc doku denen bir gevşek bağ dokusu uzanır (Şekil 4)^{119,120}.

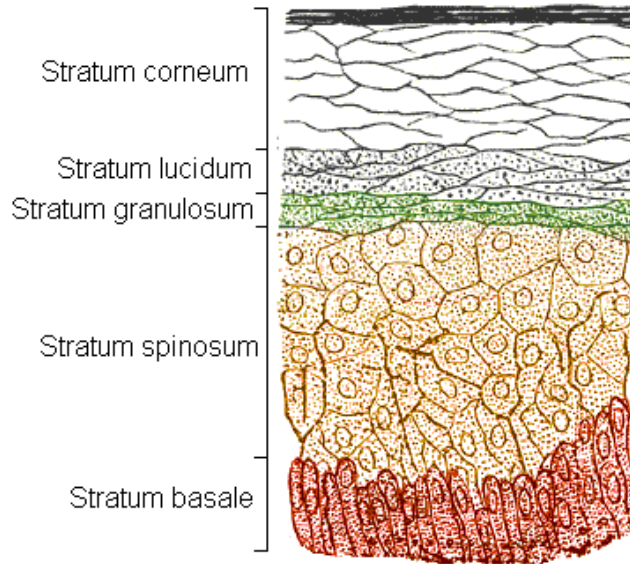
Derinin dış yüzeyi nispeten suya geçirgen değildir. Böylece buharlaşma ile aşırı su kaybını önler. Deri çevre ile sürekli iletişim sağlayan reseptör bir organ olarak işlev görür ve organizmayı çarpma, sürtünme ile oluşabilecek yaralanmalar ile kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı korur. Epidermis hücrelerinde üretilen ve depolanan bir pigment olan melanin ultraviyole güneş ışınlarına karşı da önemli bir koruma sağlar. Derinin bezleri, kan damarları ve yağ dokusu sıcaklık düzenlenmesinde, vücut metabolizmasında ve çeşitli maddelerin atılmasında görev alır. Derinin yüzeyi, pH 5.2-5.6 arasında asidik bir özellik gösterir¹²⁰⁻¹²².



Şekil 4. Derinin yapısı¹²³

2.3.2. Epidermis

Epidermis başlıca çok katlı yassı keratinize epitelden meydana gelir. Melanositler, Langerhans ve Merkel hücreleri diğer hücre türleridir. Keratinleşen epidermal hücrelere keratinositler denir. El ayası ve ayak tabanında bulunan kalın deri ve vücudun diğer bölgesinde bulunan ince deri 75-150 μm ve 400-600 μm arasında değişen epidermal tabaka kalınlığına sahiptir. Dermisten dışa doğru epidermis, keratin üreten beş hücre (keratinosit) tabakasından meydana gelir (Şekil 5)^{119-122,124}:



Şekil 5. Epiderminin yapısı¹²⁵

a. Stratum Basale (Stratum Germinatum)

Dermal-epidermal birleşme yerinde bazal tabaka üzerine oturmuş bazofilik, prizmatik ya da kübik hücrelerden oluşan tek bir hücre tabakasından meydana gelir ve dermisi epidermisten ayırır. Stratum basale yoğun mitotik aktivite ile karakterizedir ve bir sonraki tabakanın başlangıç bölümü ile birlikte epidermal hücrelerin sürekli yenilenmesinden sorumludur. İnsanda epidermis, yaşa, vücut bölgesine ve diğer etkenlere bağlı olarak yaklaşık her 15-30 günde bir yenilenmektedir^{119,120}.

b. Stratum Spinozum

Bu tabaka, merkezi çekirdekli ve sitoplazmik uzantıları filament demetleri ile dolu kübik, poligonal ya da hafifçe yassılaştırmış hücrelerden oluşur. Bu filament demetleri bir araya gelerek birçok küçük hücresel çıkıntılar oluştururlar ve bu dikensi çıkıntıların ucunda yerleşmiş olan *desmozomlarla* sonlanırlar. Bu tabakadaki hücreler birbiriyle içi filament dolu dikensi sitoplazmik çıkıntılar ve hücre yüzeyindeki desmozomlarla sıkıca bağlanmıştır^{119, 120}.

c. Stratum Granülozum

Bu tabaka sitoplazması *keratohiyalin* granülleri denen kaba bazofilik granüllerle dolu üç ila beş yassılaştırmış poligonal hücre tabakasının bulunması ile karakterizedir. Bu granüller sistin, fosfor ve histidin içeren proteinler içerir. Stratum granülozumda, diğer karakteristik yapı ise, çift tabakalı lipitten oluşmuş lameller diskler içeren, oval yada çubuk şeklinde, küçük (0.1-0.3 µm), membranla çevrili *lamellar granüldür*. Bu granüller hücre membranı ile kaynaşarak içeriklerini stratum granülozumun hücreler arası boşluğuna boşaltıp, burada lipid içeren şeritler halinde depolanır. Yabancı maddelerin penetrasyonunda bir bariyer gibi görev alır^{119,120}.

d. Stratum Lusidum

Bu tabaka kalın deride daha belirgindir. Oldukça yassı *eozinofilik* hücrelerin oluşturduğu yarı saydam ince bir tabakadır. Organeller ve çekirdekler artık belirgin değildir ve sitoplazma sıkıca paketlenmiş *filamentlerden* meydana gelir. Komşu hücreler arasındaki *desmozomlar* daha belirgindir^{119, 120}.

e. Stratum Korneum

Bu tabaka, 15-20 çekirdeksiz ve yassılaştırmış keratinize hücre tabakasından meydana gelmiştir. Hücrelerin sitoplazması *keratin* ile doludur. Keratin, molekül ağırlıkları 40.000-70.000 arasında değişen en az

altı değişik polipeptit içerir. Toplam deri kalınlığı 2-3 mm iken, SC'un kalınlığı sadece 10-15 µm kadardır. Keratinizasyondan sonra, hücrelerde sadece fibriller, amorf proteinler ve kalın plazma membranı bulunur. Bunlara *boynuzsu hücreler* denir. Bu hücreler SC yüzeyinden sürekli olarak dökölür^{119, 120, 124}.

2.3.3. Epidermiste Yer Alan Diğer Hücreler

2.3.3.1. Melanositler

Derinin rengini belirleyen en önemli etkenler, derinin melanin, karoten içeriği ve dermisteki kan damarlarıdır. Melanosit, stratum bazale hücrelerinin altında, ya da arasında ve kıl foliküllerinde bulunan özelleşmiş bir epidermis hücresidir. Melanin sentezi melanositte olur. Hücreleri güneş ışığının zararlı etkilerinden korur^{119, 124, 126, 127}.

2.3.3.2. Langerhans Adacıkları

Yıldız şeklindeki bu hücreler epidermisin stratum spinozum tabakasında bulunur ve epidermal hücrelerin % 2-8'ini oluşturur. Bunlar kemik iliğinden türemiş makrofajlardır. İmmünolojik deri reaksiyonlarında önemli bir rol oynarlar^{120, 124, 126, 127}.

2.3.3.3. Merkel Hücreleri

Merkel hücreleri, el ayalarında ve ayak tabanlarında kalın deride bulunur. Merkel hücrelerinin tabanında serbest sinir sonlanmaları bulunur. Bu hücrelerin duyuşal mekanoreseptörler olduğu bildirilmiştir^{120, 124, 126, 127}.

2.3.4. Dermis

Dermis, epidermisi destekleyen ve bunu alttaki komşu sc dokuya (hipodermis) bağlayan bağ dokusundan meydana gelir. Dermisin kalınlığı bulunduğu bölgeye bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Dermiste sınırları pek ayırt edilemeyen iki tabaka bulunur. Bunlar en dışta bulunan *papiller tabaka* ile daha derinde yerleşmiş *retiküler*

tabakadır. İnce papiller tabaka gevşek bağ dokusundan oluşur; ayrıca fibroblastlar ile en çok makrofaj ve mast hücresi olmak üzere diğer bağ dokusu hücreleri yeralır. *Retiküler tabaka* daha kalındır ve düzensiz bağ dokusundan ve kollajenden oluşur.

Dermiste bulunan zengin bir kan ve lenf ağı, vücut sıcaklığı ve kan basıncının düzenlenmesinde ve epidermisin beslenmesine rol oynar. Bu yapıların dışında, dermiste kıl folikülü ile ter ve yağ bezi gibi epidermal yapılar da bulunur. Dermis sinir bakımından zengindir^{120, 122}.

2.3.5. Subkütan Doku

Bu tabaka, deriyi alttaki komşu organlara gevşekçe bağlayan bir bağ dokusudur. Hipodermiste, sayısı bulunduğu bölgeye, boyutları ise, kişinin beslenme durumuna göre değişen yağ hücreleri bulunur^{120, 122}.

2.3.6. Yağ Bezleri

Yağ bezleri, vücut yüzeyinin hemen her tarafında dermis içinde gömülü olarak bulunmaktadır. Ayak tabanı, el ayası ve kılsız derisinde bulunmayan yağ bezleri genellikle kısa bir kanala açılan birkaç asinüsü olan asiner bezlerdir. Bu kanal genellikle bir kıl folikülünün üst kısmında sonlanır. Asinüsler bazal tabaka üzerinde oturan ve farklılaşmamış epitelyal hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler çoğalıp farklılaşır ve sitoplazmasında yağ damlacığı bulunan hücreler haline gelir. Çekirdekleri giderek küçülür ve yağ damlacığı dolu hücreler patlar. Bu olayın ürünü olarak yağ bezlerinin salgısı olan ve giderek derinin yüzeyine doğru hareket eden sebum oluşur¹²².

2.3.7. Ter Bezleri

Ter bezleri yaygın olarak deride görülür. Ekrin (merokrin) ter bezleri, kanalları deri yüzeyine açılan basit ve kıvrıntılı tübüler bezlerdir. Bu bezler tarafından salgılanan sıvı viskoz değildir ve çok az protein vardır. Su, sodyum klorür, üre, amonyak ve ürik asit içerir. Termoregülasyonda görev

alır. Aksiller, areolar ve anal bölgelerde apokrin ter bezleri bulunur. Subkütan doku içine gömülüdür ve kanalları kıl folikülüne açılır. Bu bezler başlangıçta kokusuz olan, ancak bakteriyel bozunma sonucu belirgin bir koku salan, protein, feromon, şeker ve amonyak içeren yapışkan bir salgı üretirler^{120, 122, 126, 127}.

2.3.8. Kıllar

Kıllar, epidermal epitelin invajinasyonlarından türeyen, uzun ve keratinize yapılardır. Renk, boyut ve yerleşimi, ırk, yaş, cinsiyet ve bulunduğu vücut bölgesine göre değişir¹²⁰.

2.3.9. Tırnaklar

Tırnak, keratinize epitelyal hücre plaklarıdır. Derinin SC'una karşılık gelen tırnak plağı, tırnak yatağı denilen bir epidermis yatağı üzerine oturur¹²⁰.

2.3.10. Derinin Damar ve Sinirleri

Deriyi besleyen arteriyel damarlar iki pleksus oluşturur. Biri papiller ve retiküler tabakalar arasında, diğeri ise dermis ile sc doku arasında yerleşmiştir. Bu pleksuslardan çıkan ince dallar dermal papillaları damarlandırır. Venler, ikisi arteriyel damarlar için tarif edilen konumda ve üçüncüsü de dermisin orta kısmında olmak üzere, üç pleksus halinde düzenlenmiştir^{120, 122}.

Lenfatik damarlar dermisin papillasında kör kesecikler olarak başlar ve arteriyel damarlarda tarif edildiği gibi iki pleksus oluşturmak üzere birbirine sokulurlar.

Derinin en önemli fonksiyonlarından biri bol miktarda duyuşal sinir donanımı ile çevreden uyarıları almaktır. Epidermis ve kütanöz bezlerdeki serbest sinir sonlanmalarına ek olarak, dermiste ve sc dokuda reseptörler mevcuttur¹²⁰.

2.4. Perkütan Emilim

Yassılaşıp keratin dolu ölü hücreler (korneosit) içeren ve derinin en dış tabakası olan SC, transepidermal su kaybını azaltan lipofilik bir bariyerdir. Ayrıca, bu tabaka ilaçların deriden penetrasyonu için başlıca bariyeri oluşturur. SC'un, seramit, kolesterol ve yağ asitlerinden oluşan intersellüler lipit bileşimi, perkütan emilimde önemli rol oynar^{124, 128}.

SC'dan moleküllerin geçişi, basit difüzyon ile kontrol edilir. Fick'in difüzyon kanunu, bileşiklerin deriden permeasyonu için uygulanabilir¹²⁹⁻¹³².

Denge durumunda difüzyonu tanımlayan Fick'in 1. Yasası Eşitlik 5 ile gösterilmiştir¹³².

$$J = \frac{DK(C_f - C_r)}{h} \quad \text{Eşitlik 5}$$

$$J = \frac{DK\Delta C}{h} \quad \text{Eşitlik 6}$$

J: akı (g.cm⁻².saniye⁻¹)

D: difüzyon katsayısı (cm²/saniye)

K: deri ile formülasyon arasındaki partiyon katsayısı

C_f: formülasyondaki derişim (g/cm³)

C_r: reseptör kompartmandaki derişim (g/cm³)

ΔC: derişim farkı (g/cm³)

h: intersellüler kanallarda difüzyon yolu uzunluğu (cm)

Normal durumlarda, uygulanan formülasyonundaki ilaç derişimi, deriatı derişimlerden çok büyüktür. Bu yüzden, bu eşitlik, Eşitlik 7 halini alır¹³².

$$J = k_p C_f \quad \text{Eşitlik 7}$$

k_p : permeabilite katsayısı (cm/saniye)

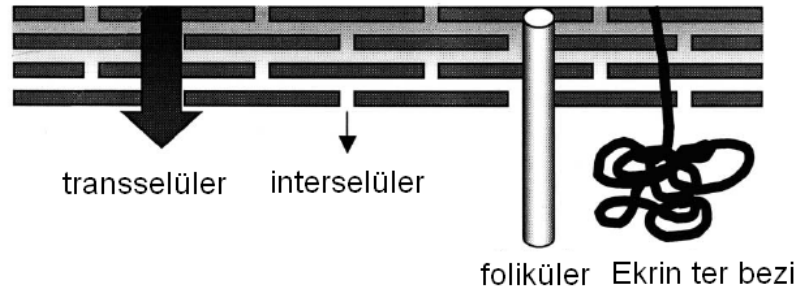
C_f: formülasyondaki derişim (g/cm³)

$$k_p = \frac{KD}{h}$$

Eşitlik 8

Bir bileşiğin deriden penetrasyonu üç ana yol ile olabilir (Şekil 6):

- İntersellüler yol (Korneositler arasındaki ince lipit tabakası boyunca)
- İntrasellüler (Transsellüler) yol (Korneositten korneosite geçiş)
- Kıl folikülleri ile yağ bezi ve ter bezi kanalları gibi yan geçit yolu



Şekil 6. Deriden penetrasyon yolları¹³²

Normal koşullarda, en önemli penetrasyon yolunun intersellüler boşluklardan olduğu belirtilmektedir. Saç folikülleri, yağ ve ter bezi kanallarından bileşiklerin geçişi sınırlıdır. Çünkü bu yollar derinin tüm yüzey alanının % 1'inden azdır¹³³. Bununla birlikte kıl foliküllerinin, uzun dönemde ilaçlar için depo görevi görerek, intersellüler yoldan daha hızlı penetrasyon sağlayabildikleri de belirtilmiştir¹³⁴⁻¹³⁶. Genelde, lipofilik bileşiklerin, lipit çifte tabakada çözünerek intersellüler yol ile penetre oldukları düşünülür. Korneositler arasındaki eğri-büğrü intersellüler yol dikkate alındığında, bileşiklerin difüzyon için izledikleri yolun SC'un kalınlığından (~20 µm) daha fazla, 500 µm kadar olduğu bulunmuştur¹³⁷. Hidrofilik bileşikler ise, transsellüler yoldan proteince zengin korneositlerden geçerler. Kimyasal açıdan amfifilik özellikteki moleküller en iyi penetre olurlar. Ayrıca bileşiklerin stereokimyasal karakterleri ve molekül ağırlıkları da emilimde önemlidir¹³⁴.

Deriden emilimde etkili en önemli fizikokimyasal özellikler, partiyon katsayısı, difüzyon katsayısı ve çözünürlüktür. Yüksek partiyon katsayısı, akıyı artırır fakat aynı zamanda çözünürlük de azalır. Genellikle, $\log K_{oct} \sim 1-3$ olan moleküller optimum partiyona sahiptirler. Yağda ve suda dengede çözünürlüğe sahip bileşiklerin emilim için, uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, permeasyon iyonizasyon derecesine ve bunun çözünürlüğü etkileyişine de bağlıdır. İlaçları iyonize formda uygulamanın emilimde yararlı olacağı yönünde bulgular bulunmaktadır¹³⁷.

2.5. Bant ile Soyma (Tape Stripping)

Derinin SC tabakası, vücuda yabancı bileşiklerin girişini önleyen veya endojen bileşiklerin salgılanmasını sınırlayan en dış bariyer olarak görev yapar. Bu nedenle, birçok dermatolojik çalışma bu deri tabakasının incelenmesi üzerinedir. SC'un yapışkan bantlar kullanarak soyulması yöntemi olan bant ile soyma (tape-stripping), bu tür çalışmalarda yararlı bir yöntem olarak görülmektedir¹³⁸. Bu noninvasif yöntem, hem in vivo, hem in vitro, insan¹³⁹⁻¹⁴⁵ ve hayvan çalışmalarında^{146, 147} kullanılmaktadır. Bant ile soyma, topikal uygulanan formülasyonlardan ilaçların penetrasyonunu ve depo olarak davranışlarını¹⁴⁸⁻¹⁵¹ araştırmak ve ayrıca SC'un fizyolojisini^{152, 153} ve epidermal yara iyileşmesini^{154, 155} incelemek için temel bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

2.5.1. Bant ile Soyma Yönteminin Prensibi

Bant ile soyma yönteminde SC'un bant ile soyulması işlemine topikal formülasyon uygulanmasından ve formülasyonun penetrasyonundan sonra başlanır. Yapışkan bantlar, deride aynı uygulama alanına arka arkaya uygulanır ve kaldırılır. Bu bantlar, SC ve topikal olarak uygulanan etkin maddeleri içerir. İlk bantlar tam bir korneosit hücre tabakası içerirken, bant ile soyma sayısı arttıkça, alınan korneositler giderek azalır. Her bant ile alınan SC miktarını, topikal olarak uygulanan

formülasyonun özellikleri de etkiler. Örneğin etanol içeren bir çözeltinin uygulanmasından sonra, yapışan boynuzsu tabaka artarken, yağlı bir formülasyonun uygulanmasından sonra banta yapışan korneosit miktarı azalır¹³⁸.

2.5.2. Bant ile Soyma Yönteminin Özellikleri ve Basamakları

2.5.2.1. Uygulama Bölgesi

Bant ile soyma uygulanacak bölge, kıllı, kaslı veya geçmişten gelen herhangi bir yara izi olan bir bölge olmamalıdır. Kıllı bir bölge kullanılacak ise, SC'un alınmaması için, kılların traş yapılmadan, makas ile kesilmesi gereklidir¹³⁸.

2.5.2.2. Bantın Cinsi

Bant ile soyma yönteminde kullanılmak üzere birçok yapışkan bant vardır. Bantın saydamlık, esneklik gibi genel özellikleri ile bant ile alınan SC miktarının saptanması için uygun yöntemin belirlenmesi gereklidir. Ayrıca istenmeyen etkileri önlemek için, bantın deri ile geçimliliği ispatlanmalıdır¹³⁸.

2.5.2.3. Bantın Uygulanışı

Bantın cinsi kadar, uygulanan basınç, süresi ve uygulanan anatomik bölge de alınan SC miktarını etkileyen etkenlerdendir¹⁵⁶. Şimdiye kadar standardize edilmemiş olsa da, bantların deriden kaldırılma hızı, alınan SC miktarını etkileyen diğer bir etkendir. Bantın çekilmesi sırasında, her zaman sabit hız kullanılmalıdır. Deri yüzeyinden yavaş alınması, bant üzerine yapışan SC miktarında artışa neden olurken, hızlı alınması ise korneosit miktarında azalış ile sonuçlanır¹⁵⁷.

2.5.3. Stratum Korneum Miktarının Saptanma Yöntemleri

Genel olarak, bantların üzerinde korneosit dağılımının homojenliği öncelikle, göz ile kontrol edilmelidir. Bant ile soyma yönteminde, banta

yapışan SC miktarını saptamak için, birçok yöntem önerilmiştir. Bunlar, bantların tartılması¹⁵³, spektroskopik yöntem¹⁵⁸, mikroskopik ölçümler¹⁵⁹ ve transepidermal su kaybının (TEWL) ölçülmesidir¹⁶⁰.

2.5.3.1. Tartma Yöntemi

Alınan SC miktarını saptamak için, deri üzerine uygulanmadan önce ve deri yüzeyinden kaldırıldıktan sonra bantın tartılması sıklıkla kullanılan bir yöntemdir^{146,149,161}. Fakat sebum ve topik uygulanan bileşikler, ilk bantlar için ağırlık farkını artırabilir. Ayrıca, birkaç banttıan sonra çıkan interstisyel sıvı, daha derin kısımlardan alınan bant ile soyma örneklerinde ağırlık farkını artırabilmektedir. Yapışkan bantların uçucu bileşimi de zamana bağılı olarak ağırlıkta azalışa neden olabileceğinden, uygulamadan önce bantların incelenmesi gereklidir¹³⁸.

2.5.3.2. Protein İçeriğinin Saptanması Yöntemi

Korneositlerdeki protein miktarının saptanması, alınan SC miktarını saptamak için bir yöntemdir¹⁶². Protein miktarı UV spektrometresinde ölçülebilir. Banttıan ya da uygulanan bileşikten gelecek başka bileşikler, yöntemin uygulamasında sorun yaratabilir¹³⁸.

2.5.3.3. Optik Spektroskopi Yöntemi

Deriden alınan bant örneğı, UV/vis spektrometresi ile ölçölür. Korneosit agregatları ışığın geçişini azaltır ve korneositlerin psödo-absorpsiyonu, alınan SC miktarını saptamak için kullanılabilir¹⁶³.

2.5.3.4. Mikroskop Yöntemi

Bir bant üzerine yapışmış korneosit yoğunluğunu saptanmak için mikroskopta incelenebilir¹⁵⁹.

2.5.3.5. Transepidermal Su Kaybının (TEWL) Ölçülmesi

Bant ile soyma ile gerçekleşen SC kalınlığındaki düşüş, TEWL değerinde artış ile sonuçlanır^{164, 165}. TEWL, birkaç bantın kaldırılmasından önce ve sonra ölçülür. SC'ü homojen membran olarak kabul eden Fick'in yasasına göre, 1/TEWL ile yığılmalı olarak alınan SC miktarı arasında doğrusal korelasyon vardır¹⁶⁴. Bu ilişki deri üzerinde kalan SC miktarını saptamak için kullanılmıştır. Fakat her bant tek başına bu miktarı saptamak için uygun değildir. Kalan SC miktarı ise, bağıl miktar olarak hesaplanmaktadır. Ayrıca, hassas TEWL ölçümü, çevre koşullarından, topik uygulanan bileşiklerden ve interstisyel sıvıdan etkilenir¹³⁸.

2.5.4. İn Vivo İnsan Çalışmalarında Bant ile Soyma Yönteminin Kullanılması

Bant ile soyma yönteminde, bant ile alınan soyma örnekleri sadece korneosit ve penetre olan etkin maddenin miktarları hakkında değil, etkin maddenin SC'un farklı derinliklerindeki dağılımı ile ilgili de bilgi sağlar. Bu nedenle, bant ile soyma topikal ilaçların BY'larını incelemek için temel bir yöntemdir^{161, 166, 167}.

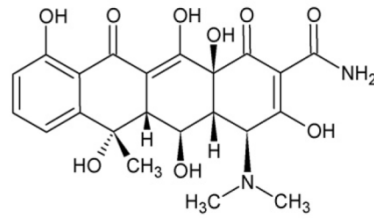
Ayrıca, bant ile soyma diğer bir ifadeyle DFK yönteminin, topikal ürünlerin BE'lerini saptamak için kullanılabileceği belirtilmektedir^{103, 105, 168, 169}. Bu amaçla, derinin hedef bölgesindeki ilaç seviyelerinin bir ölçütü olarak, derinin en dış tabakası olan SC'daki seviyelerin örneklenmesi önerilmektedir. Formülasyonun uygulandığı bölgedeki SC'da bulunan etkin maddenin çoğu, aynı bölgeye en az dokuz kez tekrarlı bant yapıştırılması ile alınabilmektedir¹⁶⁸. Ön kol üzerinde test ya da referans formülasyonun uygulandığı farklı bölgelerde, zamana karşı etkin madde seviyelerinin izlendiği bu yöntem, sistemik ilaçlar için kullanılan kan seviyelerinin değerlendirilmesi yöntemine benzer şekilde yorumlanabilir. İnsanda in vivo olarak uygulanmasının kolay olması avantajını sunan yöntemin, tüm

topikal dermatolojik ürünlere uygulanabileceği de belirtilmektedir^{103, 105}. Bu amaçla, lidokain, triamsinolon asetonit, tretinoin ve ketoprofen formülasyonlarının insanlar üzerinde in vivo topikal BE'lerinin, DFK yöntemi ile değerlendirilebileceği gösterilmiştir^{117, 170-172}.

2.6. Oksitetrasiklin

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Kimyasal Yapısı:



Şekil 7. Oksitetrasiklinin kimyasal yapısı^{173, 174}

Kimyasal Adı: (4S,4aR, 5s, 5aR, 6S, 12aS)-4-(Dimetilamino) 1, 4, 4a ,5, 5a, 6, 11, 12a-oktahidro-3, 5, 6, 10, 12, 12a-hekzahidroksi-6-metilen-1, 11-dioksinaftasen-2-karboksamit¹⁷⁵

Kapalı formülü¹⁷⁵: C₂₂H₂₄N₂O₉

Molekül Ağırlığı¹⁷⁵: 460.4

Oksitetrasiklin (OTC), OTC, OTC hidroklorür, OTC dihidrat ve OTC kalsiyum tuzu şeklinde bulunur¹⁷³.

OTC HCl'ün CAS Numarası¹⁷⁶: 2058-46-0

OTC HCl'ün Molekül Ağırlığı: 496.9

OTC HCl, 90°C üzerinde güneş ışığına ve neme maruz kaldığında koyulaşan; sarı, higroskopik, kristal bir tozdur. 180°C üzerinde dekompoze olur^{175, 176}.

OTC HCl'ün Çözünürlüğü¹⁷⁷: 2 k suda 1 k, 45 k etanolde 1 k olarak çözünürlüğe sahip olup, kloroform ve eterde pratik olarak çözünmez.

pK_a¹⁷⁷: 3.3, 7.3, 9.1 (25 °C)

logP (oktanol/pH 7.5)¹⁷⁷: -1.6

2.6.2. Oksitetrasiklinin Miktar Tayin Yöntemleri

OTC'in farmasötik dozaj şekillerinde ve biyolojik materyallerde miktar tayini için geliştirilmiş, kapiller elektroforez^{178, 179}, elektrokimyasal¹⁸⁰, kolorimetrik¹⁸¹⁻¹⁸³ yöntemler ve MS^{184,185}, floresans¹⁸⁶, UV^{187,188} dedektörlerin kullanıldığı kromatografik yöntemler bulunmaktadır.

2.6.3. Farmakolojik Özellikleri

Tetrasiklinler yapıca birbirine çok yakından benzeyen ve tetrasiklik bir bileşik olan naftasenkarboksamid'den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. FK özelliklerindeki farklılık dışında, antimikrobiyal etkileri birçok yönüyle birbirine benzer. Streptomyces aureofaciens'ten izole edilen klortetrasiklin ile 1948'de kullanılmaya başlanmıştır. OTC, Streptomyces rimosus'tan izole edilir. Yeni türevleri yarısentetiktir. Tetrasiklinler 1. ve 2. nesil olmak üzere iki gruptur (Tablo 1). Klortetrasiklin, OTC ve tetrasiklin ilk türevler olup, 2. grup, metasiklin ve demeklosiklin yarısentetiktir. 3. grup, minosiklin ve doksisisiklin ise yeni türevlerdir. Artmış antibakteriyal etki ve iyi emilim, uzun süreli etki gibi, gelişmiş FK özellikleri vardır^{189, 190}.

Tablo 1. Tetrasiklin alt grupları¹⁹⁰

1. Nesil		2. Nesil
1. Grup	2. Grup	3. Grup
• Oksitetrasiklin • Tetrasiklin • Klortetrasiklin	• Metasiklin • Demeklosiklin	• Minosiklin • Doksisisiklin

Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteristatik etki oluştururlar. Bakteri hücresi içine girdikten sonra, bakteriyel ribozomun 30 S alt ünitesindeki reseptörlere tersinir olarak bağlanırlar. Böylece 30 S alt birimlerinin, mRNA-ribozomal kompleksi üzerindeki akseptör noktasına aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve peptit zincirine yeni aminoasitlerin eklenmesini güçlü bir biçimde önleyerek protein sentezini inhibe eder¹⁹¹.

Tetrasiklinler oldukça fazla sayıda ve çeşitli gruplardan aerobik ve anerobik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere ve ayrıca riketsiyalara, klamidyalara, spiroketlere, mikoplazmalara ve bazı protozoa ve mikobakterilere karşı etkilidirler. Bu nedenle en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir^{191, 192}.

Tetrasiklinler, atipikal pneumoniae, sinuzit ve bronşit gibi solunum yollarının karışık bakteriyel enfeksiyonlarında etkilidir. Kolera vibriolarının yayılmasını hızla durdurur. Fakat epidemilerde tetrasikline karşı direnç ortaya çıkar. Akne, üriner sistem enfeksiyonları, bronşit alevlenmesi, lime hastalığı, tekrarlayan ateş ve leptospiroz tedavide kullanıldığı diğer alanlardır. Bruselloz, tularemi ve vebada tetrasiklinler bir aminoglikozitle kombine edilerek verilebilir^{192, 193}.

Günümüzde, tetrasiklinlere karşı direnç gelişmesi, yeni ve etkili antibiyotiklerin ortaya çıkması ile tetrasiklin kullanımında azalmaya neden olmuştur. Fakat, tetrasiklinlerin dermatolojideki önemi hala korunmakta, akne vulgaris, rozasea ve perioral dermatit gibi yerleşmiş kullanım endikasyonları dışında, enfeksiyöz olmayan, daha çok inflamatuvar ve otoimmün deri hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Yalnız, ya da nikotinamit ile birlikte büllöz pemfigoid ve linear Ig A dermatozunda kullanılmaktadır. Eritema migransa karşı etkilidir^{193, 194}. *Vibrio vulnificus* ve *M. Marinum*'a karşı etkili olduğu için, enfekte yaraların tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır¹⁹⁴.

2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri

Tetrasiklinler oral alındıklarında, doksisisiklin ve minosiklin hariç, açlık durumunda daha iyi emilim gösterirler. Emilimleri alüminyum hidroksit jel, kalsiyum, magnezyum, demir veya çinko tuzları, bizmut subnitratın etkilenir. Tetrasiklinler içinde, OTC ve tetrasiklin kısa-etkili ajanlardır. Renal bozukluk, doksisisiklin hariç tetrasiklinlerin yarı ömrünü uzatır. Renal bozukluğu olan hastalarda kullanılmamalıdır¹⁹³. Azalmış renal filtrasyon sonucunda serum seviyeleri artarak hepatotoksisteye neden olabilir. Bununla birlikte, doksisisiklin ve minosiklin hepatobiliyer ve gastrointestinal kanaldan (GIK) atılır ve renal bozukluğu olan hastalarda kullanılabilirler¹⁹¹. Tetrasiklinler hemodiyaliz ile yavaş bir şekilde uzaklaştırılırlar, fakat peritonal diyalizle etkili bir şekilde uzaklaştırılamazlar. Hepatik bozukluğu olan hastalarda, potansiyel hepatotoksiste nedeniyle kullanılmamalıdır¹⁹³. Barbitürat, karbamazepin, fenitoin gibi antikonvülzanlar tetrasiklinlerin hepatik mikrozomal metabolizmasını artırır ve serum derişimlerini azaltır. Kolestiramin ve kolestipol ile GI emilim azalır. Oral kontraseptiflerin etkisi azalabilir. OTC, % 58 oral emilim gösterir. Yiyecek etkisi emilimi azaltır. Biyolojik yarı ömrü 6-10 saat arasındadır. Primer atılım yolu renal yoldur¹⁹¹. Sağlıklı gönüllülerde 500 mg İV tek doz olarak uygulanan OTC ile gerçekleştirilen FK çalışma ile OTC'in biyolojik yarı-ömrü ($t_{1/2}$) 9.2 ± 0.5 saat olarak bulunmuştur. Sanal dağılım hacmi (V_d) 128.0 ± 4.7 Litre, serumdan CL'i 162 ± 14 mL/dak olarak bulunmuştur. OTC, kreatin CL'inin % 85 ± 14 'ü olacak şekilde, böbreklerden hızlı klirens uğrar. Renal CL hızı, idrar akış hızından bağımsızdır. İdrarla atılan ilaç miktarı ortalama uygulanan dozun % 70'i kadardır. Plazma proteinlerine bağlanması % 20'dir¹⁹⁵. Kısa süreli etkili OTC için önerilen doz, 6 saatte bir 250-500 mg'dır¹⁹³.

2.6.5. Yan Etkiler

En sık görülen yan etkileri epigastrik yanma, abdominal rahatsızlık, bulantı, kusma gibi doz ile ilişkili GI yan etkilerdir. Gastrik yan etkiler yiyecek ile birlikte ilacın alınması ile azaltılabilir. Tetrasiklinler, yüksek doz alan hastalarda ve hamilelerde hepatotoksiktir. En önemli yan etkileri fotosensitivite ve dişlerde renklenmedir. Tetrasiklinlerin gebelik, emzirme ve sekiz yaş altı çocuklarda kullanımı kontraendikedir^{191, 196}.

2.7. **Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhemi**

OTC HCl'ün Türk İlaç Piyasasında Terramycin® (Phzer) ve Polimisin® (Koçak Farma) deri merhemi olmak üzere iki preparatı bulunmaktadır. Merhem formülasyonları özel bir vazelin sıvağı içinde süspansiyon halinde, her gramında 30 mg OTC HCl ve 10000 IU polimisin B sülfat içermektedir. Geniş spektrumlu OTC bakteriyostatik, polimiksin B sülfat ise, bakteriyosit etkilidir. Derinin primer ve sekonder enfeksiyonlarına karşı çok etkili bir antibakteriyel preparattır. Piyodermit, püstüllü dermatit, yara ve yanıklarla birlikte olan enfeksiyonların lokal tedavisinde endikedir. Steril bir gazlı bez üzerine konulan merhem, cilt temizlendikten sonra, hasta bölgeye günde 2-3 kez uygulanır.

Her ne kadar OTC'nin dermal uygulamasını takiben, sistemik emilimi olduğuna dair yayınlanmış bir bilgi olmasa da, bütün tetrasiklinlerde olduğu gibi hamilelerde, emzirme döneminde, belirgin hepatik veya renal disfonksiyon hikayesi olanlarda kullanılmamalıdır¹⁹⁷. Kişisel aşırı duyarlılığa bağlı kontakt dermatit dahil, alerjik reaksiyonlar nadir olarak bildirilmiştir. Bu tür reaksiyonlarda OTC tedavisi kesilmelidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril (HPLC grade)	Riedel
Eter	Gurup Deltalar
Formik asit, $\geq$ % 95	Merck
Fosforik asit	Riedel
Hidroklorik asit, % 37	Merck
Metanol (HPLC grade)	Riedel
Oksalik asit	Fluka
Oksitetrasiklin hidroklorür	Fluka
Polimiksin B sülfat	Fluka
Serum fizyolojik	Eczacıbaşı/Baxter
Sodyum asit fosfat	Merck
Sodyum fosfat	Merck
Sodyum klorür	Merck

Çalışmada kullanılan OTC HCl içeren ticari preparatlar Terramycin® ve Polimisin® deri merhemleridir. Terramycin® (Seri no: 120, üretim tarihi: 09-2008) ve Polimisin® (Seri no: 1426701, üretim tarihi: 03-2007), gramında 30 mg OTC HCl ve 10000 ünite (1 mg standart polimiksin B'ye eşdeğer) polimiksin B sülfat içermektedir.

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

HPLC, UV dedektör, pompa, injection port ve 20 µL Rheodyne lup	Hewlett-Packard Series 1050
50 µL Rheodyne lup	Hewlett-Packard Series 1050
İntegratör	Hewlett-Packard Series 3396
C18, 5µm, 250×4.6 mm. ters-faz kolon	ACE 5C-18

Enjektör, 50 µL	Hamilton
ACQUITY UPLC® Sistemi	Waters
Quattro Premier™ XE tandem	
quadrupole mass spektrometre	Waters
Acquity UPLC® BEH C18	
1.7 µm, 2.1x100 mm kolon	Waters
UPLC için 2 mL'lik cam vial	Waters
UPLC için 300 µL'lik cam insert	Waters
Peristaltik pompa	Alltech
Filtre tutucu	Alltech
Membran filtre, 0.22 µm'lik, Nylon 66	Aldrich
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Biohit Proline/Isolab
Otomatik pipet, 10-100 µL	Biohit Proline/Isolab
Spektrofotometre	Beckman DU-600
TA.XT.Plus Texture Analyser	Stable Micro Systems, UK
Rotasyonel Viskozimetre	Brookfield RVIII +Rheometer, USA
pH metre	Schott CG 840
Ultrasonik banyo	Branson 221
Vorteks	Firlabo.sa
Manyetik karıştırıcı su banyosu	Nüve Laboratory Equipments
Isıtıcı	Heto/DT Hetotherm
Bant	Crystal Tape 3M Scotch®, USA
CMA 66 Lineer katater	CMA/Microdialysis
(poliariletersulfon membran, membran uzunluğu: 30 mm, membran çapı:0.5 mm, membran cut-off: 20 kDalton)	
Intoducer iğne	CMA/Microdialysis
CMA 107 Mikrodiyaliz Pompası	CMA/Microdialysis
CMA 106 Şırınga	CMA/Microdialysis
Mikrotüp	CMA/Microdialysis

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR

3.2.1.1.Oksitetrasiklin Hidroklorürün UV Spektrumu

OTC HCl'ün bidistile suda (24 µg/mL) 200-800 nm arasında 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanılarak köre karşı spektrumu alındı ve λ_{maks} değeri saptandı.

3.2.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilitesi

Derin Dondurucudaki Stabilitesi

Serum fizyolojikte üç değişik derişimde (0.200, 2.00, 4.00 µg/mL) OTC HCl içeren örnekler hazırlandı. Bu örnekler -70°C'de derin dondurucuda saklandı. 15, 30 ve 55 gün sonra HPLC ile analiz edildi. Ölçümler üç defa tekrarlandı. İstatistiksel olarak değerlendirildi.

Buzdolabındaki Stabilitesi

Serum fizyolojikte üç değişik derişimde (1.60, 3.20, 4.80 µg/mL) hazırlanan OTC HCl içeren örnekler, +4°C'de 5 gün boyunca saklandıktan sonra HPLC analizleri yapıldı. Ölçümler üç defa tekrarlandı. İstatistiksel olarak değerlendirildi.

Dondurma-Çözme Periyodu

Derin dondurucuda (-70°C) saklanan, 3 değişik derişimde (0.200, 2.00, 4.00 µg/mL) serum fizyolojik içinde OTC HCl içeren örneklerle, birbirini takip eden iki gün, iki kez dondurma-çözme işlemi uygulandı ve HPLC ile analiz edildi.

3.2.1.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler

3.2.1.3.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini

OTC HCl merheminde etkin madde miktar tayini için USP 26'daki geçerli olan yöntem uygulandı¹⁹⁸. Tam olarak tartılmış Referans (Terramycin® deri merhemi) (1.73 g)/Test (Polimisin® deri merhemi) (1.62 g), 50 mL eterde 15 dakika boyunca vorteks ile çalkalandı. 20 mL 0.1 N HCl ilave edilerek 5 dakika vorteks ile çalkalandı. Bu işlem sonunda asitli kısım ayırma hunisinden ayrılarak toplandı. Kalan eterli kısma üç defa daha 20 mL 0.1 N HCl ilavesi ile 5 dakika vorteks ile çalkalama yapıldı ve asitli kısım ayrılıp alındı. 100 mL'lik balon jodede toplandı. Sonunda 0.1 N HCl ile 100 mL'ye tamamlandı. Buradan 1 mL alınıp, 50mL'ye balon jodede distile su ile tamamlandı. HPLC'de analiz edildi. Gerekli hesaplar yapılarak, etkin madde miktarının etiket değerinin % kaç olduğu hesaplandı.

Oksitetrasiklin HCl Miktar Tayini için Kullanılan HPLC Yöntemi :

Kolon: Reverse phase-C-18, 5 µm, 250×4.6 mm

Mobil faz: Metanol:0.01 M Oksalik asit (40:60)

Akış Debisi:1 mL/dak

Enjeksiyon Hacmi:20 µL

Bastırma (attenuation): 5-8

Eşik seviyesi (threshold):1

Kağıt hızı (Cht sp): 0.6 cm / dak

Pik genişliği (Pk wd): 0.16 cm

Dalga boyu: 354 nm

Oksitetrasiklin pikinin alıkonma zamanı: 4.96 dak

3.2.1.3.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi*

Test ve referans formülasyonların viskoziteleri, sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmış Brookfield viskozimetresi kullanılarak, spindle no: 52 ile ölçüldü. Her iki formülasyonun viskozluk ölçümleri için, 0.2-0.6 s⁻¹ aralığında değişen kayma hızları kullanıldı.

3.2.1.3.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi

Test ve referans formülasyonların homojenlik denetimi, cilt üzerine sürülerek ve polarize mikroskop* (Leica DMEP Polarize Mikroskop, oküler: 10X122, objektif: 5) ile incelenerek yapıldı.

3.2.1.3.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi

Test ve referans için, 10'ar adet numune alındı. Tüpler tek tek tartıldı. İçeri tamamen boşaltıldı. Tüpler tekrar tartılarak, içerindeki preparat miktarı hesaplandı.

3.2.1.3.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi

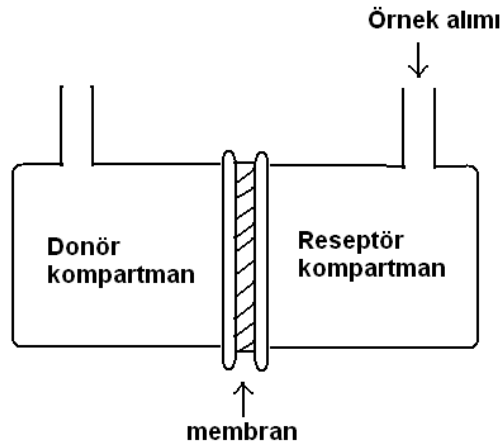
Referans (Terramycin®) ve Test (Polimisin®) preparatlarının salım özellikleri yatay difüzyon hücresi kullanılarak incelendi (Şekil 8). Salım deneyi için, donör fazda 3 mL formülasyon kullanıldı. Membran olarak, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalından, cerrahi operasyon sonrası temin edilen, insan meme derisi kullanıldı. Yağ dokusundan, temizlenerek tamamen ayrılan meme derisi, SC en üst

* Brookfield viskozimetresi ve polarize mikroskopun kullanılmasında göstermiş olduğu yardımlarından dolayı, Sayın Uzm. Ecz. Şeyda AKKUŞ'a teşekkür ederiz.

tabakası donör faza gelecek şekilde difüzyon hücresine yerleştirildi. Formülasyon ile temas halindeki yüzey alanı olarak, 1.54 cm²'lik bir difüzyon alanı kullanıldı. Deney, her formülasyon için, 4 paralel hücrede 35°C'de gerçekleştirildi. Salım ortamı olarak, 3 mL pH 7.4 izotonik fosfat tamponu kullanıldı. Hücrelerin reseptör kompartmanları deney boyunca sabit hızda mıknatıs ile karıştırıldı. Örnekler, 15., 30., 60., 90., 120., 180. ve 240. dakikalarda 50 µL olarak alındı. HPLC ile analiz edildi.

İzotonik fosfat tamponu:

Sodyum asit fosfat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O).....	2.1 g/L
Sodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	19.1 g/L
NaCl.....	4.4 g/L



Şekil 8. Yatay difüzyon hücresi

3.2.1.4. İn vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi

3.2.1.4.1. Kullanılan Yöntem

Bölüm 3.2.1.3.1'de belirtilen HPLC yöntemi, 0-5 değerleri arasında bastırma (attenuation) değeri kullanılarak uygulanmıştır.

3.2.1.5. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu

3.2.1.5.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

501 µg/mL derişimdeki OTC HCl'ün serum fizyolojikteki stok çözeltisinden hareketle, 0.0310, 0.0620, 0.125, 0.250, 0.501, 1.00, 2.00, 4.01, 6.01 µg/mL derişimde örnekler hazırlandı. HPLC ile analizleri yapıldı. Her derişimin analizi üç kez tekrarlandı. Pik yükseklikleri bulundu. OTC HCl'ün derişimlerine karşılık gelen pik yüksekliklerine doğrusal regresyon uygulanarak, standart doğru denklemi ve uyum ölçütleri bulundu.

3.2.1.5.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde

OTC HCl'ün beş farklı derişimde (0.250, 0.501, 1.00, 2.00, 4.01 µg/mL) serum fizyolojikte çözeltisi hazırlandı. HPLC ile analizleri yapıldı. Her derişimin ölçümü üç kez tekrarlandı. Pik yükseklikleri bulundu. Standart denklem kullanılarak bu örneklerin % gerieldesini hesaplandı. Her derişimin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Standart sapma, bağıl sapma ve güven aralıkları hesaplandı.

3.2.1.5.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Analitik yöntemin kesinliği, sistemin ve yöntemin kesinliği olmak üzere iki şekilde değerlendirildi:

Sistemin kesinliği için, 1.00 µg/mL OTC HCl içeren örnek hazırlandı. HPLC ile analizi aynı gün içinde altı kez tekrarlanarak % gerielde hesaplandı. Tekrarlanan ölçümlerin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı.

Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik (deney-içi kesinlik) ve tekrar elde edilebilirlik (deneyler-arası kesinlik) olarak değerlendirildi.

Tekrarlanabilirlik, üç farklı derişimde (0.501, 2.00, 4.01 µg/mL) hazırlanan örneklerin aynı gün içinde üç defa analizi yapılarak saptandı.

% gerielde hesaplandı ve her derişim için istatistiksel değeriendirme yapıldı.

Tekrar elde edilebilirlik için, OTC HCl'ün 2.00 µg/mL derişimde hazırlanan örneği birbirini takip eden üç farklı günde üçer kez analiz edildi. % gerielde edilen miktar hesaplanarak, istatistiksel olarak değeriendirildi.

3.2.1.5.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

Yöntemin, serum fizyolojik içeriğinden ve formülasyonda bulunan polimiksin B sülfattan etkilenmediği HPLC kromatogramları incelenerek değeriendirildi. Polimiksin B sülfatın bidistile suda (300 µg/mL) ve metanolde (100 µg/mL), 200-800 nm arasında 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanılarak köre karşı UV spektrumu alındı. Boş serum fizyolojik, belirli derişimde polimiksin B sülfat ve OTC HCl içeren örneklerin analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramları karşılaştırıldı.

3.2.1.5.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

OTC HCl'ün miktar tayininde kullanılan standart doğrunun hazırlanmasında kullanılan en küçük derişim 0.0310 µg/mL ve farklı olarak 0.0160 µg/mL'lik örnekler hazırlandı. HPLC ile analizleri yapıldı. Bunlar arasında istenilen doğruluğu sağlayan derişim saptandı ve analitik yöntemin kantitatif saptama sınırı (duyarlık sınırı) (LOQ) bulundu. Ayrıca derişimlerin kromatogram üzerinde oluşturdıkları sinyal/gürültü oranları incelenerek analitik yöntemin saptama sınırı (LOD) saptandı.

3.2.1.6. **İn Vitro Mikrodializ Deneyleri**

MD yöntemine ait in vitro gerielde deneyleri, probun OTC HCl örneklerinin derişimi için tekrarlanabilir sonuçlar verip vermediğini kanıtlamak için yapıldı. İn vitro MD deneyleri, Bölüm 3.2.1.6.1 ve 3.2.1.6.2'de anlatıldığı şekilde, in vitro % gerielde ve % kayıp olmak üzere iki yöntem ile yapıldı.

3.2.1.6.1. İn Vitro Gerielde Deneyleri

İn vitro gerielde deneyleri için, serum fizyolojikte bilinen derişimlerde hazırlanan OTC HCl çözeltisinden, CMA 66 Lineer MD katateri (Şekil 9) kullanılarak, MD yöntemi ile örnekler alındı ve HPLC ile analiz edildi.

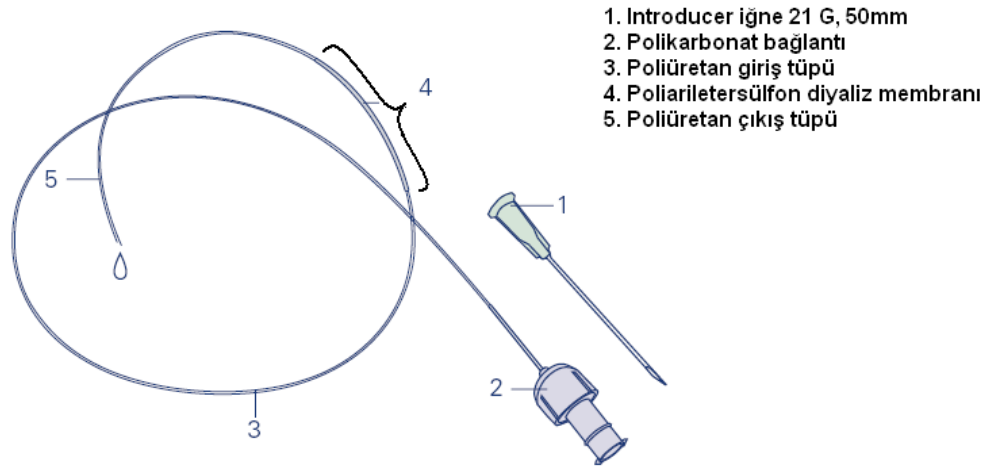
% Gerielde Eşitlik 9 kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Gerielde} = \frac{C_{\text{dializat}}}{C_{\text{ortam}}} \cdot 100 \quad \text{Eşitlik 9}$$

C_{dializat} : Mikrotüplere toplanan dializat örneklerindeki OTC HCl derişimi

C_{ortam} : Bilinen derişimde hazırlanan çözeltideki OTC HCl derişimi

MD katateri boyunca perfüze edilen perfüzyon sıvısının akış debisinin ve ortamdaki OTC HCl derişiminin in vitro gerielde üzerine etkileri sırasıyla, Bölüm 3.2.1.6.1.1 ve 3.2.1.6.1.2’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

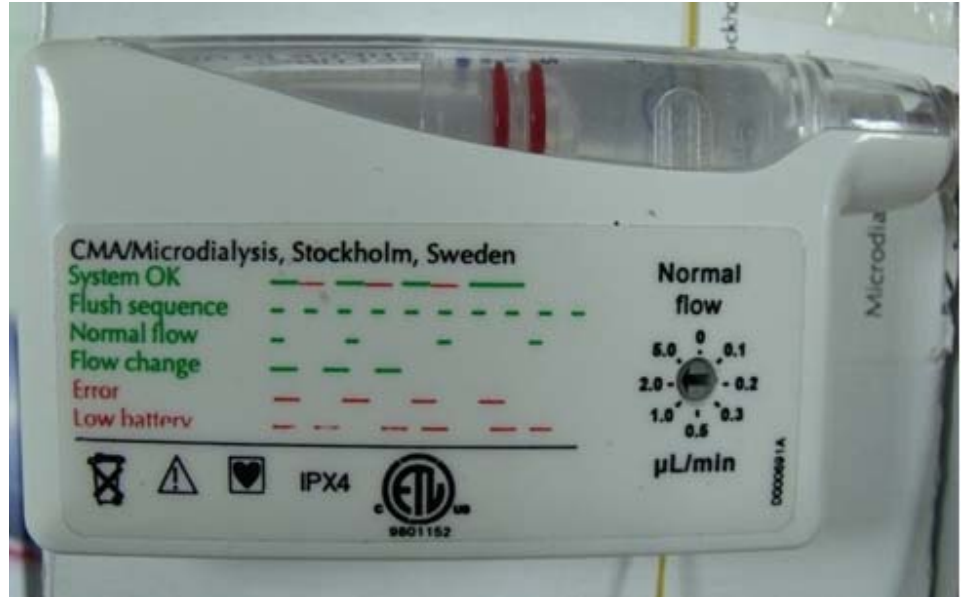


Şekil 9. CMA 66 Lineer mikrodializ katateri ve introducer iğne

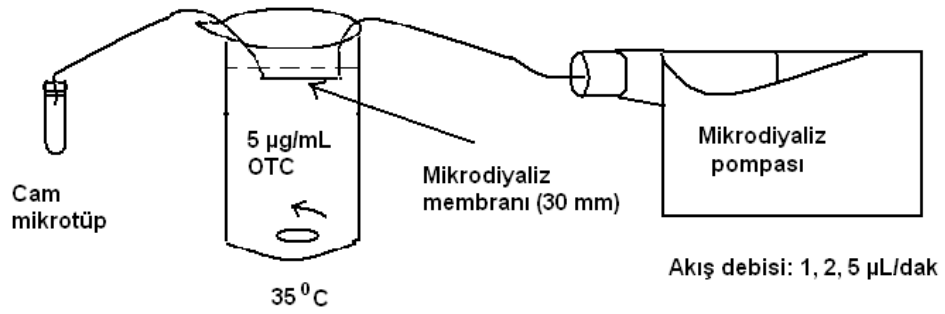
3.2.1.6.1.1. In Vitro Gerielde Üzerine Akış Debisinin Etkisi

MD pompaları çok düşük akış debisinde çalışabilen pompalardır. Akış debisi etkin maddelerin ve endojen bileşiklerin in vitro gerieldesini etkileyen etkenlerden biridir. CMA 107 MD pompası, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2 ve 5 µL/dak akış debisinde çalışabilen bir pompadır. Bu çalışmada, CMA 107 MD pompası (Resim 1) ile 1, 2, 5 µL/dak olmak üzere üç farklı akış debisinde çalışıldı. Akış debisinin in vitro gerielde üzerine etkisini incelemek için, 5.00 µg/mL derişimde hazırlanan OTC HCl çözeltisi 35°C'de sıcak su banyosuna yerleştirildi. Çözelti deney boyunca belirli hızda manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözelti içine MD katateri (CMA 66 Lineer kateter) üzerinde yer alan 30 mm uzunluğundaki membran (poliariletersulfon) yerleştirildi ve çözeltinin bulunduğu beherin üzeri deney süresince buharlaşmayı önlemek amacıyla parafilmle kapatıldı. Katater, bir ucundan MD pompasına (CMA 107 MD Pompası) bağlandı. Serum fizyolojik içeren şırınga MD pompası içine yerleştirildi. MD pompasının akış debisi 1, 2 ve 5 µL/dak olmak üzere, üç farklı akış debisinde deney tekrarlandı. Kataterin diğer ucundan 60 µL MD örnekleri 30 dakika boyunca 300 µL'lik mikrotüplere toplandı. Deneye beş saat devam edildi (Şekil 10). Toplanan örneklerdeki OTC HCl miktarı HPLC ile analiz edilerek saptandı. Yapılan bütün in vitro gerielde deneylerinde aynı yöntem izlendi.

Her bir akış debisine ait % Gerielde Eşitlik 9 kullanılarak hesaplandı.



Resim 1. CMA 107 mikrodializ pompası



Şekil 10. İn vitro gerielde üzerine akış debisinin etkisi deneyi

3.2.1.6.1.2. İn Vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi

İn vitro gerieldeyi etkileyen etkenlerden biri de derişimdir. Bu çalışmada, OTC HCl'ün yedi farklı derişimi için in vitro % gerielde deneyi yapıldı. MD pompasının akış debisi 2 µL/dak olarak ayarlandı. Derişimin in vitro gerielde üzerine etkisini incelemek için, 0.250, 0.500, 1.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0 µg/mL derişimlerinde hazırlanan OTC HCl çözeltileri

kullanıldı. Her bir derişime ait in vitro gerielde deneyi Bölüm 3.2.1.6.1.1’de anlatılan yöntem ile yapıldı. Toplanan örneklerdeki OTC HCl miktarı, HPLC ile analiz edilerek saptandı. Her bir derişime ait % gerielde Eşitlik 9 kullanılarak hesaplandı.

3.2.1.6.2. İn Vitro % Kayıp Deneyleri

İn vitro % kayıp deneyinde, 30 mm uzunluğundaki membran (poliariletersulfon) 200 µL’lik mikrotüpün içine yerleştirildi. Mikrotüpün içi serum fizyolojik ile dolduruldu. Mikrotüpün her iki ucu mikrotüpün plastik tıparıyla kapatıldı. Bunun için mikrotüpün plastik tıparı klavuz kanül yardımıyla kataterin giriş ve çıkış boruları üzerine, membranın başına ve sonuna gelecek şekilde önceden sabitlendi. Böylece membran, serum fizyolojik içeren mikrotüp içerisine yerleştirilmiş oldu. Sistem 35°C ortam sıcaklığı sağlamak amacıyla sıcak su banyosuna yerleştirildi. Katater bir ucundan MD pompasına (CMA 107 MD Pompası) bağlandı. OTC HCl’ün serum fizyolojikte belirli derişimde hazırlanan çözeltisini içeren şırınga MD pompası içine yerleştirildi. MD pompasının akış debisi (2 µL/dak) seçilerek pompa çalıştırıldı. Belirli derişimde OTC HCl içeren serum fizyolojik çözeltisi ile 2 µL/dak hızda perfüze edilen kataterin 30 mm’lik yarıgeçirgen membran kısmından, perfüzyon sıvısından serum fizyolojik ortam sıvısına doğru basit difüzyon ile OTC HCl geçişi oldu. Kataterin diğer ucundan MD örnekleri 30 dakika boyunca 300 µL’lik mikrotüplere toplandı. (Toplanan örneklerin hacmi 60 µL’dir.) Deneye üç saat devam edildi (Şekil 11). Toplanan örneklerdeki OTC HCl miktarı HPLC ile analiz edildi. Yapılan bütün in vitro % kayıp deneylerinde aynı yöntem izlendi.

% Gerielde Eşitlik 10 kullanılarak hesaplandı.

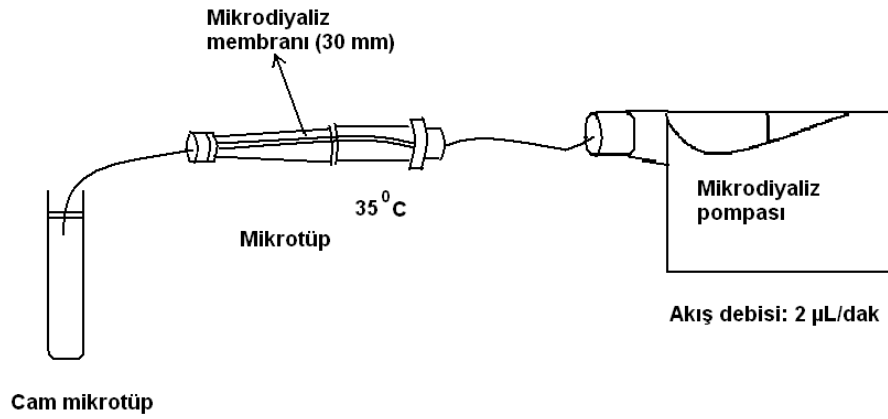
$$\% \text{ Gerielde} = \frac{C_{\text{perfüzat}} - C_{\text{dializat}}}{C_{\text{perfüzat}}} \cdot 100$$

Eşitlik 10

$C_{\text{perfüzat}}$: Perfüzyon sıvısındaki OTC HCl derişimi ($\mu\text{g/mL}$)

C_{dializat} : Mikrotüplere toplanan dializat örneklerindeki OTC HCl derişimi ($\mu\text{g/mL}$)

İn vitro % kayıp deneyleri, MD pompasının akış debisi her seferinde **2 $\mu\text{L/dak}$** olmak üzere, **1.00, 5.00, ve 10.0 $\mu\text{g/mL}$** derişimlerinde tekrarlandı.



Şekil 11. İn vitro % kayıp deney düzeneği

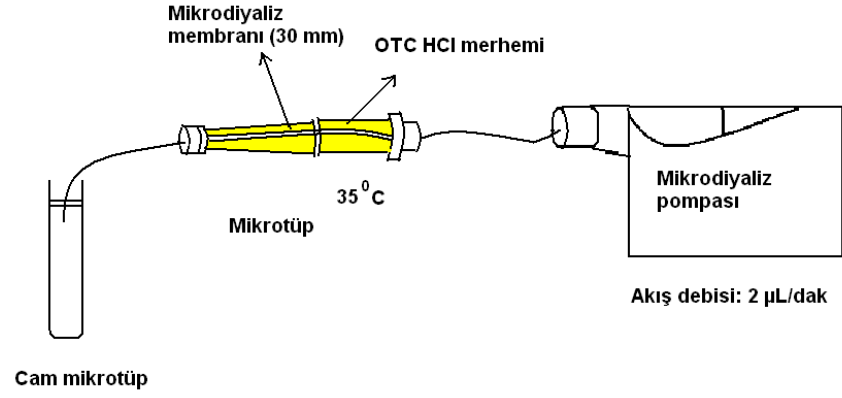
3.2.1.7. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Merhemden Mikrodiyaliz Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi

İn vitro difüzyon deneyi, hem test hem de referans preparatı için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Bunun için, 30 mm uzunluğundaki membran (poliariletersulfon) 200 μL 'lik mikrotüpün içine yerleştirildi. Mikrotüpün içi Referans (Terramycin deri merhem)/Test (Polimisin deri merhemi) preparat ile dolduruldu. Mikrotüpün her iki ucu mikrotüpün plastik tıparıyla kapatıldı. Sistem 35°C ortam sıcaklığı sağlamak amacıyla sıcak su banyosuna yerleştirildi. Katater bir ucundan MD pompasına (CMA 107 MD Pompası) bağlandı. Serum fizyolojik çözeltisini içeren şırınga MD pompası içine yerleştirildi. MD pompasının akış debisi (2 $\mu\text{L/dak}$) seçilerek

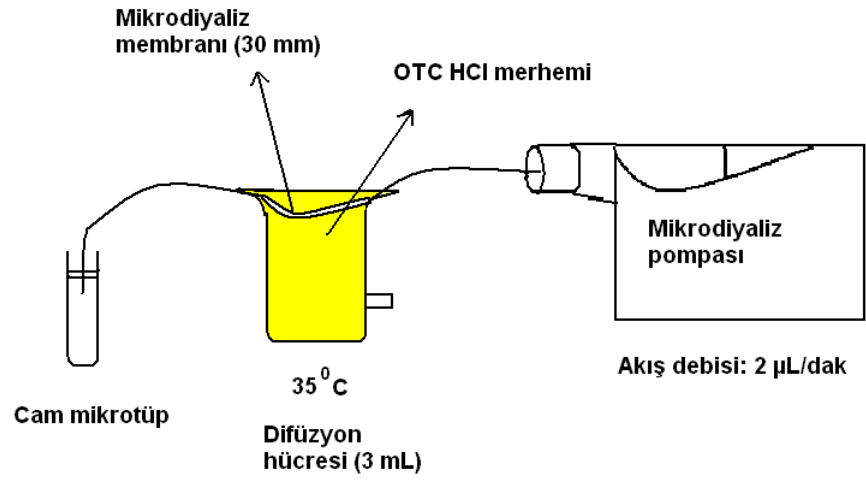
pompa çalıştırıldı (Şekil 12). Kataterin 30 mm'lik yarıgeçirgen membran kısmından, perfüzyon sıvısına merhemden etkin madde geçişi oldu. Kataterin diğer ucundan MD örnekleri 30 dakika boyunca mikrotüplere toplandı. (Toplanan örneklerin hacmi 60 µL'dir.) Deneye beş saat devam edildi. Toplanan örnekler HPLC ile analiz edildi. Zamana karşı etkin madde derişimi, yığılmalı salınan miktarı ve etkin madde çıkış hızı grafikleri çizildi.

Aynı deney, donör faz olarak 200 µL'lik mikrotüp yerine, 3 mL'lik cam difüzyon hücresi kullanılarak da yapıldı.

(a)



(b)



Şekil 12. Mikrodiyaliz katater membranında merhemden oksitetrasiklin HCl'ün in vitro difüzyon deneyi

3.2.1.8. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini*

3.2.1.8.1. Kullanılan Yöntem

UPLC: Acquity™ UPLC Sistemi (Waters, USA)

Dedektör: Quattro Premier XE Tandem quadropole

Enstrüman kontrolü, veri kaydı ve işlem: MassLynx V 4.1 Software

Kolon: Acquity™ BEHC₁₈ (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) (Waters®, USA)

Kolon sıcaklığı: 35°C

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Mobil faz:

Mobil Faz A: Metanol:Bidistile su; 20:80, 8.25 mM Formik asit

Mobil Faz B: Metanol:Bidistile su; 95:5, 8.25 mM Formik asit

% 100 Mobil Faz A'dan, % 100 Mobil Faz B'ye gradient akış,

Değişim hızı: 0.091 µL/dak²

Akış debisi: 0.25 µL/dak

Oksitetrasiklin pikinin alıkonma zamanı: 2.34 dak

3.2.1.8.2. MS Akordu (Tuning)

OTC HCl'e ait prekürsör iyonları saptamak için, MS ayar (tuning) işlemi pozitif elektrospray iyonizasyon modunda gerçekleştirildi. Bu iyonların dissosiasyonu indüklendi. Ebeveyn (parent) ve çocuk (daughter) iyon için tarama yapıldı. Piklerin ayırımına ve yüksekliğine bakıldı. MS ayar işlemi için, OTC HCl'ün 1.00 µg/mL derişiminde metanoldeki çözeltisi 20 µL/dak debisinde infüzyon ile sisteme enjekte edildi. Mobil faz olarak, Mobil Faz B ve 0.1 mL/dak akış debisi kullanıldı. İşlem cihaza ait yazılım

* UPLC-MS-MS miktar tayin yönteminin geliştirilmesi, validasyonu ve örneklerin ölçülmesi, tarafımızdan ve kontrolümüz altında DÜZEN-NORWEST Laboratuvarında yapılmıştır. Katkılarından dolayı DÜZEN-NORWEST Laboratuvarlar grubuna teşekkür ederiz.

ile kontrol edildi. Nebilüzör ve desolvatasyon gazı olarak kullanılan azot, yüksek saflıkta azot jeneratöründen (Peak Scientific, USA, 6.5 Bar) sağlandı. 10 Bar enstrümantal saflıktaki argon (% 99.999) çarpışma (collision) gazı olarak kullanıldı. OTC HCl'ün 1. parçalanma ürünü 460.95 > 425.85 (Cone Volt.24; Coll. Energy: 20) miktar tayini için; 2. parçalanma ürünü 460.95 > 442.85 (Cone Volt.24; Coll. Energy: 15) analizin onayı için kullanıldı.

3.2.1.8.3. MS En İyileştirilmesi (Optimizasyonu)

En yüksek kantitatif duyarlılığı sağlayabilmek için, OTC HCl için en çok ESI-MS/MS geçişi, çoklu tepkime izleme (multiple reaction monitoring) (MRM) modunda izlendi. OTC için parçalanma ürünlerinin seçimi, en yoğun sinyale dayalı olarak yapıldı. Cone voltajı, enerji collision'ları ve diğer enstrüman parametrelerinin optimizasyonu, 1.00 µg/mL derişimde metanolde hazırlanan standart OTC HCl çözeltisinin direkt infüzyonu ile incelendi. Bunun için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) ile mobil faz MS içine doğrudan pompalandı.

Oksitetrasiklin HCl için Uygulanan En İyi MS Ayarları :

Capillary voltage: 3.5 kV

Cone voltage: 24 V

Extractor voltage: 3 V

RF lens voltage: 0.1 V

Source temperature: 120°C

Desolvation temperature: 250°C

Cone gas flow rate: 50 L/h

Desolvation gas flow rate: 750 L/h

Multiplier voltage: 650 V

Collision gas flow: 0.17 mL/min

Collision Cell Pressure: 1.00.e-004 mbar

3.2.1.9. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu

3.2.1.9.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

200 µg/mL derişimdeki OTC HCl'ün metanodeki stok çözeltisinden hareketle, 0.500, 1.00, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0, 40.0, 100 ng/mL derişimde ve bileşiminde % 20 metanol içeren örnekler hazırlandı. Bölüm 3.2.1.8'de anlatılan yöntem ve koşullarda UPLC-MS-MS ile analizleri yapıldı. Derişimlere karşılık gelen pik alanları elde edildi. Bu verilere doğrusal regresyon uygulanarak, standart doğru denklemi ve uyum ölçütleri bulundu.

3.2.1.9.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde

Üç farklı derişimde (5.00, 10.0, 20.0 ng/mL) OTC HCl içeren örneklerin UPLC-MS-MS ile analizleri yapıldı. Her derişimin ölçümü iki kez tekrarlandı. Standart denklem kullanılarak bu örneklerin % geriieldesi hesaplandı.

3.2.1.9.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Sistemin kesinliği, 0.500 ng/mL; tekrarlanabilirliği 5.00, 10.0, 40.0 ve 100 ng/mL OTC HCl içeren örneklerde incelendi.

3.2.1.9.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

Yöntemin, serum fizyolojik içeriğinden ve metanolden etkilenmediği UPLC-MS-MS kromatogramları incelenerek değerlendirildi. Boş serum fizyolojik örneği ve metanol kromatogramları alındı.

3.2.1.9.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

0.500 ng/mL derişimde OTC HCl örneği arka arkaya 10 kez enjekte edilerek, UPLC-MS-MS ile analizi yapıldı. Ölçümlerin standart sapma

değerinin 10 katı, analitik yöntemin LOQ; 3 katı, LOD değeri olarak kabul edildi.

3.2.1.10. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi

3.2.1.10.1. Kullanılan Yöntem

Kolon: Reverse phase-C-18, 5µm, 250×4.6 mm

Mobil faz: Metanol: 0.01 M Oksalik asit (40:60)

Akış Debisi: 1 mL/dak

Enjeksiyon Hacmi: 20 µL

Bastırma (attenuation): 1-6

Eşik seviyesi (threshold):1

Kağıt hızı (Cht sp): 0.5 cm / dak

Pik genişliği (Pk wd): 0.16

Dalga boyu: 354 nm

Oksitetrasiklin pikinin alıkonma zamanı: 5.1 dak

Oksitetrasiklin pikinin alıkonma hacmi: 5.1 mL

Bant ile soyma yönteminde bant ile alınan örneklerden OTC HCl'ün ekstraksiyonu, toplanan bantların 10 mL metanolde bir gece bekletilmesi ve analiz öncesi vorteksle beş dakika boyunca karıştırılması ile gerçekleştirildi. Metanole ekstre edilen örnekler Bölüm 3.2.1.10.1'deki HPLC yöntemi ile analiz edildi.

3.2.1.11. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu

3.2.1.11.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

200 µg/mL derişimdeki OTC HCl'ün metanoldeki stok çözeltisinden hareketle, 0.500, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.0, 32.0, 48.0, 64.0 µg/mL derişimlerde örnekler hazırlandı. Analitik yöntemin doğrusallığı Bölüm 3.2.1.5.1'de anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

3.2.1.11.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde

OTC HCl'ün beş farklı derişimde (2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 40.0 µg/mL) metanolde çözültisi hazırlandı. Analitik yöntemin doğruluğu Bölüm 3.2.1.5.2'de anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

3.2.1.11.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Analitik yöntemin kesinliği, Bölüm 3.2.1.5.3'de anlatıldığı şekilde, sistemin ve yöntemin kesinliği olmak üzere iki şekilde değerlendirildi:

Sistemin kesinliği ve tekrar elde edilebilirlik için, 12.0 µg/mL, tekrarlanabilirlik için, üç farklı derişimde (2.00, 24.0, 40.0 µg/mL) OTC HCl içeren örnekler hazırlandı.

3.2.1.11.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

Yöntemin, metanolden ve tape stripping yönteminde kullanılacak olan bantın bileşiminden etkilenmediği HPLC kromatogramları incelenerek değerlendirildi. Metanol, boş bantın metanolde ekstre edilmesinden elde edilen örnek ve belirli derişimde OTC HCl ilave edilmesiyle hazırlanan örneklerin analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramları karşılaştırıldı.

3.2.1.11.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

OTC HCl'ün miktar tayininde kullanılan standart doğrunun hazırlanmasında kullanılan en küçük derişim 0.500 µg/mL ve farklı olarak 0.300, 0.200, 0.100 µg/mL'lik örnekler hazırlandı. Yöntemin duyarlılığı, Bölüm 3.2.1.5.5'de anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

3.2.1.12. **İstatistiksel Analiz**

Deneyisel bulgulardaki ortalama değerler arasında anlamlı fark olup olmadığı yönünde istatistiksel analiz, SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) kullanılarak bağımsız t testi ve tek yönlü varyans analizi yapılarak gerçekleştirildi.

3.2.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR

3.2.2.1. Mikrodializ Çalışması

3.2.2.1.1. Çalışma İçin Etik Kurul İzni

OTC HCl'ün sağlıklı gönüllülerde MD ve bant ile soyma yöntemleri ile topikal FK'inin değerlendirilmesi için yapılacak olan klinik araştırmanın, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D, Nefroloji Bilim Dalı ile ortak yürütülmesi planlandı. Bu amaçla ilgili yönetmeliğe uygun olarak "Oksitetrasiklin HCl'ün Sağlıklı Gönüllülerde Topikal Farmakokinetiği ve Topikal Biyoeşdeğerliğin Değerlendirilmesinde Mikrodializ ve Bantla Soyma (Tape-Stripping) Yöntemlerinin Karşılaştırılması" konulu etik kurul başvuru dosyası hazırlandı.

Bu çalışma için yapılan yerel etik kurul başvurusu, Gazi Tıp Fakültesi Kurulunun 24 Eylül 2007 tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş ve 266 sayılı kararı ile çalışma etik bulunmuştur(Bknz. EK-1).

3.2.2.1.2. Çalışma Protokollerinin Tasarımı

Biyokimyasal ve klinik testlerin sonucunda sağlıklı bulunan denekler çalışmaya dahil edildi. Araştırmaya katılacak olan deneklerle ön görüşmeler yapılarak araştırma ile ilgili sözlü ve yazılı bilgi verildi. Deneklere ait bilgi formu, bilgilendirme metni ve gönüllü olur formu hazırlandı ve dökümanite edildi(Bknz. EK-2, 3)

3.2.2.1.3. Deneklere Ait Bilgiler

İn vivo çalışmaya katılan deneklere ait bilgiler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Deneklere ait bilgiler

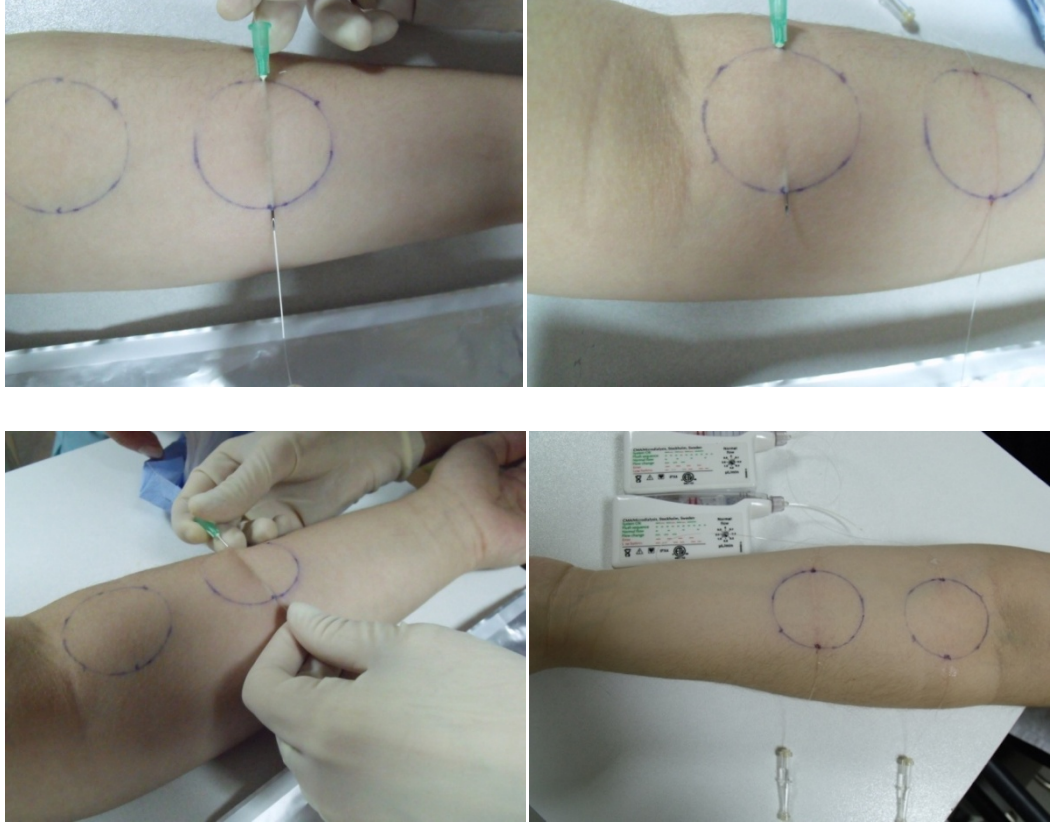
Denek No	Yaş	Kilo	Boy	Cinsiyet	Dermatolojik Rahatsızlık veya Hikayesi	Devamlı Kullanmakta Olduğu İlaç(lar)
1	23	82	1.85	Erkek	Yok	Yok
2	24	88	1.87	Erkek	Yok	Yok
3	22	98	1.77	Erkek	Yok	Yok
4	22	51	1.67	Kız	Yok	Yok
5	22	68	1.79	Erkek	Yok	Yok
6	22	92	1.79	Erkek	Yok	Yok
7	23	53	1.68	Kız	Yok	Yok
8	24	55	1.65	Kız	Yok	Yok
9	23	106	1.92	Erkek	Yok	Yok
10	23	59	1.78	Erkek	Yok	Yok
11	22	72	1.65	Kız	Yok	Yok
12	22	61	1.75	Kız	Yok	Yok

3.2.2.1.4. Deneyin Yapılışı

Deney herhangi bir dermatolojik rahatsızlığı olmayan 12 sağlıklı gönüllü ile gerçekleştirildi. OTC HCl'ün iki topikal formülasyonu [Referans (Terramycin®), Test (Polimisin®)] sağlıklı gönüllülerde ön kol üzerinde iki farklı alana eş zamanlı olarak uygulandı. Bunun için, sağlıklı gönüllünün ön kolu üzerinde birbirinden merkezden itibaren 7 cm uzaklıkta olacak şekilde iki tane 4.3 cm çapında dairesel uygulama alanı çizildi. Herbir daire içerisine prob girişi ve çıkışı işaretlendi. Klavuz kanül ile işaretli uçtan

girilerek deri yüzeyine paralel olacak şekilde üç cm ilerlendi ve diğer işaretli uçtan kanülün ucu çıkarıldı. Klavuz kanülün içinden katater geçirilerek, 30 mm'lik membran kısmın deri altına gelmesi sağlandıktan sonra, klavuz kanül dikkatli bir şekilde deriden çıkartıldı. Böylece, kataterlerin 3 cm'lik membran kısımları, birbirlerinden 7 cm uzaklıkta olacak şekilde dermis içersine bu işlem ile yerleştirilmiş oldu. Herbir katater bir ucundan MD pompasına (CMA 107 MD Pompası) (Resim 1) bağlandı. Serum fizyolojik çözeltisi içeren şırınga MD pompası içine yerleştirildi. MD pompasının akış debisi 2 µL/dak olarak ayarlanarak pompa çalıştırıldı. Proben yerleşmesinden kaynaklanabilecek travmanın geçmesi için, yarım saat perfüzyon gerçekleştirilerek denge periyodu uygulandı. Denge periyodu sonunda, dairesel alanlardan birine 4 cc (3.8 g) Test, diğerine ise aynı miktarda Referans preparat dört dakika boyunca dairesel hareketlerle masaj uygulanarak sürüldü. Yarım saat sonra, kateterin diğer ucundan 30 dakika boyunca toplam dört saat MD örnekleri (60 µL) her iki formülasyon uygulama alanından eşzamanlı olarak toplandı. Her iki bölge de deney boyunca alüminyum folya ile kapatılmış şekilde tutuldu. İşlem sırasında sağlıklı gönüllülere herhangi bir anestezi uygulanmasına gerek kalmadı. Deney süresi boyunca deneklerin yarı yatar pozisyonda kalmaları sağlandı (Resim 2).

Deneklerin deney boyunca sigara kullanmaları yasaklandı. Deneklerin deneyden bir hafta öncesinden itibaren oral veya topikal başka bir ilaç kullanmaları ve deneyden iki gün öncesinden itibaren alkol kullanmaları yasaklandı. Standardize koşullar altındaki deneklerden 30-60, 60-90, 90-120, 120-150, 150-180, 180-210, 210-240, 240-270. dakikalar arasında MD örnekleri toplandı. Örnekler, analize kadar -70°C'de saklandı.



Resim 2. Sağlıklı gönüllü ön kolunda dermis içine CMA 66 Lineer mikrodializ kataterinin implantasyonu

3.2.2.1.5. Mikrodializ Örneklerinin Analizi

MD örneklerinin analizleri Bölüm 3.2.1.8'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Örneklerin pik alanlarından hareketle, OTC HCl'ün MD derişimleri hesaplandı ve her bir deneğe ait dermisteki ilaç derişimi-zaman profilleri çıkartıldı.

3.2.2.1.6. Verilerin Değerlendirilmesi

İn vivo MD verilerinden hareketle, MD deneyinin modellemesi yapılarak, k_d (uzaklaşma hız değışmezi), k_1 (merhemden ekstrasellüler sıvıya geçiş hızı ve V_d (sanal dağılım hacmi) parametreleri bulundu. Her iki formülasyona ait BY ölçütleri ($AUC_{0 \rightarrow n}$, C_{maks} , t_{maks}) hesaplanarak, istatistiksel açıdan BE'leri değerlendirildi.

Biyoeşdeğerlik hesapları, güven aralığı yöntemi ile yapıldı¹⁹⁹:

n sayıda denek ile yapılan test preparatının BY ölçüt değerlerinin ortalaması $X_{ort,T}$ ve bu değer standard sapması SS_T 'dir. Yine, n sayıda denek ile yapılan referans preparatının BY ölçüt değerlerinin ortalaması $X_{ort,R}$ ve bu değer standard sapması SS_R 'dir.

$$\text{Testin varyansı} = SS_T^2 \quad \text{Eşitlik 11}$$

$$\text{Referansın varyansı} = SS_R^2 \quad \text{Eşitlik 12}$$

olmaktadır. İki preparat ortalamaları arasındaki farka d denilirse,

$$d = X_{ort,T} - X_{ort,R} \quad \text{Eşitlik 13}$$

olur. Bu fark d'nin varyansı, test ve referans preparatlarının varyanslarından hesaplanır. Bu varyansa S_p^2 (harmanlanmış varyans) denilir:

$$S_p^2 = \frac{SS_T^2(n-1) + SS_R^2(n-1)}{n+n-2} \quad \text{Eşitlik 14}$$

Harmanlanmış varyansın karekökü S_p , harmanlanmış standart sapmayı verir. Burada,

$$\text{Serbestlik derecesi (df)} = n + n - 2 \quad \text{Eşitlik 15}$$

d'nin % 90 olasılıklı güven aralığı GA,

$$\%90 \text{ olasılıklı güven aralığı (GA)} = t_{0.05,df} \sqrt{\frac{2S_p^2}{n}} \quad \text{Eşitlik 16}$$

olmaktadır. Sonuçta iki preparat arasındaki farkın güven aralığı,

$$\text{Farkın güven aralığı (fga)} = d \pm GA \quad \text{Eşitlik 17}$$

olacaktır.

$$fga = (X_{ort,T} - X_{ort,R}) \pm t_{0.05,df} \sqrt{\frac{2S_P^2}{n}}$$

Eşitlik 18

Bu güven aralıklarının ($\pm fga$) referans preparatın ortalamasını çekeceği üst ve alt yüzdeler bulunur:

$$\text{Üst yüzde} = \frac{X_{ort,R} + (+fga)}{X_{ort,R}} 100$$

Eşitlik 19

$$\text{Alt yüzde} = \frac{X_{ort,R} + (-fga)}{X_{ort,R}} 100$$

Eşitlik 20

3.2.2.1.7. Mikrodiyaliz için İn Vivo Gerieldenin Saptanması

MD yöntemi ile gerçek doku derişimlerini saptamak için in vivo gerielde değerinden yararlanılır. İn vivo gerielde değeri, in vitro gerielde değerinden farklı olabilir. Bu nedenle, gerçek doku derişimlerini saptamak için, ölçülen derişimler in vivo gerielde değerine göre düzeltilir. Bu çalışmadaki in vivo gerielde deneyinde kullanılan yöntem, yarı geçirgen membranda her iki yöne doğru difüzyon prosesinin eşit olduğu varsayımına dayanmaktadır.

Serum fizyolojikte, derişimi bilinen OTC HCl çözeltisi ile, in vivo olarak deri perfüze edilerek, perfüzattan dermise doğru OTC HCl'ün kaybı Eşitlik10'dan hareketle hesaplandı.

İn vivo gerielde deneyi için, sağlıklı gönüllünün ön koluna deri yüzeyine paralel olacak şekilde, dermis içerisine kataterin 30 mm'lik membran kısmı implante edildi. 5.00 µg/mL derişimdeki OTC HCl'ün serum fizyolojikteki çözeltisi ile 2 µL/dak akış debisinde perfüze edildi. Proben yerleşmesinden kaynaklanabilecek travmanın geçmesi için bir saat denge periyodu olarak 2 µL/dak akış debisinde perfüzyon gerçekleştirildi. Denge periyodundan sonra, 30 dakika boyunca örnekler mikrotüplere

toplandı. Bir saat denge periyodu ile birlikte deney, toplam beş saat sürdürüldü. Toplanan örneklerdeki OTC HCl miktarı, HPLC yöntemi ile analiz edildi.

3.2.2.1.8. Yüzeysel Doku Ultrasonografisi ile Mikrodializ Membranının Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi

Sağlıklı gönüllü ön koluna lineer MD kataterinin implantasyonu sonucunda, probun dermis içindeki derinliğini ölçmek için ultrason ile yüzeysel doku incelemesi yapıldı. Ultrason taraması, 10 MHz'te, 11 L geniş bantlı transdüser ile General Electric Logiq 9 Ultrasonografi sistemi kullanılarak, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Radyoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Prob derinliği, MD membranı üzerinden deriye giriş, orta nokta ve deriden çıkış olmak üzere üç yerden ölçüldü. Ölçümler tek denekte, iki prob üzerinde tekrarlandı.

3.2.2.2. Bant ile Soyma (Tape-stripping) Çalışması

Bant ile soyma çalışması, MD çalışmasına katılan aynı 12 sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirildi. Her denek, 4 hafta ara ile Test ve Referans preparat için, ayrı ayrı iki defa bant ile soyma deneyine katıldı. Herbir denek için, bant ile soyma ve MD deneyleri arasındaki süre 1.5-5 ay arasındadır.

3.2.2.2.1. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi Deneyi*

Bant ile soyma yönteminde kullanılmak üzere, piyasada mevcut farklı bantlar arasından, iyi yapışkanlığa sahip bir bant olan Crystal Clear

* TAXT Plus Texture Analyser cihazının kullanılmasında göstermiş olduğu yardımlarından dolayı Sayın Dr.Ecz. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ'e teşekkür ederiz.

Tape 3M Scotch®, D.Art.Nr.:11265, USA seçildi¹⁴⁵. TAXT Plus Texture Analyser cihazı kullanılarak, denek ön kolu üzerinde, bu bantın adhezyon kuvveti ölçüldü. Cihazın 1.25 cm çapındaki penetrometre probu üzerine, kesit halinde ve yapışkan yüzü dış yüzeyde olacak şekilde bantlar yapıştırıldı. Aletin aparatı ile üç saniye boyunca, 10 N'luk bir basınç uygulanarak, denek ön kolu üzerine bant yapıştırıldı. Yapışan bantın ön kol üzerinden kaldırılması esnasında harcanan güç ölçülerek adhezyon kuvveti bulundu. Çalışmada 3 paralel ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda, cihazın kendine ait olan Texture Exponent 2.0.6.0 yazılım programı kullanılarak, kopma kuvveti (F, N) ve yapılan adhezyon işi (W, N.mm) bulundu. Ayrıca, birim alanda yapılan iş Eşitlik 21 ile hesaplandı:

$$\text{Adhezyon işi} = \frac{\text{AUC}}{\pi r^2} \quad \text{Eşitlik 21}$$

πr^2 : denek ön kolu ile temas eden bant alanı

Test koşulları:

Bantın yapışması için kullanılan kuvvet: 10 N

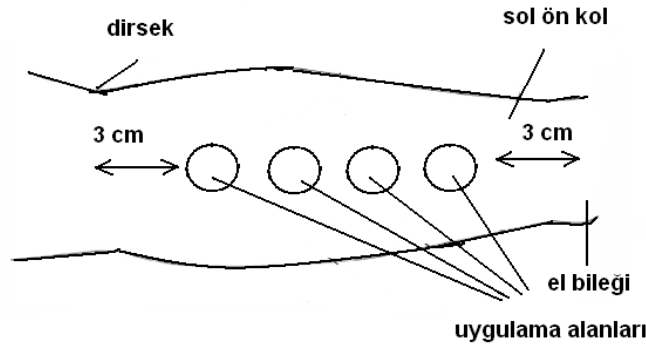
Kuvvetin uygulanma süresi:..... 3 sn

Kullanılan bant alanı:.....1.23 cm² (çap:1.25 cm)

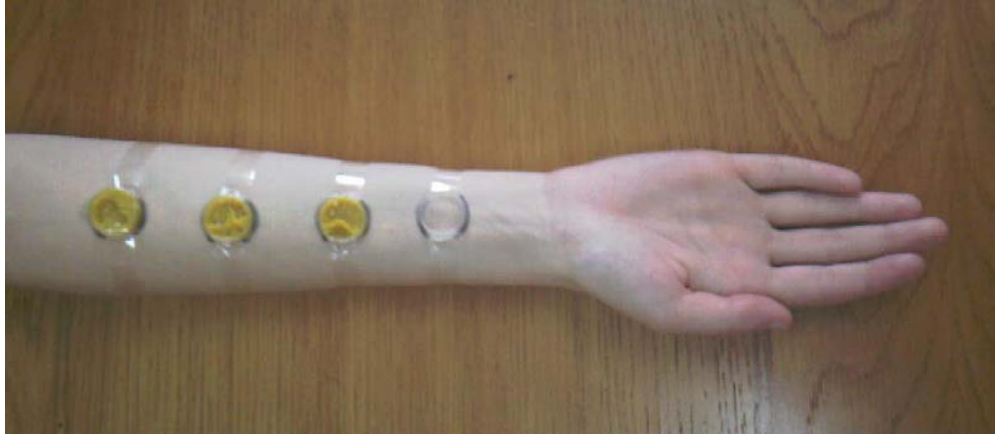
3.2.2.2.2. Bant ile Soyma Deneyinin Yapılışı

Deneklerin deney boyunca sigara kullanmaları yasaklandı. Deneklerin deneyden bir hafta öncesinden itibaren oral veya topikal başka bir ilaç kullanmaları ve deneyden iki gün öncesinden itibaren alkol kullanmaları yasaklandı. Deneklerin her iki ön kolu üzerinde, 2.1 cm. çapında dört dairesel alan belirlendi. Bunun için, dirsek ve bilekten üçer cm ve birbirinden en az ikişer cm uzaklıkta olacak şekilde plastik halkalar (iç çap: 1.9 cm, dış çap: 2.1 cm) denek önkolu üzerine yapıştırıldı. Bu alanlardan bir tanesi kontrol olarak kullanıldı. Bant ile soyma yönteminin

şematik uygulanişı Şekil 13'de gösterilmektedir. Enjektör ile 0.95 g Test veya Referans preparat, önkol üzerindeki 7 dairesel alana 30 dakika boyunca uygulandı (Şekil 13, Resim 3). Bu süre sonunda her bir uygulama alanındaki formülasyon, bir kağıt peçete yardımı ile dikkatlice temizlendi. Uygulama alanları temizlendikten sonra, 15., 30., 60., 90., 120., 180., 240. dakikalarda denek ön kolu üzerinde uygulama bölgesindeki SC 15 kez tekrarlı olarak yapışkan bant (3M Scotch, Crystal, USA) kullanarak soyuldu (Resim 4). Her seferinde ilk iki bant deri yüzeyinden gelebilecek kontaminasyonu engellemek amacı ile atıldı. İlk iki banttıan sonra toplanan bant örnekleri, 10 mL metanolde +4°C'de 1 gece bekletilerek analiz edildi.



Şekil 13. Bant ile soyma (Tape-stripping) yönteminin şematik uygulanişı



Resim 3. Sağlıklı gönüllü ön kolu üzerine oksitetrasiklin HCl merheminin uygulanışı



Resim 4. Sağlıklı gönüllü ön kolu üzerinde bant ile soyma işlemi

3.2.2.2.3. Bant ile Soyma Örneklerinin Analizi

Bant ile Soyma örneklerinin analizleri Bölüm 3.2.1.10'da anlatıldığı şekilde yapıldı. Örneklerin pik yüksekliklerinden hareketle, OTC HCl'ün örneklerdeki derişimleri hesaplandı ve her bir deneğe ait zamana karşı SC'daki ilaç miktarı profilleri elde edildi.

3.2.2.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen SC ilaç miktarlarından hareketle OTC HCl'ün DFK modellemesi yapıldı. Her iki formülasyona ait BY ölçütleri ($AUC_{0 \rightarrow n}$, C_{maks} , t_{maks}) hesaplanarak, istatistiksel açıdan BE'leri değerlendirildi.

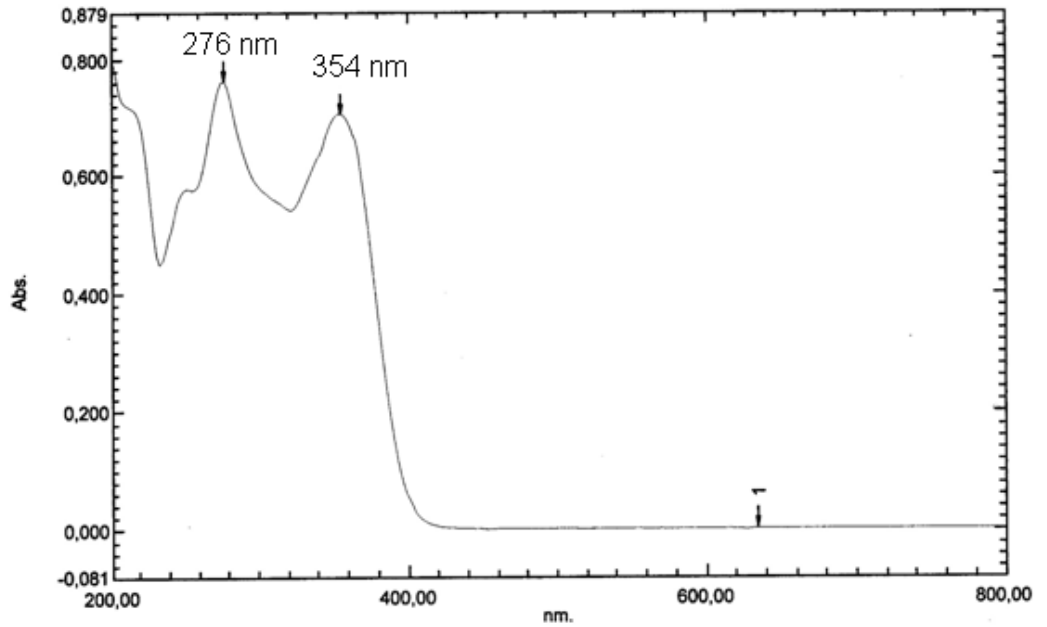
Biyoeşdeğerlik hesapları Bölüm 3.2.2.1.6'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR

4.1.1. Oksitetrasiklin Hidroklorürün UV Spektrumu

OTC HCl'ün bidistile sudaki UV spektrumu 200-800 nm arasında taranarak alındı. OTC HCl'ün maksimum absorbands verdiği dalga boyu değerleri ve UV spektrumları Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14. Oksitetrasiklin HCl'ün bidistile sudaki (24 µg/mL) UV spektrumu

4.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilesi

OTC HCl'ün Bölüm 3.2.1.2.'de belirtilen koşullarda yapılan stabilite çalışmasına ait bulgular Tablo 3, 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Tablo 3. Oksitetrasiklin HCl'ün serum fizyolojikte -70°C'deki stabilitesi

Zaman (gün)	C (µg/mL)	C[^]_{ort} (µg/mL)	± SS	BS (%)	% gerielde
0	0.200	0.203	0.003	1.59	101
15	0.200	0.204	0.008	3.81	102
30	0.200	0.197	0.013	6.73	98.3
55	0.200	0.196	0.006	3.02	97.8
0	2.00	1.95	0.02	0.869	97.4
15	2.00	2.03	0.01	0.273	102
30	2.00	1.93	0.06	3.17	96.4
55	2.00	2.05	0.07	3.48	103
0	4.00	4.03	0.05	1.29	101
15	4.00	4.11	0.14	3.30	103
30	4.00	4.10	0.02	3.17	103
55	4.00	3.81	0.07	1.72	95.4

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, (n=3)

Tablo 4. Oksitetrasiklin HCl'ün serum fizyolojikte +4°C'deki stabilitesi

C (µg/mL)	C[^]_{ort} (µg/mL)	± SS	BS (%)	% gerielde
1.60	1.58	0.04	2.35	98.5
3.20	3.11	0.11	3.50	97.3
4.80	4.64	0.11	2.44	96.7

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, (n=3)

Tablo 5. Birinci dondurma-çözme periyodu

C (µg/mL)	C^{ort} (µg/mL)	± SS	BS (%)	% gerielde
0.200	0.198	0.003	1.63	98.9
2.00	2.07	0.03	1.24	104
4.00	4.10	0.02	0.521	103

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, (n=3)

Tablo 6. İkinci dondurma-çözme periyodu

C (µg/mL)	C^{ort} (µg/mL)	± SS	BS (%)	% gerielde
0.200	0.208	0.007	3.40	104
2.00	2.05	0.04	1.88	102
4.00	4.14	0.02	0.517	103

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, (n=3)

4.1.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler

4.1.3.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini

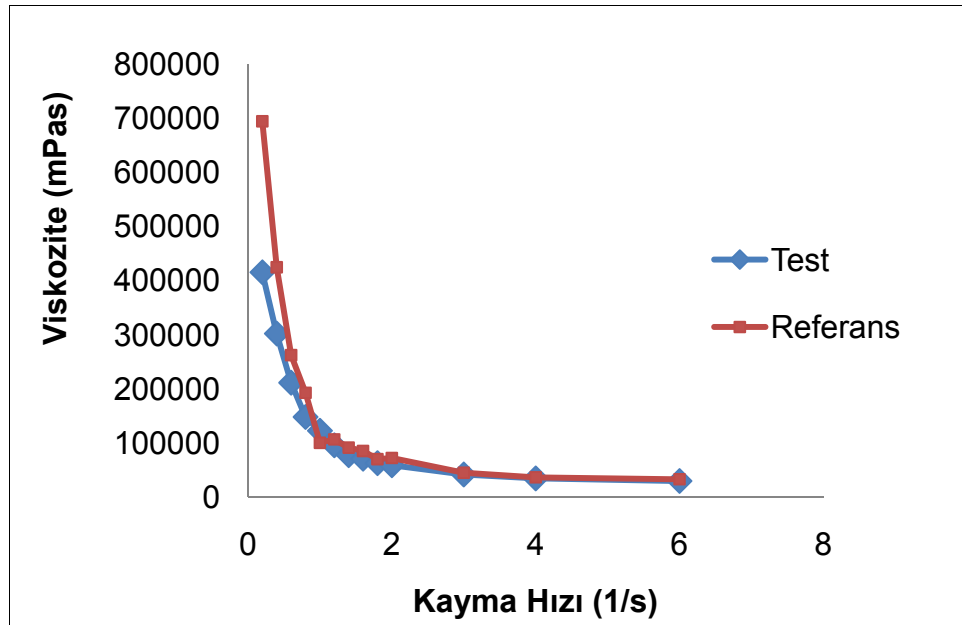
Bölüm 3.2.1.3.1’de anlatıldığı şekilde yapılan OTC HCl merheminde etkin madde miktar tayini denetimine ait bulgular Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Referans ve Test deri merheminde oksitetrasiklin HCl miktar tayini

	Ortalama (%) ± SS, n=3
Referans deri merhemi	108±3
Test deri merhemi	112±7

4.1.3.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi

Test ve referans için, Bölüm 3.2.1.3.2’de anlatıldığı şekilde, artan kayma hızlarına karşı ölçülen viskozite değerlerinden elde edilen akış reogramı Şekil 15’de verimiştir. Test ve referans formülasyonun viskozite değerleri Tablo 8’de verilmiştir.



Şekil 15. Oksitetrasiklin HCl’ün merhem formülasyonlarının akış reogramı

Tablo 8. Referans ve Test deri merheminin viskoziteleri

Formülasyon	Viskozite (mPa.s) (Kayma Hızı: 1 s ⁻¹)
Referans deri merhemi	100390
Test deri merhemi	122660

4.1.3.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi

Bölüm 3.2.1.3.3'de anlatıldığı şekilde yapılan homojenlik denetimi sonucunda, her iki formülasyonun da cilt üzerinde ve mikroskop altında incelendiğinde, pürüklü görünüşte olmadığı, gözle görünür hava kabarcığı veya partikül içermediği ve homojen görünüşte olduğu görüldü.

4.1.3.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi

Bölüm 3.2.1.3.4'de anlatıldığı şekilde yapılan ağırlık denetimine ait bulgular Tablo 9'da verilmiştir.

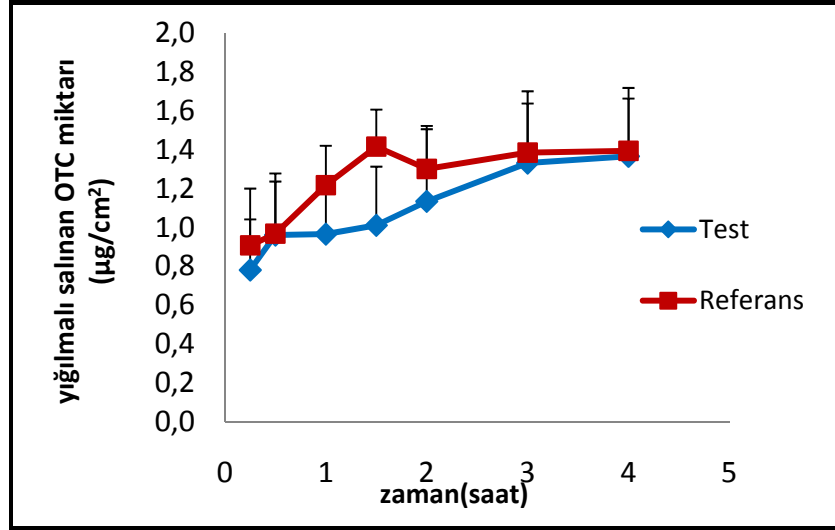
Tablo 9. Referans ve Test deri merheminin ağırlık denetimi sonuçları

	Ortalama (g)±SS	Etiket değeri (g)	Ortalama (%) ± SS (n=10)
Referans deri merhemi	14.0±0.1	14.2	98.4±0.9
Test deri merhemi	14.1±0.1	14.2	99.2±0.5

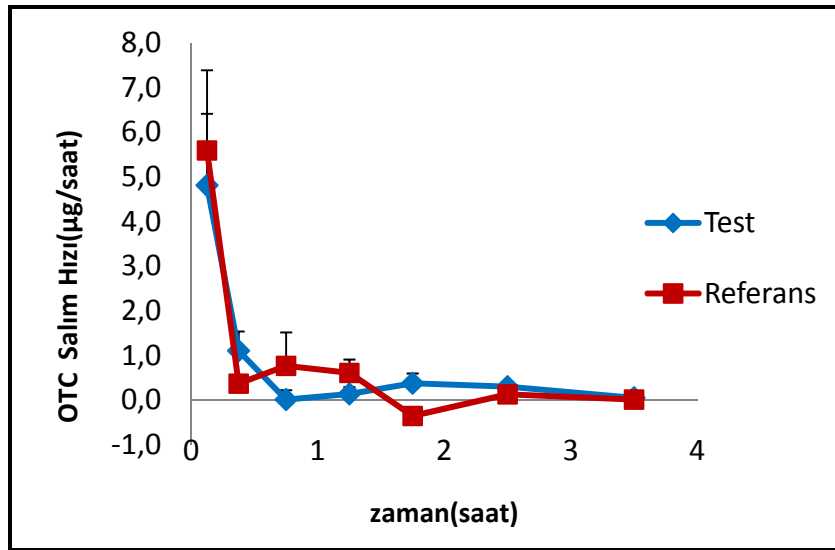
4.1.3.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi

Bölüm 3.2.1.3.5'de anlatıldığı şekilde, difüzyon hücresinde, insan meme derisi kullanılarak yapılan salım deneyi sonucunda elde edilen salım profili ve salım hızı grafiği, sırasıyla Şekil 16 ve 17'de verilmiştir.

Salım verilerinin kinetik değeriendirilmesi Tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 16. Oksitetrasiklin HCl'ün merhem formülasyonlarından salım profili (n=4)



Şekil 17. Oksitetrasiklin HCl'ün merhem formülasyonlarından salım hızı profili (n=4)

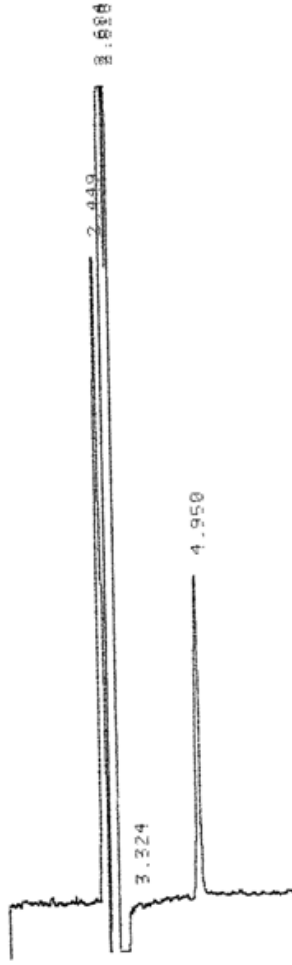
Tablo 10. Oksitetrasiklin HCl'ün Referans ve Test formülasyonlarının meme derisinden salım kinetikleri

REFERANS				TEST		
	0.derece	1.derece	karekök kinetiği	0.derece	1.derece	karekök kinetiği
k	0.121	0.105	0.340	0.150	0.137	0.381
r²	0.626	0.615	0.764	0.932	0.902	0.940
SKT	0.0981	0.0772	0.0619	0.0181	0.0229	0.0160
AIC	-12.3	-13.9	-15.5	-24.1	-22.4	-24.9
SIC	-12.4	-14.0	-15.6	-24.2	-22.5	-25.1
Sr	0.140	0.124	0.111	0.0602	0.0676	0.0566
Runs	3	3	3	2	3	3

k: Eğim ,r²: Determinasyon katsayısı, SKT: Sapma kareleri toplamı , AIC: Akaike bilgi ölçütü, SIC: Schwartz bilgi ölçütü ,Sr: Regresyonun standart sapması, Runs: Runs denetimi sonucu

4.1.4. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi

Çalışmalarımızın başında ilk önce OTC HCl'ün yüksek derişimli çözeltileri kullanılarak, etkin madde pikinin yeri saptandı. OTC HCl'ün MD örneklerinden analizi için literatürdeki yöntem²⁰⁰, kolon, mobil faz oranı, akış hızı, enjeksiyon hacmi ve UV dedektörün dalga boyunda Bölüm 3.2.1.4.1'de belirtildiği şekilde değişiklikler yapılarak kullanıldı. Değişik ATT ve THRSH parametreleri kullanılarak, saptanabilecek en düşük derişimlere inildi. Kalibrasyon aralığı, 0.031-6.01 µg/mL olarak alındı. En uygun mobil faz oranı Metanol:0.01 M Oksalik asit (40:60), akış debisi 1 mL/dak ve dalga boyu 354 nm olarak bulundu. OTC HCl'e ait HPLC kromatogramı Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. Oksitetrasiklin HCl'ün (0.250 µg/mL) HPLC kromatogramı

4.1.5. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu

4.1.5.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

Bölüm 3.2.1.5.1'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonuçları Tablo 11'de, uyum ölçütleri Tablo 12'de ve kalibrasyon grafiği Şekil 19'da verilmiştir.

Tablo 11. Analitik yöntemin doğrusallığına ait bulgular

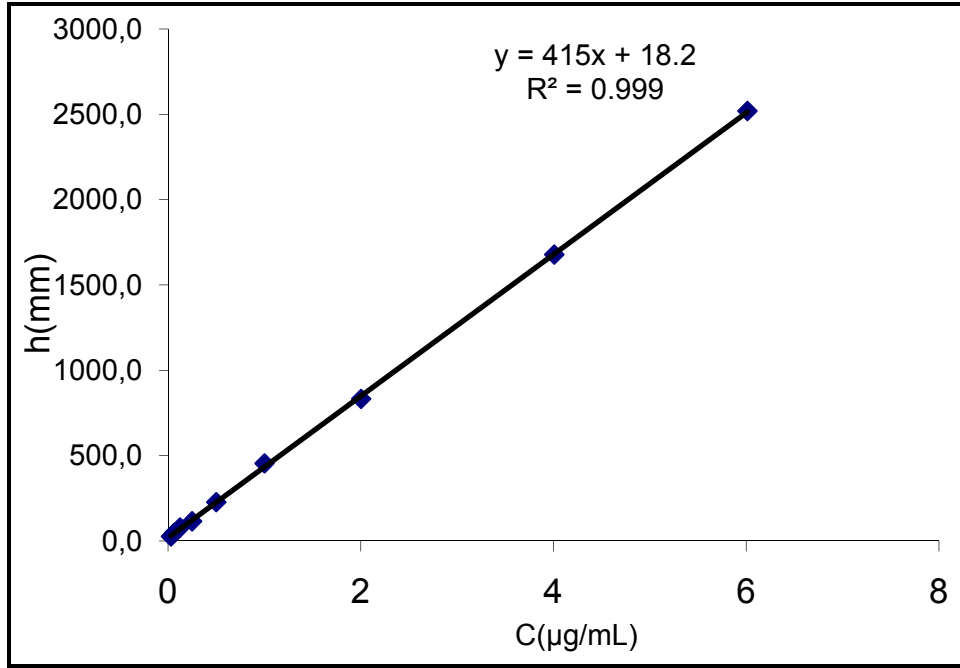
C (µg/mL)	h_{ort} (mm)	± SS	BS
0.0310	25.8	0.8	% 2.96
0.0620	45.4	1.4	% 3.16
0.125	78.0	2.0	% 2.56
0.250	115	1	% 1.01
0.501	227	2	% 0.663
1.00	454	3	% 0.712
2.00	832	15	% 1.83
4.01	1678	35	% 2.10
6.01	2520	21	% 0.846

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, h_{ort} : Pik yüksekliğinin ortalaması, (n=3)

Tablo 12. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri

DOĞRUSAL	r^2	SKT	ASKT	KASKT	S_r	AIC
REGRESYON	0.999	922	3.61	0.0490	11.5	65.4

r^2 : Determinasyon katsayısı, SKT: Sapma kareleri toplamı, ASKT: Ağırlıklı sapma kareleri toplamı, KASKT: Kare ağırlıklı sapma kareleri toplamı, S_r : Regresyonun standart sapması, AIC: Akaike bilgi ölçütü



Şekil 19. Oksitetrasiklin HCl'ün HPLC kalibrasyon grafiği

4.1.5.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde

Bölüm 3.2.1.5.2'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonuçları Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Analitik yöntemin doğruluğu ve gerielde

C (µg/mL)	C^ (µg/mL)	± SS	BS	GA±	% gerielde
0.250	0.243	0.006	% 2.62	0.007	97.0
0.501	0.508	0.009	% 1.75	0.010	101
1.00	1.00	0.01	% 1.47	0.02	99.8
2.00	1.96	0.03	% 1.41	0.03	97.8
4.01	3.99	0.01	% 0.290	0.01	99.5
				Ortalama	99.1
				± SS	1.8
				BS	% 1.79
				GA±	1.5

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

4.1.5.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Bölüm 3.2.1.5.3'de anlatıldığı şekilde yapılan deneyler sonucu sistemin kesinliğine, yöntemin kesinliğine ve tekrar edilebilirliğine ait elde edilen sonuçlar Tablo 14, 15, 16'da verilmiştir.

Tablo 14. Sistemin kesinliğine ait bulgular

C (µg/mL)	C^ (µg/mL)	% gerielde
1.00	1.01	101
1.00	0.985	98.5
1.00	0.995	99.5
1.00	0.988	98.8
1.00	1.00	100
1.00	1.01	101
Ortalama	0.997	99.7
± SS	0.009	0.9
BS	% 0.938	% 0.938
GA±	0.007	0.7

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma

GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

Tablo 15. Yöntemin kesinliğine ait bulgular

C (µg/mL)	C^ (µg/mL)	± SS	BS	GA±	% gerielde
0.501	0.515	0.006	% 1.17	0.007	103
2.00	1.97	0.01	% 0.441	0.01	98.3
4.01	3.94	0.03	% 0.815	0.04	98.2
				Ortalama	99.7
				± SS	2.6
				BS	% 2.61
				GA±	2.9

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

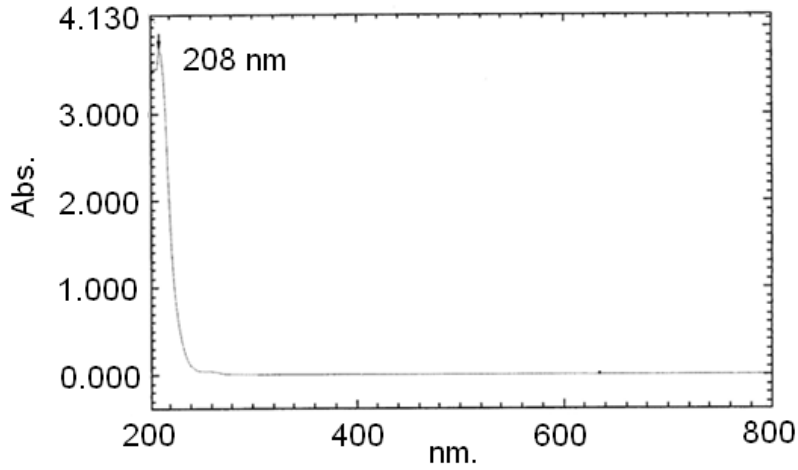
Tablo 16. Yöntemin tekrar edilebilirliğine ait bulgular

C(µg/mL)	C^(µg/mL)	± SS	BS	GA	% gerielde
2.00	1.96	0.03	% 1.73	0.04	97.8
2.00	1.98	0.02	% 0.793	0.02	98.7
2.00	1.94	0.02	% 1.13	0.02	96.9
				Ortalama	97.8
				± SS	0.9
				BS	% 0.917
				GA±	1.0

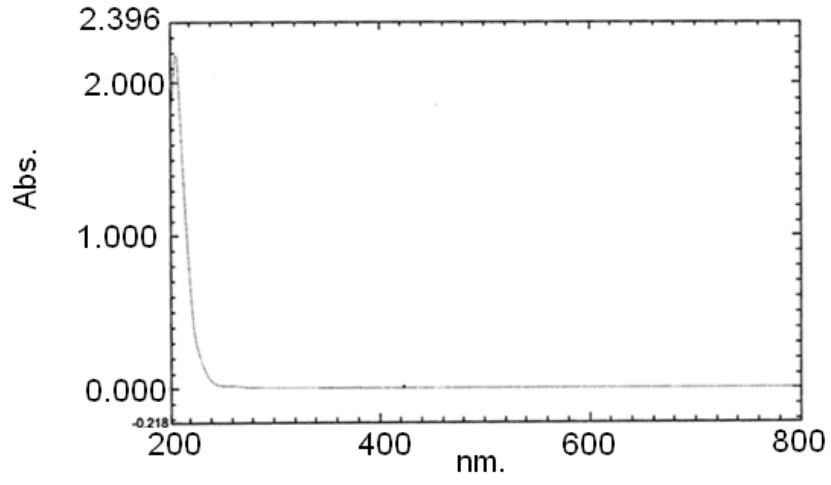
SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

4.1.5.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

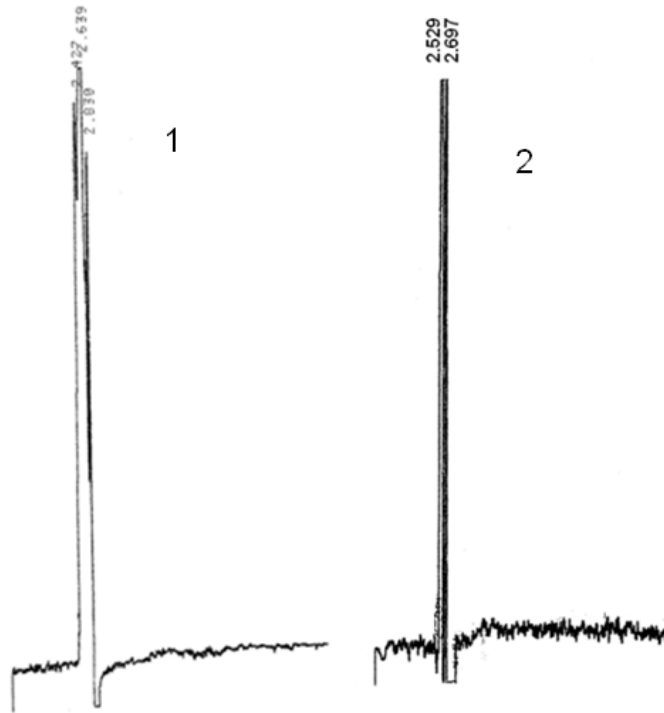
Kullanılan HPLC yönteminin özgünlüğü Bölüm 3.2.1.5.4'de anlatıldığı şekilde denetlendi. Özgünlüğe ilişkin UV spektrumu ve kromatogramlar Şekil 20, 21 ve 22'de verilmiştir.



Şekil 20. Polimiksin B sülfatın bidistile sudaki (300 µg/mL) UV spektrumu



Şekil 21. Polimiksin B sülfatın metanoldeki (100 µg/mL) UV spektrumu



Şekil 22. Özgünlüğe ilişkin kromatogram: 1. Boş serum fizyolojik kromatogramı 2. Polimiksin B sülfat (300 µg/mL) enjeksiyonuna ait kromatogram

4.1.5.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

Bölüm 3.2.1.5.5’de açıklandığı şekilde hazırlanan 0.0310 µg/mL ve 0.0160 µg/mL’lik örneklerin analizi sonucu 0.0310 µg/mL’lik örneğin bağıl sapması % 0.94, gerieldesesi % 98 bulundu. LOQ 0.0310 µg/mL olarak kabul edildi. HPLC kromatogramları incelenerek, sinyal/gürültü oranı 3:1 ve analitik yöntemin LOD değeri 0.0160 µg/mL olarak kabul edildi.

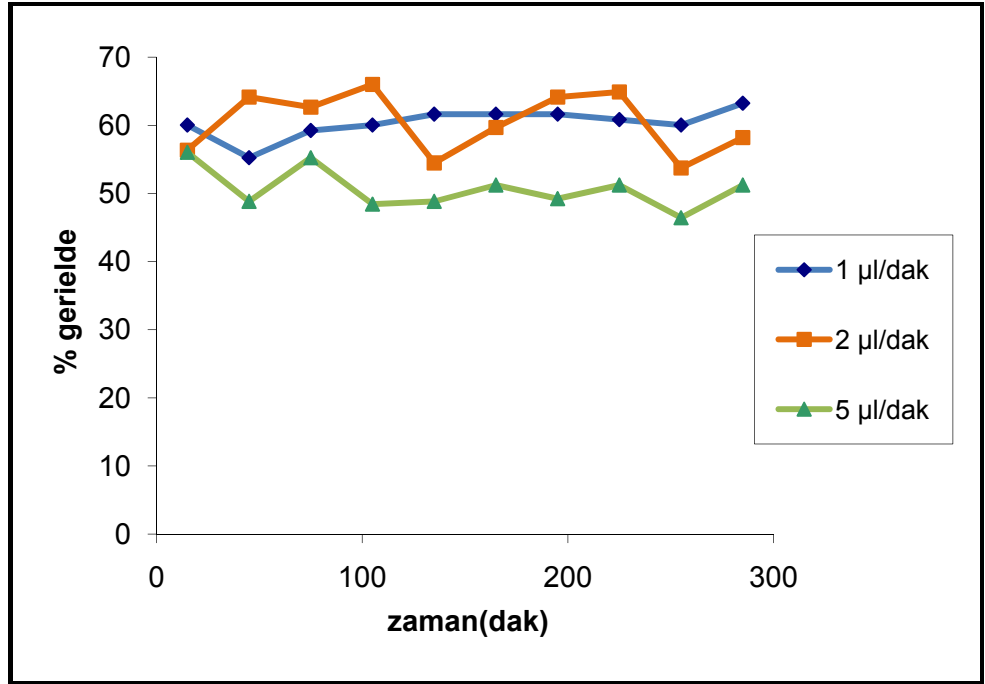
4.1.6. **İn Vitro Gerielde Deneyleri**

4.1.6.1. İn Vitro Gerielde Üzerine Akış Debisinin Etkisi

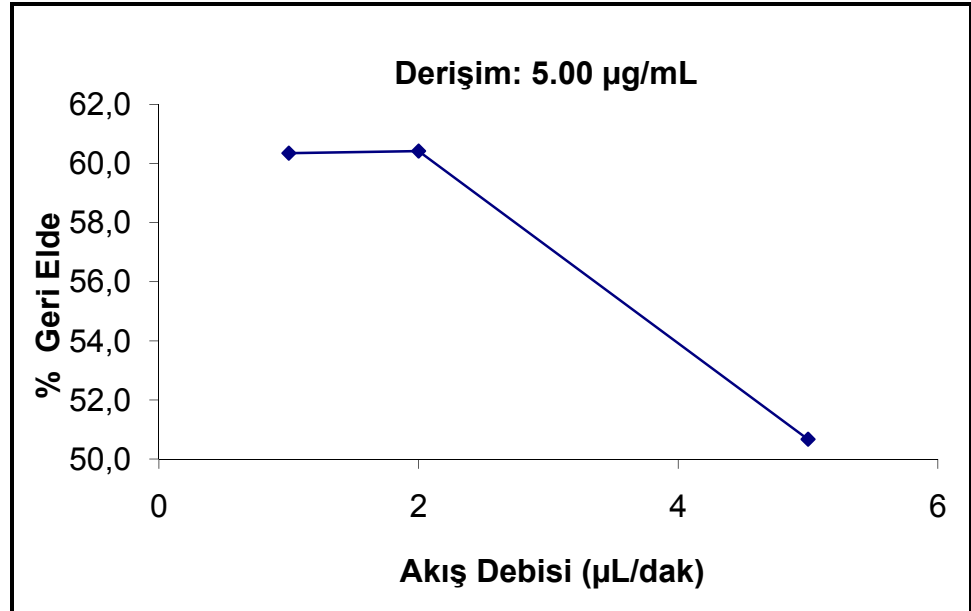
Bölüm 3.2.1.6.1.1’de anlatıldığı şekilde, 1, 2 ve 5 µL/dak olmak üzere üç farklı akış debisinde yapılan in vitro gerielde deneyine ait sonuçlar Tablo 17’de, zamana karşı % gerielde grafiği Şekil 23’de ve akış debisine karşı % gerielde grafiği Şekil 24’de verilmiştir.

Tablo 17. İn vitro gerielde deneyine ait sonuçlar

Akış Debisi	1 µL/dak		2 µL/dak		5 µL/dak	
t(dak)	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde
15	3.00	60.0	2.82	56.3	2.80	56.0
45	2.76	55.2	3.21	64.1	2.44	48.8
75	2.96	59.2	3.13	62.7	2.76	55.2
105	3.00	60.0	3.30	66.0	2.42	48.4
135	3.08	61.6	2.72	54.5	2.44	48.8
165	3.08	61.6	2.98	59.7	2.56	51.2
195	3.08	61.6	3.21	64.1	2.46	49.2
225	3.04	60.8	3.24	64.9	2.56	51.2
255	3.00	60.0	2.69	53.7	2.32	46.4
285	3.16	63.2	2.91	58.2	2.56	51.2
	Ortalama	60.3	Ortalama	60.4	Ortalama	50.7
	± SS	2.1	± SS	4.5	± SS	3.0
	% BS	3.5	% BS	7.5	% BS	6.0



Şekil 23. 1, 2 ve 5 µL/dak olmak üzere üç farklı akış debisine ait zamana karşı in vitro geri elde



Şekil 24. Akış debisine karşı % geri elde grafiği

4.1.6.2. İn vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi

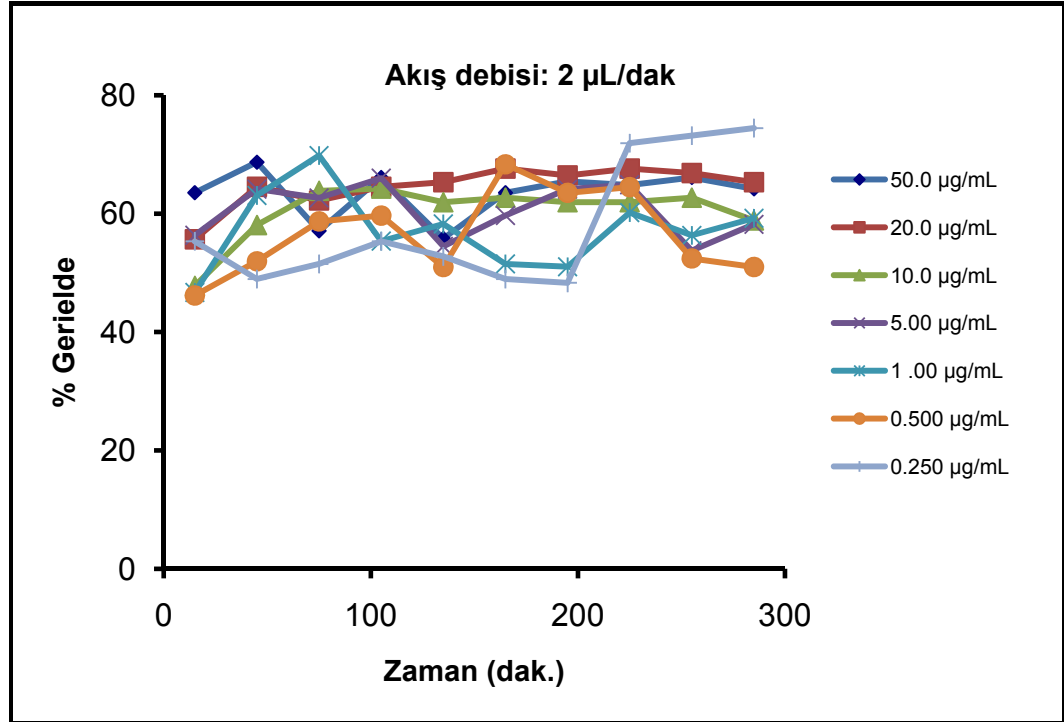
Bölüm 3.2.1.6.1.2’de anlatıldığı şekilde, 0.250, 0.500, 1.00, 10.0, 20.0, 50.0 µg/mL derişimde yapılan in vitro gerielde deneyine ait sonuçlar Tablo 18 ve 19’da ve zamana karşı % gerielde grafiğı Şekil 25’de verilmiştir. Derişime karşı % gerielde grafiğı Şekil 26’da, ortam derişimine karşı dializat derişimi korelasyonu Şekil 27’de verilmiştir.

Tablo 18. 0.250, 0.500, 1.00 µg/mL derişime ait in vitro gerielde sonuçları

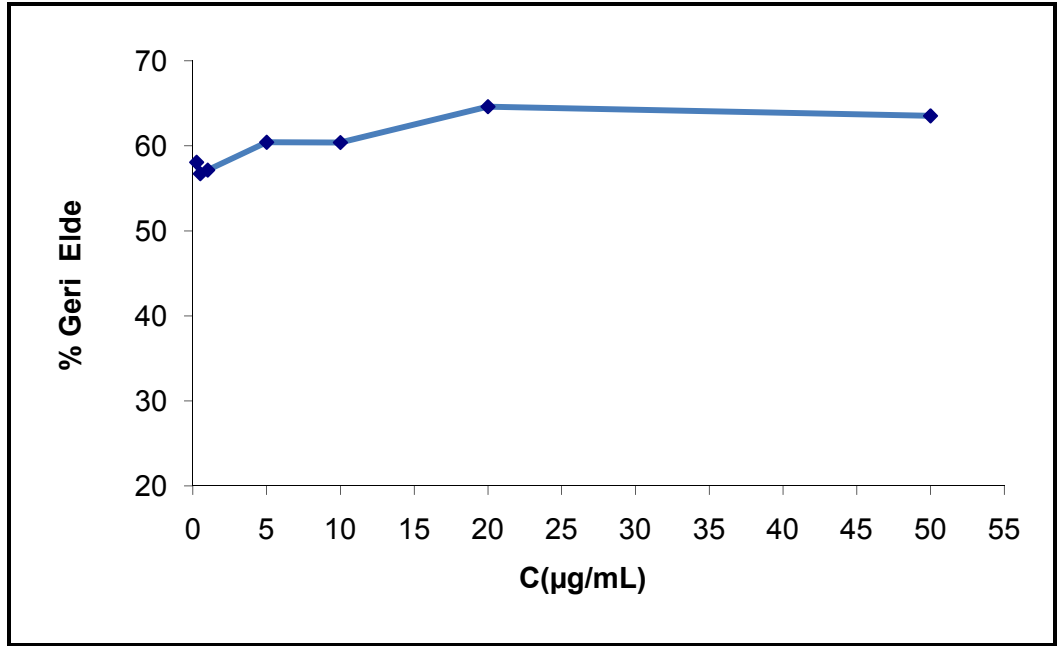
Derişim	0.250 µg/mL		0.500 µg/mL		1.00 µg/mL	
t(dak)	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C _{dializat} (µg/mL)	% Gerielde
15	0.138	55.3	0.231	46.2	0.467	46.7
45	0.122	48.9	0.260	51.9	0.631	63.1
75	0.129	51.5	0.293	58.7	0.698	69.8
105	0.138	55.3	0.298	59.7	0.554	55.4
135	0.132	52.8	0.255	51.0	0.583	58.3
165	0.122	48.9	0.342	68.3	0.515	51.5
195	0.121	48.3	0.318	63.5	0.510	51.0
225	0.180	71.9	0.322	64.5	0.602	60.2
255	0.183	73.2	0.262	52.4	0.563	56.3
285	0.186	74.4	0.255	51.0	0.592	59.2
	Ortalama	58.1	Ortalama	56.7	Ortalama	57.1
	± SS	10.7	± SS	7.2	± SS	6.6
	% BS	18.5	% BS	12.8	% BS	11.6

Tablo 19. 10.0, 20.0, 50.0 µg/mL derişime ait in vitro gerielde sonuçları

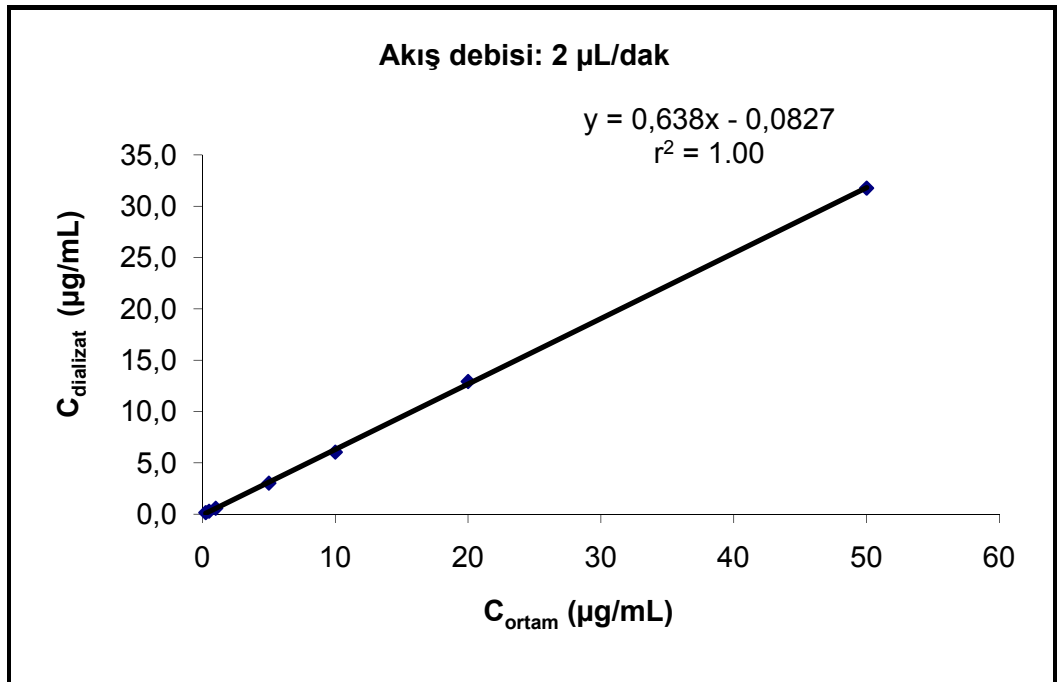
Derişim	10.0 µg/mL		20.0 µg/mL		50.0 µg/mL	
t (dak)	C (µg/mL)	% Gerielde	C (µg/mL)	% Gerielde	C (µg/mL)	% Gerielde
15	4.80	47.8	11.1	55.7	31.8	63.5
45	5.80	58.1	12.9	64.5	34.3	68.7
75	6.40	63.8	12.4	62.2	28.5	57.1
105	6.40	64.2	12.9	64.5	33.1	66.1
135	6.20	61.9	13.1	65.3	27.9	55.8
165	6.30	62.7	13.5	67.6	31.8	63.5
195	6.20	61.9	13.3	66.5	32.7	65.5
225	6.20	61.9	13.5	67.6	32.4	64.8
255	6.30	62.7	13.4	66.8	33.1	66.1
285	5.90	58.8	13.1	65.3	32.1	64.2
	Ortalama	60.4	Ortalama	64.6	Ortalama	63.5
	± SS	4.8	± SS	3.5	± SS	4.0
	% BS	8.0	% BS	5.5	% BS	6.4



Şekil 25. 2 µL/dak akış debisinde zamana karşı % gerielde grafiği



Şekil 26. Derişime karşı % gerielde grafiğı



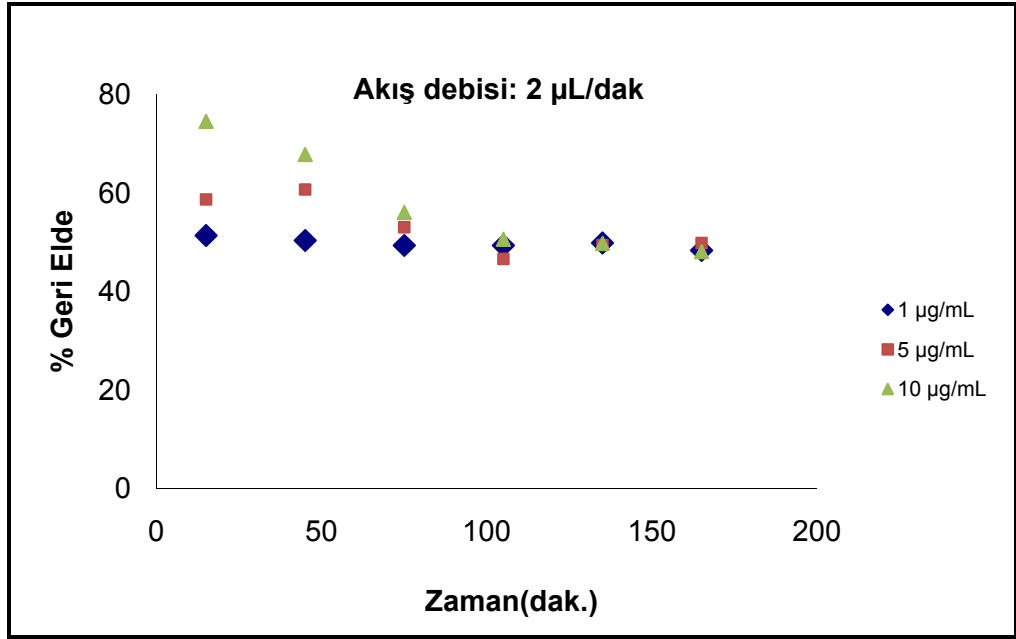
Şekil 27. Ortam derişimine karşı dializat derişimi korelasyonu

4.1.7. İn Vitro % Kayıp Deneyleri

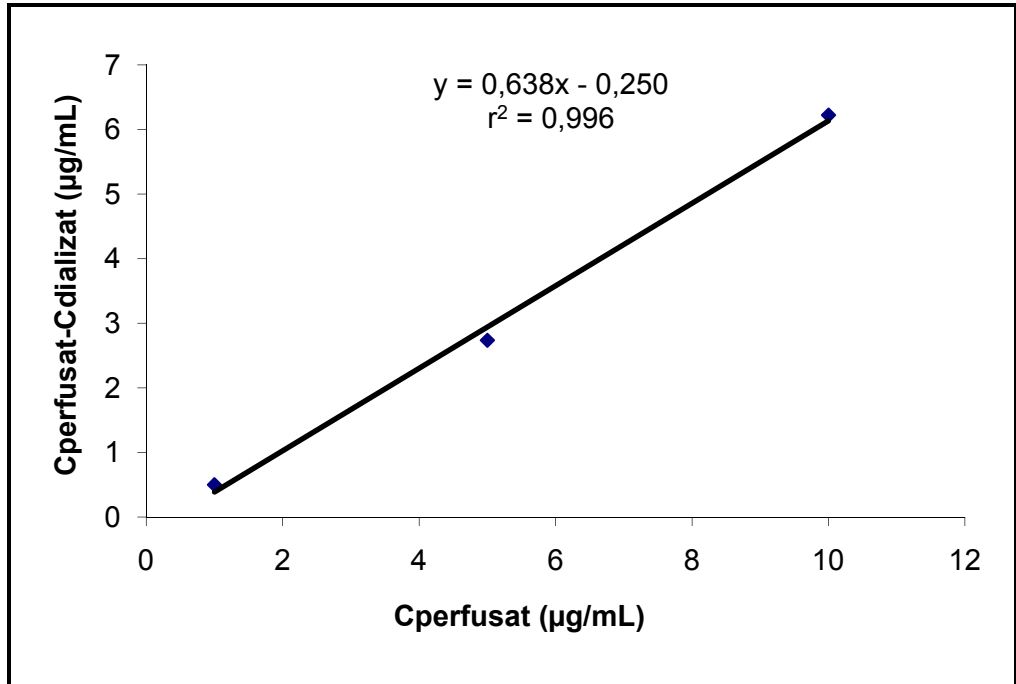
Bölüm 3.2.1.6.2’de anlatıldığı şekilde yapılan, 1.00, 5.00 ve 10.0 µg/mL derişimlerine ait in vitro % kayıp deney sonuçları Tablo 20’de ve zamana karşı % gerielde grafiği Şekil 28’de verilmiştir. $C_{\text{perfüzat}}$ derişimleri ile $C_{\text{perfüzat}} - C_{\text{dializat}}$ arasındaki korelasyona ait grafik Şekil 29’da verilmiştir.

Tablo 20. 1.00, 5.00 ve 10.0 µg/mL derişimlerine ait in vitro % kayıp deney sonuçları

Derişim	1.00 µg/mL		5.00 µg/mL		10.0 µg/mL	
t (dak)	C_{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C_{dializat} (µg/mL)	% Gerielde	C_{dializat} (µg/mL)	% Gerielde
15	0.486	51.4	2.07	58.7	2.55	74.5
45	0.496	50.4	1.97	60.7	3.22	67.8
75	0.507	49.3	2.35	53.0	4.40	56.0
105	0.507	49.3	2.67	46.6	4.94	50.6
135	0.501	49.9	2.53	49.4	5.02	49.8
165	0.517	48.3	2.51	49.8	5.19	48.1
	ortalama	49.8	ortalama	53.0	ortalama	57.8
	± SS	1.03	± SS	5.57	± SS	10.9
	% BS	2.06	% BS	10.5	% BS	18.8



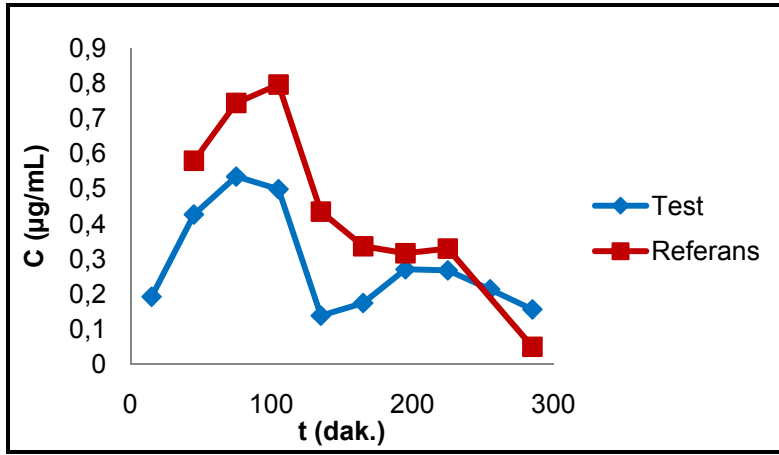
Şekil 28. 1.00, 5.00, 10.0 µg/mL derişimde ve 2 µL/dak akış debisinde zamana karşı in vitro % kayıp grafiğı



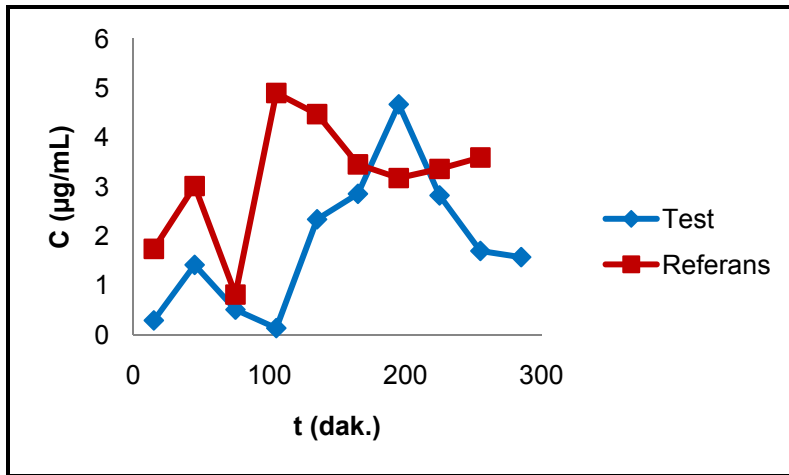
Şekil 29. $C_{\text{perfüzat}}$ ile $(C_{\text{perfüzat}} - C_{\text{dializat}})$ arasındaki korelasyon

4.1.8. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Merhemden Mikrodializ Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi

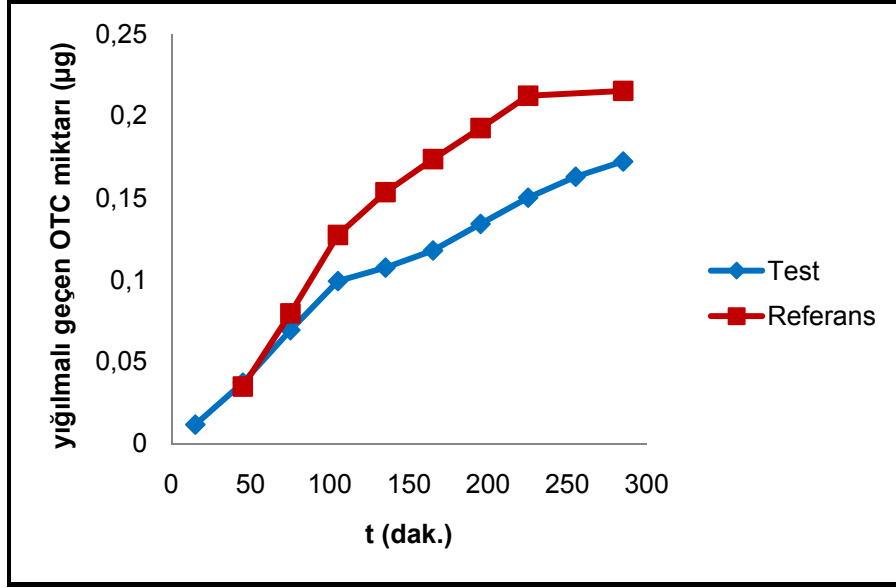
Bölüm 3.2.1.7’de anlatıldığı şekilde yapılan OTC HCl’ün Test ve Referans formülasyondan MD membranına difüzyonu deneyine ait zamana karşı derişim, yığılmalı atılan miktar ve atılma hızı, sırasıyla Şekil 30, 31, 32, 33, 34 ve 35’de verilmiştir.



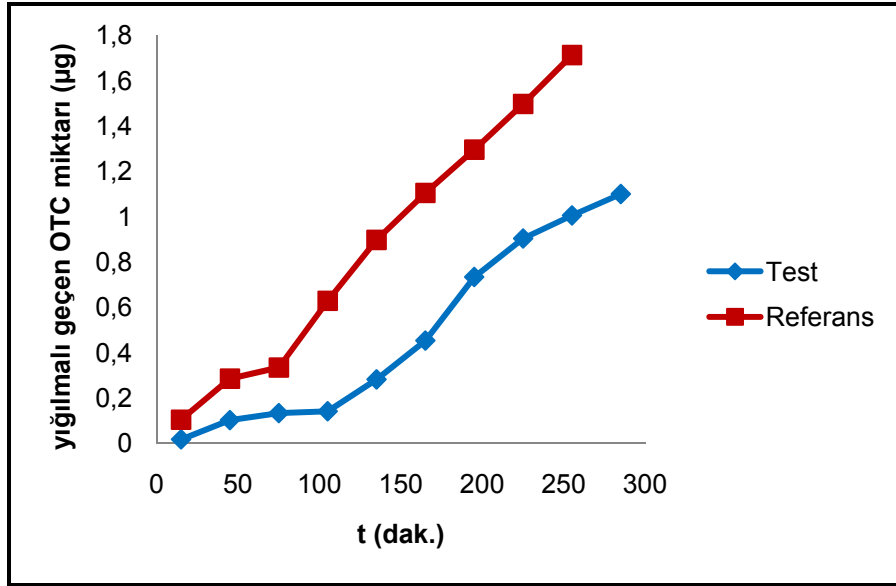
Şekil 30. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl’ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-derişim profili



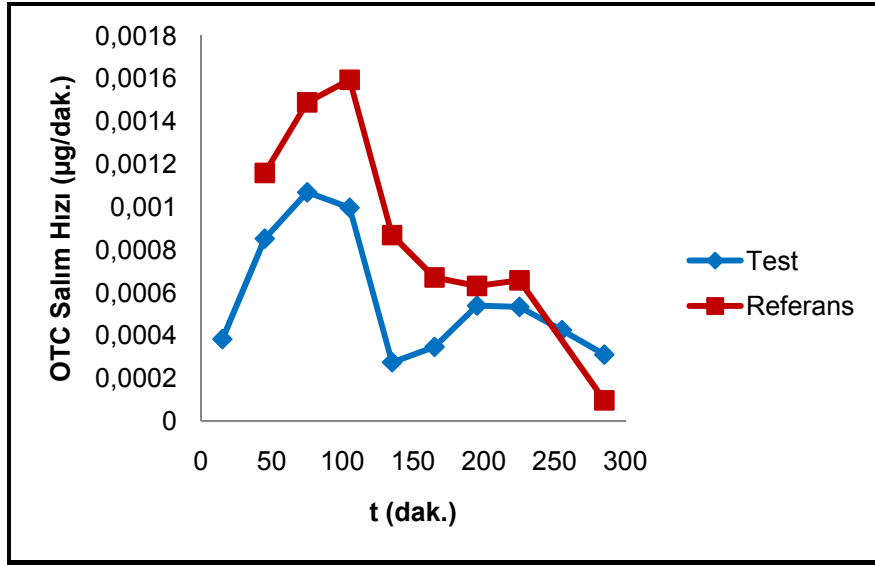
Şekil 31. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl’ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-derişim profili



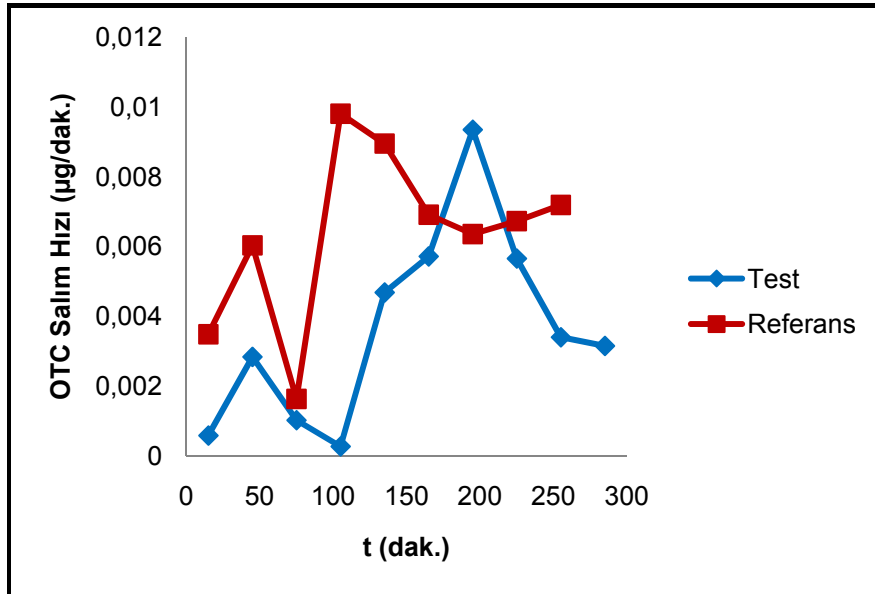
Şekil 32. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-yığılmalı atılan miktar profili



Şekil 33. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-yığılmalı atılan miktar profili



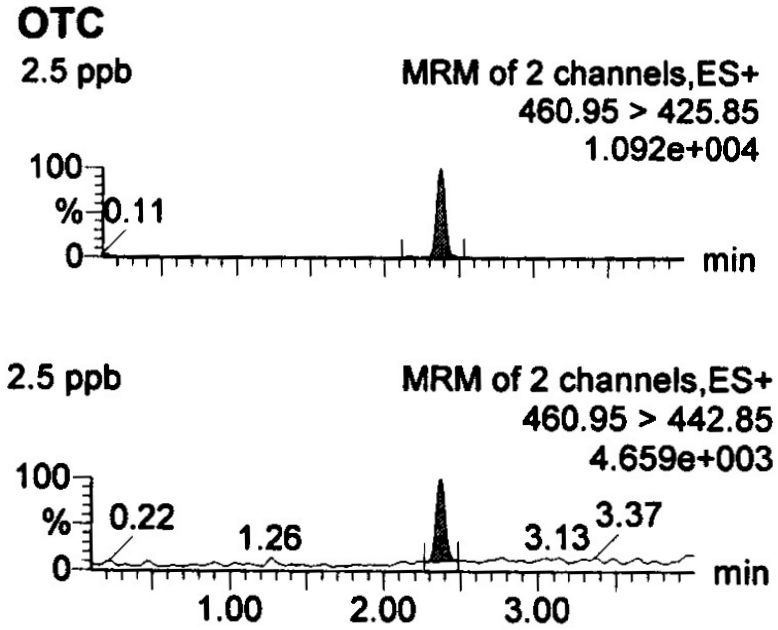
Şekil 34. 200 µL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-atılma hızı profili



Şekil 35. 3 mL ortamda oksitetrasiklin HCl'ün Test ve Referans formülasyonundan mikrodializ membranına difüzyonuna ait zaman-atılma hızı profili

4.1.9. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini

OTC HCl'ün MD örneklerinden analizi için literatürdeki yöntem²⁰¹, Bölüm 3.2.1.8'de belirtildiği şekilde değişiklikler yapılarak kullanıldı. MD örnekleri, % 20 metanol içerecek şekilde, metanol-su ile 2.5-5 kat seyreltilerek analiz edildi. Kalibrasyon aralığı, 0.500-100 ng/mL olarak alındı. Değişik derişimlerdeki OTC HCl'e ait HPLC kromatogramları Şekil 36 ve 37'de verilmiştir. Test ve referans formülasyonu uygulanan bir deneğin 30-60. dakikadaki MD örneğine ait OTC HCl UPLC-MSMS kromatogramları Şekil 38 ve 39'da verilmiştir.

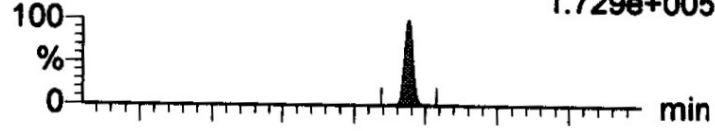


Şekil 36. Oksitetrasiklin HCl'ün (2.50 ng/mL) UPLC-MS-MS kromatogramı

OTC

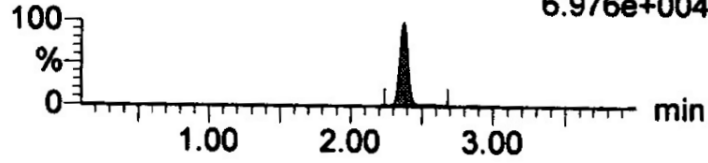
40 ppb

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 425.85
1.729e+005



40 ppb

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 442.85
6.976e+004

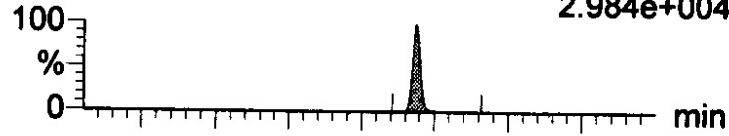


Şekil 37. Oksitetrasiklin HCl'ün (40.0 ng/mL) UPLC-MS-MS kromatogramı

OTC

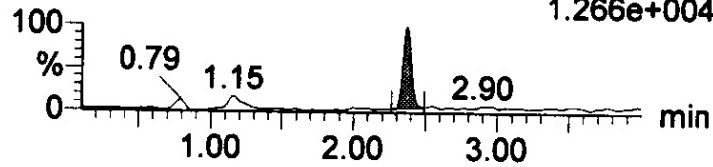
651430-01P1

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 425.85
2.984e+004



651430-01P1

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 442.85
1.266e+004

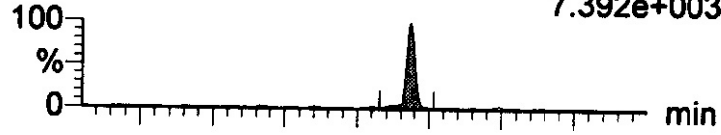


Şekil 38. Test preparatı uygulanan bir deneğin 30-60. dakikadaki mikrodializ örneğine ait oksitetrasiklin HCl UPLC-MS-MS kromatogramı

OTC

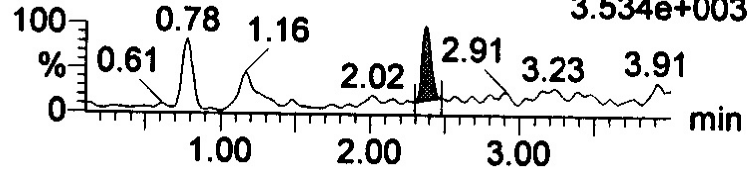
651422-01T1

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 425.85
7.392e+003



651422-01T1

MRM of 2 channels, ES+
460.95 > 442.85
3.534e+003



Şekil 39. Referans preparatı uygulanan bir deneğin 30-60. dakikadaki mikrodializ örneğine ait oksitetrasiklin HCl UPLC-MS-MS kromatogramı

4.1.10. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu

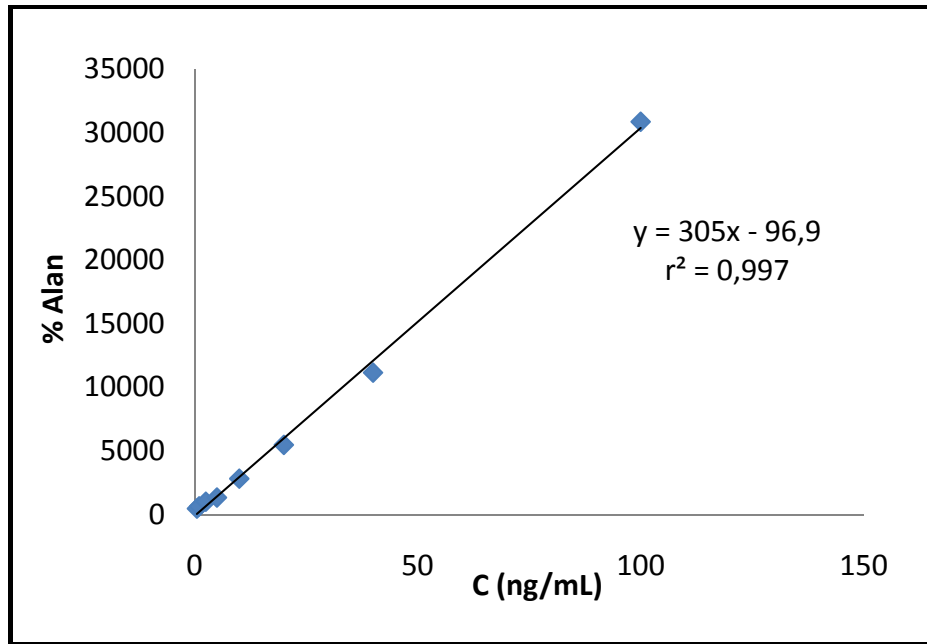
4.1.10.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

Bölüm 3.2.1.9.1'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 40'da, uyum ölçütleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri

DOĞRUSAL	r^2	ASKT	KASKT	S_r	AIC
REGRESYON	0.997	929	1.38	563	120

r^2 : Determinasyon katsayısı, ASKT: Ağırlıklı sapma kareleri toplamı, KASKT: Kare ağırlıklı sapma kareleri toplamı, S_r : Regresyonun standart sapması, AIC: Akaike bilgi ölçütü



Şekil 40. Oksitetrasiklin HCl'ün kalibrasyon grafiği

4.1.10.2. Analitik Yöntemin Doğruluğu ve Gerielde

Bölüm 3.2.1.9.2'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonucu Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Analitik yöntemin doğruluğu ve gerielde

C (ng/mL)	C^ (ng/mL)	% gerielde
5.00	4.80	96.1
10.0	10.5	105
20.0	19.6	98.0
	Ortalama	99.5
	± SS	4.4
	BS	% 4.5
	GA±	5.0

SS: Standart sapma, BS: Bağlı sapma,
GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=2)

4.1.10.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Bölüm 3.2.1.9.3'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonucu Tablo 23'de verilmiştir.

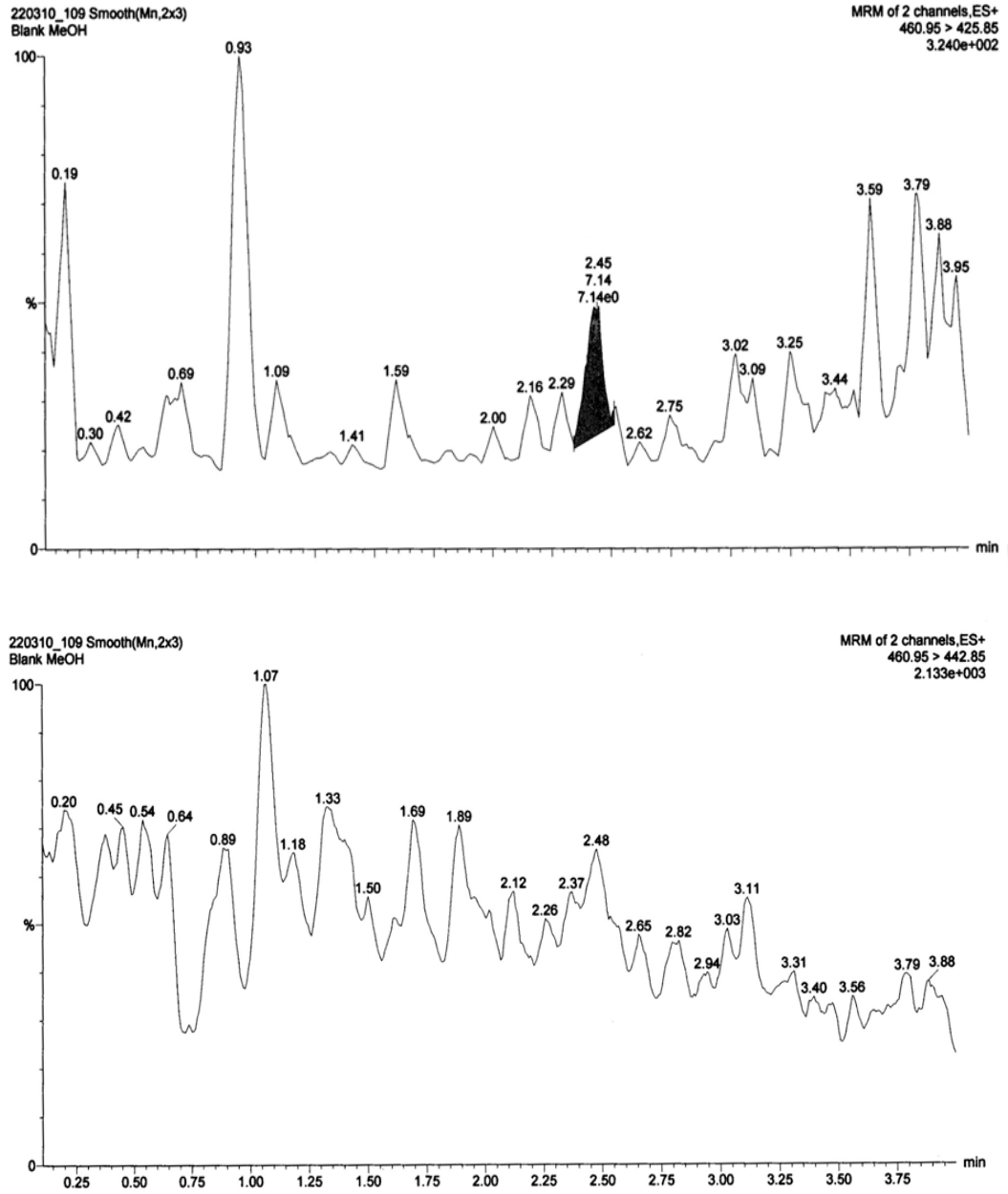
Tablo 23. Analitik yöntemin kesinliği

C (ng/mL)	C^ (ng/mL)	SS	BS	GA±	% gerielde
5.00	5.21	0.46	% 8.87	0.523	104
10.0	9.79	0.21	% 2.10	0.233	97.9
40.0	37.9	0.9	% 2.31	0.989	94.8
100	105	3	% 2.79	3.31	105
				Ortalama	101
				± SS	5
				BS	% 4.90
				GA±	4.83

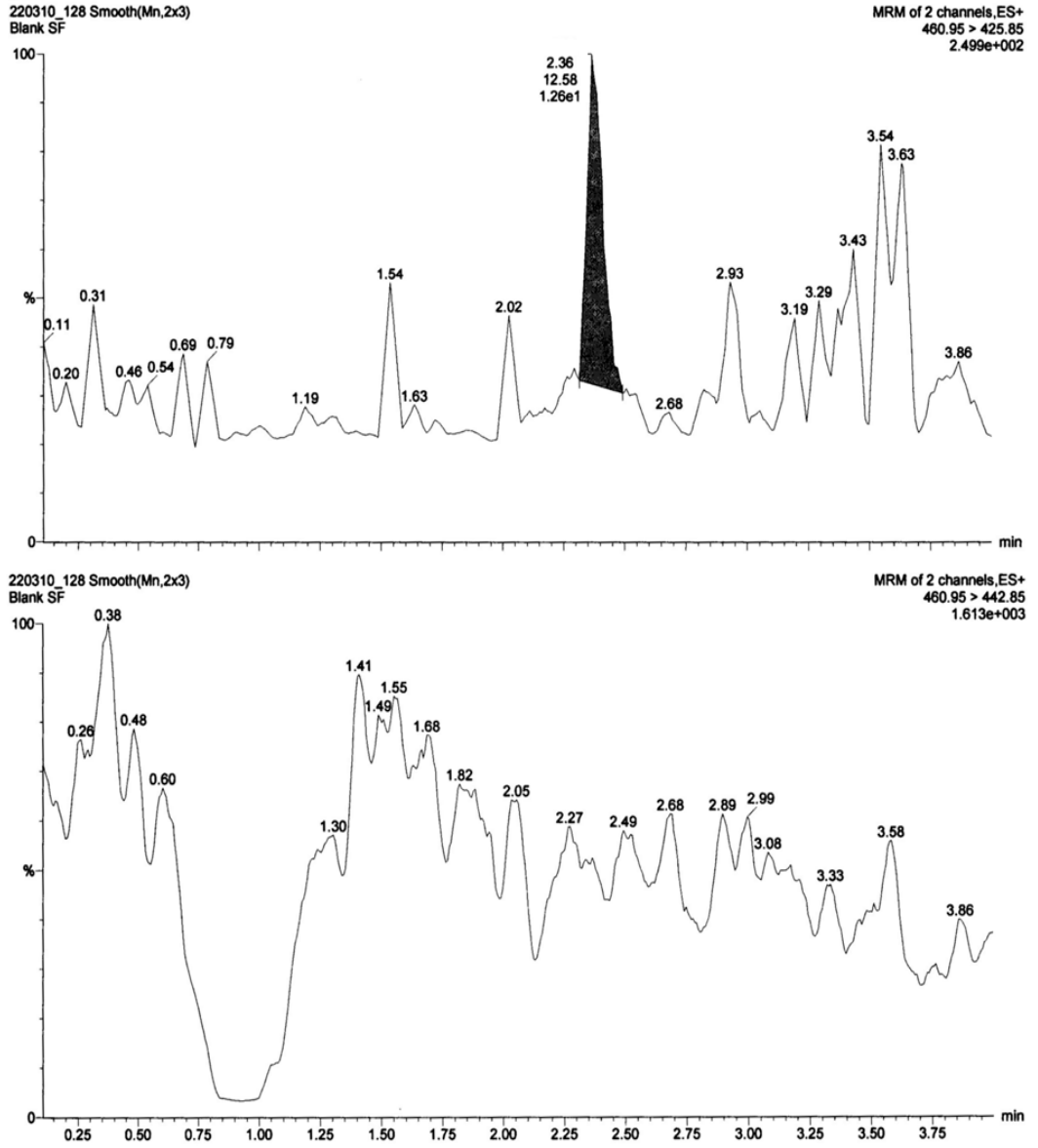
SS: Standart sapma, BS: Bağlı sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı
(n=2)

4.1.10.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

Kullanılan UPLC-MS-MS yönteminin özgünlüğü ve seçiciliği Bölüm 3.2.1.9.4'de anlatıldığı şekilde test edildi. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kromatogramlar Şekil 41 ve 42'de verilmiştir.



Şekil 41. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kütle kromatogramı: Metanol kromatogramı



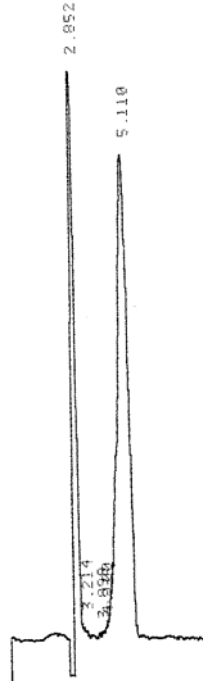
Şekil 42. Özgülük ve seçiciliğe ilişkin kütle kromatogramı: Boş serum fizyolojik örneği

4.1.10.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

Bölüm 3.2.1.9.5’de anlatıldığı şekilde yapılan enjeksiyonlardan, analitik yöntemin LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0.600 ve 0.200 ng/mL olarak bulundu.

4.1.11. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi

Kalibrasyon için, örnekler metanolde hazırlanarak dokuz noktalı kalibrasyon yapıldı. Yöntem, kolon, mobil faz oranı, akış hızı, enjeksiyon hacmi ve UV dedektörün dalga boyunda Bölüm 3.2.1.10’da belirtildiği şekilde uygulanmıştır. OTC HCl’e ait HPLC kromatogramı Şekil 43’de verilmiştir.



Şekil 43. Oksitetrasiklin HCl’ün (4.00 µg/mL) kromatogramı

4.1.12. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyonu

4.1.12.1. Analitik Yöntemin Doğrusallığı

Bölüm 3.2.1.11.1’de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonuçları Tablo 24’de, uyum ölçütleri Tablo 25’de ve kalibrasyon grafiği Şekil 44’de verilmiştir.

Tablo 24. Analitik yöntemin doğrusallığına ait bulgular

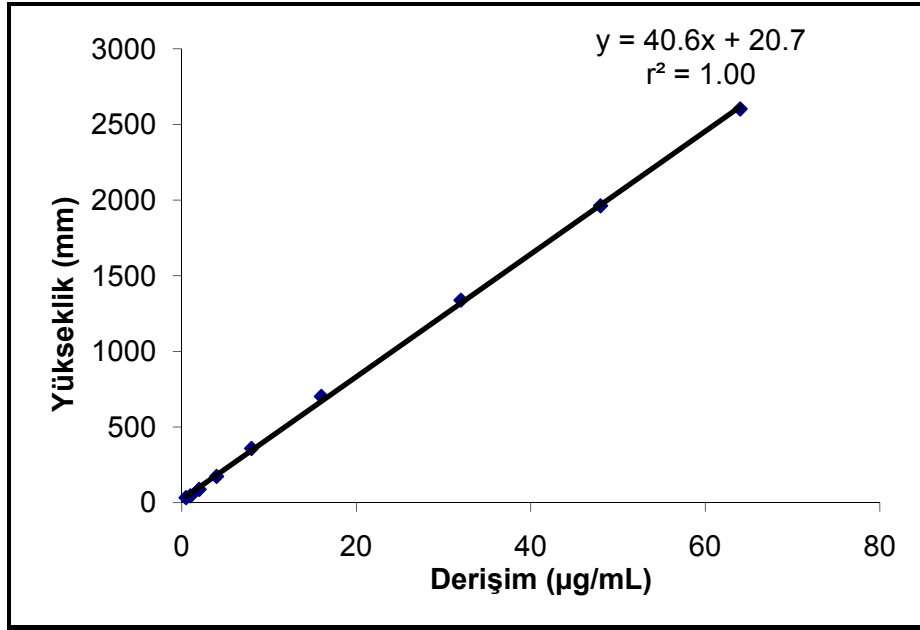
C (µg/mL)	h_{ort} (mm)	± SS	BS
0.500	33.5	0.5	% 1.49
1.00	45.3	0.8	% 1.68
2.00	88.2	1.6	% 1.82
4.00	174	1	% 0.575
8.00	359	6	% 1.70
16.0	703	8	% 1.18
32.0	1339	24	% 1.82
48.0	1963	9	% 0.471
64.0	2603	49	% 1.88

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, (n=3)

Tablo 25. Doğrusal regresyona ait uyum ölçütleri

DOĞRUSAL	r^2	SKT	ASKT	KASKT	S_r	AIC
REGRESYON	0.999	2465	10.3	0.126	18.8	74.3

r^2 : Determinasyon katsayısı, SKT: Sapma kareleri toplamı, ASKT: Ağırlıklı sapma kareleri toplamı, KASKT: Kare ağırlıklı sapma kareleri toplamı, S_r : Regresyonun standart sapması, AIC: Akaike bilgi ölçütü



Şekil 44. Oksitetrasiklin HCl'ün HPLC kalibrasyon grafiğı

4.1.12.2. Analitik Yöntemin Doğruluğı ve Gerielde

Bölüm 3.2.1.11.2'de anlatıldığı şekilde yapılan deney sonuçları Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 26. Analitik yöntemin doğruluğı ve gerielde

C(µg/mL)	C^(µg/mL)	± SS	BS	% 95 olasılıklı GA	% gerielde
2.00	2.06	0.01	% 0.597	0.01	103
5.00	4.94	0.03	% 0.576	0.03	98.8
10.0	9.66	0.12	% 1.28	0.14	96.6
20.0	19.6	0.2	% 1.00	0.2	98.0
40.0	39.2	0.4	% 1.16	0.5	98.0
				Ortalama	99.0
				SS	2.5
				BS	% 2.56
				GA±	2.2

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

4.1.12.3. Analitik Yöntemin Kesinliği

Bölüm 3.2.1.11.3'de anlatıldığı şekilde yapılan deneyler sonucu sistemin kesinliğine, yöntemin kesinliğine ve tekrar edilebilirliğine ait elde edilen sonuçlar Tablo 27, 28 ve 29'da verilmiştir.

Tablo 27. Sistemin kesinliğine ait bulgular

C(µg/mL)	C^(µg/mL)	% gerielde
12.0	12.1	101
12.0	11.8	98.4
12.0	11.8	98.4
12.0	11.9	99.3
12.0	12.0	99.7
12.0	11.9	99.3
12.0	12.0	100
12.0	12.0	99.7
12.0	11.9	98.9
12.0	12.0	100
Ortalama	11.9	99.5
± SS	0.1	0.8
BS	% 0.785	% 0.785
GA±	0.1	0.484

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma

GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

Tablo 28. Yöntemin kesinliğine ait bulgular

C (µg/mL)	C^ (µg/mL)	± SS	BS	GA±	% gerielde
2.00	2.07	0.02	% 0.941	0.02	103
24.0	24.8	0.1	% 0.237	0.06	103
40.0	41.6	0.3	% 0.753	0.34	104
				Ortalama	103
				± SS	0.4
				BS	% 0.434
				GA±	0.5

SS: Standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±: % 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

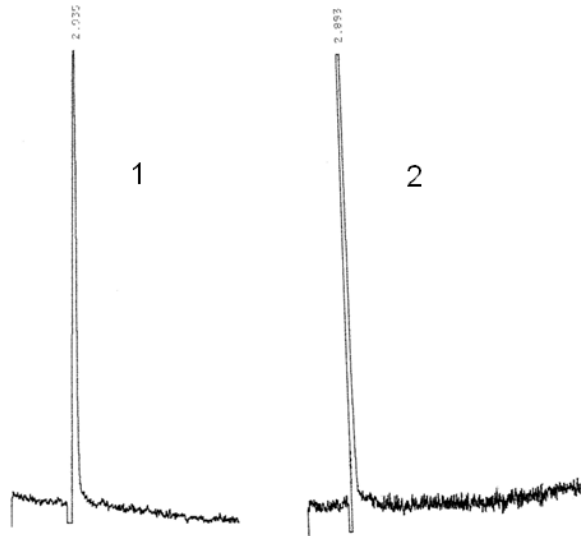
Tablo 29. Yöntemin tekrar edilebilirliğine ait bulgular

C (µg/mL)	C^ (µg/mL)	± SS	BS	GA±	% gerielde
12.0	12.0	0.1	% 0.474	0.1	100
12.0	12.2	0.1	% 0.949	0.1	102
12.0	12.1	0.2	% 1.25	0.2	101
				Ortalama	101
				± SS	0.8
				BS	% 0.812
				GA±	0.9

SS: standart sapma, BS: Bağıl sapma, GA±:% 95 olasılıklı güven aralığı, (n=3)

4.1.12.4. Analitik Yöntemin Özgünlüğü ve Seçiciliği

Bölüm 3.2.1.11.4'de anlatıldığı şekilde test edilen özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kromatogramlar Şekil 45'de verilmiştir.



Şekil 45. Özgünlük ve seçiciliğe ilişkin kromatogram:

1. Boş metanol kromatogramı 2. Boş bantın metanolde ekstre edilmesinden elde edilen örneğe ait kromatogram

4.1.12.5. Analitik Yöntemin Duyarlılığı

Bölüm 3.2.1.11.5'de açıklandığı şekilde yapılan analiz sonucu, 0.5 µg/mL'lik örneğin bağıl sapması % 1.49 bulunmuştur. Standart doğrunun hazırlanmasında kullanılan en küçük derişim olan 0.500 µg/mL LOQ ve 0.100 µg/mL LOD olarak kabul edildi.

4.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR

4.2.1. Dermal Mikrodiyaliz Çalışması

Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde yapılan in vivo MD çalışması sonucu elde edilen, deneklere ait zamana karşı OTC HCl dermis derişimleri Tablo 30'da ve Test ve Referans preparatları için zaman-dermis derişimleri Şekil 46'da verilmiştir. Şekil 47 ve 48'de ortalama dermis derişimlerine ait normal ve yarı-logaritmik grafikler verilmektedir.

Çalışmaya katılan 6. deneğe ait örneklerde oluşan analiz sorunu nedeniyle, bu denek çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmaya katılan 7. denekte ise problemlerin implantasyonunda yaşanan güçlük nedeniyle, denek çalışmadan çıkarılmıştır. Bu denekte, deri altında membran çevresindeki aşırı pıhtılaşmadan dolayı, proplardan düzgün akış sağlanamamıştır. Deneğin de strese girmesi nedeniyle, tekrar prob implantasyonu gerçekleştirilememiştir. MD çalışması on denek ile gerçekleştirilmiştir.

MD verilerinden elde edilen, Test ve Referans preparatlarına ait BY ölçütleri, $AUC_{0 \rightarrow n}$, C_{maks} ve t_{maks} Tablo 31'de verilmiştir.

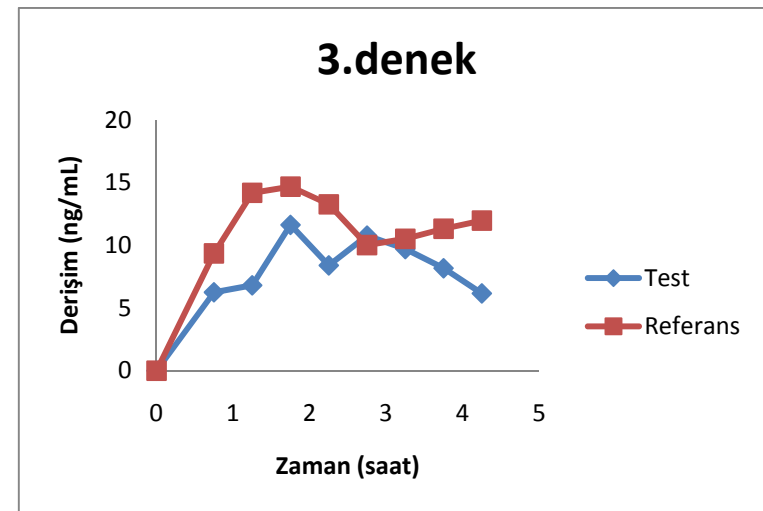
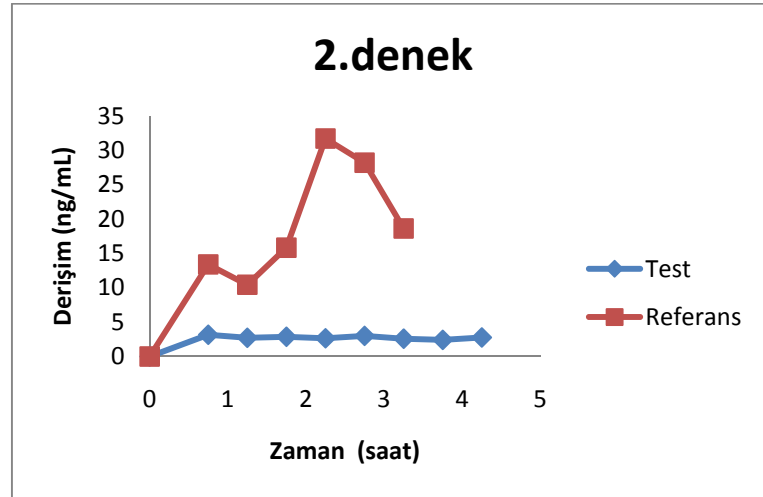
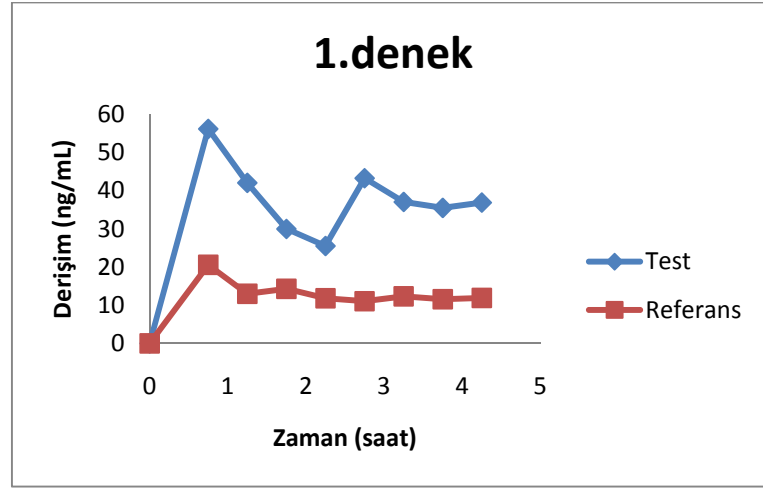
Tablo 30. Sağlıklı gönüllülerde Test (T) ve Referans (R) için oksitetrasiklin HCl dermis derişimleri

1.denek			2.denek		3.denek		4.denek	
t _{orta} (saat)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	20.6	56.3	13.4	3.15	9.36	6.26	4.36	36.6
1.25	13.0	42.1	10.4	2.72	14.2	6.82	4.88	15.3
1.75	14.3	30.0	15.8	2.86	14.7	11.6	3.12	9.42
2.25	11.8	25.6	31.7	2.64	13.3	8.41	3.35	10.7
2.75	11.1	43.3	28.2	2.99	10.0	10.8	2.96	*
3.25	12.3	37.1	18.6	2.58	10.5	9.71	2.99	10.3
3.75	11.6	35.6	*	2.41	11.3	8.18	3.14	6.97
4.25	11.9	36.9	*	2.76	12.0	6.17	3.44	9.12

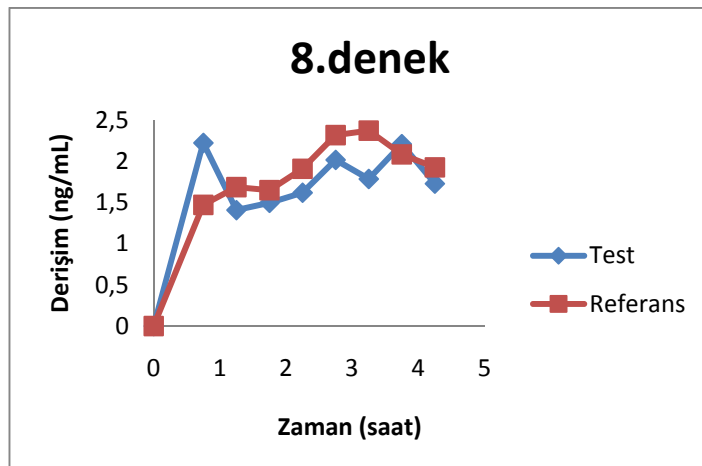
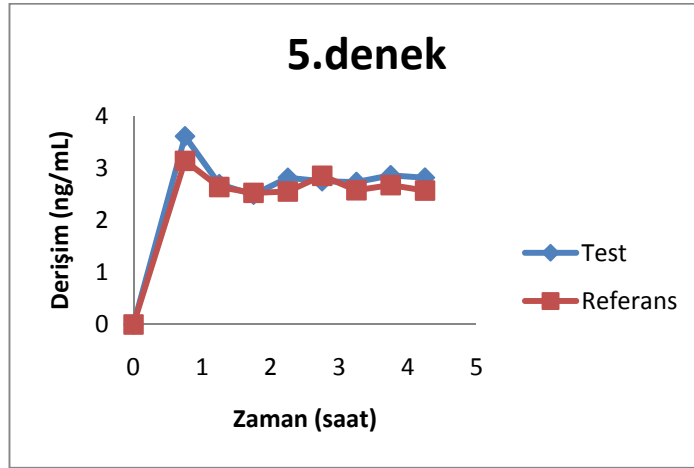
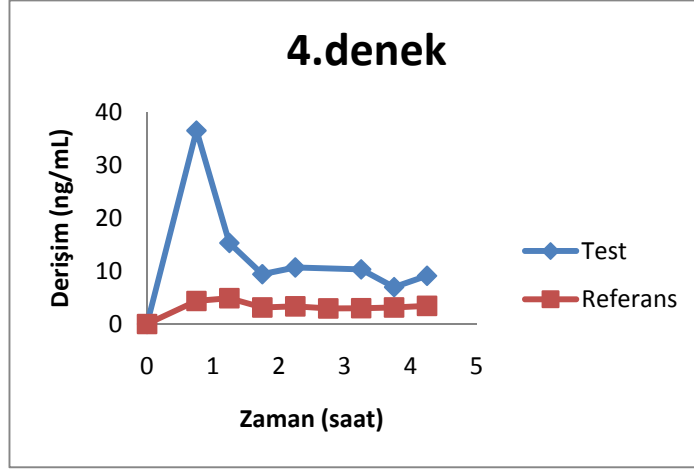
5.denek			8.denek		9.denek		10.denek	
t _{orta} (saat)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	3.14	3.61	1.47	2.22	4.49	11.1	12.1	7.34
1.25	2.64	2.69	1.69	1.41	4.43	8.29	9.78	7.18
1.75	2.52	2.49	1.65	1.50	3.34	6.35	10.3	5.77
2.25	2.55	2.81	1.91	1.62	2.67	3.01	9.33	5.41
2.75	2.85	2.74	2.32	2.02	2.56	2.57	11.5	5.43
3.25	2.57	2.73	2.37	1.79	3.77	3.87	11.5	4.93
3.75	2.67	2.86	2.08	2.21	3.87	5.08	11.4	5.62
4.25	2.57	2.81	1.93	1.73	3.54	5.32	12.2	5.56

11.denek			12.denek	
t _{orta} (saat)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)	C _R (ng/mL)	C _T (ng/mL)
0	0	0	0	0
0.75	7.70	*	4.52	3.34
1.25	4.08	64.7	3.73	5.79
1.75	2.57	28.6	1.96	7.93
2.25	3.63	16.0	0.827	8.98
2.75	0.906	6.95	2.05	9.45
3.25	1.66	4.98	2.65	7.82
3.75	1.21	7.55	1.78	12.6
4.25	3.02	6.50	2.20	14.7

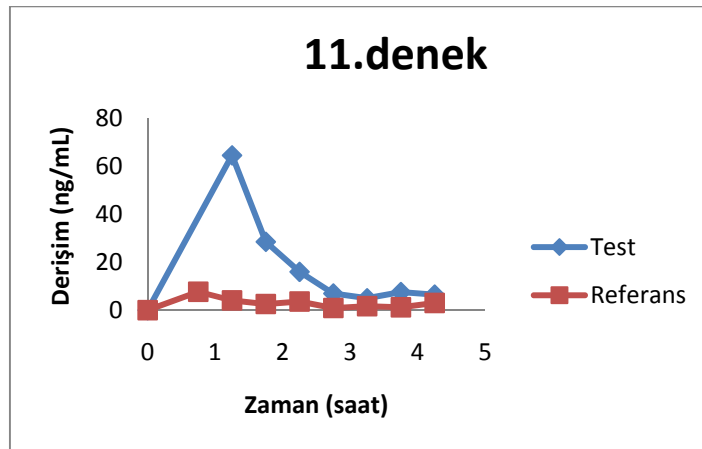
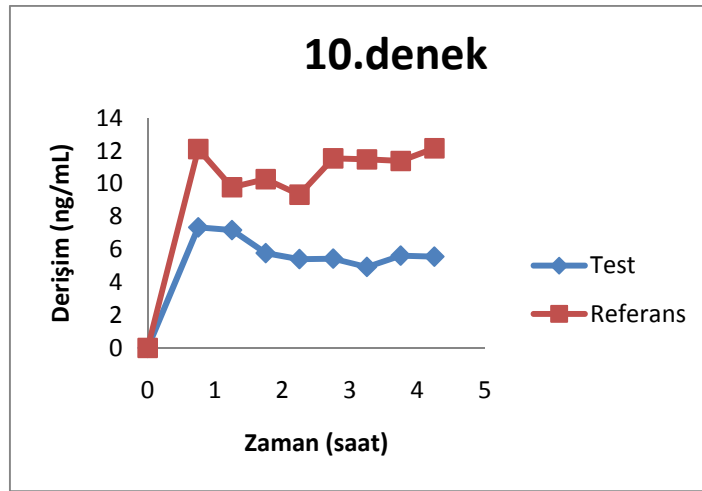
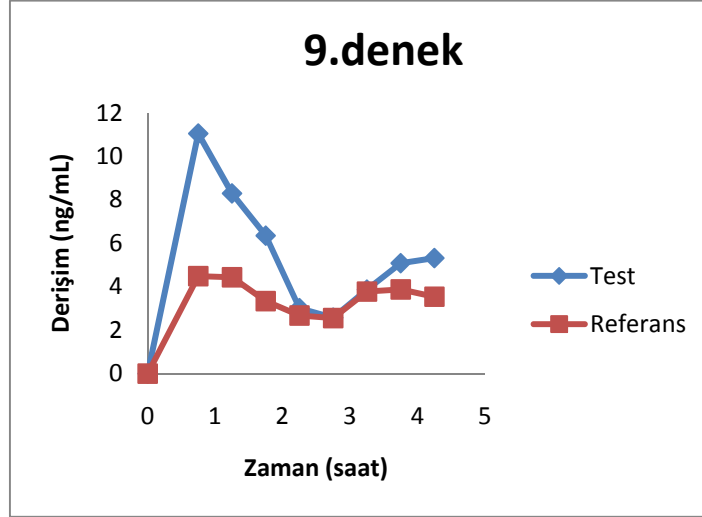
* Analiz hatası nedeni ile işaretli zamanlardaki örnekler iptal edilmiştir.



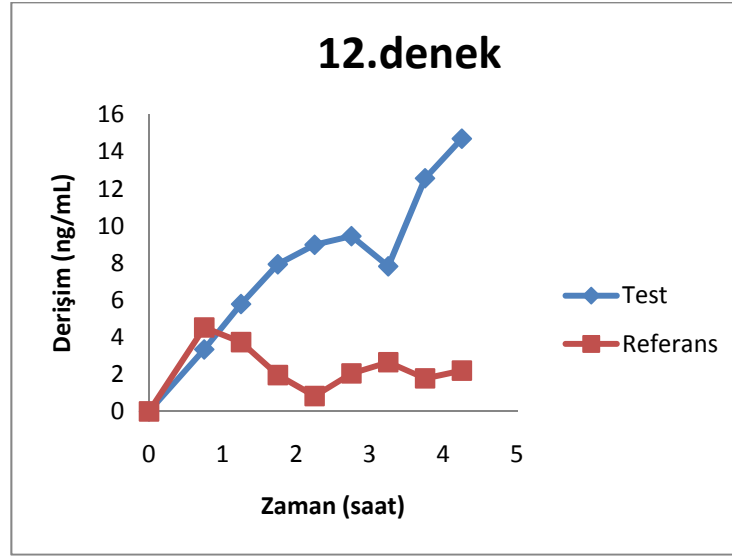
Şekil 46. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl dermis derişimi-zaman profilleri



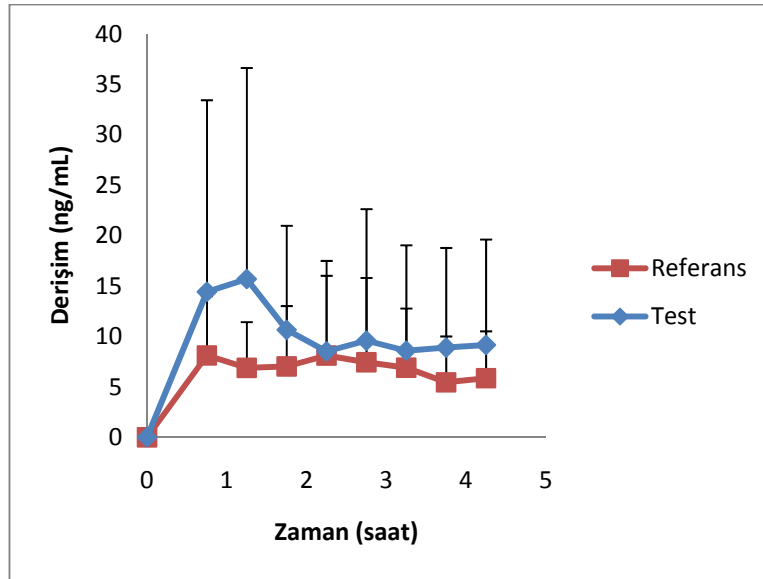
Şekil 46. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl dermis derişimi-zaman profilleri (devamı)



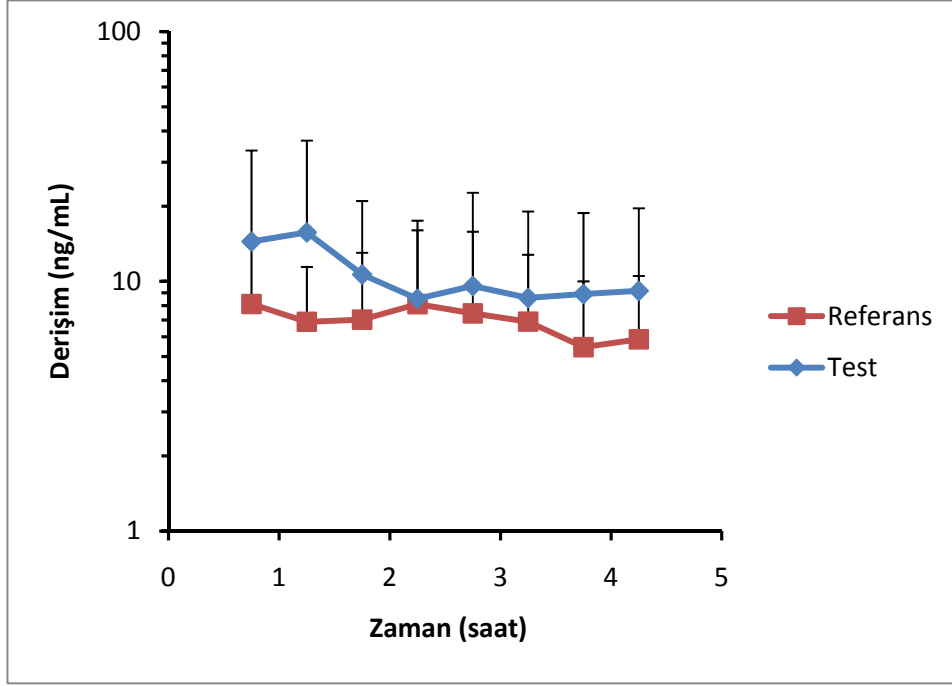
şekil 46. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl dermis derişimi-zaman profilleri (devamı)



Şekil 46. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl dermis derişimi-zaman profilleri (devamı)



Şekil 47. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl ortalama dermis derişimi-zaman profili



Şekil 48. Sağlıklı gönüllülerde oksitetrasiklin HCl ortalama dermis derişimi -zaman profili (yarı-logaritmik grafik)

Tablo 31. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans formülasyonlarına ait biyoyararlanım ölçütleri

Denek No	REFERANS			TEST		
	AUC (ng/mL.saat)	C _{maks} (ng/mL)	t _{maks} (saat)	AUC (ng/mL.saat)	C _{maks} (ng/mL)	t _{maks} (saat)
1	52.9	20.6	0.75	151	56.3	0.75
2	55.8	31.7	2.25	10.8	3.15	0.75
3	45.9	14.7	1.75	33.2	11.6	1.75
4	13.8	4.88	1.25	56.7	36.6	0.75
5	10.5	3.14	0.75	11.1	3.61	0.75
8	7.41	2.37	3.25	7.08	2.22	0.75
9	14.0	4.49	0.75	22.8	11.0	0.75
10	42.5	12.2	4.25	23.2	7.34	0.75
11	12.5	7.70	0.75	89.6	64.7	1.25
12	9.83	4.52	0.75	32.0	14.7	4.25
Ortalama	26.5	10.6	1.65	43.8	21.1	1.25
± SS	20.0	9.45	1.24	45.2	23.1	1.11
% BS	75.4	88.9	75.3	103	109	88.4

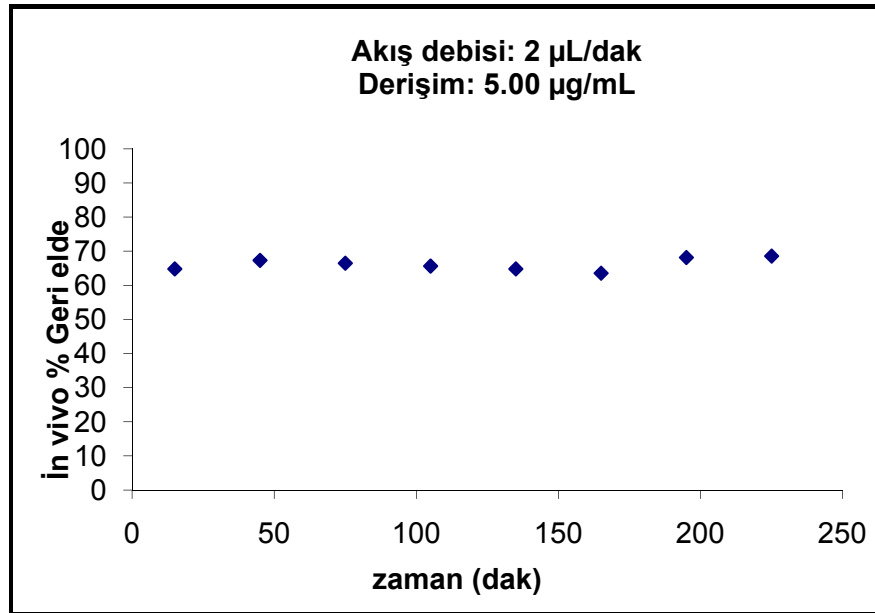
AUC: Dermis profili altında kalan alan (ng/mL.saat), C_{maks}: maksimum dermis derişimi (ng/mL), t_{maks}: C_{maks}'a ulaşmak için geçen süre (saat)

4.2.2. Mikrodializ için İn Vivo Gerieldenin Saptanması

Bölüm 3.2.2.1.7’de anlatıldığı şekilde yapılan in vivo geri elde deneyine ait bulgular Tablo 32’de, zamana karşı in vivo % geri elde grafiği Şekil 49’da verilmiştir.

Tablo 32. İn vivo geri elde sonuçları

t (dak)	C _{dializat} (µg/mL)	% Geri elde
15	1.76	64.8
45	1.63	67.3
75	1.68	66.5
105	1.72	65.6
135	1.76	64.8
165	1.82	63.6
195	1.59	68.1
225	1.57	68.6
	Ortalama	66.2
	± SS	1.8
	% BS	2.7



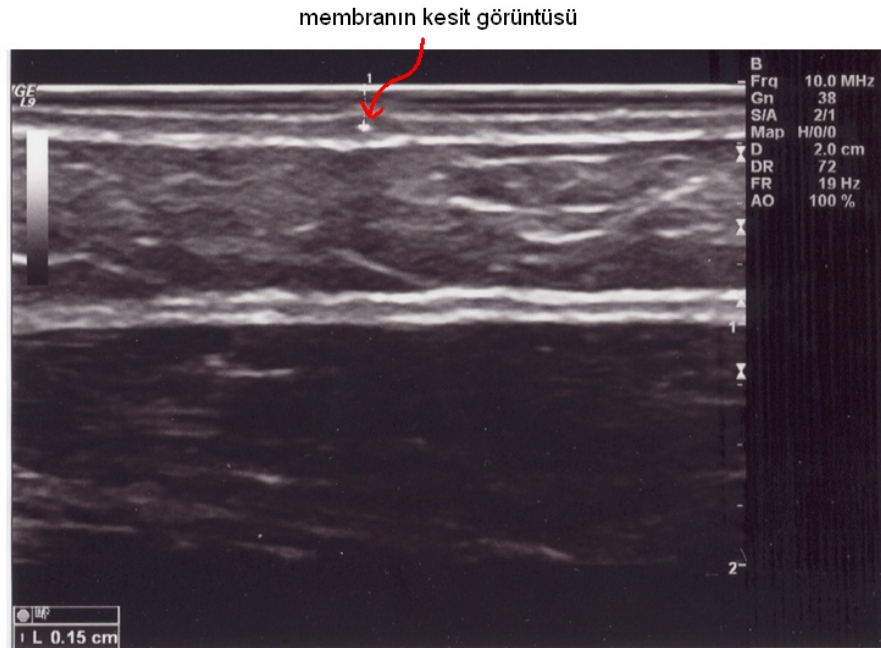
Şekil 49. Zamana karşı in vivo % geri elde grafiği

4.2.3. Yüzeyel Doku Ultrasonografisi ile Mikrodiyaliz Membranının Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi

Bölüm 3.2.2.1.8’de anlatıldığı şekilde yapılan MD membranının deri altındaki derinliğinin ölçülmesi deneyine ait bulgular Tablo 33’de verilmiştir. 30 mm uzunluğundaki MD membranının başlangıç, orta ve son noktalarının yüzeyel ultrasonografi görüntüsü Şekil 50’de verilmiştir.

Tablo 33. Mikrodiyaliz membranının deri altındaki derinliği

Ölçüm No:	Membranın Derinliği (mm)
1	1.7
2	1.9
3	1.5
4	1.3
5	1.3
6	1.3
ortalama	1.5
SS	0.3
% BS	1.7



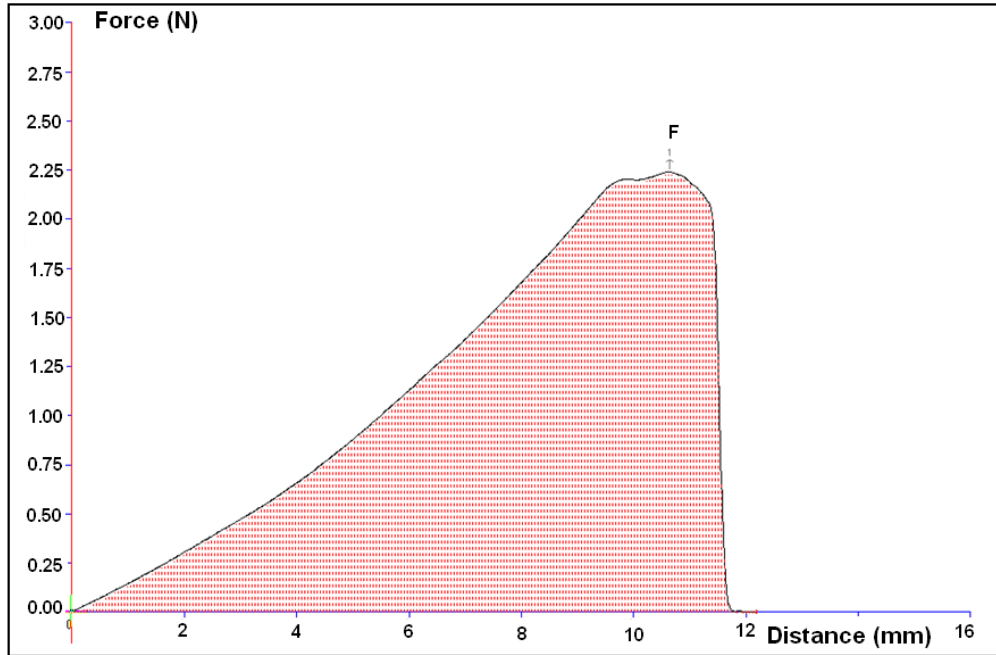
Şekil 50. Mikrodiyaliz membranının deri altında yüzeyel ultrasonografi görüntüsü

4.2.4. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi Deneyi

Bölüm 3.2.2.2.1’de anlatıldığı şekilde yapılan bantın adhezyon kuvvetinin ölçülmesi deneyine ait bulgular Tablo 34’de, adhezyon kuvvetini gösteren grafik Şekil 51’de verilmiştir.

Tablo 34. Crystal Clear Tape 3M Scotch® bantın adhezyon kuvvetinin ölçülmesi

	F (N)	W (F.d) (N.mm)	W (F.d/A) (N.mm/cm ²)
	1.90	9.86	9.86
	2.24	13.1	13.1
	2.23	12.7	12.7
ortalama	2.12	11.9	11.9
SS	0.19	1.8	1.8
BS (%)	9.15	14.9	14.9



Şekil 51. Bantın adhezyon kuvveti

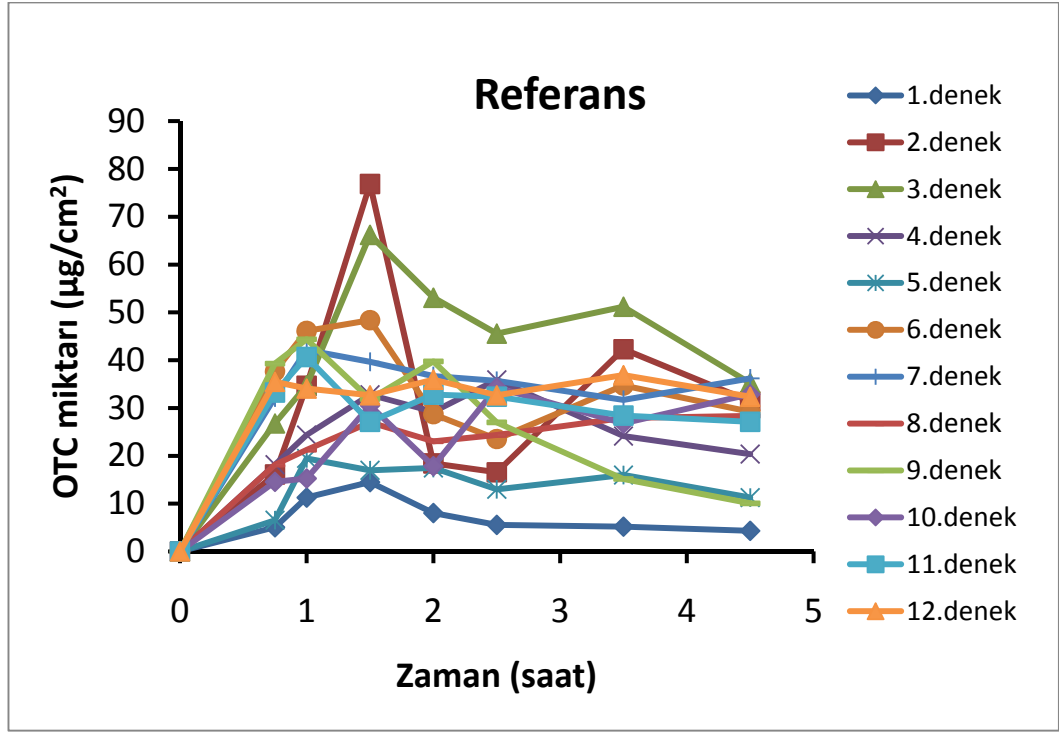
4.2.5. Bant ile Soyma (Tape-stripping) Çalışması

Bölüm 3.2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde yapılan in vivo bant ile soyma çalışması sonucu elde edilen, deneklere ait zamana karşı OTC HCl’ün SC’daki miktarları Tablo 35’de ve Referans ve Test preparatları için zaman-SC’daki OTC HCl miktarı ve yığılmalı miktarlar, sırasıyla Şekil 52, 53, 54 ve 55’de verilmiştir. Şekil 56 ve 57’de SC’daki ortalama OTC HCl miktarları ve yarı-logaritmik grafikler, Şekil 58’de ise yığılmalı miktarlara ait grafikler verilmektedir.

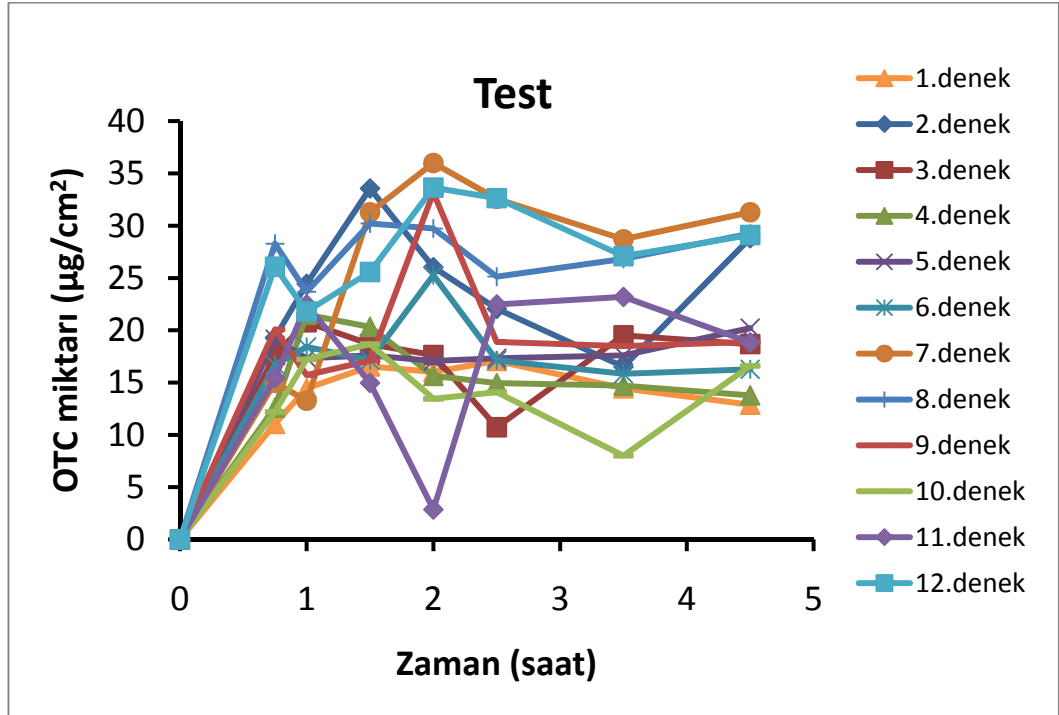
Bant ile soyma verilerinden elde edilen, Test ve Referans preparatlarına ait BY ölçütleri, $AUC_{0 \rightarrow n}$, C_{maks} ve t_{maks} Tablo 36’da verilmiştir.

Tablo 35. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans için oksitetrasiklin HCl'ün zamana karşı Stratum Korneumdaki miktarları

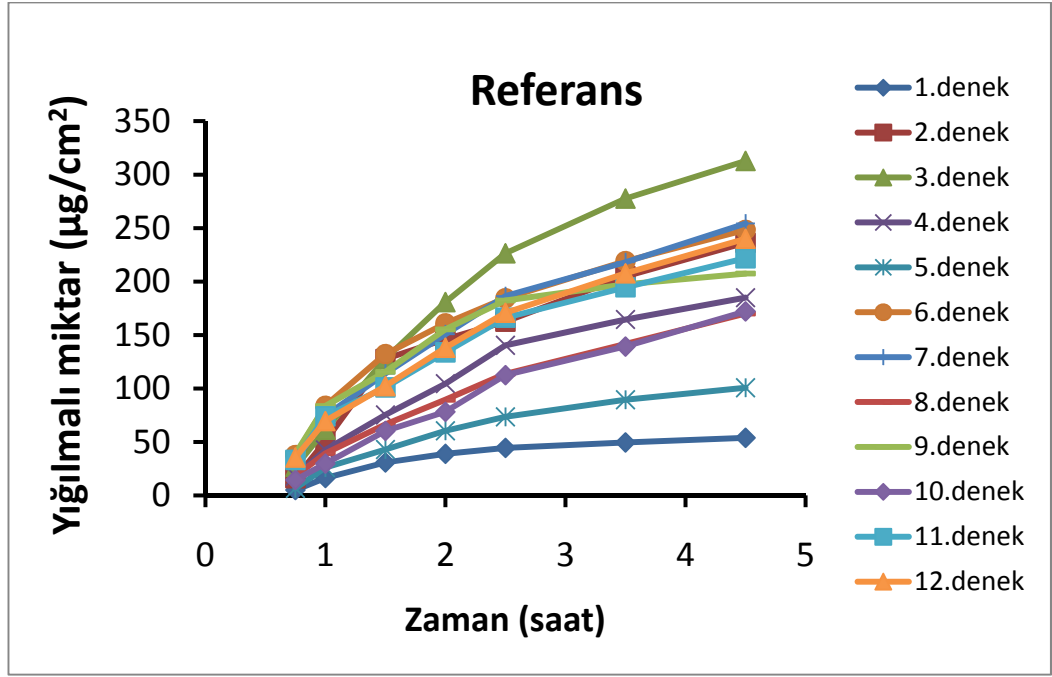
1.denek			2.denek		3.denek		4.denek	
	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test
t _{orta} (saat)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	5.05	11.1	16.1	19.3	26.8	17.6	18.1	12.6
1	11.3	14.5	34.6	24.4	34.8	20.8	24.4	21.5
1.5	14.5	16.5	76.9	33.6	66.2	18.7	32.8	20.3
2	8.04	16.0	18.4	26.0	53.1	17.6	29.2	15.7
2.5	5.55	17.1	16.6	22.1	45.6	10.7	35.9	15.0
3.5	5.18	14.5	42.3	16.5	51.2	19.5	24.1	14.7
4.5	4.31	12.9	31.4	28.8	35.2	18.7	20.4	13.8
5.denek			6.denek		7.denek		8.denek	
	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test
t _{orta} (saat)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	6.54	19.2	37.7	16.7	32.2	15.0	18.1	28.3
1	19.5	17.3	46.1	18.4	42.2	13.3	21.3	23.7
1.5	17.0	17.6	48.4	17.1	39.7	31.3	27.0	30.2
2	17.5	17.1	28.7	25.3	36.7	36.0	23.0	29.7
2.5	13.0	17.3	23.5	17.1	35.7	32.6	24.4	25.1
3.5	16.0	17.6	34.7	15.8	31.7	28.7	27.9	26.8
4.5	11.3	20.2	29.2	16.3	36.2	31.3	28.4	29.2
9.denek			10.denek		11.denek		12.denek	
	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test	Referans	Test
t _{orta} (saat)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)	Q/A (µg/cm ²)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75	39.3	20.1	14.6	12.2	33.2	15.5	35.5	26.1
1	44.4	15.7	15.3	17.2	40.7	22.5	34.1	21.8
1.5	31.9	17.1	30.5	18.7	27.1	15.0	32.7	25.6
2	39.7	33.2	17.8	13.4	32.8	2.86	35.9	33.7
2.5	27.0	18.9	34.3	14.1	32.4	22.5	32.7	32.6
3.5	15.2	18.5	26.8	8.01	28.4	23.2	36.9	27.1
4.5	10.1	18.9	32.9	16.6	27.1	18.8	32.4	29.1



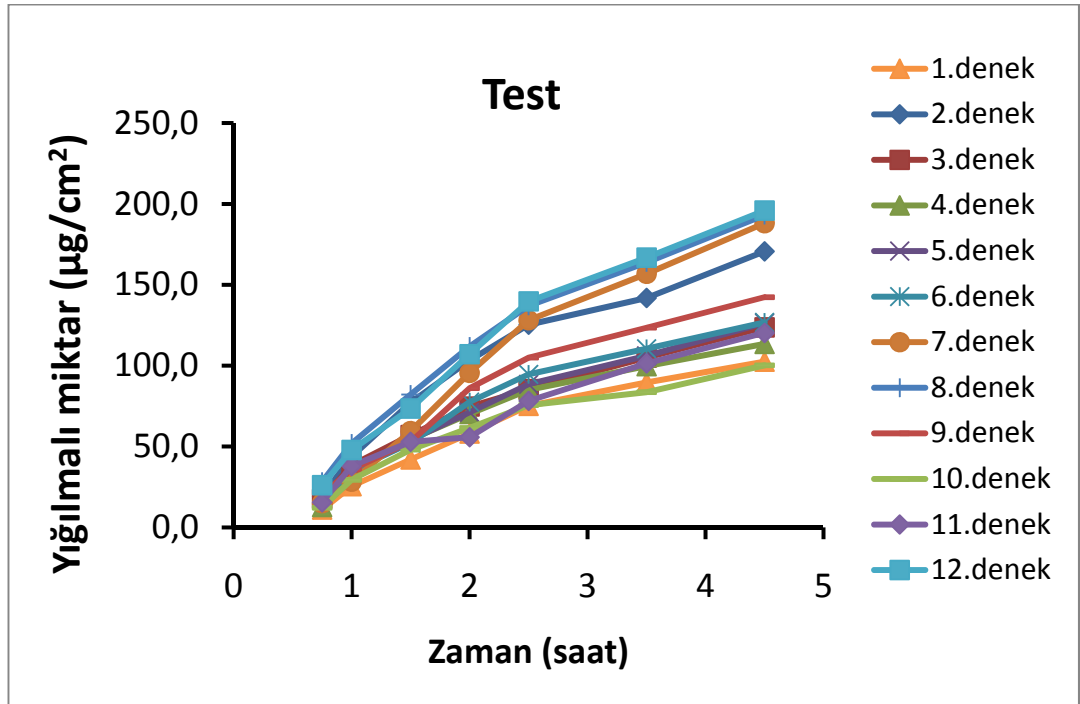
Şekil 52. 12 sağlıklı gönüllüde Referans preparatı için Stratum Korneumdaki zamana karşı oksitetrasiklin HCl miktarı



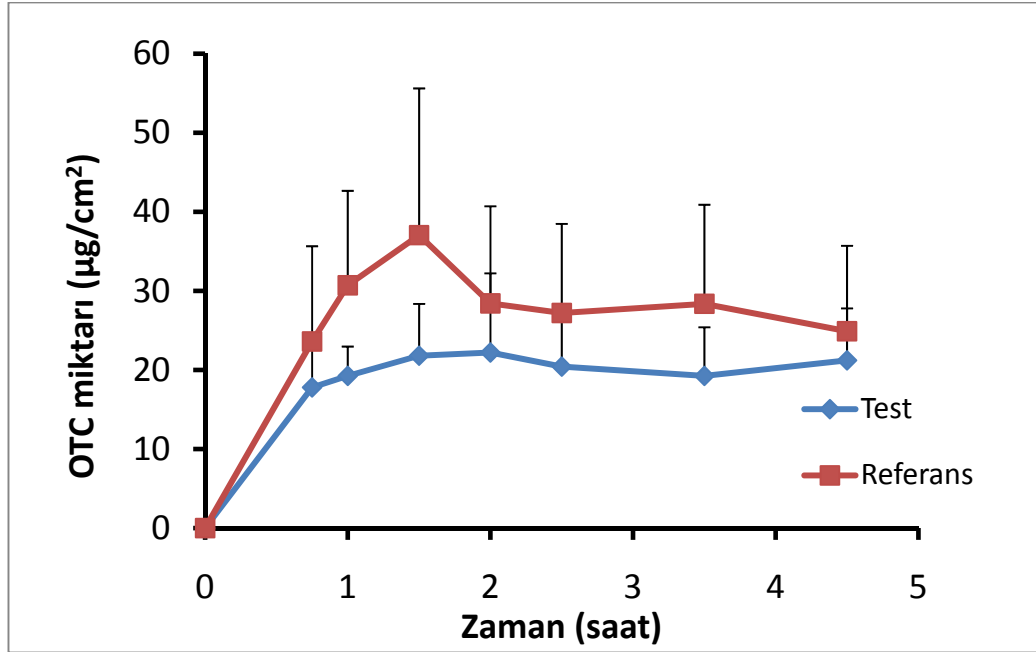
Şekil 53. 12 sağlıklı gönüllüde Test preparatı için Stratum Korneumdaki zamana karşı oksitetrasiklin HCl miktarı



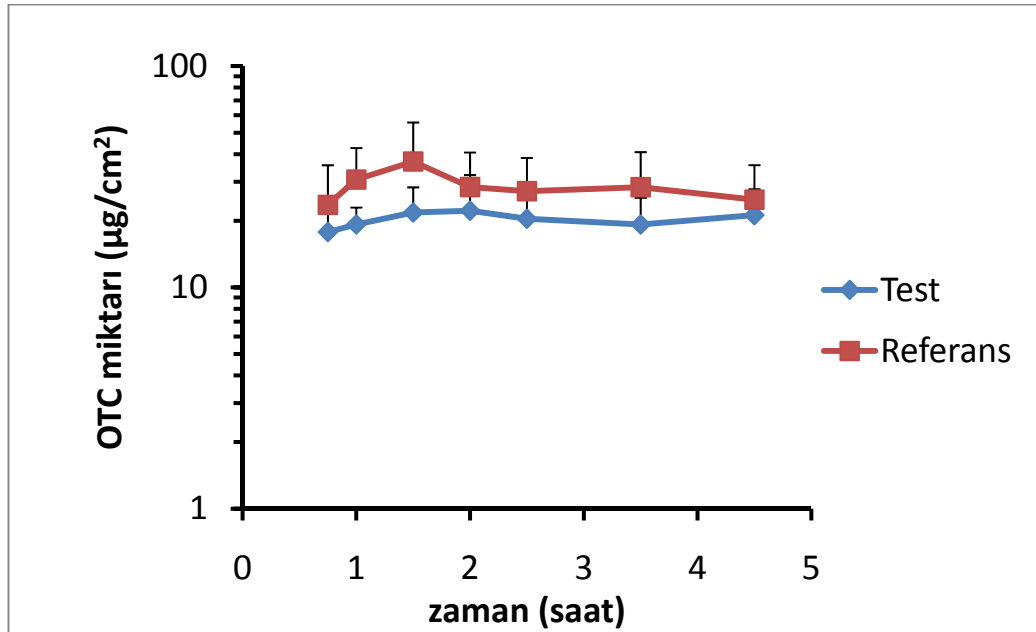
Şekil 54. 12 sağlıklı gönüllüde Referans preparatı için zamana karşı Stratum Korneumdaki yığılmalı oksitetrasiklin HCl miktarları



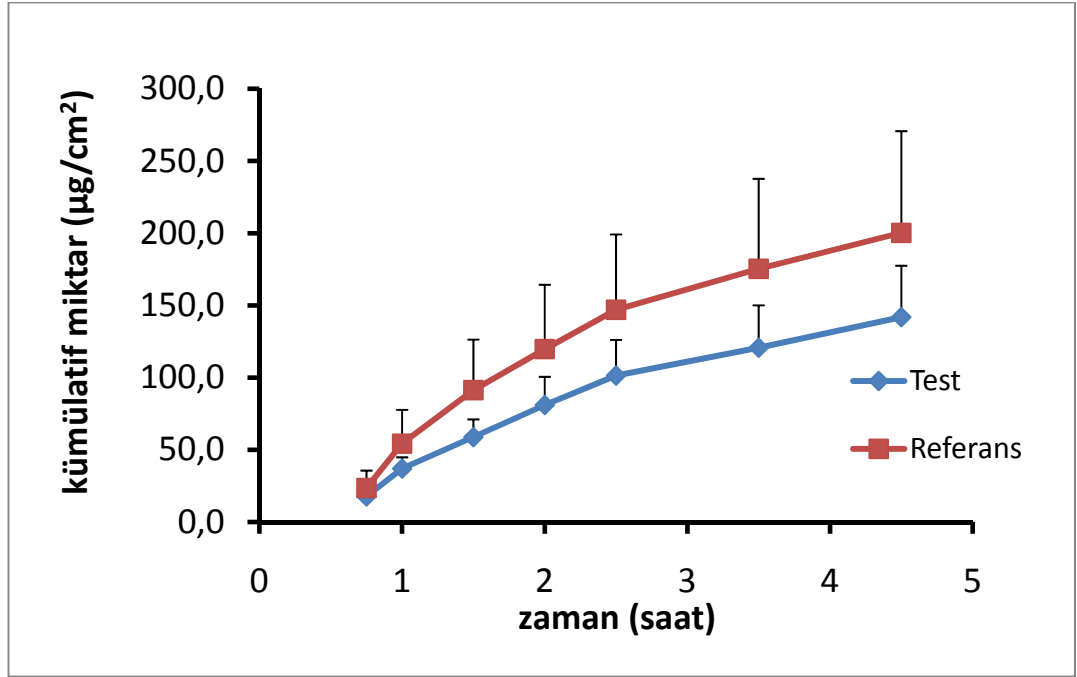
Şekil 55. 12 sağlıklı gönüllüde Test preparatı için zamana karşı Stratum Korneumdaki yığılmalı oksitetrasiklin HCl miktarları



Şekil 56. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki ortalama oksitetrasiklin HCl miktarları (12 denek ortalaması)



Şekil 57. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki ortalama oksitetrasiklin HCl miktarları yarı-logaritmik grafiği (12 denek ortalaması)



Şekil 58. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans preparatları için zamana karşı Stratum Korneumdaki oksitetrasiklin HCl yığılmalı miktarı (12 denek ortalaması)

Tablo 36. Sağlıklı gönüllülerde Test ve Referans formülasyonlarına ait biyoyararlanım ölçütleri

Denek No	REFERANS			TEST		
	AUC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{saat}$)	C _{maks} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	t _{maks} (saat)	AUC ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{saat}$)	C _{maks} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	t _{maks} (saat)
1	29.5	14.5	1.5	60.9	17.1	2.5
2	139	76.9	1.5	95.3	33.6	1.5
3	189	66.2	1.5	71.7	20.8	1
4	110	35.9	2.5	65.2	21.5	1
5	59.0	19.5	1	74.1	20.2	4.5
6	142	48.4	1.5	73.3	25.3	2
7	147	42.2	1	115	36.0	2
8	102	28.4	4.5	113	30.2	1.5
9	112	44.4	1	83.2	33.2	2
10	106	34.3	2.5	55.0	18.7	1.5
11	128	40.7	1	74.5	23.2	3.5
12	142	36.9	3.5	117	33.7	2
Ortalama	117	40.7	1.92	83.2	26.1	2.08
SS	42	17.6	1.13	21.7	6.8	1.02
% BS	35.8	43.2	58.7	26.1	26.0	48.9

AUC: Stratum korneumdaki derişim-zaman profili altında kalan alan

($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{saat}$), C_{maks}: Stratum korneumdaki maksimum miktar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$),

t_{maks}: C_{maks}'a ulaşmak için geçen süre (saat)

5. TARTIŞMA

5.1. İn Vitro Çalışmaların Değerlendirilmesi

5.1.1. Oksitetrasiklin Hidroklorürün Stabilitésinin Değerlendirilmesi

OTC HCl içeren örnekler saklama koşullarında, -70°C, 2 ay ve +4°C'de 5 gün dayanıklı bulundu. Ayrıca, birbirini takip eden 2 günde, arka arkaya iki kez yapılan dondurma-çözme işlemi sonucunda örneklerin stabilitesini koruduğu gözlemlendi.

5.1.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Yapılan Farmasötik Denetimler

5.1.2.1. Merhem Formülasyonlarındaki Oksitetrasiklin Hidroklorür Miktar Tayini

Merhem formülasyonlarında yapılan miktar tayini sonuçlarına göre, OTC HCl ortalama miktarı (%±SS), referans ve test üründe sırayla 108±3 ve 112±7 olarak bulundu. USP 26'ya¹⁹⁸ göre, OTC HCl merheminde, OTC HCl miktarının etiket değerinin % 90'ından az, %120'sinden fazla olmaması gerektiğinden, referans ve test ürünler USP'ye göre uygun bulundu.

5.1.2.2. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarının Viskozitelerinin İncelenmesi

Test ve referans formülasyonların Newtonian olmayan akış özelliğine sahip olduğu görüldü. Her iki formülasyon da oldukça viskoz olup, test referanstan bir miktar daha fazla viskoz bulundu.

5.1.2.3. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Homojenlik Denetimi

Her iki formülasyonun da, cilt üzerinde ve mikroskop altında yapılan incelemeler sonucunda uygun homojenlikte olduğu görüldü.

5.1.2.4. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merhem Formülasyonlarında Ağırlık Denetimi

Test ve referans formülasyonların ağırlıkları, etiketlerinde belirtilen miktarların %95'inden az olmadığı için, ağırlık denetimi sonuçları test ve referans için uygun bulundu²⁰².

5.1.2.5. Merhem Formülasyonlarında Oksitetrasiklin Hidroklorür Salımının İncelenmesi

Yatay difüzyon hücrelerinde insan meme derisi kullanılarak gerçekleştirilen salım deneyi sonucunda, test ve referans formülasyonlarının salım kinetiği için, sıfırıncı, birinci derece kinetik ve karekök kinetiği incelendi ve uyum ölçütleri saptandı. Referans için 1.5 saatte ulaşılan denge, test için 3 saatte gerçekleşerek, sonuçta aynı kümülatif seviyelere ulaşıldı. Her iki profil için de başlangıçta elde edilen yüksek salım hızının yarım saat içinde azaldığı ve nispeten dengeye geldiği görüldü. Sıfırıncı, birinci derece ve karekök salım kinetiklerine ait uyum ölçütleri birbirine yakın çıkmıştır. Geçiş profili incelendiğinde, bir sıçramayla oluştuğu görüldü. Geçiş kinetiği, bu sıçramaya ait veriler dikkate alınarak değerlendirmeler yapıldı. Bu durumda geçiş kinetiğinin sıfır derece olduğu kabul edildi. Referans için birim zamanda geçen madde miktarı 1.17 µg/saat ve test için ise, 0.231 µg/saat olarak bulundu. Salım profillerinde eğri altında kalan alan (AUC), test ve referans için sırasıyla, 4.41±2.56 µg/cm²*saat ve 4.96±1.81 µg/cm²*saat olmakla beraber, SPSS 11.5'de yapılan bağımsız t testine göre, test ve referans için ortalama AUC değerleri arasında % 95 güven aralığında anlamlı fark yoktur (p = 0.735). Difüzyon hücresinden salım çalışması, referansın testten daha hızlı denge seviyelere ulaştığı; ve bunula birlikte test ve referansın sonuçta benzer salımlar gösterdiği sonuçlarını ortaya koymuştur.

5.1.3. İn Vitro Mikrodializ Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi ve Validasyonu

Bölüm 4.1.4'de anlatıldığı şekilde, MD örneklerinin analizi için geliştirilen HPLC yönteminin, 0.0310-6.01 µg/mL analiz aralığı arasında doğrusal olduğu gösterildi. Bu aralıkta dokuz farklı derişimin analizleri sonucunda elde edilen bağıl sapma (BS) değerleri % 0.663-% 3.16 arasında olup, uygun bulundu (Tablo 11).

Yöntemin doğruluğu beş farklı derişimde % gerielde, standart sapma (SS) ve BS olarak gösterildi. Analiz yönteminde % gerielde miktarı % 97.0-101 arasında değişmektedir. Ortalama gerielde % 99.1 ve ölçümlerin BS'sı % 0.290-% 2.62 arasındadır (Tablo 13).

Analiz yönteminin kesinliğinin değerlendirilmesinde, sistemin kesinliği için tekrarlanan ölçümlerin BS değeri % 0.938 olarak bulundu (Tablo 14). Yöntemin kesinliğinin göstergesi olan tekrarlanabilirlikte, analizi yapılan üç farklı derişim, aynı gün içinde üç defa analiz edilerek değerlendirildi. Yüzde ortalama gerielde değeri % 99.7±2.6 ve BS'sı % 2.61 olarak bulundu (Tablo 15). Bu, yöntemin, aynı çalışma koşulları içinde, kısa bir süre içinde ardı ardına yapılan ölçümlerin tekrarlanabilir olduğunu gösterdi. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinde günlerarasındaki ölçüm farkına ait bulgular Tablo 16'da gösterilmektedir. Birbirini takip eden üç günde yapılan ölçümler sonucu ortalama % gerielde % 97.8 ve BS % 0.917 olarak bulundu. Analitik yöntem ile yapılan ölçümlerde günüçi ve günlerarası fark kabul edilebilir sınırlar içinde bulundu.

Serum fizyolojik ve polimisin B sülfata ait, OTC HCl'ün pik verdiği tutulma zamanında, bu kromatografik koşullarda herhangi bir pik gözlenmedi. Analiz yönteminin OTC HCl için özgün ve seçici olduğu gösterildi.

Analitik yöntemin LOQ değeri 0.0310 µg/mL olup, duyarlılığı yüksektir.

5.1.4. İn Vitro Gerielde ve % Kayıp Deneyleri

İn vivo MD deneylerine başlamadan önce, MD probunun in vitro davranışının incelenmesi gerekmektedir¹⁰⁹. Zira, MD yönteminde, incelenen bileşiğin MD probundan geriieldesi, perfüzyon sıvısının akış hızı, membran türü, uzunluğu, çapı gibi prob özellikleri ve bileşiğin difüzyon katsayısı, sıcaklık ve matriks eğrilik bükürlüğü gibi birçok etkene bağlıdır²⁰³ Bu çalışmada kullanılan CMA 66 MD probunun OTC HCl'ün deney boyunca tekrarlanabilir bir şekilde örneklemesini sağladığı, in vitro gerielde deneyleri ile gösterildi.

5.1.4.1. İn Vitro Gerielde Üzerine Akış Debisinin Etkisi

İn vitro gerielde üzerine akış debisinin etkisi, 1, 2 ve 5 µL/dak olmak üzere üç farklı akış debisinde incelendi. MD pompasının 0.1, 0.2, ve 0.5 µL/dak akış debilerinde çalışılması, bu debilerde analiz için toplanacak olan örnek hacminin çok az olacağından tercih edilmedi. Üç farklı akış debisinden elde edilen gerielde değerlerine SPSS 11.5'de tek yönlü varyans analizi yapıldı. Düşük akış debisinde beklenen yüksek gerielde, 1 ve 2 µL/dak akış debilerinde (sırasıyla, % 60.3±2.1 ve % 60.4±4.5) birbirine yakın bulundu (p = 1.00). 5 µL/dak akış debisinde gerielde anlamlı bir şekilde düşük çıktı (% 50.7±3) (p = 0.000). Akış debisi ve gerielde arasındaki bu ilişki literatür bilgisini destekler niteliktedir². Düşük akış debisinde, analiz için uygun örnek hacmini toplayabilmek için, uzun örnek toplama zamanı gerekecektir. Bu da, uygun olmayan bir ayırım nedeniyle, profilde derişim değerlerinde bilgi kaybına neden olacaktır. Kabul edilebilir gerielde, uygun örnek alma zaman aralığı ve örnek hacminden etkilenecek analiz yönteminin duyarlılığı dikkate alınarak, 2 µL/dak akış debisi ve 30 dak örnek alma periyodu (örnek hacmi : 60 µL) in vitro ve in vivo MD çalışmamız için uygun bulundu. Geriieldenin, deney

süresi olan beş saat boyunca değişmediği görüldü. Zamandan bağımsız gerielde, gerieldede çalışma süresi boyunca meydana gelebilecek bir değişikliğin ve bu nedenle deney verilerinin yorumlanmasında oluşacak herhangi bir karışıklığın söz konusu olmadığını gösterdi.

5.1.4.2. In Vitro Gerielde Üzerine Derişimin Etkisi

OTC HCl'ün 0.250-50.0 µg/mL derişim aralığında elde edilen gerieldenin derişimden bağımsız ve deney süresi boyunca nispeten sabit olduğu gösterildi. Gerielde % 56.7 ile % 64.6 arasında değişmektedir. Ortam ve dializat derişimi arasında 0.250-50.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal ilişki gösterildi. Bu doğrusal ilişkinin eğimi olan 0.638 değeri in vitro gerieldeyi vermektedir.

5.1.4.3. In Vitro % Kayıp Deneyleri

Üç farklı derişimde gerçekleştirilen % kayıp deneyleri sonucu % gerielde, % 49.8 ile % 57.8 arasında değişmektedir. Her bir derişim için, deney süresi boyunca ilk bir saatte bir miktar yüksek olan gerieldenin, birinci saatten sonra dengeye gelerek deney boyunca stabil kaldığı görüldü. Aynı derişimler için, in vitro gerielde deneylerinden ve in vitro % kayıp deneylerinden elde edilen % gerielde değerleri arasında % 8'den az bir fark olduğu görüldü. Literatürde, pratik olarak bu farklılığın ihmal edilebileceği ve in vitro gerielde ve in vitro % kayıp sonuçlarının benzer kabul edilebileceği belirtilmektedir⁵⁵. SPSS 11.5'de yapılan bağımsız t testine göre, 10 µg/mL derişimi için ortalama değerler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p = 0.602$). 1 µg/mL ve 5 µg/mL derişimleri için ise, anlamlı fark vardır (sırasıyla, $p = 0.06$ ve $p = 0.05$). Bununla birlikte, % kayıp ve gerielde grafiklerindeki, in vitro gerieldeyi veren doğrusal regresyon eğimleri, birbirine eşit (0.64) bulundu (Şekil 27, 29). Bu bulgu, MD'in prensibi gereği, membran boyunca OTC HCl difüzyonunun membranın her iki yönünde de eşit olduğunu gösterdi.

5.1.5. Oksitetrasiklin Hidroklorür Merheminden Mikrodiyaliz Membranına İn Vitro Difüzyon Deneyi

Bölüm 3.2.1.7’de anlatıldığı şekilde yapılan OTC HCl’ün test ve referans formülasyonundan MD membranına difüzyonu, test ve referans için benzer davranışta profiller verdi. Genel olarak, etkin maddenin zamana karşı yığılmalı çözünen veya salınan miktarlarına ait grafiklerdeki veri noktaları, terminal faza doğru yığılmalıdır ve bu nedenle de yığılmalı olarak artan hata içerir. Bu hata dezavantajını gidermek için, salım hızlarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi daha uygun bir seçim olarak görülmektedir²⁰⁴. Bu deneyde de benzer şekilde, OTC HCl’ün test ve referans formülasyonundan, MD membranı boyunca geçişini izleyebilmek için hız profilleri incelenmiştir. Bu in vitro difüzyon deneyi, MD yöntemi ile gerçekleştirildiğinden, zamana bağlı hız profilleri, OTC HCl’ün merhem formülasyonundan dializat ortamına geçişinin de bir göstergesidir. Zamana bağlı derişim ve hız profillerinin bifazik davranış göstermesi bu durumun doğal sonucudur. Referanstan yığılmalı olarak çıkan OTC HCl miktarları, test formülasyona oranla 1.3-1.6 kat daha fazla olduğu bulundu. Difüzyonun gerçekleştirildiği ortam hacmi ve dolayısıyla merhem formülasyonları miktarı, salımın profil davranışını etkilememekle birlikte, salımın gerçekleştiği hacmin 200 µL’den 3 mL’ye çıkması ile, salınan miktarın test için, 6.4; referans için 8.0 kat arttığı görüldü. MD membranından, test ve referans formülasyonları için, diyaliz ile alınan yığılmalı OTC HCl miktarlarının (sırasıyla 1.10 ve 1.71 µg), insan meme derisi kullanılarak gerçekleştirilen salım deneyi sonuçları (sırasıyla 2.10 ve 2.15 µg) ile karşılaştırılabilir seviyelerde olduğu görüldü.

5.1.6. Oksitetrasiklin Hidroklorür için Geliştirilen UPLC-MS-MS Yöntemi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Çok düşük hacimlerde ve derişimlerdeki MD örneklerinde kantitatif miktar tayini yapılabilmesi için, duyarlılığı yüksek analiz yöntemleri ve dedektörlere gereksinim duyulmaktadır²⁰⁵. Bölüm 4.1.4'de anlatıldığı şekilde geliştirilen ve valide edilen HPLC-UV dedektör yönteminin duyarlılığının in vivoda MD örneklerinin analizi için yeterli olmadığı, yapılan ön denemelerle görüldü. Diğer taraftan, son yıllarda hızla gelişen UPLC sistemlerinin MS ile birlikte kullanımı, MD örneklerinde varolan duyarlılık ve düşük örnek hacmi sorunlarına çözüm sunmaktadır. Yüksek basınç pompaları, 2 µm'nin altında partikül büyüklüğüne sahip kolonların kullanımlarını sağlayarak, hızlı enjeksiyon siklusu, düşük enjeksiyon hacmi, sıcaklık kontrolü ve de hızlı örnek analizi avantajlarını sunan bu sistem, MD örneklerinin analizinde kullanılabilecek uygun bir analiz yaklaşımdır. Çalışmamızda, in vivo MD örneklerinde OTC HCl'ün kantitatif miktar tayini için, Bölüm 3.2.1.8.'de anlatılan UPLC-MS-MS yöntemi kullanıldı. Yöntemde, Bölüm 3.2.1.8.3'te anlatıldığı şekilde, MS optimizasyonu sağlandı. Pozitif elektrospray iyonizasyon modunda, en iyi parçalanma ürünleri, sırasıyla 425.85 ve 442.85 m/z olarak bulundu. Analitik yöntemin geliştirilmesinde değişik mobil faz oranlarının (metanol:formik asit çözeltisi), pik alıkonma zamanına, pik simetrisine ve saptama duyarlılığına etkisi inceledi. Duyarlılığın, metanol oranının artması ile arttığı görüldü. Fakat, buna pik şeklinde bozulma ve pik genişliğinde artmanın eşlik ettiği görüldü. Örneklerin bileşiminde % 20 metanol içerecek şekilde hazırlanmasının, pik şeklinde, simetrisinde ve duyarlılıkta olumlu etki yaptığı görüldü ve örnekler analiz öncesi bu şekilde hazırlandı. Kolon sıcaklığının 35°C'ye getirilerek ayırım optimizasyonu sağlandı. Bölüm 3.2.1.8.1'de belirtilen mobil faz oranlarında ve gradient akışta 0.25 mL/dak akış debisinde optimum analiz koşulları belirlendi. Akış debisinin artırılması, pik duyarlılığında herhangi bir olumlu etki

oluşturmayıp, istenmeyen bir şekilde yüksek kolon basıncına neden olduğu görüldü ve 0.25 mL/dak optimum akış debisi olarak saptandı. Yöntemin analiz aralığı olarak seçilen 0.500-100 ng/mL arasında doğrusal olduğu gösterildi. Analiz yönteminin doğruluğu, % gerielde olarak 96.1-105, kesinliği % BS olarak 2.10-8.87 olarak bulundu. Analiz yönteminin, metanol ve boş serum fizyolojik örneğinden etkilenmediği ve OTC HCl için özgün ve seçici olduğu gösterildi. Bölüm 3.2.1.9.5'de anlatıldığı şekilde bulunan analitik yöntemin duyarlılığının (LOQ: 0.6 ng/mL, LOD: 0.2 ng/mL), in vivo MD örneklerinin analizi için yeterli duyarlılıkta olduğu bulundu. Bu yöntemin küçük örnek enjeksiyon hacmi (10 µL) ile, hızlı, doğru ve duyarlı analiz sağlamak için kullanılabileceği gösterildi.

5.1.7. Bant ile Soyma Örneklerinde Oksitetrasiklin Hidroklorür Analizi için Geliştirilen HPLC Yöntemi ve Validasyonu

Bölüm 3.2.1.10'da belirtildiği şekilde yapılan OTC HCl'ün bant ile soyma örneklerinde analizi için geliştirilen HPLC yönteminin 0.500-64.0 µg/mL kalibrasyon aralığında doğrusal olduğu gösterildi. Yöntemin doğruluğu için, % gerielde miktarı 96.6-103 ve BS'sı % 0.597-1.28 arasında değişmektedir (Tablo 26). Sistemin kesinliğine ait BS değeri, % 0.785 (Tablo 27), yöntemin kesinliğinin göstergesi olan tekrarlanabilirliğe ait % ortalama gerielde 103 ve BS'sı % 0.434 olarak, uygun bulundu (Tablo 28). Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinde günlerarasındaki ölçümler sonucu ortalama % gerielde 101 ve BS'sı % 0.812 olarak bulunarak, analitik yöntemle ait günüçi ve günlerarası varyasyonun kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görüldü. Yöntemde metanol ve boş banttan gelen herhangi bir girişim görülmedi. LOQ değeri 0.500 µg/mL olan yöntemin, bant ile soyma örneklerinin analizi için uygun duyarlılık, doğruluk, kesinlik ve özgünlükte olduğu gösterildi.

5.2. İn Vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi

5.2.1. Mikrodializ Çalışması

Deneye katılan deneklerde, OTC merhemi uygulanan alanlarda, ilk örnekten itibaren deri altına penetre olmuş OTC HCl, dializatta ölçülebilir miktarlarda saptanarak, hızlı dermal emilim olduğu görüldü. Deneklerin MD probu implantasyonuna göstermiş oldukları uyuncun, deney sırasında strese giren tek bir denek hariç, genel olarak iyi kabul edilebilir olduğunu bulduk. Ayrıca, deney sonrası görüşmelerde de bütün denekler uygulamayı saldırgan (invasif) bulmadıklarını ve işlem sırasında kaydadeğer bir rahatsızlık yaşamadıklarını bildirdiler. Çalışma sırasında formülasyonlardan ya da implantasyon işleminden kaynaklanan herhangi bir advers reaksiyon gözlenmedi. Çalışmayı takip eden günlerde hiçbir denekte herhangi bir enflamasyon, yara veya tahriş görülmedi. Bu gözlemlerimiz, DMD'nin kabul edilebilir ve denekler üzerinde uygulanabilirliği olan bir yöntem olduğunu gösterdi.

DMD, topikal formülasyonlarda BY ve BE'in değerlendirilmesi için umut verici bir yöntem olarak düşünülmektedir^{117, 118}. Çalışmamızda, dermisten doğrudan örnekleme ile zamana bağlı derişim profilleri elde edildi. Dermis derişimi-zaman profili eğrisi altında kalan alanlar (AUC), epidermisten penetre olan ve de dermise 4.5 saat boyunca difüze olan toplam OTC HCl miktarını vermektedir. Test/Referans AUC oranı 2.25 ± 2.16 'dır. Test ve referans için AUC, sırasıyla, 43.8 ± 45.2 ng/mL.saat ve 26.5 ± 20.0 ng/mL.saat'tir. AUC üzerinden yapılan BE hesaplarına göre, % 90 olasılıkla testin referansa göre, üst ve alt yüzdesinin 268 ve 63 olduğu görüldü. AUC değerleri için, test ve referans için deneklerarası varyasyon sırasıyla % 103 ve 75.4 olarak bulundu. Varyans homojenliğini sağlamak için, bu verilere logaritmik transformasyon yapıldı. AUC değerlerinin logaritmik transformasyon işleminden geçirilmesi olağan bir işlem olup, bireylerarası yüksek varyasyonun görüldüğü verilerde yararlı

olacağı yönünde bilgiler mevcuttur¹⁰⁴. Bizim çalışmamızda da, bu varyasyon logaritmik transformasyon sonucunda test ve referans için, sırasıyla % 28.9 ve 28.4 haline dönüştü. DMD ile değerlendirilen topikal ilaç penetrasyonundaki değişkenliğin literatürde, AUC için BS olarak % 63-91 arasında değiştiği¹¹⁵, AUC ve maksimum derişim (C_{maks}) için % 41 olduğu bildirilmiştir¹¹⁷. Yine, 18 denekle yapılan başka bir DMD çalışmasında¹¹⁸, ketoprofen için bireylerarası varyasyon % 68 olarak bulunmuş olup, bizim çalışmamızdaki varyasyon ile karşılaştırılabilir niteliktedir.

İki formülasyon arasında AUC ve C_{maks} BE parametreleri üzerinden, güven aralığı yöntemi ile hesaplanan istenen BE koşulu, % 90 olasılıkla testin, referansa göre, % 80-125 arasında olmasıdır¹⁹⁹. Logaritmik transformasyon sonucu AUC değerleri ile tekrarlanan hesaplamalar sonucu, üst ve alt yüzdelere 135 ve 88.8 olarak bulundu. Böylece, % 90 olasılıkla test ve referansın BE olmadıkları görüldü (Tablo 37). Testin C_{maks} değeri 21.1 ± 23.1 ng/mL, referansın C_{maks} değeri ise, 10.6 ± 9.45 ng/mL olarak bulundu. Maksimum derişime ulaşmak için geçen süre (t_{maks}) test için, 1.25 ± 1.11 saat olup, referans için ise 1.65 ± 1.24 saat'tir. C_{maks} ve t_{maks} değerleri için bireylerarası varyasyonlar yüksek olup, t_{maks} değerlerinin referans ve test için varyasyonu, sırasıyla % 75.3 ve 88.4'tir. C_{maks} değerlerinin referans ve test için varyasyonu ise sırasıyla, % 88.9 ve 109'dur.

Tablo 37. DMD yöntemi ile logaritmik transformasyon sonucu elde edilen BE parametrelerinin % 90 olasılıklı alt ve üst yüzde değerleri

AUC		C_{maks}	
Üst Yüzde	Alt Yüzde	Üst Yüzde	Alt Yüzde
135	88.8	161	81.6

log C_{maks} değerleri üzerinden yapılan hesaplamalarda testin, referansa göre alt ve st yüzdesi 81.6 ve 161 olarak bulundu ve % 90 olasılıkla BE olmadıkları görüldü (Tablo 37). DMD çalışmalarında, % 90 olasılıkla % 80-125 BE limitlerini sağlayacak çalışmanın kurulabilmesi için, istatistiksel açıdan 27 kişi ve iki prob veya 18 kişi ve üç prob kullanılması gerektiği bildirilmiřtir¹¹⁷. Yine benzer şekilde, % 80 olasılıkla iki prob ile 20 kişide % 80-125 BE limitleri içerisinde test ve referansın BE'lerini kıyaslamanın olası olduğu bildirilmiřtir¹⁰⁴. Ancak bu yazarlar, yaptıkları çalışmalarda bu rakamları kullanmamışlardır. 117 nolu literatürdeki çalışmada sekiz denek kullanılmıştır. 104 nolu literatürde ise yazarlar hiçbir deneysel çalışma yapmayıp, sadece literatürden aldıkları verileri yorumlamışlardır. DMD alışmamızda biz, 12 denekle başladık, ancak iki deneği çıkartmak zorunda kaldığımız için 10 denekle çalışmayı sürdürdük. DMD çalışmamız, 10 denek ile gerçekleştirildiğinden, çalışmadaki varyasyonun denek sayısı ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Dolayısıyla, daha fazla denekle çalışılması varyasyonu azaltabilir.

OTC HCl'n dermis derişimlerinde test ve referans formülasyonda sırasıyla, % 88.1-136 ve % 65.8-116 olarak görülen yüksek bireylerarası varyasyonun, OTC HCl'n in vivo penetrasyonunda deneklerarası değişkenliğin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Esasen bileşiklerin perkütan emiliminde, geniş bir dermal derişim aralığı gösterdiği bilinmektedir¹³⁴. Bunun nedeni olarak, insan derisinin bariyer fonksiyonundaki biyolojik varyasyonlar, deride metabolizasyon hızındaki ve klirensindeki değişiklikler gsterilebilir^{118, 134}. Söz konusu durum, beklenmedik bir durum değildir. MD ile değerlendirilen kütan ilaç seviyelerinde bireylerarası ve bireyiçi yüksek varyasyon başka çalışmalarda da grlmektedir^{115, 117, 118}. Çalışmamızdaki bireylerarası bu değişkenliğin, emilim hızlarındaki değişkenliğe, dağılım ve OTC'in metabolizma ve sistemik sirkülasyona difüzyon hızını kapsayan, atılıma bağlı olduğunun düşünmekteyiz. Test formülasyona ait derişimlerin,

referans formülasyonuna ait derişimlere göre, dört denekte 1.5-16 kat yüksek olduğu görölürken, üç denekte bu oranın birin altında olduğu ve diğer üç denek için ise birbirine yakın olduğu bulundu.

Literatürde DMD ile topikal BE'in değerlendirildiği çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır¹¹⁵⁻¹¹⁸. Bu anlamda ilk çalışma, sekiz sağlıklı gönüllü ile model madde olarak lidokainin emülsiyon ve mikroemülsiyon formülasyonlarının topikal BE'lerini inceleyen Kreilgaard ve arkadaşlarının çalışmasıdır¹¹⁵. İki formülasyon arasında emilim hız değişmezleri, gecikme süreleri ve AUC değerleri üzerinden karşılaştırmalar yapılarak, mikroemülsiyon formülasyonunun emülsiyon formülasyonuna üstünlüğu FK parametreler ile gösterilmiş ve modelleme yapılmıştır. Başka bir çalışma ise, 8-metoksi psoralenin, oral, krem ve banyo şeklinde uygulamalarından sonra deri derişimlerinin ölçüldüğu Tegeder ve arkadaşlarının çalışmasıdır¹¹⁶. Sekiz sağlıklı gönüllü ile yapılan üç yollu çapraz çalışmada MD örnekleri ile birlikte eşzamanlı olarak kan örnekleri de toplanarak, üç uygulamanın sonucunda kan ve doku derişimleri kıyaslanmıştır. Yine de bu çalışma, iki farklı formülasyonun değerlendirildiği bir BE çalışması değildir. Sonraki yıllarda lidokain model madde olarak tekrar çalışılmıştır. Krem ve merhem formülasyonlarında DMD ile topikal BE sekiz sağlıklı gönüllüde değerlendirilmiş ve BE olmadıkları bulunmuştur¹¹⁷. 18 sağlıklı gönüllü ile yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, tek bir ketoprofen jel formülasyonunun DMD ile farklı uygulama alanlarında BE'i değerlendirilmiştir. Ön kol üzerinde dört uygulama bölgesinin ikisi test ve ikisi referans olarak kabul edilerek, aynı topikal ürün ile BE çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, aynı ürünün BE'inin aynı olması beklenmekle birlikte, uygulama bölgesindeki farklılıkların etkisinin incelenmesi ve topikal ürünlerin BE'lerinin değerlendirilmesi için DMD yönteminin valide edilmesi amaçlanmıştır. Aynı topikal ürün ile farklı uygulama bölgeleri için BE koşulu sađlanmışır¹¹⁸. Bu nedenle çalışmamız, aynı farmasötik şekilde iki formülasyonda topikal

BE'in değerlendirildiği ve OTC HCl ile yapılmış tek DMD çalışmasıdır. Çalışmamızda non-kompartmansal olarak topikal BE'in değerlendirilmesinin yanında, Bölüm 5.2.2'de anlatıldığı şekilde in vivo MD deneyinin modellemesi* yapıldı ve buradan test ve referans için, formülasyondan ekstrasellüler sıvıya geçiş hızı, k_1 ; uzaklaşma hız değişmezi, k_d ve sanal dağılım hacmi, V_d hesaplandı.

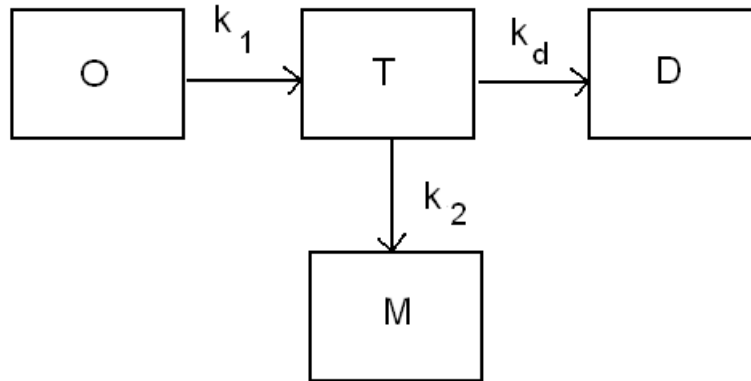
5.2.2. Mikrodiyalizde Modelleme*

5.2.2.1. Merhemden Deriye Geçiş

Bölüm 5.1.2.5'de anlatıldığı şekilde, in vitro meme derisinden geçiş profili incelendiğinde, referans ve test için k_1 değerleri sırasıyla, 1.17 $\mu\text{g/saat}$ ve 0.231 $\mu\text{g/saat}$ olarak bulunmuştur.

5.2.2.2. Mikrodiyaliz Deneyi Modellemesi

MD deneyi modellendiğinde, şekil 59'daki modele uyduğu görüldü:



şekil 59. Mikrodiyaliz deneyinin modeli

Burada, O kompartmanı merhemi, T kompartmanı ekstrasellüler sıvısı; D, vücuttan uzaklaşan ilaç kompartmanını ve M de MD ile çekilen ilaç kompartmanını göstermektedir. k_1 , merhemden ekstrasellüler sıvıya

* Mikrodiyaliz deneyinin modellemesi Sayın Prof.Dr. İlbeyi AĞABEYOĞLU tarafından yapılmıştır

geçiş hızını (sıfır derece kinetik); k_d , uzaklaşma hız değişmezini (birinci derece kinetik) ve k_2 de, MD ile uzaklaştırma hızını göstermektedir.

İn vitro meme derisi geçiş çalışmamız bize k_1 'i vermiştir.

İn vivo gerielde çalışmasından elde edilen orana α denirse,

$$\alpha = \frac{C_{\text{dializat}}}{T/V_d} \quad \text{Eşitlik 22}$$

bulunur. Burada T , ekstrasellüler sıvıdaki etkin madde miktarını ve T/V_d ise bunun derişimini göstermektedir. V_d , etkin maddenin sanal dağılım hacmi olmaktadır. Bunun değeri literatürde 128 L^{195} olarak verilmiştir.

Eşitlik 22'den giderek,

$$C_{\text{dializat}} = \frac{\alpha T}{V_d} \quad \text{Eşitlik 23}$$

yazılabilir.

k_2 hızı aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$k_2 = DB \cdot C_{\text{dializat}} = \frac{DB \cdot \alpha \cdot T}{V_d} \quad \text{Eşitlik 24}$$

DB, MD'deki akış debisi olup, değeri

$DB = 2 \text{ } \mu\text{L/dak} = 0.12 \text{ mL/saat}$ olmaktadır.

Şekil 59'da yer alan modele göre, ekstrasellüler sıvı kompartmanındaki etkin madde miktarını diferansiyel olarak tanımlarsak,

$$\frac{dT}{dt} = k_1 - k_2 - k_d T \quad \text{Eşitlik 25}$$

yazılabilir. dT/dt , ekstrasellülerdeki ilaç değişim hızını göstermektedir (sözelimi, mg/saat).

Eşitlik 24'ten, k_2 'yi Eşitlik 25'te yerine koyarsak,

$$\frac{dT}{dt} = k_1 - DB \cdot C_{\text{dializat}} - k_d T \quad \text{Eşitlik 26}$$

ve

$$\frac{dT}{dt} = k_1 - \frac{DB.\alpha.T}{V_d} - k_d T \quad \text{Eşitlik 27}$$

bulunur. Eşitlik 27, T parantezine alınırsa,

$$\frac{dT}{dt} = k_1 - \left(\frac{DB.\alpha}{V_d} + k_d \right) T \quad \text{Eşitlik 28}$$

bulunur. Bir kısaltma olarak,

$$A = \frac{DB\alpha}{V_d} + k_d \quad \text{Eşitlik 29}$$

diyebiliriz. Bu halde Eşitlik 28 denklemini

$$\frac{dT}{dt} = k_1 - AT \quad \text{Eşitlik 30}$$

şeklini alır. Terimlerin yerleri değiştirilirse,

$$\frac{dT}{dt} + AT = k_1 \quad \text{Eşitlik 31}$$

olur. Buradan,

$$dT + ATdt = k_1 dt \quad \text{Eşitlik 32}$$

yazılabilir. Bu denklem, birinci dereceden lineer bir diferansiyel denklem olup, çözümünü için bir $\mu(t)$, integrasyon faktörü bulunabilir²⁰⁶:

$$\mu(t) = e^{\int A dt} = e^{At} \quad \text{Eşitlik 33}$$

Bu bulunan integrasyon faktörü ile Eşitlik 32'nin iki tarafını çarparsak,

$$e^{At}.dT + e^{At}.A.Tdt = e^{At}.k_1 dt \quad \text{Eşitlik 34}$$

denklemini çıkar. Eşitliğin sol tarafı tam bir integral olup,

$$d(e^{At}.T) = e^{At}k_1.dt \quad \text{Eşitlik 35}$$

şeklinde gösterilebilir. Denklemin iki tarafının da integrali alınırsa,

$$\int d(e^{At}.T) = \int e^{At}.k_1.dt \quad \text{Eşitlik 36}$$

$$e^{At}.T = \frac{k_1}{A} e^{At} + C \quad \text{Eşitlik 37}$$

ve

$$T = \frac{k_1}{A} + e^{-At} \cdot C \quad \text{Eşitlik 38}$$

denklemini elde edilir.

Burada C, integrasyon değişmezidir. Sistemin ilk koşulları ele alındığında,

$$t = 0, T = 0$$

olduğu görülür. Bu değerler Eşitlik 38'e konursa,

$$0 = \frac{k_1}{A} + e^0 C \quad \text{Eşitlik 39}$$

$$C = -\frac{k_1}{A} \quad \text{Eşitlik 40}$$

olarak bulunur. Bu değer Eşitlik 38'e konursa,

$$T = \frac{k_1}{A} + e^{-At} \left(-\frac{k_1}{A} \right) \quad \text{Eşitlik 41}$$

denklemini elde edilir. k_1/A parantezine alınınca denklem,

$$T = \frac{k_1}{A} (1 - e^{-At}) \quad \text{Eşitlik 42}$$

şeklini alır.

Eşitlik 29'un irdelenmesi:

$$A = \frac{DB_{\infty}}{V_d} + k_d \quad \text{Eşitlik 29}$$

DB, deneysel bir değerimiz olup, 0.12 mL/saat'e eşittir. α 'yı, Bölüm 3.2.2.1.7'de anlatıldığı şekilde yapılan in vivo gerielde deneyine göre, 0.662 olarak bulmuştuk. V_d , literatürde 128 L olarak verilmiştir¹⁹⁵. k_d , yine literatürden $t_{1/2} = 9.2$ saat FK parametresinden hareketle hesaplanırsa,

$$k_d = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = \frac{0.693}{9.2} = 0.0753 \text{ saat}^{-1} \quad \text{Eşitlik 43}$$

olarak bulunur. Bu değerleri Eşitlik 29'da yerlerine koyarsak,

$$A = \frac{0.12 \text{ mL/saat} \times 0.662}{128000 \text{ mL}} + 0.0753 \text{ saat}^{-1} \quad \text{Eşitlik 44}$$

$$A = 0.000000621 + 0.0753 \quad \text{Eşitlik 45}$$

çıkar. MD ile dışarı çekilen ilaç miktarının, etkin maddenin uzaklaşma kinetiği üzerinde son derece önemsiz bir etki yaptığı görülmektedir. Bu durumda,

$$A = k_d \quad \text{Eşitlik 46}$$

olmaktadır. Bu da, Eşitlik 42 denklemini

$$T = \frac{k_1}{k_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad \text{Eşitlik 47}$$

şekline dönüştürmektedir.

5.2.2.3. Mikrodiyaliz ile Çıkışın Modellenmesi

Eşitlik 47, MD ile çıkışın genel uzaklaşmaya göre önemsiz olduğunu göstermektedir. Ancak bu çıkışı kendi çerçevesinde incelediğimizde, çok düşük derişimler olmakla birlikte belli bir takım değerleri gösterdiği görülmektedir. Bu çıkış modellenenebilir. Nitekim, Şekil 59'daki modeli göz önüne alırsak,

$$\frac{dM}{dt} = k_2 = \frac{DB \cdot \alpha \cdot T}{V_d} \quad \text{Eşitlik 48}$$

olmaktadır. dM/dt terimi, MD ile dışarı alınan ilaç ekstraksiyon hızını vermektedir. T değeri, Eşitlik 47 nolu denklemde tanımlanmıştı. Eşitlik 47, Eşitlik 48 denkleminde konursa,

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DB \cdot \alpha \cdot k_1}{k_d V_d} (1 - e^{-k_d t}) \quad \text{Eşitlik 49}$$

denklemini elde edilir. Eşitlik 49, diferansiyel bir hızı ($\Delta t \rightarrow 0$) göstermektedir. Bunu, makro seviyedeki hız denkleminde dönüştürürsek,

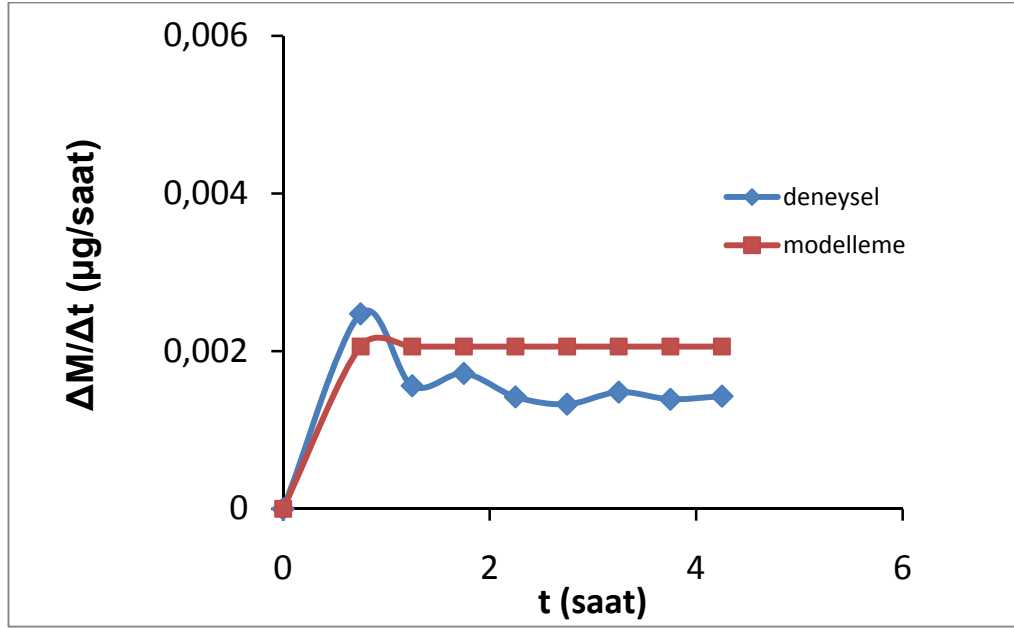
$$\frac{\Delta M}{\Delta t} = \frac{DB \cdot \alpha \cdot k_1}{k_d \cdot V_d} (1 - e^{-k_d t^*}) \quad \text{Eşitlik 50}$$

denklemini elde edilir. $\Delta M/\Delta t$ terimi, MD'de örnek alınan sürelerle ait ortalama hız olmakta ve bu sürelerin orta noktası da t^* olmaktadır. Deneysel MD bulguları, bu denklem kullanılarak nonlineer regresyona sokularak, test ve referans formülasyonları için, k_d , k_1 ve V_d değerleri optimize edilmiş olarak elde edildi (Tablo 38).

Tablo 38. Test ve Referansa ait optimize k_d , k_1 ve V_d değerleri

	TEST			REFERANS		
DENEK NO	k_1 (µg/saat)	k_d (saat ⁻¹)	V_d (mL)	k_1 (µg/saat)	k_d (saat ⁻¹)	V_d (mL)
1	12.8	21.6	10.2	24.7	21.4	57.3
2	4.76	20.9	54.7	21.3	0.653	749
3	5.31	1.80	217	27.6	2.82	532
4	6.66	21.4	14.7	24.0	21.5	209
5	4.64	21.4	50.5	52.9	21.9	596
8	4.98	21.2	85.7	26.5	1.30	6311
9	6.50	20.2	37.4	22.6	20.8	200
10	6.35	21.0	34.0	21.8	20.6	63.5
11	7.03	13.0	18.5	24.7	20.8	254
12	8.67	0.216	1211	21.4	21.2	271
Ortalama	6.77	16.3	173	26.8	15.3	924
SS	2.45	8.4	370	9.40	9.50	1907
% BS	36.3	51.9	213	35.3	62.0	206

Bu modellemeye göre, Referans formülasyonu için, 1. deneğe ait zamana karşı MD ile dışarı alınan ilaç ekstraksiyon hızı ($t^* - \Delta M/\Delta t$) profili ve modelleme sonucu elde edilen profil Şekil 60'da verilmiştir. Bu modele ait uyum ölçütleri Tablo 39'da yer almaktadır.



Şekil 60. 1 nolu denekte referans formülasyonu için zamana karşı MD ile dışarı alınan ilaç ekstraksiyon hızına ($t^*-\Delta M/\Delta t$) ve modellemesine ait profiller

Tablo 39. 1 nolu denekte referans formülasyonu için elde edilen MD ile çıkış modeline ait uyum ölçütleri

Uyum Ölçütü	
SKT	1.29×10^{-6}
ASKT	7.76×10^{-4}
AIC	-102
SIC	-102
Sr	5.08×10^{-4}

SKT: Sapma Kareleri Toplamı, ASKT: Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı, AIC: Akaike Bilgi Ölçütü, SIC: Schwartz Bilgi Ölçütü, Sr: Regresyonun Standart Sapması

İn vitrodan çekirdek değer olarak verdiğimiz k_1 değerleri test ve referans için, modelleme sonucunda yüksek değerler olarak optimize edilmiştir. Yani, deriden ekstrasellüler sıvıya geçişin epey yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, literatürden çekirdek değer olarak aldığımız k_d

değeri de nonlinear regresyon sonucu optimize edilerek, deri altında hızlı bir uzaklaşmaya işaret etti. Nonlinear regresyon sonucu test ve referans için elde edilen k_1 , k_d ve V_d parametrelerinin % 90 olasılıkla eşdeğer olmadığı, fakat atılım hız değişiminin nispeten birbirine yakın olduğu görüldü. Referans için, ekstrasellüler sıvıya geçiş hızı, testten daha hızlı bulundu. Bununla birlikte, referans için dağılım hacminin de teste göre fazla olduğu bulundu. Bu da referansın teste oranla düşük dermis derişimleri göstermesini destekleyerek açıklamaktadır. Modelleme ile bulunan yüksek k_1 ve k_d değerlerini, in vivo da deriden hızlı emilimi, doku içinde hızlı dağılımı ve dermisin damar ağı içinde hızla atılımı ile açıklayabiliriz. Elde ettiğimiz nanogram seviyelerindeki düşük dermis derişimleri de bunu destekler niteliktedir. İn vitro meme derisinden geçiş çalışmasında mikrogram seviyelerinde geçiş göz önüne alındığında canlı derideki emilimin, dağılım ve atılım etkenleriyle in vitro dan belirgin şekilde farklı olduğu görülmektedir. OTC için test ve referans formülasyonlarında bulduğumuz yüksek k_1 değerleri, hızlı emilime işaret etmektedir. Benzer şekilde, Kreilgaard ve arkadaşları da¹¹⁵, emülsiyon ve mikroemülsiyon formülasyonlarından lidokainin in vivo deriden geçişleri için kurdukları kompartmansal modele göre, yüksek emilim katsayıları ($147 \pm 44 \mu\text{g/L/dak}$; $466 \pm 288 \mu\text{g/L/dak}$) bulmuşlardır. Parametrelerin, bireylerarası varyasyonu beklenen bir sonuç olup, çalışmamızda k_1 ve k_d için ılımlı, V_d için ise daha yüksek varyasyon bulundu.

5.2.3. Mikrodializ için İn Vivo Gerieldenin Saptanması

Dializat derişimleri, doku derişimlerinin bir kesri olduğundan, in vivo gerieldenin saptanması gereklidir. Bölüm 3.2.2.1.7’de anlatıldığı şekilde yapılan in vivo gerielde çalışması sonucu elde edilen % 66.2’nin in vivo gerielde değeri ile dializat derişimleri düzeltilerek dermis profilleri çıkarıldı. Bu değer % 63.8 olarak bulduğumuz in vitro gerielde değerine de yakın

çıktı. İn vivo gerielde zamana bağlı olarak değişim göstermeyip, deney süresince stabil kaldığı ve yöntemin deri altı derişimleri doğru bir şekilde yansıttığı görüldü.

5.2.4. Yüzeyel Ultrasonografi ile Mikrodializ Membranın Deri Altındaki Derinliğinin Ölçülmesi

MD membranının deri altındaki derinliği, yüzeyel ultrasonografi ile literatürde de belirtildiği şekilde ölçüldü²⁰⁷. Membranın 3 cm'lik uzunluğu boyunca tekrarlanan ölçümlerde deri yüzeyine paralel bir şekilde, dermis içersine implantasyonun gerçekleştirildiği görüldü. Böylece, örnek aldığımız in vivo ortamın dermis dokusu olduğunu ispatlamış olduk.

5.2.5. Bant ile Soyma Yönteminde Kullanılan Bantın Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi

Crystal Clear Tape 3 M Scotch bantın, bant ile soyma deneylerinde SC'ü almak için uygun olduğu yapılan önceki çalışmada gösterilmiştir¹⁴⁵. Bantların adhezyon kuvveti ve adhezyon işi ölçülerek, bantın yapışkanlık özelliğinin önceki bir çalışma ile karşılaştırılabilir olduğunu gördük. Ortalama adhezyon işi 11.9 Nmm olup, daha önceki çalışmadaki¹⁴⁵ sonuç ile (12.7 Nmm) paralellik gösterdi.

5.2.6. Bant ile Soyma Çalışması

Bant ile soyma deneyinde, OTC merhemi uygulanan alanlarda, ilk örnekten itibaren SC'da OTC saptanarak, üst deri tabakasında ilaç birikimi olduğu sonucuna ulaştık. Bu noninvasif yöntemde denek uyuncunun çok iyi olduğu ve hiçbir yan etkinin olmadığı görüldü.

Bireylerarası zamana bağılı SC'daki miktarların varyasyonu, referans için, % 38.9-51.0, test için, % 19.2-45.0 arasındadır. Literatürde, triamsinolon asetonit krem formülasyonu ile 10 denekte yapılan bir BE çalışmasında, emilime ait varyasyonun, bireye bağımlı olduğu ve % 21-67 arasında değiştiğini bildirilmektedir¹⁷⁰. Yüksek bireylerarası varyasyon, % 90 güven aralığında 80-125 BE'lik koşulunu sağlayabilmek için, DFK çalışmalarda 32-40 birey kullanılması gerektiğini göstermektedir¹⁷⁰. Biz de çalışmamızda, bant ile soymada SC'daki ilaç miktarı açısından bireylerarası varyasyonun, dermisteki ilaç derişimlerine ait varyasyona oranla daha ılımlı olduğunu gördük. Varyasyonlar arasındaki bu fark, dermiste hızlı atılım, hızlı dağılım ile açıklanabilir. Bunun yanında SC'daki OTC bir depo görevi yapmakta ve bireylerarası varyasyondaki değişikliği daha ılımlı kılmakta olduğunu düşünmekteyiz.

Testin referansa göre BE'i, AUC üzerinden değerlendirildiğinde, üst ve alt sınır sırasıyla, % 91 ve % 51 olarak bulundu. C_{maks} üzerinden ise, üst ve alt sınır sırasıyla, % 87.1 ve % 41.1 olarak bulundu. Yine logaritmik transformasyon sonucunda yapılan BE hesabına göre, AUC üzerinden üst ve alt sınır sırasıyla, % 99.7 ve % 87.9; C_{maks} üzerinden yapılan hesaplamalarda ise üst sınır % 96.8 ve alt sınır % 82.2 olarak bulundu. Dolayısıyla, % 90 olasılıkla testin referans ürüne BE olduğu söylenebilir(Tablo 40). BE'lik hesabının, MD ve Bant ile Soyma Yöntemlerinde test ve referans ürün için, farklı sonuçlar verdiğini gördük. $AUC_{test}/AUC_{referans}$ oranı, 0.838 ± 0.460 olup, MD de ise, bu oran, 2.25 ± 2.16 çıkmıştır. SC'un test ve referans için depo olarak görev alarak ve dermise geçen OTC miktarının formülasyona bağılı olduğu sonucuna ulaşıldı. Testin referansa oranla daha fazla ekstrasellüler sıvıya geçtiği görüldü.

Tablo 40. Bant ile soyma yöntemi ile logaritmik transformasyon sonucu elde edilen BE parametrelerinin % 90 olasılıklı alt ve üst yüzde değerleri

AUC		C _{maks}	
Üst Yüzde	Alt Yüzde	Üst Yüzde	Alt Yüzde
99.7	87.9	96.8	82.2

Test ve referans için SC verilerinin DFK analizi, WinNonlin® Professional V.5.2.1 (Pharsight®, Certara™, St.Louis, Missouri, USA) ile yapıldı*. Dermise geçişi yansıtan SC'daki OTC miktarı-zaman profili, oral yoldan tek doz verilise ait plazma profiline benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, her bir denek için, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ cinsinden SC'daki OTC miktarı verileri, WinNonlin® programında tek kompartmanlı emilmeli yoldan verilış FK modellemesine göre analiz edildi. 3 nolu deneğin referans ürün verilerinin, WinNonlin® programı ile FK analizine ait program çıktısı EK-4'de yer almaktadır. Buna göre, test ve referans için tek kompartmanlı modele göre bulunan FK parametreler Tablo 41 ve 42'de verilmiştir. Bu FK parametreler plazma verilerinden hareketle bulunan parametrelere benzemektedir. Bununla birlikte, verilış yolunun doğası gereği yorumlanması farklı olmaktadır. Bu DFK parametreler deriden emilim, dağılım, metabolizasyon ve atılım kinetiklerini ifade etmektedir.

Tek kompartmanlı DFK modeli tanımlayan denklem Eşitlik 51'de verilmiştir.

* WinNonlin® Professional V.5.2.1 programının kullanılmasında göstermiş olduğu yardımlarından dolayı, Sayın Yrd.Doç. Dr.Zeynep Şafak TEKSİN'e teşekkür ederiz.

$$C = \frac{D \cdot k_a}{V \cdot (k_a - k_d)} (e^{-k_d t} - e^{-k_a t})$$

Eşitlik 51

C: Stratum Korneumdaki miktar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

t: Zaman (saat)

D: Doz (μg)

k_a : Emilim hız değişmezi (saat^{-1})

k_d : Uzaklaşma hız değişmezi (saat^{-1})

V: Etkin maddenin dağıldığı yüzey alanı (cm^2)

V parametresi, etkin maddenin dağıldığı yüzey alanını göstermekte olup, ortalama SC kalınlığı¹³⁷ (20 μm) ile çarpılarak, V_d (mL) sanal dağılım hacmi bulundu.

Tablo 41. Testin tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri

DENEK NO:	V _d (mL)	k _a (saat ⁻¹)	k _d (saat ⁻¹)	t _o (saat)	AUC (µg/cm ² *saat)	t _{1/2} (saat)	CL (mL/saat)	t _{maks} (saat)	C _{maks} (µg/cm ²)
1	3.17	1.95	0.122	0.315	166	5.70	0.387	1.83	16.8
2	2.20	5.10	0.0719	0.539	406	9.65	0.158	1.39	27.4
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2.97	8.88	0.150	0.648	144	4.63	0.446	1.12	20.2
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2.53	1.54	0.132	0.00102	192	5.24	0.334	1.74	20.1
7	1.45	1.19	0.128	0.484	345	5.41	0.186	2.58	33.8
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1.11	0.421	0.368	0.326	157	1.88	0.408	2.12	22.7
10	3.74	2.68	0.0785	-	219	8.83	0.293	1.36	15.4
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0.768	0.289	0.287	-0.711	291	2.41	0.220	2.76	30.9
Ort.	2.24	2.76	0.167	0.229	240	5.47	0.304	1.86	23.4
SS	1.05	2.91	0.105	0.464	97	2.72	0.108	0.59	6.65
% BS	47.0	105	62.6	203	40.3	49.8	35.4	31.6	28.4

V_d: Sanal dağılım hacmi, k_a: Emilim hız değişmezi, k_d: Uzaklaşma hız değişmezi,

t_o: Gecikme süresi, AUC: Eğri altında kalan alan, t_{1/2}: Biyolojik yarıömür, CL: Klirens,

t_{maks}: Maksimum stratum korneum miktarına ulaşmak için geçen süre, C_{maks}: Maksimum stratum korneum derişimi

Tablo 42. Referansın tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri

DENEK NO:	V _d (mL)	k _a (saat ⁻¹)	k _d (saat ⁻¹)	t _o (saat)	AUC (µg/cm ² *saat)	t _{1/2} (saat)	CL (mL/saat)	t _{maks} (saat)	C _{maks} (µg/cm ²)
1	3.63	4.66	0.508	0.674	33.3	1.37	1.85	1.21	12.9
2	1.20	5.47	0.190	0.685	269	3.65	0.228	1.32	45.3
3	0.862	2.19	0.188	0.556	379	3.69	0.162	1.78	56.6
4	1.01	0.921	0.366	0.326	166	1.89	0.370	1.99	33.1
5	3.06	8.81	0.145	0.704	139	4.79	0.444	1.18	18.7
6	1.35	15.2	0.154	0.627	296	4.51	0.208	0.934	43.4
7	1.50	21.5	0.0584	0.679	700	11.8	0.0874	0.953	40.3
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0.616	0.875	0.711	-0.246	140	0.975	0.438	1.02	40.5
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	1.68	30.8	0.0869	0.671	420	7.98	0.146	0.862	35.9
12	1.65	2.90	0.0282	0.0000180	1317	24.6	0.0466	1.61	35.5
Ort.	1.66	9.33	0.244	0.468	386	6.53	0.398	1.29	36.2
SS	0.96	10.10	0.219	0.336	378	7.14	0.528	0.39	12.7
% BS	58.1	108	90.0	71.8	97.8	109	133	30.1	35.0

V_d: Sanal dağılım hacmi, k_a: Emilim hız değişmezi, k_d: Uzaklaşma hız değişmezi,

t_o: Gecikme süresi, AUC: Eğri altında kalan alan, t_{1/2}: Biyolojik yarıömür, CL: Klirens,

t_{maks}: Maksimum stratum korneum miktarına ulaşmak için geçen süre, C_{maks}: Maksimum stratum korneum miktarı

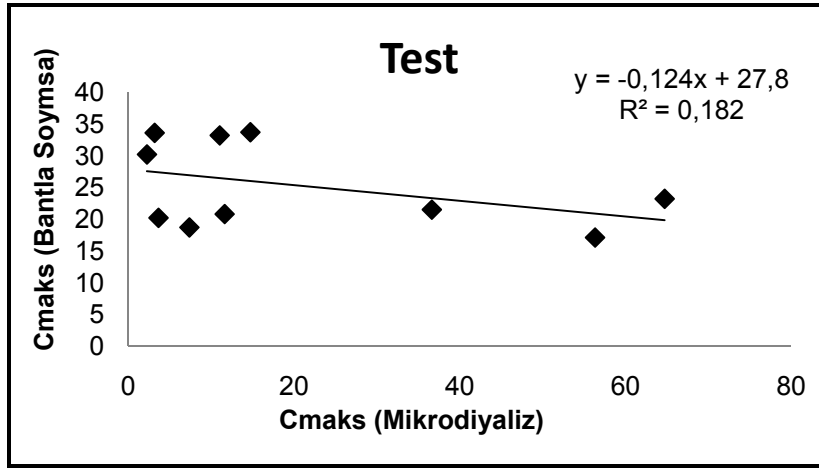
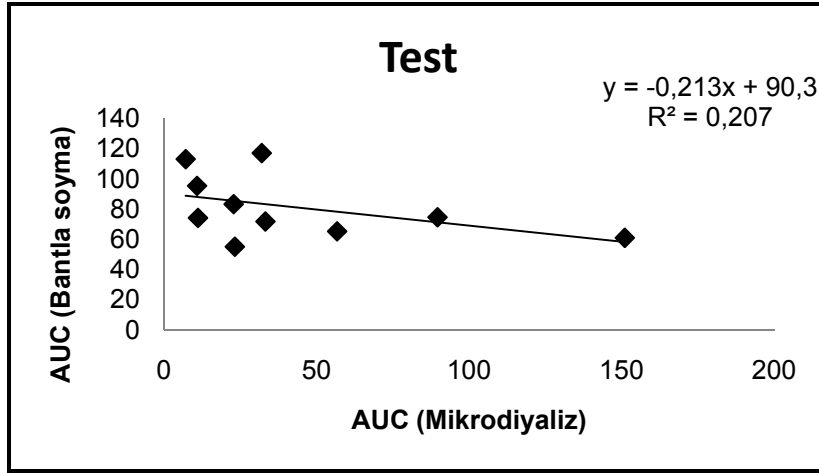
Referans için, 8. ve 10. deneklerde; test için, 3., 5., 8. ve 11. deneklerde, tek kompartmanlı modele uyum sağlanamadı. Bu deneklerde, zaman-SC'daki miktar profilinde terminal bölgede atılım bölgesi net olmadığı için, verilerin bir bölümünde k_d ve dolayısıyla V_d, AUC_{0→∞}, CL ve t_{1/2} hesaplamalarında tutarsız sonuçlar çıktı; ya da veriler tek kompartmanlı model ile hiç tanımlanamadı. Bununla birlikte test ve referans formülasyonu için, ortalama SC miktarı-zaman profillerine tek kompartmanlı modele göre DFK analiz yapıldığında, Tablo 43'deki FK parametreler elde edildi. Test ve referans için t_{1/2} değerleri farklı olmakla birlikte, OTC'ye ait oral t_{1/2} (9.2 saat)¹⁹⁵ ile karşılaştırılabilir olduğu görüldü. Test ve referans için anlamlı gecikme süreleri bulundu.

Tablo 43. Test ve Referans için ortalama verilerin tek kompartmanlı modele göre farmakokinetik parametreleri

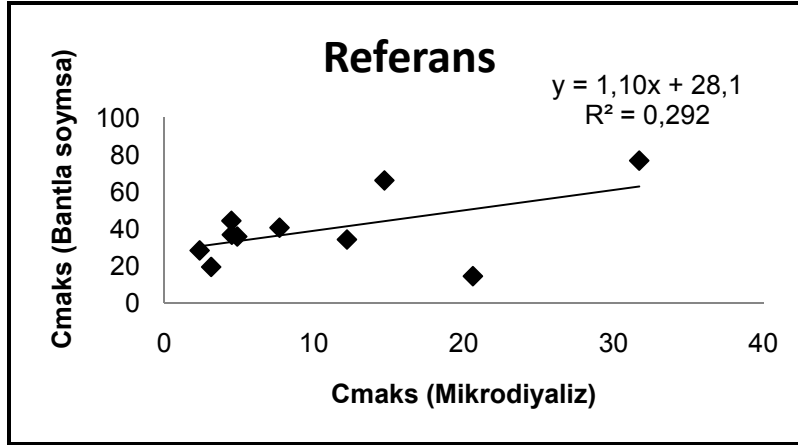
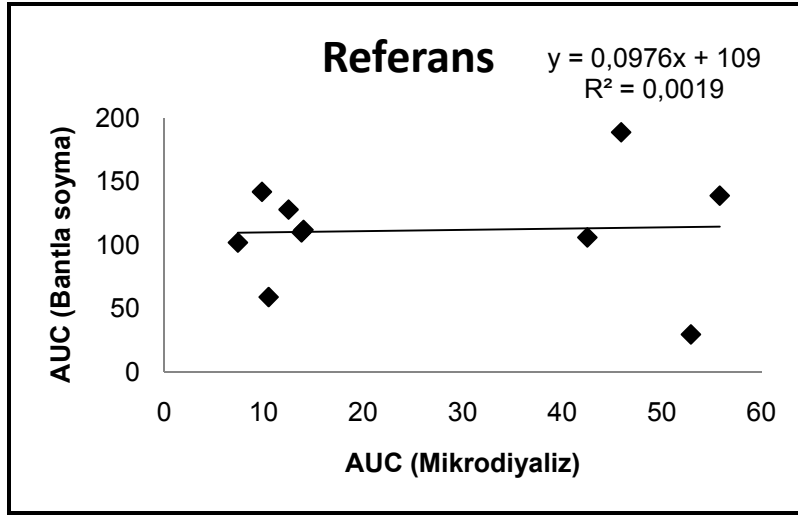
	TEST			REFERANS		
	Ortalama	SS	% BS	Ortalama	SS	% BS
V_d (mL)	2.76	0.25	8.94	1.64	0.18	10.9
k_a (saat ⁻¹)	3.06	3.18	104	5.37	5.35	99.7
k_d (saat ⁻¹)	0.0234	0.0310	133	0.100	0.050	49.9
t_o (saat)	0.220	0.517	235	0.545	0.200	36.6
AUC (µg/cm ² *saat)	944	1173	124	355	144	40.5
$t_{1/2}$ (saat)	29.6	39.2	133	6.90	3.44	49.9
CL (mL/saat)	0.06	0.08	124	0.16	0.07	40.5
t_{maks} (saat)	1.82	0.60	33.1	1.30	0.34	26.4
C_{maks} (µg/cm ²)	21.3	0.703	3.30	33.0	2.0	5.96

V_d : Sanal dağılım hacmi, k_a : Emilim hız değişmezi, k_d : Uzaklaşma hız değişmezi, t_o : Gecikme süresi, AUC: Eğri altında kalan alan, $t_{1/2}$: Biyolojik yarıömür, CL: Klirens, t_{maks} : Maksimum stratum korneum miktarına ulaşmak için geçen süre, C_{maks} : Maksimum stratum korneum derişimi

MD verilerine göre, testin topikal BY'ı daha fazla, diğer taraftan bant ile soyma verileri logaritmik transformasyon sonucunda, testin referansa BE olduğu sonucunu verdi. Dolayısıyla, testin referansa oranla daha hızlı emildiğini ve referansın stratum korneumda daha yüksek miktarlarda olduğunu gördük. Bant ile soyma ve MD yöntemleri arasındaki korelasyon, AUC ve C_{maks} değerleri açısından incelendiğinde, yöntemler arasında düşük korelasyon saptandı ($r^2 = 0.002-0.292$) (Şekil 61).



Şekil 61. Mikrodiyaliz ve dermatofarmakokinetik verileri arasındaki korelasyon



Şekil 61. Mikrodiyaliz ve dermatofarmakokinetik verileri arasındaki korelasyon (devamı)

İki yöntemin de farklı kompartmanlardaki ilaç miktarlarını ölçüyor olması nedeniyle, birbirlerinin yerine kullanılabilmesi pek olası görünmüyor. Bant ile soyma yönteminin, SC'daki ilaç miktarlarını vermesi ile dermise geçen ilaç miktarını yansıtacağı düşünülebilir. Fakat ilacın fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon özellikleri gibi etkenler dermis ilaç derişimlerini etkileyecektir. MD ise, hedef dokuya, yani etki bölgesine, zamana bağlı olarak ilaç geçiş hızı ve miktarını tam olarak ölçebilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, SC'dan örneklemeyi sağlayan bant ile soyma yöntemi ile MD yöntemi topikal BE'lik açısından farklı sonuçlar vermiştir. Bant ile soyma yönteminin topikal kullanılan lokal

etkili ilaçların, deriye penetrasyonunun bir ölçütü olarak SC tabakasından örnekleme yapmasının yararlı olabileceği ve bunun yanında, oldukça pratik ve noninvasif bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, SC bariyerini geçen ve epidermisten dermise ulaşan ilaç miktarı yani dermisteki ilaç derişimleri, deri altındaki dağılım, metabolizasyon ve uzaklaşma kinetik olaylarından, ilaca ait fizikokimyasal parametrelerden ve formülasyondan etkileneceğinden, SC ilaç miktarları dermis derişimlerini her zaman doğru bir şekilde yansıtmayabilir. Zaten literatürde bu yönde bir korelasyonun incelendiği çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır¹¹⁷. Benfeldt ve arkadaşları¹¹⁷, lidokain içeren krem ve merhem formülasyonlarının in vivo BE'ini inceledikleri bu çalışmalarında, her iki yöntem ile de (bant ile soyma ve DMD) lidokain penetrasyonunun krem formülasyonunda, merhem formülasyonuna oranla 3-5 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, bant ile soyma ve MD seviyeleri ya da AUC değerleri arasında, merhem formülasyonu için güçlü bir korelasyon saptamışlardır. Fakat bunun yanında, krem formülasyonu için ise, hem yüksek varyasyon olduğunu, hem de iki yöntem arasında zayıf bir korelasyon olduğunu görmüşlerdir. Bizim bulgularımıza göre, iki yöntem arasında iyi bir korelasyon saptanamamıştır ve bu durumda yöntemlerin birbirinin yerine kullanılabilmesi olası değildir. Her ne kadar literatürde bant ile soyma sonuçlarının dermis derişimlerinin bir göstergesi olabileceği belirtilmiş olsa da, yöntemler arası güçlü bir korelasyonun kurulabilmesi için, dermisteki yüksek varyasyon faktörünün de dikkate alınarak, farklı etkin maddeler ile bu ilişkinin incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Bant ile soyma ve mikrodializ (MD) yöntemleri kullanılarak oksitetrasiklin (OTC) HCl ile yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Deneye katılan deneklerde, test ve referans OTC HCl merhemi uygulaması sonucunda, deri altına penetre olmuş OTC HCl ilk örnekten itibaren dializatta dermal mikrodializ (DMD) ile saptanabilmiştir.
- MD probu implantasyonuna deneklerin göstermiş oldukları uyum, yarı-invasif MD yönteminin in vivo dermatolojik çalışmalarda rutin olarak kullanılmasının olası olacağını göstermiştir.
- MD yönteminde, gerçek derişimlerin bir kesri olan dializat derişimlerinden hareketle yapılan gerielde çalışmalarında, in vitro gerielde % 64; in vivo gerielde ise % 66 olarak bulunmuş olup, birbirine yakındır. Deney boyunca gerieldelerin değişmediği ve yöntemin deri altı derişimleri doğru bir şekilde yansıttığı ispatlanmıştır.
- Perkütan emilimin göstergesi olan dermis derişimi-zaman profili eğrisi altında kalan alanlar (AUC) açısından, AUC_{Test}/AUC_{Ref} 2.25 ± 2.16 olarak bulunmuştur.
- Test ve referans için, AUC ve C_{maks} üzerinden logaritmik transformasyon sonucu yapılan BE hesaplamalarında % 90 olasılıkla, test ve referansın BE olmadıklarını görülmüştür.
- DMD yöntemi ile elde edilen AUC, C_{maks} ve t_{maks} değerleri için, test ve referansa ait literetürle karşılaştırılabilir şekilde, yüksek varyasyon bulunmuştur.
- OTC HCl dermis derişimlerinde test ve referans için görülen yüksek bireylerarası varyasyonun, insan derisinin bariyer fonksiyonundaki biyolojik varyasyonun, deri metabolizasyon hızındaki ve

klirensindeki değişikliklerin doğal sonucu olan, perkütan emilimin bireylerarası varyasyonu olarak kabul edilmiştir.

- Bu araştırma ile, aynı farmasötik dozaj şeklindeki iki topikal formülasyonun BE'inin değerlendirilmesinde DMD yönteminin uygun olduğu ve daha fazla denek ile çalışılarak varyasyonun azaltılabileği sonucuna ulaşılmıştır.
- MD deneyinin modellemesinde, MD ile dışarı çekilen ilaç miktarının, etkin maddenin uzaklaşma kinetiği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görölmüştür. MD ile çıkışın modellenmesi ile test ve referans için, merhemden ekstrasellüler sıvıya geçiş hızı, k_1 ; sanal dağılım hacmi, V_d ve uzaklaşma hız değişmezi, k_d değerleri optimize edilmiştir. İn vivoda deriden hızlı emilim, doku içinde hızlı dağılım ve atılım olduğu görölmüştür. Referans için, ekstrasellüler sıvıya geçiş hızının, testten daha hızlı olduğu ve dağılım hacminin ise, teste göre fazla olduğu bulunmuştur. k_1 , V_d , k_d parametrelerinin test ve referans için % 90 olasılıkla eşdeğer olmadığı fakat uzaklaşma hız değişmezinin, k_d , birbirine nispeten yakın olduğu bulunmuştur.
- Test ve referans merhemi uygulanan deneklerde SC'daki OTC miktarı, Bant ile Soyma yöntemi ile saptanarak, noninvasif bu yöntemle denek uyuncunun çok iyi olduğu görölmüştür.
- Bant ile Soyma ile tespit edilen, SC'daki OTC miktarlarının bireylerarası varyasyonun, dermis OTC derişimlerine ait varyasyondan daha az olduğu görölmüştür.
- Bant ile soyma yönteminde, AUC ve C_{maks} üzerinden logaritmik transformasyon sonucunda yapılan BE hesabına göre, testin referansa, % 90 olasılıkla BE olduğu söylenebilir. Bu açıdan Bant ile Soyma, MD yönteminden farklı sonuç vermiştir.
- SC'daki OTC miktarı-zaman eğrisi altında kalan alan oranı, AUC_{Test}/AUC_{Ref} 0.838 ± 0.460 olarak bulunmuştur.

- SC'un test ve referans için depo olarak görev aldığı ve dermise geçen OTC miktarının formülasyona bağlı olduğu görülmüştür. MD deneyi, referansın teste oranla daha hızlı emildiği; bunun yanında Bant ile Soyma deneyi ise, referansın SC'da daha yüksek miktarlarda olduğunu göstermiştir.
- Test ve referans için, tek kompartmanlı modele göre yapılan DFK analizde, karşılaştırılabilir AUC, V_d , k_a , k_d , t_o , $t_{1/2}$, CL, t_{maks} ve C_{maks} değerleri elde edilmiştir.
- AUC ve C_{maks} parametreleri açısından, Bant ile soyma ve MD yöntemleri arasında düşük korelasyon saptanmıştır. SC'daki etkin madde miktarlarının dermis derişimlerinin bir göstergesi olduğu, fakat canlı deri, dermisteki, dağılım, metabolizasyon, uzaklaşma kinetikleri, ilacın fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon etkenleri nedeniyle, her zaman dermis derişimlerini doğru yansıtmayabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla, iki yöntemin farklı kompartmanlardaki ilaç miktarlarını ölçüyor olması nedeniyle, birbirinin yerine kullanılabilmesi pek olası görünmemektedir.

7. ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Mikrodiyaliz (MD) ve Bant ile Soyma yöntemleri kullanılarak, topikal biyoeşdeğerliğin (BE) incelenmesidir.

Oksitetrasiklin hidroklorürün (OTC) iki ticari preparatının BE'i 12 sağlıklı gönüllü üzerinde her iki yöntem ile incelenmiştir. Test ve referans, ön kol üzerine uygulandıktan sonra, dermal MD (DMD) yöntemi ile 30 dakika aralıklarla 4 saate kadar örnek toplanmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında, aynı gönüllülerde, test ve referans için, ön kol üzerine formülasyon uygulandıktan sonra, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ve 4. saatlerde Bant ile Soyma ile örnekler alınmıştır.

Dermis derişimi-zaman eğrisi altında kalan alan oranı, $AUC_{Test}/AUC_{Referans}$ 2.25 ± 2.16 bulunmuştur. % 90 olasılıkla testin referansa göre BE olmadığı görülmüştür.

İn vivo MD verilerinin modellenmesi, test ve referans için sırasıyla, 6.77 ± 2.45 , 26.8 ± 9.40 µg/saat merhemden ekstrasellüler kompartmana geçiş hızı (k_1); 16.3 ± 8.4 , 26.8 ± 9.4 saat⁻¹ uzaklaşma hız değişmezi (k_d) ve 173 ± 370 , 924 ± 1907 mL dağılım hacmi (V_d) göstermiştir.

Stratum korneum (SC) miktarı-zaman eğrisi altında kalan alan oranı, $AUC_{Test}/AUC_{Referans}$ 0.838 ± 0.460 bulunmuştur. % 90 olasılıkla AUC ve C_{maks} için, test referansa göre BE bulunmuştur.

Dermatofarmakokinetik analize göre, test ve referans için sırasıyla, emilim hız değişmezi (k_a) 2.76 ± 2.91 , 9.33 ± 10.10 saat⁻¹; uzaklaşma hız değişmezi (k_d) 0.167 ± 0.105 , 0.244 ± 0.219 saat⁻¹; sanal dağılım hacmi (V_d), 2.24 ± 1.05 , 1.66 ± 0.96 mL; biyolojik yarıömür ($t_{1/2}$), 5.47 ± 2.72 , 6.53 ± 7.14 saat; klirens (CL), 0.304 ± 0.108 , 0.398 ± 0.528 mL/saat bulunmuştur.

İki yöntem arasında zayıf korelasyon görülmüştür ($r^2 = 0.002-0.292$).

Sonuç olarak, Bant ile Soymanın SC'a penetrasyonu değerlendirmek için yararlı bir yöntem olduğu, fakat SC derişimlerinin canlı deri dermisteki OTC derişimlerini kestiremediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu yüzden, DMD yöntemi ile etki bölgesindeki OTC seviyelerini saptayarak topikal BE daha iyi değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Bant ile soyma, dermal mikrodializ, oksitetrasiklin HCl, topikal biyoeşdeğerlik

8. SUMMARY

The aim of this study was to examine topical bioequivalence (BE) by Microdialysis (MD) and Tape-stripping methods.

BE of two commercial oxytetracycline hydrochloride (OTC) formulations were investigated in 12 healthy volunteers. After the application of formulations on forearms, samples were collected at 30-minute intervals upto four hours by DMD. Samples were obtained at 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ve 4. hours by tape-stripping.

The ratio of the areas under the dermis concentration-time profiles ($AUC_{\text{Test}}/AUC_{\text{Reference}}$) was 2.25 ± 2.16 . The bioavailability of the test product was not found to be BE at 90 % CI.

Pharmacokinetic modelling of MD data yielded transfer rates from ointment to extracellular compartment (k_1) of 6.77 ± 2.45 , 26.8 ± 9.40 $\mu\text{g/h}$; disposition rate constant (k_d) of 16.3 ± 8.4 , 26.8 ± 9.4 h^{-1} , skin distribution (V_d) of 173 ± 370 , 924 ± 1907 mL for test and reference, respectively.

The ratio of the areas under the OTC amount in Stratum Corneum (SC)-time ($AUC_{\text{Test}}/AUC_{\text{Reference}}$) profiles was found to be 0.838 ± 0.460 . The test product was found to be BE as regarding AUC and C_{max} at % 90 CI.

Dermatopharmacokinetic analysis yielded absorption rate constant (k_a) of 2.76 ± 2.91 , 9.33 ± 10.10 h^{-1} ; disposition rate constant (k_d) of 0.167 ± 0.105 , 0.244 ± 0.219 h^{-1} ; volume of distribution (V_d) of 2.24 ± 1.05 , 1.66 ± 0.96 mL; biological half life ($t_{1/2}$) of 5.47 ± 2.72 , 6.53 ± 7.14 h; clearance (CL) of 0.304 ± 0.108 , 0.398 ± 0.528 mL/h for test and reference, respectively.

The correlation between two methods was weak ($r^2 = 0.002-0.292$).

As a result, it was concluded that tape-stripping is a useful method to assess the penetration to SC, however, SC concentration was found not

to be a predictive of OTC concentration in the living skin, dermis. Therefore, DMD sampling can better assess the topical BE, measuring the levels of OTC at the site of action.

Keywords: Tape-stripping, dermal microdialysis, oxytetracycline HCl, topical bioequivalence

9. KAYNAKLAR

1. Kalant H. A microdialysis procedure for extraction and isolation of corticosteroids from peripheral blood plasma, *Biochem J* 1958; 69: 99-103.
2. Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis –Theory and application. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 195-215.
3. Ungerstedt U. Microdialysis –principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230 (4): 365-373.
4. Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; 14(3): 267-288.
5. Tsai T-H, Liu M-C. Determination of unbound theophylline in rat blood and brain by microdialysis and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1032: 97-101.
6. Lange ECM, Marchand S, Berg D-J, Sandt ICJ, Boer AG, Delon A et al. In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. *Eur J Pharm Sci* 2000; 12: 85-93.
7. Tsai T-H, Chen Y-F. Pharmacokinetics of metronidazole in rat blood, brain and bile studied by microdialysis coupled to microbore liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2003; 987: 277-282.
8. Feng J, Li F, Zhao Y, Feng Y, Abe Y. Brain pharmacokinetics of tetramethylpyrazine after intranasal and intravenous administration in awake rats. *Int J Pharm* 2009; 375: 55-60.
9. Li F, Feng J, Cheng Q, Zhu W, Jin Y. Delivery of ¹²⁵I-cobrotoxin after intranasal administration to the brain: A microdialysis study in freely moving rats. *Int J Pharm* 2007; 328: 161-167.
10. Kovar A, Costa TD, Derendorf H. Comparison of free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *J Pharm Sci* 1997; 86 (1): 52-56.

11. Wang Li, Zhang Z, Yang W. Pharmacokinetic study of trimebutine maleate in rabbit blood using in vivo microdialysis coupled to capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 399-403.
12. Höcht C, DiVerniero C, Opezzo JAW, Taira CA. Applicability of microdialysis as a technique for pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling of antihypertensive beta-blockers. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005; 52: 244-250.
13. Ekstrom PO, Giercksky KE, Andersen A, Slordal L. Alterations in methotrexate pharmacokinetics by naproxen in the rat as measured by microdialysis. *Pharmacol Lett* 1997; 60 (24): PL359-364.
14. Tsai T-H. Determination of naringin in rat blood, brain, liver, and bile using microdialysis and its interaction with cyclosporin A, a P-glycoprotein modulator. *J Agric Food Chem* 2002; 50(23): 6669-6674.
15. Cheng FC, Tsai TR, Chen YF, Hung LC, Tsai TH. Pharmacokinetic study of levofloxacin in rat blood and bile by microdialysis and high-performance liquid chromatography. *Chromatogr A* 2002; 961: 131-136.
16. Araujo BV, Silva CF, Haas SE, Costa TD. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47: 876-881.
17. Pena A, Costa TD, Talton JD, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U et al. Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. *Pharm Res* 2001; 18 (9): 1310-1314.
18. Wei G, Ding P-T, Zheng J-M, Lu W-Y. Pharmacokinetics of timolol in aqueous humor sampled by microdialysis after topical administration of thermosetting gels. *Biomed Chromatogr* 2006; 20: 67-71.
19. Mathy F-X, Lombry C, Verbeeck RK, Preat V. Study of the percutaneous penetration of flurbiprofen by cutaneous and subcutaneous microdialysis after iontophoretic delivery in rat. *J Pharm Sci* 2005; 94 (1): 144-152.

20. Simonsen L, Jorgensen A, Benfeldt E, Groth L. Differentiated in vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats measured by cutaneous microdialysis. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 379-388.
21. Stagni G, Shukla C. Pharmacokinetics of methotrexate in rabbit skin and plasma after iv-bolus and iontophoretic administrations. *J Control Release* 2003; 93: 283-292.
22. Benfeldt E, Serup J. Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 517-526.
23. Murakami T, Yoshioka M, Yumoto R, Higashi Y, Shigeki S, Ikuta Y et al. Topical delivery of keloid therapeutic drug, tranilast, by combined use of oleic acid and propylene glycol as a penetration enhancer: Evaluation by skin microdialysis in rats. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 49-54.
24. Murakami T, Yoshioka M, Okamoto I, Yumoto R, Higashi Y, Okahara K et al. Effect of ointment bases on topical and transdermal delivery of salicylic acid in rats: evaluation by skin microdialysis. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 55-61.
25. Kreilgaard M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis. *Pharm Res* 2001; 18 (3): 367-373.
26. Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE. Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res* 1994; 11 (11): 1631-1639.
27. Beier H, Kaiser K, Langhans M, Malmendier K, Sluijsmans I, Weiher J. Peritoneal microdialysis in freely moving rodents: An alternative to blood sampling for pharmacokinetic studies in the rat and the mouse. *Eur J Pharm Sci* 2007; 30: 75-83.
28. Nakashima M, Takeuchi N, Hamada M, Matsuyama K, Ichikawa M, Goto S. In vivo microdialysis for pharmacokinetic investigations: a

plasma protein binding study of valproate in rabbits. *Biol Pharm Bull* 1994; 17 (12): 1630-1634.

29. Delvecchio FC, Auge BK, Munver R, Brown SA, Brizuela RM, Zhong P et al. Shock wave lithotripsy causes ipsilateral renal injury remote from the focal point: the role of regional vasoconstriction. *J Urol* 2003; 169 (4): 1526-1529.
30. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Angiotensin II type 1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1897-1903.
31. Obata T, Yamanaka Y. Cardiac microdialysis of salicylic acid OH generation on nonenzymatic oxidation by norepinephrine in rat heart. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1375-1378.
32. Bednar I, Friberg L, Nordberg A. Modulation of dopamine release by the nicotinic agonist epibatidine in the frontal cortex and the nucleus accumbens of naive and chronic nicotine treated rats. *Neurochem Int* 2004; 45: 1049-1055.
33. Kanno M, Matsumoto M, Togashi H, Yoshioka M, Mano Y. Effects of acute repetitive transcranial magnetic stimulation on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. *J Neurol Sci* 2004; 217: 73-81.
34. Nagayama M, Katsuramaki T, Kimura H, Isobe M, Meguro M, Matsuno T et al. Prediction of graft viability from non-heart-beating donor pigs using hepatic microdialysate hypoxanthine levels. *J Surg Res* 2002; 107: 210-218.
35. Award AS, Webb RL, Carey RM, Siragy HM. Renal nitric oxide production is decreased in diabetic rats and improved by AT₁ receptor blockade. *J Hypertens* 2004; 22: 1571-1577.
36. Devineni D, Klein-Szanto A, Gallo JM. Uptake of temozolomide in a rat glioma model in the presence and absence of the angiogenesis inhibitor TNP-470¹ *Cancer Res* 1996; 56: 1983-1987.

37. Lönnroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* 1987; 253: E228-E231.
38. Stahle L, Alm C, Ekquist B, Lundquist B, Tomson T. Monitoring free extracellular valproic acid by microdialysis in epileptic patients. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 14-18.
39. Karjagin J, Pahkla R, Starkopf J. Perioperative penetration of metronidazole into muscle tissue: a microdialysis study. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 59: 809-813.
40. Karjagin J, Pahkla R, Karki T, Starkopf J. Distribution of metronidazol in muscle tissue of patients with septic shock and its efficacy against *Bacteroides fragilis* in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 341-346.
41. Pena A, Brunner M, Eichler H-G, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, Müller M, Derendorf H. Comparative target site pharmacokinetics of immediate- and modified-release formulations of cefaclor in humans. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 403-411.
42. Liu P, Müller M, Grant M, Obermann B, Derendorf H. Tissue penetration of cefpodoxime and cefixime in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 564-569.
43. Delacher S, Derendorf H, Hollenstein U, Brunner M, Joukhadar C, Hofmann S et al. A combined in vivo pharmacokinetic-in vitro pharmacodynamic approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in humans. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 733-739.
44. Müller M, Schmid R, Georgopoulos A, Buxbaum A, Wasicek C, Eichler H-G. Application of microdialysis to clinical pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 371-380.
45. Sasongko L, Williams KM, Day RO, McLachlan A J. Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 551-561.

46. Hollenstein U, Brunner M, Mayer BX, Delacher S, Erovic B, Eichler HG et al. Target site concentrations after continuous infusion and bolus injection of cefpirome to healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 229-236.
47. Müller M, Stab H, Brunner M, Möller JG, Lackner E, Eichler HG. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (10): 2345-2349.
48. Müller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B et al. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (12): 2703-2709.
49. Lorentzen H, Kallehave F, Kolmos HJ, Knigge U, Bülow J, Gottrup F. Gentamicin concentrations in human subcutaneous tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (8): 1785-1789.
50. Tegeder I, Muth-Selbach U, Lötsch J, Rüsing G, Oelkers R, Brune K et al. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 357-368.
51. Tegeder I, Lötsch J, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Kelm GR, Meller ST et al. Comparison of tissue concentrations after intramuscular and topical administration of ketoprofen. *Pharm Res* 2001; 18 (7): 980-986.
52. Borg N, Götharson E, Benfeldt E, Groth L, Stahle L. Distribution to the skin of penciclovir after oral famciclovir administration in healthy volunteers: comparison of the suction blister technique and cutaneous microdialysis. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 274-277.
53. Petersen LJ, Church MK, Rihoux J-P, Skov PS. Measurement of interstitial cetirizine concentrations in human skin: correlation of drug levels with inhibition of histamine-induced skin responses. *Allergy* 1999; 54: 607-611.

54. Dehghanyar P, Mayer BX, Namiranian K, Mascher H, Müller M, Brunner M. Topical skin penetration of diclofenac after single-and multiple-dose application. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42 (7): 353-359.
55. Benfeldt E, Serup J, Menne T. Microdialysis vs. suction blister technique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 338-342.
56. Brunner M, Reinprecht A, Illievich U, Spiss CK, Dittrich P, Houte M et al. Penetration of fosfomycin into the parenchyma of human brain: a case study in three patients. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 548-552.
57. Lindberger M, Tomson T, Wallstedt L, Stahle L. Distribution of valproate to subdural cerebrospinal fluid, subcutaneous extracellular fluid, and plasma in humans: A microdialysis study. *Epilepsia* 2001; 42 (2): 256-261.
58. Ekstrom PO, Andersen A, Saeter G, Giercksky KE, Slordal L. Continuous intratumoral microdialysis during high-dose methotrexate therapy in a patient with malignant fibrous histiocytoma of the femur: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 39: 267-272.
59. Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke* 1995; 26: 2187-2189.
60. Kennergren C, Mantovani V, Lönnroth P, Nyström B, Berglin E, Hamberger A. Monitoring of extracellular aspartate aminotransferase and troponin T by microdialysis during and after cardioplegic heart arrest. *Cardiology* 1999; 92: 162-170.
61. Müller M. Science, medicine, and the future. Microdialysis. *BMJ* 2002; 324: 588-591.
62. Barbe P, Stich V, Galitzky J, Kunesova M, Hainer V, Lafontan M. In vivo increase in β -adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue of obese subjects submitted to a hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 (1): 63-69.

63. Dabrosin C, Öllinger K, Ungerstedt U. Variability of glutathione levels in normal breast tissue and subcutaneous fat during the menstrual cycle: an in vivo study with microdialysis technique. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82 (5): 1382-1384.
64. Weiss DJ, Lunte CE, Lunte SM. In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trends Analyt Chem* 2000; 19 (10): 606-616.
65. Plock N, Kloft C. Microdialysis- theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 1-24.
66. Pena A, Liu P, Derendorf H. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 189-216.
67. Langer O, Müller M. Methods to assess tissue-specific distribution and metabolism of drugs. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 463-481.
68. Brunner M, Derendorf H. Clinical Microdialysis: Current applications and potential use in drug development. *Trends Analyt Chem* 2006; 25 (7): 674-680.
69. Davies MI. A Review of microdialysis sampling for pharmacokinetic applications. *Anal Chim Acta* 1999; 379, 227-249.
70. Lange ECM, Boer AG, Breimer DD. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45:125-148.
71. Hansen DK, Davies MI, Lunte SM, Lunte CE. Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci* 1999; 88 (1): 14-27.
72. Hsiao JK , Ball BA, Morrison PF, Mefford IN, Bungay PM. Effects of different semipermeable membranes on in vitro and in vivo performance of microdialysis probes. *J Neurochem* 1990; 54:1449-1452.
73. Joukhadar C, Müller M. Microdialysis: Current applications in clinical pharmacokinetic studies and its potential role in the future. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44 (9): 895-913.

74. Anderson C, Andersson T, Wårdell K. Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 807–811.
75. Lange ECM, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res* 1994; 666 (1): 11-8.
76. Lange ECM, Danhof M, Zurcher C, Boer AG, Breimer DD. Repeated microdialysis perfusions: periprobe tissue reactions and BBB permeability. *Brain Res* 1995; 702 (1-2): 261-265.
77. Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM. Analytical considerations for microdialysis sampling. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 169-188.
78. Deterding LJ, Dix K, Burka LT, Tomer KB. On-line coupling of in vivo microdialysis with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 1992; 64 (21): 2636-2641.
79. Hogan BL, Lunte SM, Stobaugh JF, Lunte CE. On-line coupling of in vivo microdialysis sampling with capillary electrophoresis, *Anal Chem* 1994; 66 (5): 596-602.
80. Groth L, Jorgensen A. In vitro microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. *Anal Chim Acta* 1997; 355: 75-83.
81. Benfeldt E, Groth L. Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by in vivo microdialysis after topical or systemic drug administration. *Acta Derm Venereol* 1998; 78 (4): 274-278.
82. Clough GF, Boutsouki P, Church MK, Michel CC. Effects of blood flow on the in vivo recovery of a small diffusible molecule by microdialysis in human skin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302 (2): 681-686.
83. Stenken JA. Methods and issues in microdialysis calibration. *Anal Chim Acta* 1999; 379: 337-358.

84. Khramov AN, Stenken JA. Enhanced microdialysis extraction efficiency of ibuprofen in vitro by facilitated transport with β -cyclodextrin. *Anal Chem* 1999; 71: 1257-1264.
85. Plock N, Buerger C, Kloft C. Successful management of discovered pH dependence in vancomycin recovery studies: novel HPLC method for microdialysis and plasma samples. *Biomed Chromatogr* 2005; 19: 237-244.
86. Kjellström S, Emneus J, Laurell T, Heintz L, Marko-Varga G. On-line coupling of microdialysis sampling with liquid chromatography for the determination of peptide and non-peptide leukotrienes, *J Chromatogr A* 1998; 823: 489-496.
87. Jacobson I, Sandberg M., Hamberger A. Mass transfer in brain dialysis devices—a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. *J Neurosci Methods* 1985; 15: 263-268.
88. Stahle L, Arner P, Ungerstedt U. Drug distribution studies with microdialysis III: extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. *Life Sci* 1991; 49: 1853-1858.
89. Brunner M, Staß H, Möller J-G, Schrolnberger C, Erovic B, Hollenstein U et al. Target site concentrations of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob Agents and Chemother* 2002; 46 (12): 3724-3730.
90. Frossard M, Joukhadar C, Erovic BM, Dittrich P, Mrass PE, Houte M et al. Distribution and antimicrobial activity of fosfomycin in the interstitial fluid of human soft tissues. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (10): 2728-2732.
91. Frossard M, Joukhadar C, Steffen G, Schmid R, Eichler HG, Müller M. Paracrine effects of angiotensin-converting-enzyme- and angiotensin-II-receptor-inhibition on transcapillary glucose transport in humans. *Life Sci* 2000; 66 (10): PL147-154.

92. Mathy F-X, Preat V, Verbeeck RK. Validation of subcutaneous microdialysis sampling for pharmacokinetic studies of flurbiprofen in the rat. *J Pharm Sci* 2001; 90 (11): 1897-1905.
93. Joukhadar C, Derendorf H, Müller M. Microdialysis. A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 211-219.
94. Larsson CI, The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. *Life Sci* 1991; 49: PL73-78.
95. Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis –further development of the retrodialysis method. *Pharm Res* 1998; 15 (11): 1673-1679.
96. Deguchi Y, Terasaki T, Kawasaki S, Tsuji A. Muscle microdialysis as a model study to relate the drug concentration in tissue interstitial fluid and dialysate. *J Pharmacobiodyn* 1991; 14 (8): 483-492.
97. Brunner M, Joukhadar C, Schmid R, Erovic B, Eichler HG, Müller M. Validation of urea as an endogenous reference compound for the in vivo calibration of microdialysis probes. *Life Sci* 2000; 67: 977-984.
98. Strindberg L, Lönnroth P. Validation of an endogenous reference technique for the calibration of microdialysis catheters. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 205-212.
99. Degim IT, Ilbasimis S, Dundaroz R, Oguz Y. Reverse iontophoresis: a non-invasive technique for measuring blood urea level. *Pediatr Nephrol* 2003; 18 (10): 1032-1037.
100. Scheller D, Kolb J. The internal reference technique in microdialysis: a practical approach to monitoring dialysis efficiency and to calculating tissue concentration from dialysate samples. *J Neurosci Methods* 1991; 40 (1): 31-38.
101. Kreilgaard M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54 Suppl.1: S99-S121.
102. Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 1975; 64: 190-195.

103. Shah VP. Topical drug products-microdialysis: regulatory perspectives. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42 (7): 379-381.
104. McCleverty D, Lyons R, Henry B. Microdialysis sampling and the clinical determination of topical dermal bioequivalence. *Int J Pharm* 2006; 308: 1-7.
105. Midha KK, Shah VP, Singh GJP, Patnaik R. Conference Report: Bio-International 2005. *J Pharm Sci* 2007; 96 (4): 747-753.
106. Anderson C, Andersson T, Boman A, Molander M. Cutaneous microdialysis for the measurement in vivo of the percutaneous absorption of organic solvents. *Curr Probl Dermatol* 1996; 25: 37-46.
107. Benfeldt E, Serup J, Menne T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *Br J Dermatol* 1999; 140: 739-748.
108. Stagni G, O'Donnell D, Liu YJ, Kellogg DL, Morgan T, Shepherd AMM. Intradermal microdialysis: Kinetics of iontophoretically delivered propranolol in forearm dermis. *J Control Release* 2000; 63: 331-339.
109. Hegemann L, Forstinger C, Partsch B, Lagler I, Krotz S, Wolff K. Microdialysis in cutaneous pharmacology: kinetic analysis of transdermally delivered nicotine. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 839-843.
110. Müller M, Schmid R, Wagner O, Osten B, Shayganfar H, Eichler HG. In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis. *J Control Release* 1995; 37: 49-57.
111. Boelsma E, Anderson C, Karlsson AMJ, Ponc M. Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin in vivo. *Pharm Res* 2000; 17 (2): 141-147.
112. Müller M, Mascher H, Kikuta C, Schafer S, Brunner M, Dorner G et al. Diclofenac concentrations in defined tissue layers after topical administration. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 293-299.

113. Brunner M, Dehghanyar P, Seigfried B, Martin W, Menke G, Müller M. Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60 (5): 573-577.
114. Cross SE, Anderson C, Roberts MS. Topical penetration of commercial salicylate esters and salts using human isolated skin and clinical microdialysis studies. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46: 29-35.
115. Kreilgaard M, Kemme MJB, Burggraaf J, Schoemaker RC, Cohen AF. Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics. *Pharm Res* 2001; 18 (5): 593-599.
116. Tegeder I, Brautigam L, Podda M, Meier S, Kaufmann R, Geisslinger G, Grundmann-Kollmann M. Time course of 8-methoxypsoralen concentrations in skin and plasma after topical (bath and cream) and oral administration of 8-methoxypsoralen. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71: 153-161.
117. Benfeldt E, Hansen SH, Volund A, Menne T, Shah VP. Bioequivalence of topical formulations in humans: Evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 170-178.
118. Tettey-Amlalo RNO, Kanfer I, Skinner MF, Benfeldt E, Verbeeck RK. Application of dermal microdialysis for the evaluation of bioequivalence of a ketoprofen topical gel. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 219-225.
119. McGraft JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*, 7th ed. Volume 1, Malden, USA: Blackwell Publishing Co.; 2004. p 3.1-3.84.
120. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji*. Aytekin Y(Çev), 7. basım, İstanbul, Barış Kitapevi, 1998.

121. Ağabeyoğlu İ. Transdermal sistemler. İçinde: Gürsoy AZ, editör. Kontrollü Salım Sistemleri, 1. Baskı. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını; 2002; p.239-260.
122. Robinson P. Skin. Encyclopedia of Toxicology 2005; Elsevier: 25-54.
123. Fox SI. Human Physiology. 11th ed. New York: McGraw-Hill International Edition; 2009.
124. Banga AK. Electrically assisted transdermal and topical drug delivery. Padstow, UK: TJ International Ltd; 1998.
125. [http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermis_\(skin\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermis_(skin)), Wikipedia, the Free Encyclopedia, Epidermis(skin), 2010.
126. Klein-Szanto AJP, Conti CJ. Skin and oral mucosa. Handbook of Toxicologic Pathology 2002; Elsevier: 85-119.
127. Haschek WM, Rousseaux CG, Walling MA. Skin and oral mucosa. Fundamentals of Toxicologic Pathology 2010; Elsevier: 135-161.
128. Murthy SN, Shivakumar HN. Topical and transdermal drug delivery. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems 2010; Chapter 1, Elsevier: 1-36
129. Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: Influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. Eur J Pharm Biopharm 2009; 71: 362-366.
130. Curdy C, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion, J Control Release 2001; 76: 73-79.
131. Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny J-D, Guy RH. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. J Control Release 2001; 71: 319-327.
132. Hadgraft J. Skin, the final frontier. Int J Pharm 2001; 224: 1-18.
133. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. Int J Pharm 2005; 305: 2-12.

134. Schnetz E, Fartasch M. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier__a promising tool for future research? *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 165-174.
135. Patzelt A, Antoniou C, Sterry W, Lademann J. Skin penetration from the inside to the outside: A review. *Drug Discov Today Dis Mech* 2008; 5 (2): e229-e235.
136. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route-Research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 173-180.
137. Hadgraft J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 291-299.
138. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann H-J, Fluhr JW. The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 72: 317-323.
139. Pershing LK, Reilly CA, Corlett JL, Crouch DJ. Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 200: 73-81.
140. Teichmann A, Jacobi U, Waibler E, Sterry W, Lademann J. An in vivo model to evaluate the efficacy of barrier creams on the level of skin penetration of chemicals. *Contact Derm* 2006; 54: 5-13.
141. Montenegro L, Ademola JI, Bonina FP, Maibach HI. Effect of application time of betamethasone-17-valerate 0.1% cream on skin blanching and stratum corneum drug concentration. *Int J Pharm* 1996; 140: 51-60.
142. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U, Presse G, Neubert RHH, Sterry W, Lademann J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 699-706.
143. Coderch L, Oliva M, Pons M, Maza A, Manich AM, Parra JL. Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. *Int J Pharm* 1996; 139: 197-203.

144. Wagner H, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer UF. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm Res* 2000; 17 (12): 1475-1481.
145. Odabaşioğlu E. Flurbiprofen ile Dermatofarmakokinetik Çalışma. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2006.
146. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res* 2004; 21 (10): 1818-1825.
147. Contreras MJF, Soriano MMJ, Diéguez AR. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *Int J Pharm* 2005; 297: 134-145.
148. Puglia C, Blasi P, Rizza L, Schoubben A, Bonina F, Rossi C, Ricci M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. *Int J Pharm* 2008; 357: 295-304.
149. Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny J-D, Guy RH. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, in vivo. *Int J Pharm* 2001; 219: 11-19.
150. Moser K, Kriwet K, Froehlich C, Kalia YN, Guy RH. Supersaturation: enhancement of skin penetration and permeation of a lipophilic drug. *Pharm Res* 2001; 18 (7): 1006-1011.
151. Wang Y-Y, Hong C-T, Chiu W-T, Fang J-Y. In vitro and in vivo evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. *Int J Pharm* 2001; 224: 89-104.
152. Kondo H, Ichikawa Y, Imokawa G. Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur J Immunol* 1998; 28: 769-779.
153. Bommannan D, Potts RO, Guy RH. Examination of Stratum Corneum Barrier Function In Vivo by Infrared Spectroscopy. *J Invest Dermatol* 1990; 95 (4): 403-408.
154. Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, Weyher I, Diepgen TL, Berardesca E. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and

stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol* 2002; 146: 770-776.

155. Stoscheck CM, Nanney LB, King LE. Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing. *J Invest Dermatol* 1992; 99(5): 645-649.
156. Breternitz M, Flach M, Präßler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping; a randomized, controlled study. *Br J Dermatol* 2007; 156: 231-240.
157. Löffler H, Dreher F, Maibach HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol* 2004; 151: 746-752.
158. Dreher F, Arens A, Hostynek JJ, Mudumba S, Ademola J, Maibach HI. Colorimetric method for quantifying human stratum corneum removed by adhesive-tape-stripping. *Acta Derma Venereol* 1998; 78: 186-189.
159. Lindemann U, Wilken K, Weigmann H-J, Schaefer H, Sterry W, Lademann J. Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques. *J Biomed Opt* 2003; 8(4): 601-607.
160. Tsai J-C, Lin C-Y, Sheu H-M, Lo Y-L, Huang Y-H. Noninvasive characterization of regional variation in drug transport into human stratum corneum in vivo. *Pharm Res* 2003; 20 (4): 632-638.
161. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: in vitro-in vivo comparison. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 135-142.
162. Bashir SJ, Dreher F, Chew AL, Zhai H, Levin C, Stern R, Maibach HI. Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. *Int J Pharm* 2005; 292: 187-194.
163. Lademann J, Ilgevicus A, Zurbau O, Liess HD, Schanzer S, Weigmann HJ, Antoniou C, Pelchrzim RV, Sterry W. Penetration

studies of topically applied substances: optical determination of the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *J Biomed Opt* 2006; 11(5): 054026-1-6.

164. Schwindt DA, Wilhelm KP, Maibach HI. Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *J Invest Dermatol* 1998; 111(3): 385-389.
165. Kalia YN, Pirot F, Guy RH. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J* 1996; 71: 2692-2700.
166. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability in vivo. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 887-894.
167. Tsai J-C, Chuang S-A, Hsu M-Y, Sheu H-M. Distribution of salicylic acid in human stratum corneum following topical application in vivo: a comparison of six different formulations. *Int J Pharm* 1999; 188: 145-153.
168. Shah VP, Flynn GL, Yacobi A, Maibach HI, Bon C et al. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms-methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm Res* 1998; 15 (2): 167-171.
169. Ikeda Y, Hirata K, Kano S, Yanagihara H, Takahara J, Kondo K, Umemura K. In vivo assessment of the cutaneous bioavailability of topically applied maxacalcitol. *Methods Find Exp.Clin Pharmacol* 2005; 27 (5): 305-310.
170. Pershing LK, Bakhtian S, Poncelet CE, Corlett JL, Shah VP. Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources. *J Pharm Sci* 2002; 91 (5): 1312-1324.
171. Pershing LK, Nelson JL, Corlett JL, Shrivastava SP, Hare DB, Shah VP. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the

bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 740-751.

172. Lodén M, Akerström U, Lindahl K, Berne B. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int J Pharm* 2004; 284: 23-30.
173. Yuwono M, Indrayanto G. Oxytetracycline: Analytical profile. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* 2005; 32: 97-117.
174. Vardanyon RS, Hruby VJ. Tetracyclines. *Synthesis of Essential Drugs* 2006; 32: 425-298.
175. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 31th ed. London Royal Pharmacoutical Society 1996; 31: 259-260.
176. European Pharmacopoeia 6 th ed. Nördlingen, Germany 2008; 2: 2591-2593.
177. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material. 2nd ed. England 1985; 846-847.
178. Tjornelund J, Hansen SH. Validation of a simple method for the determination of oxytetracycline in ointment by non-aqueous capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15: 1077-1082.
179. Maia PP, Amaya-Farfan J, Rath S, Reyes FG. Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 450-456.
180. Kurzawa M, Kowalczyk-Marzec A. Electrochemical determination of oxytetracycline in veterinary drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 95-102.
181. Saha U. Colorimetric Determination of tetracycline derivatives in pharmaceutical preparations. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 72 (2): 242-244.

182. El Sadek M, Ayad M, Mostaffa S. New colorimetric method for determination of tetracycline and oxytetracycline via charge transfer complex formation. *Anal Lett* 1987; 20 (11): 1885-1893.
183. Ayad M, El-Sadek M, Mostaffa S. 4-Aminoantipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of tetracycline and oxytetracycline *Anal Lett* 1986; 19 (21&22): 2169-2181.
184. Lykkeberg AK, Halling-Sorensen B, Cornett C, Tjornelund J, Hansen SH. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 325-332.
185. Sczesny S, Nau H, Hamscher G. Residue analysis of tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 697-703.
186. Pena A, Carmona A, Barbosa A, Lino C, Silveiro I, Castillo B. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 18: 839-845.
187. Smyrniotakis CG, Archontaki HA. C18 columns for the simultaneous determination of oxytetracycline and its related substances by reversed-phase high performance liquid chromatography and UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 506-514.
188. Coyne R, Bergh Q, Samuelsen OB. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *J Chromatogr B* 2004; 810: 325-328.
189. Jawetz E. (Çev: Güngör M.) Kloramfenikol ve tetrasiklinler. İçinde: Katzung BG, editor (Çev: Özüner Z.) *Temel ve Klinik Farmakoloji*, 6. Baskı. İstanbul; 1995; p. 922-931.
190. Tsankov N, Broshtilova V, Kazandjieva J. Tetracyclines in dermatology. *Clin Dermatol* 2003; 21: 33-39.
191. Smilack JD. The tetracyclines. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 727-729.

192. Aronson JK. Tetracyclines. Meyler's Side Effects of Drugs: International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions And Interactions, 2006: 3330-3342.
193. Epstein ME, Amodio-Groton M, Pharm D, Sadick NS. Antimicrobial agents for the dermatologists. II. macrolides, fluoroquinolones, rifamycins, tetracyclines, trimethoprim-sulfamethoxazole and clindamycin. J Am Acad Dermatol 1997; 37 (3): 365-384.
194. Aksoy L, Şentürk N, Cantürk T, Turanlı AY. Enfeksiyöz Olmayan Deri Hastalıklarında Tetrasiklinlerin Kullanımı. T Klin J Dermatol 2002; 12: 223-228.
195. Kunin CM, Dornbush AC, Finland M. Distribution and excretion of four tetracycline analogues in normal young men. J Clin Invest 1959; 38: 1950-1965.
196. Usluer G. Tetrasiklinler ve kloramfenikol. ANKEM Derg 2007; 21: 45-51.
197. Robertson DB, Milbach HI. (Çev:Süzer Ö.) Dermatolojik Farmakoloji. İçinde: Katzung BG, editor (Çev: Özüner Z.) Temel ve Klinik Farmakoloji, 6. Baskı. İstanbul; 1995; p. 1246-1247.
198. USP 26 / NF21, The United States Pharmacopeia / The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, Inc.12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, 2003; p.1383.
199. Ağabeyoğlu İ. Biyofarmasötik. İçinde: Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Tırnaksız F. Modern Farmasötik Teknoloji, 2.Baskı. Ankara; 2009; 407-457.
200. Papadoyannis IN, Samanidou VF, Kovatsi LA. A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal 2000; 23: 275-280.
201. Sanderson H, Ingerslev F, Brain RA, Halling-Sorensen B, Bestari JK, Wilson CJ et al. Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and oxycycline using HPLC-UV and LC-MS-MS under

aquatic semi-field microcosm conditions. Chemosphere 2005; 60: 619-629.

202. Geçgil Ş. Farmasötik Teknolojiye Başlangıç. İstanbul, Cihan Matbaacılık; 1991. s.291.
203. Sasongko L, Williams KM, Ramzan I, McLachlan AJ. Assessment of in vitro and in vivo recovery of gallamine using microdialysis. J Pharmacol Toxicol Methods 2000; 44: 519-525.
204. Coşkun Ö, Ağabeyoğlu İ, Aksoy G. Release rate versus time plotting for the release / dissolution assessment. FABAD J Pharm Sci 1999; 24: 83-88.
205. Tetley-Amlalo RNO, Kanfer I. Rapid UPLC-MS/MS method for the determination of ketoprofen in human dermal microdialysis samples. J Pharm Biomed Anal 2009; 50: 580-586.
206. Boyle WE, DiPrima RC, Elementary. Differential equation and boundary value problems, 8. Baskı, Wiley, USA, 2005.
207. Krogstad AL, Jansson P-A, Gisslen P, Lönnroth P. Microdialysis methodology for the measurement of dermal interstitial fluid in humans. Br J Dermatol 1996; 134: 1005-1012.

10. EKLER

EK-1



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ, YEREL ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNİVERSTY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
TEK MERKEZ

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU					
	PROTOKOL ADI		Oksitetrasiklin Hidroklorür ve Polimiksin B Sülfatının Topikal Farmokinetiği ve Topikal Biyoeşdeğerliliğin Değerlendirilmesinde Bantla Soyma(Tape Stripping ve Mikrodiyaliz Yöntemlerinin Karşılaştırılması)			
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI		Prof.Dr.İlbeyi Ağabeyoğlu			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		G.Ü.T.F			
	DESTEKLEYİCİ FİRMA					
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	FAZİ: Biyoeşdeğerlilik çalışması					
	Belge Adı		Tarihi / değişiklik No.su	Dili: Türkçe		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU					
	OLGU RAPOR FORMU					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 266		Tarih : 24 Eylül 2007			
	G.Ü Eczacılık Fakültesi'nde sağlam gönüllülerde yapılacak, künyesi yukarıda kayıtlı olan farmakokinetik ve biyoeşdeğerlilik çalışması, proje sorumlusu Prof.Dr.İlbeyi Ağabeyoğlu, klinik sorumlu Prof.Dr.Şükrü Sindel olmak üzere kabul edilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI		İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, İA YÖNETMELİĞİ, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOTİK SÖZLEŞMESİ				
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Türkiz GÜRSEL BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	x	E	[Signature]
Prof.Dr.Leyla MEMİŞ ÜYE	Patoloji	G.Ü.T.F Patoloji A.D.	K	x	E	
Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Onkoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K	x	E	[Signature]
Prof. Dr. Ayse ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x	E	
Prof.Dr.Ayila GÜLEKON ÜYE	Dermatoloji	G.Ü.T.F Dermatoloji A.D.	K	x	E	[Signature]
Prof.Dr.Fatma AKAR ÜYE	Ecz.Fak. Farmakoloji	G.Ü.E.F Ecz.Fak. Farmakoloji	K	x	E	
Prof.Dr.Candan TUNCER ÜYE	Gastroenteroloji	G.Ü.T.F İç Hast. A.D.	K	x	E	[Signature]
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E	x	E	
Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	K	x	E	[Signature]
Doç.Dr.Canan ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x	E	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K	x	E	Katılmadı
Doç.Dr.Kenan HİZEL ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	E	x	E	
Yrd.Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x	E	[Signature]
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşaviri	G.Ü.Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x	E	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

EK-2

DENEKLERE AİT BİLGİ FORMU

DENEK NO:

ADI-SOYADI:

MESLEĞİ:

İŞ ADRESİ:

EV ADRESİ:

EVÇEP TELEFONU:

YAŞI:

CİNSİYETİ:

KİLOSU:

BOYU:

BÖBREK FONKSİYONLARI:
DÜZENSİZ

DÜZENLİ

KARACİĞER FONKSİYONLARI:
DÜZENSİZ

DÜZENLİ

SİGARA ALIŞKANLIĞI: **KULLANMIYORUM**
KULLANIYORUM

ALKOL ALIŞKANLIĞI:

KULLANIYORUM

KULLANMIYORUM

GEÇİRDİĞİ ÖNEMLİ HASTALIKLAR:

GEÇİRDİĞİ DERMATOLOJİK HASTALIKLAR:

DEVAMLİ KULLANMAKTA OLDUĞU İLAÇLAR:

EK-3

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**GÖNÜLLÜLER ÜZERİNDE İLAÇ İLE YAPILACAK KLİNİK ARAŞTIRMALAR
İÇİN**

"BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU"

“Oksitetrasiklin Hidroklorürün Topikal Farmakokinetiği ve Topikal Biyoeşdeğerliğin Değerlendirilmesinde Bantla Soyma (Tape Stripping) ve Mikrodiyaliz Yöntemlerinin Karşılaştırılması” isimli çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra, eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

- **Araştırmanın Amacı:**
Dermatolojide kullanılan topik preparatların biyoeşdeğerliklerinin saptanmasında “Mikrodiyaliz” ve “Bantla Soyma” yöntemlerini uygulamak ve dermatofarmakokinetik çalışma gerçekleştirmektir. Bu amaçla etkin madde olarak tetrasiklin grubu antibiyotiklerden olan oksitetrasiklin hidroklorür ve polipeptit bir antibiyotik olan polimiksin B sülfat içeren iki piyasa preparatı, Terramycin Deri Merhemi ve Polimisin Deri Merhemi kullanılacaktır. “Mikrodiyaliz” (MD) ve “Bantla Soyma” (BS) yöntemleri ile insanda önkol üzerinde derinin dermis tabakasındaki (1 mm derinlikte) ve derinin en dış tabakası olan Stratum Corneumdaki ilaç miktarları bulunacaktır. Zamana karşı miktarlar saptanarak profilleri elde edilecektir. Veriler farmakokinetik değerlendirmeye alınarak test ve referans piyasa preparatlarının (Terramycin Deri Merhemi ve Polimisin Deri Merhemi) biyoeşdeğerliği değerlendirilecektir.

- **Araştırma Konusu İle İlgili Başka Çalışmalar Olup Olmadığı:**
Son yıllarda in vivo olarak insanda ilaçların deriden geçişini ölçmek için Mikrodiyaliz (MD) tekniği kullanılmaktadır. İnsan derisinde uygulama alanı bulan bu teknik ile, derideki ilaç derişimi zamana karşı izlenebilir. Bu amaçla, nikotin, diklofenak, lidokain, propranolol, salisilat esterleri, salisilik asit, 8-metoksi psoralen gibi çeşitli ilaçların insan derisindeki miktarları ölçülmüştür. Yine yapılan çalışmalar Bantla Soyma Yönteminin insanda kullanılabileceğini göstermiştir. Bu yöntemin, topik uygulanan ilaçların topikal biyoeşdeğerliğini değerlendirmede insanda kullanılabileceği belirtilmiştir.
- **Çalışmaya Kaç Kişinin Alınmasının Planlandığı (Tek Ya Da Çok Merkezli İse Belirtilmesi):**
Tek merkezli çalışmadır. Araştırmaya 12 sağlıklı gönüllü alınması planlanmıştır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile, istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Çalışmayı yürüten doktor da çalışmaya devam etmenizin sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir.

Bana önerilen araştırma yöntemi dışında başka alternatif yöntemler de var mı?

Bantla Soyma Yöntemi topik olarak uygulanan ilacın derinin en dış tabakası olan Stratum Corneum tabakasındaki derişimlerini bularak, profilin çıkarılmasını sağlayan tek standart ölçme metodudur. Saldırgan bir yöntem değildir. Mikrodiyaliz Yöntemi ise, topik uygulanan ilaçların deriden geçişini, derinin yaklaşık 1 mm altındaki dermis tabakasına penetrasyonunu aynı bireyde, aynı uygulama alanında ve devamlı bir şekilde zamana karşı izleyebilecek tek yöntemdir.

Bu çalışmaya katılırsam beni neler bekliyor?

- **Yöntem:**
Çalışma Mikrodiyaliz ve Bantla Soyma Yöntemi ile gerçekleştirilecektir.
- **Deneysel uygulama:**
Çalışmanın birinci aşaması olan Mikrodiyaliz çalışmasında, sağlıklı gönüllülerin el bileği ve dirseği arasında yer alan önkolu üzerine 5 cm²'lik dairesel bir alana Test preparatı(merhem) uygulanacaktır. Bu uygulama bölgesinde, derinin yaklaşık 1 mm altına, deri yüzeyine paralel olacak şekilde klavuz kanül ile moleküler geçirgenliği 20 kDa olan membran, 0.2

mm dış çapa sahip olan çok ince MD probu yerleştirilecektir. Prob, MD pompası yardımıyla 1 µL/dak gibi çok düşük sabit bir hızda serum fizyolojik ile perfüze edilecektir. Deride perfüze olan fizyolojik sıvı örnekleri(20 µL) 0-20, 21-40, 41-60, 61-70, 81-90, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240 dak zaman aralıklarında mikrotüplere alınacaktır. Uygun koşullar altında(-70°C) analiz yapılınca kadar saklanacaktır. Aynı işlem bir hafta sonra Referans preparatı için de tekrarlanacaktır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sağlıklı gönüllülerde cansız deri örnekleri uygun koşullar ile Bantla Soyma Yöntemi ile toplanacaktır. Bunun için, önkola test preparatı(merhem) uygulanacak, yarım saat sonra ilaç pamukla yavaşça silinecektir. Daha sonra 10 defa yapışkan bant yapıştırılıp çekilerek örnekler toplanacaktır. Örnekler merhem uygulandıktan yarım saat sonra 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6. saatlerde alınacaktır. Örnekler özel tüplerde analize kadar uygun koşullar altında (-70°C) saklanacaktır. Aynı işlem bir hafta sonra referans preparatı için de tekrarlanacaktır.

- Alacağı ilaç(lar), dozları, zamanları
- Terramycin Deri Merhemi(Pfizer)

(Oksitetrasiklin HCl+Polimiksin B sülfat)

- Polimisin Deri Merhemi(Koçak Farma)

(Oksitetrasiklin HCl+Polimiksin B sülfat)

2 g. merhem

- Plasebo grubu olacaksa belirtilmesi
Yok

- Randomizasyonun açıklanması
Rastgele(2 preparat)

- Araştırmanın süresi
MD çalışması Test ve Referans preparatı için 4 saat; Bantla Soyma çalışması ise 6 saat sürecektir. Her bir çalışma birer hafta ara verilerek gerçekleştirilecektir. Toplam çalışma süresi 4 haftadır.

Ne yapmam gerekiyor?

1. Çalışma doktorunuzun size söylemiş olduğu kurallara uymaya istekli olmalısınız.
2. Doktorunuza çalışma dışında kullandığınız dermatolojik ürünleri bildirmeniz gerekmektedir.
3. Eğer bayansanız, çalışmanın başlangıcında size gebelik testi uygulanacaktır ve çalışma boyunca gebe kalmamanız gerekmektedir. Gebelik durumunda çalışma doktorunuzu derhal bilgilendiriniz.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları nelerdir, göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ?

- Görülebilecek yan etkiler:
Kişisel aşırı duyarlılığa bağlı kontakt dermatit dahil allerjik reaksiyonlar nadir olarak bildirilmiştir. Bu tür reaksiyonlar görülecek olursa oksitetrasiklin tedavisi kesilmelidir.
- Ortaya çıkan yan etki ve risklerin tedavi edilebilirliği:
Bu tür reaksiyonlar görülecek olursa oksitetrasiklin tedavisi kesilmelidir.
- Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğu üstlenecektir ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahale yapılacak ve bu konudaki tüm harcamalar üstlenilecektir.
- Katılımcıyı koruyucu nitelikte hangi önlemlerin alındığını açıklayınız:
Çalışma doktor kontrolünde ve hastane ortamında yapılacaktır.
- Muhtemel zarar durumunda gönüllünün veya yakınının bilgi için ilişki kuracağı kişinin ismini veriniz:
.....

Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir ?

Topik uygulanan ve de aynı etkin maddeyi içeren iki merhem formülasyonunun topikal biyoeşdeğerliğinin değerlendirilmesi hem Bantla Soyma, hem de Mikrodializ yöntemleri kullanılarak yapılacaktır. Böylece çalışma iki yöntemin karşılaştırılmasını mümkün kılacaktır. Bu açıdan bakıldığında, böyle bir çalışma topikal formülasyonların Biyoeşdeğerliğinin(BE) değerlendirilmesinde akademiye ve endüstriye yönelik olarak literatürde önemli bir yere sahip olacaktır.

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir ?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır, ancak kimlik bilgileriniz çalışma boyunca hekiminiz tarafından gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda, bu bilgiler hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Çalışma ilacı ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz:

ADI : Prof. Dr. Şükrü Sindel

GÖREVİ : G.Ü.T.F İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi

TELEFON : 202 52 05

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalında, Prof. Dr. Şükrü Sindel tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun, araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Şükrü Sindel'i , 202 52 05 numaralı telefonda ve G.Ü.T.F İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı'ndan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı: Prof. Dr. Şükrü Sindel

Adres: G.Ü.T.F İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı

Tel: 202 52 05

İmza:

Tarih:

EK-4

WinNonlin Compartmental Modeling Analysis

Version 5.2.1 with IVIVC Toolkit Build 2008033011

WinNonlin compiled model:

1 compartment 1st Order, lag time, 1st order elimination



$$C(T) = D * K_{01} / V * (K_{01} - K_{10}) * (EXP(-K_{10} * T) - EXP(-K_{01} * T))$$

Settings for analysis:

Input Workbook: [Untitled4]

Input Worksheet: Sheet1

Input Sort Keys: [none]

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of 0.0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

Input data:

t (hr)	C (ug/mL)
0	0
0.75	26.8
1	34.8
1.5	66.2
2	53.1
2.5	45.6
3.5	51.2
4.5	35.2

Output data:

Initial Parameters

Parameter	Value	Lower	Upper
V_F	340.1	0	3401
K01	1.137	0	11.37
K10	0.2572	0	2.572
Tlag	0.3323	0	3.323

Minimization Process

Iteration	Weighted_SS	V_F	K01	K10	Tlag
0	400.37	340.1	1.137	0.2572	0.3323
1	308.946	392.9	1.526	0.2146	0.4667
2	293.454	432.2	1.995	0.1818	0.5365
3	288.379	436.5	2.251	0.1818	0.5613
4	288.033	430	2.17	0.1887	0.5545
5	288.015	430.7	2.19	0.188	0.5558

Final Parameters

V_F (mL)	V_F_StdError	V_F_ CV%	V_F_Univar CI_Lower
430.72686	128.678393	29.87	73.463200
V_F_UnivarCI_ Upper	V_F_PlanarCI_ _Lower	V_F_PlanarCI_ _Upper	
787.990521	-229.332911	1090.786632	
K01 (1/hr)	K01_StdError	K01_ CV%	K01_Univar CI_Lower
2.190000	2.024644	92.45	-3.431237

K01_UnivarCI_Upper	K01_PlanarCI_Lower	K01_PlanarCI_Upper	
7.811237	-8.195473	12.575474	
K10 (1/hr)	K10_StdError	K10_CV%	K10_UnivarCI_Lower
0.188001	0.144554	76.89	-0.213340
K10_UnivarCI_Upper	K10_PlanarCI_Lower	K10_PlanarCI_Upper	
0.589343	-0.553494	0.929496	
Tlag (hr)	Tlag_StdError	Tlag_CV%	Tlag_UnivarCI_Lower
0.555810	0.180080	32.40	0.055834
Tlag_UnivarCI_Upper	Tlag_PlanarCI_Lower	Tlag_PlanarCI_Upper	
1.055787	-0.367917	1.479538	

Non-Transposed Final Parameters

Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
V_F	mL	430.726860	128.678393	29.87
K01	1/hr	2.190000	2.024644	92.45
K10	1/hr	0.188001	0.144554	76.89
Tlag	hr	0.555810	0.180080	32.40
UnivarCI_Lower	UnivarCI_Upper	PlanarCI_Lower	PlanarCI_Upper	
73.463200	787.990521	-229.332911	1090.786632	
-3.431237	7.811237	-8.195473	12.575474	
-0.213340	0.589343	-0.553494	0.929496	
0.055834	1.055787	-0.367917	1.479538	

Dosing

Constant	Value
Number of Doses	1
Dose #1	30700
Time of Dose #1	0

Correlation Matrix

Parameter	V_F	K01	K10	Tlag
V_F	1			
K01	0.875025	1		
K10	-0.953152	-0.806866	1	
Tlag	0.606699	0.856343	-0.531907	1

Eigenvalues

Number	Value
1	3.93E+04
2	1.25E+04
3	73.83
4	4.35E-03

Condition Numbers

Iteration	Rank	Condition
0	4	43.389654
1	4	26.521405
2	4	20.623584
3	4	19.086643
4	4	19.407112

Variance-Covariance Matrix

Parameter	V_F	K01	K10	Tlag
V_F	16558.1			
K01	227.968	4.09918		
K10	-17.7296	-0.236146	2.09E-02	
Tlag	14.0587	0.312222	-1.38E-02	3.24E-02

Summary Table

t_obs (hr)	C_obs (ug/mL)	t (hr)	C (ug/mL)	Predicted (ug/mL)	Residual (ug/mL)	Weight
0	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
0.75	26.8	0.7500	26.8000	24.2138	2.5862	1.0000
1	34.8	1.0000	34.8000	42.2471	-7.4471	1.0000
1.5	66.2	1.5000	66.2000	55.4265	10.7735	1.0000
2	53.1	2.0000	53.1000	56.1308	-3.0308	1.0000
2.5	45.6	2.5000	45.6000	52.9940	-7.3940	1.0000
3.5	51.2	3.5000	51.2000	44.7025	6.4975	1.0000
4.5	35.2	4.5000	35.2000	37.1296	-1.9296	1.0000

SE_Yhat Standard_
 Res

Missing	Missing
8.3039	1.4813
7.0117	-1.5583
5.6678	1.7060
5.3935	-0.4626
5.5234	-1.1478
4.9199	0.9398
7.3463	-0.4544

Diagnostics

Function	Item	Value
1	CSS	2832.87
1	WCSS	2832.87
1	SSR	288.015
1	WSSR	288.015
1	S	8.4855
1	DF	4
1	CORR_(OBS,PRED)	0.9478
1	WT_CORR_(OBS,PRED)	0.9478
1	AIC	53.30409
	SBC	53.62186

Partial Derivatives

Function	Time (hr)	V_F	K01	K10	Tlag
1	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
1	0.75	-0.05615998	8.85555050	-2.50295373	-97.53513494
1	1	-0.09798523	11.27508519	-10.75518771	-51.10392723
1	1.5	-0.12855268	6.92548947	-33.95530285	-9.33271253
1	2	-0.13018617	2.35170733	-57.78379502	3.94487992
1	2.5	-0.12291102	-0.12916086	-78.69352390	7.75271998
1	3.5	-0.10368011	-1.55232190	-109.62101490	8.15714375
1	4.5	-0.08611605	-1.53609263	-127.91209670	6.95308687

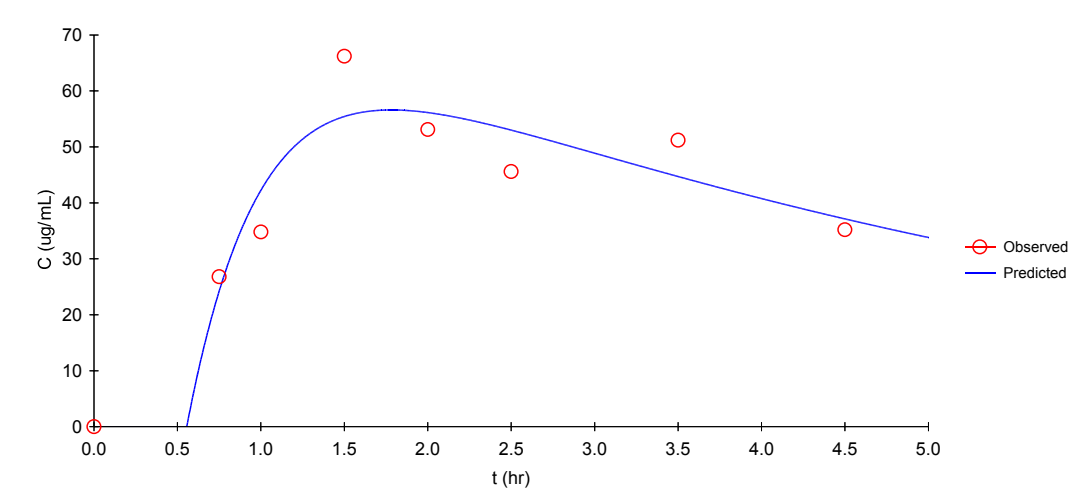
Secondary Parameters

AUC (hr*ug/mL)	AUC_StdError	AUC_CV%	K01_HL (hr)	K01_HL_Std Error	K01_HL _CV%
379.118908	186.533316	49.20	0.316506	0.292315	92.36
K10_HL (hr)	K10_HL_Std Error	K10_HL_CV%	CL_F (mL/hr)	CL_F_Std Error	CL_F _CV%
3.686926552	2.83204413	76.81	80.97723259	39.8820959	49.25
Tmax (hr)	Tmax_Std Error	Tmax_CV%	Cmax (ug/mL)	Cmax_Std Error	Cmax _CV%
1.782188642	0.4130926031	23.18	56.59853069	5.177915431	9.15

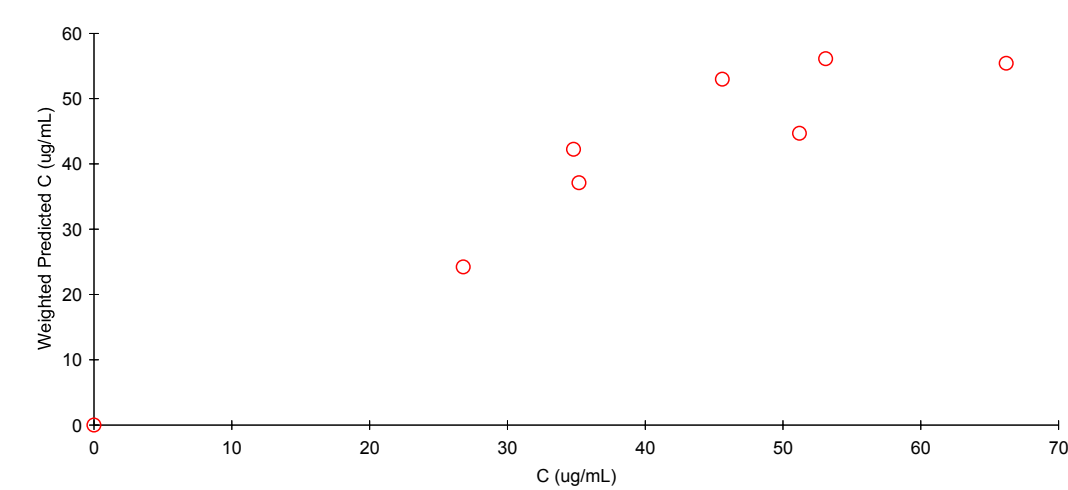
Non-Transposed Secondary Parameters

Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
AUC	hr*ug/mL	379.118908	186.533316	49.20
K01_HL	hr	0.316506	0.292315	92.36
K10_HL	hr	3.686927	2.832044	76.81
CL_F	mL/hr	80.977233	39.882096	49.25
Tmax	hr	1.782189	0.413093	23.18
Cmax	ug/mL	56.598531	5.177915	9.15

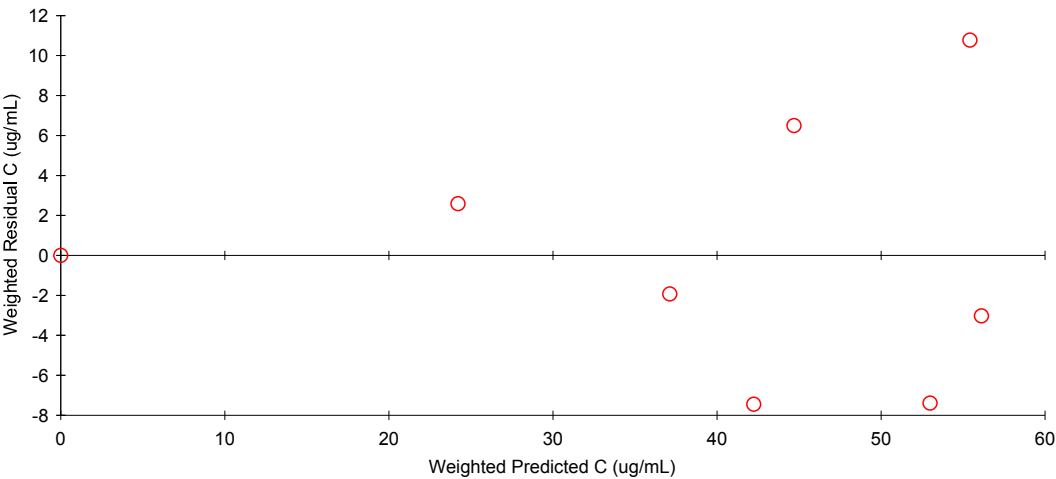
X vs. Observed Y and Predicted Y



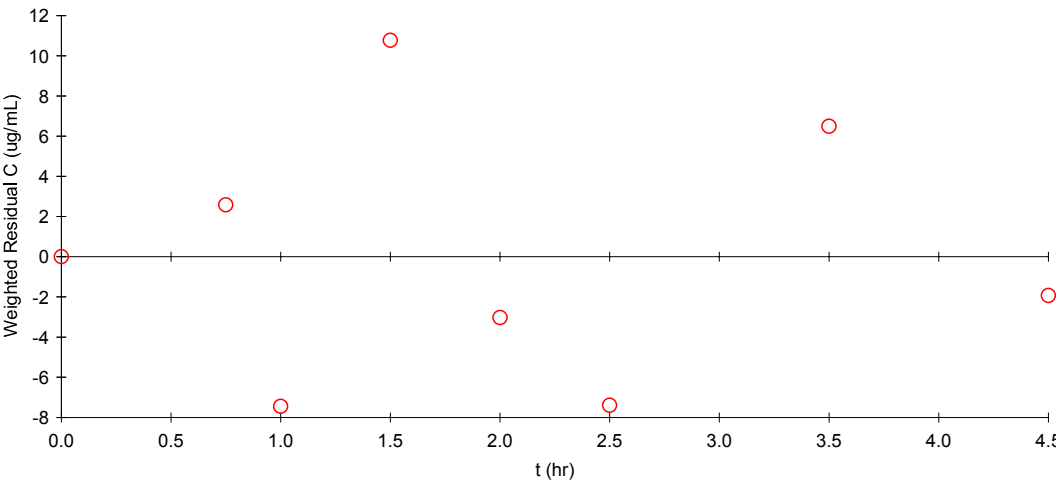
Observed Y vs. Weighted Predicted Y



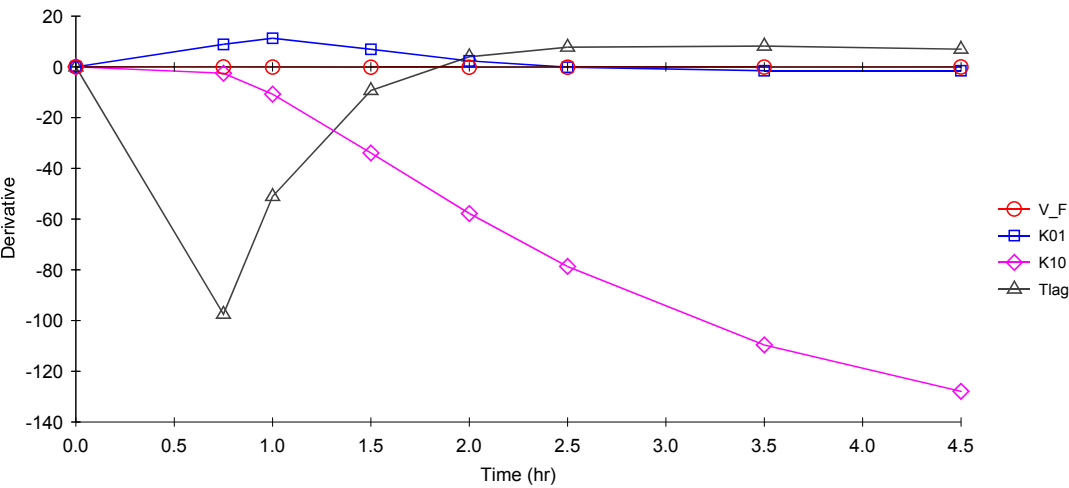
Weighted Predicted Y vs. Weighted Residual Y



X vs. Weighted Residual Y



Partial Derivatives



11. TEŞEKKÜR

Doktora tezimi yöneten ve çalışmalarım boyunca karşılaştığım sorunlarda bilgi ve deneyimine başvurduğum, rehberliğinden yararlandığım saygıdeğer hocam **Sayın Prof.Dr. İlbeyi AĞABEYOĞLU**'na,

İn vivo çalışmalarımızda ilgi ve yardımlarını gördüğüm G.Ü.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D, Nefroloji Bilim Dalı'ndan **Sayın Prof.Dr. Şükrü SİNDEL** ve **Sayın Prof.Dr. Ülver BOZTEPE DERİCİ**'ye,

Gösterdikleri yakın ilgi, destek ve yardımlarından dolayı hocalarım **Sayın Prof.Dr. Nevin ÇELEBİ**'ye, **Sayın Prof.Dr. Füsun ACARTÜRK**'e,

Sayın Prof.Dr. Tanver DOĞANAY ve **Sayın Prof.Dr. Tuncer DEĞİM**'e,

Yardımlarından dolayı **Sayın Doç.Dr. Zelihagül DEĞİM**, **Sayın Doç.Dr. Sevgi TAKKA**, **Sayın Doç.Dr. Figen TIRNAKSIZ**, **Sayın Yrd.Doç. Dr.Zeynep Şafak TEKSİN**, **Sayın Doç.Dr. Uğur TAMER**, **Dr.Ecz. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ**, **Uzm.Ecz. Sibel İLBASMIŞ TAMER**, **Uzm. Ecz. Şeyda AKKUŞ**, **Uzm.Ecz. Başaran MUTLU** ve **Fatma ÇELİK**'e,

Destek ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan **aileme**,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

12. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Tuba
Soyadı : İNCEÇAYIR
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 01.01.1979

Eğitim:

2004- **Doktora**, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara

2001-2004 **Yüksek Lisans**, Gazi Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara

Yüksek Lisans Tezi:

“Lamotrijinin Sağlıklı Gönüllülerde Tükrük ve
Plazma Profili ve Farmakokinetik Modellemesi”

1997-2001 **Lisans**, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Ankara

Yabancı dil : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Farmasötik Bilimler Ankara Derneği (FABAD)
- Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
- American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)

Bilimsel Etkinlikler:

Makaleler:

1. Incecayir T, Agabeyoglu I, Gucuyener K. “Comparison of Plasma and Saliva Concentrations of Lamotrigine in Healthy Volunteers” Drug Res./Arzneim. Forsch.57(8), 517-521, 2007.
2. Incecayir T, Agabeyoglu I. “Bioavailability File:Lamotrigine” FABAD J. Pharm. Sci.31(3), 163-179, 2006.
3. Incecayir T, Agabeyoglu I. “Validated High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Lamotrigine in Human Plasma And Saliva” Turkish Journal of Pharmaceutical Technology(baskıda)

Uluslararası Bildiriler:

1. Incecayir T, Agabeyoglu I, Gucuyener K. "Comparison of Plasma and Saliva Concentrations of Lamotrigine in Healthy Volunteers" AAPS Annual Meeting, Nashville, TN, USA, November 6-10, 2005.
2. Incecayir T, Agabeyoglu I., "Validated High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Lamotrigine in Human Plasma" 13th Int.Pharm.Technol.Symp. (IPTS-2006), Antalya, Turkey, p: 189-190. September 10-13, 2006.
3. Agabeyoglu I, Incecayir T. "Pharmacokinetic Modelling of Oral Lamotrigine Plasma Data" EUFEPS Conference on Optimising Drug Discovery and Development together with European Biosimulation Network of Excellence(BioSim) and EU Microdosing AMS Partnership Programme (EuMapp). "Integrating Systems Approaches into Pharmaceutical Sciences" Basel, Switzerland, December 5-7, 2007.
4. Incecayir T, Agabeyoglu I. "The Summary of M.Sc. Thesis: Saliva and Plasma Profiles and Pharmacokinetic Modelling of Lamotrigine in Healthy Volunteers" EUFEPS Conference on "When Variability Becomes an Issue in Drug Development: How to Understand, Predict and Manage?" Verona, Italy, May 13-14, 2008.
5. Incecayir T, Agabeyoglu I. "Dermatopharmacokinetics of Oxytetracycline Hydrochloride Ointment in Human Stratum Corneum" International Symposium on Biotechnology: Development and Trends, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, September 27-30, 2009.
6. Incecayir T, Agabeyoglu I., Arı G, Taskin G, Laleli Y. "UPLC-MS/MS Method for the Determination of Oxytetracycline HCl in Dialysates" IPSMPS 2010, Cesme, Turkey, June 24-27, 2010.
7. Incecayir T, Agabeyoglu I, Derici U, Sindel S. "Microdialysis Assessment of Oxytetracycline HCl Topical Formulations for Bioequivalence" AAPS Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, November 6-10, 2010(gönderildi).

Ulusal Bildiriler

1. T İnçeçayır, İ Ağabeyoğlu. "Ters-Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kullanılarak Tükrük Lamotrijin Derişimlerinin Ölçülmesi" 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı-Biyomut 08-29-31 Mayıs 2008 ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi ANKARA

2. T İnceçayır, İ Ağabeyoğlu. “ Oksitetrasiklin Hidroklorürün Mikrodiyaliz Örneklerinde Tayini İçin Valide Edilmiş Bir Ters-Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi(HPLC) Yöntemi” 14. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, 20-24 Mayıs 2009, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balçova, İZMİR

Çalışılan projeler

1. Ağabeyoğlu İ, Gücüyener K, İnceçayır T. “Epilepsili Pediatrik Hastalarda Lamotrijinin Tükürük Profili ve Farmakokinetik Modellemesi” GÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi, 2003, Proje No: 02/2003-18.
2. Ağabeyoğlu İ, İnceçayır T, Sindel Ş, Derici Ü. “Oksitetrasiklin Hidroklorürün Topikal Farmakokinetiği ve Topikal Biyoeşdeğerliğin Değerlendirilmesinde Mikrodiyaliz ve Bantla Soyma (Tape-Stripping) Yöntemlerinin Karşılaştırılması” TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı(1001), 2007, Proje No: 107S177.

Ödül

1. İnceçayır T, Ağabeyoğlu İ, Gücüyener K. Novartis Bilim Ödülü 2009- Farmasötik Teknoloji Alanında Novartis Araştırma Ödülü, “Comparison of Plasma and Saliva Concentrations of Lamotrigine in Healthy Volunteers”