T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE RUHSATLI İVERMEKTİN ÇÖZELTİLERİNİN SAFSIZLIK TAYİNİ VE OLASI GENOTOKSİK-SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI

MUSTAFA KESMEN

DANIŞMAN
PROF.DR.TÜLAY BAKIREL

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

İTHAF

Zamanın ruhunu aşarak uygarlığın gelişimine katkısı olan; hakkı ödenemeyecek herkese ithaf ediyorum.

"*Let the future tell the truth, and evaluate each one according to his work and accomplishments. The present is theirs; the future, for which I have really worked, is mine*" Dr.Nikola Tesla.

TEŞEKKÜR

Bir yandan Enstitüde devam eden tempolu çalışma hayatım, bir yandan araştırma çalışmaları için ayırabildiğim hafta sonlarım, akşamlarım ve tatillerimde geçen bu sürecin tamamlanmasında ismini sayamayacağım kadar insanın dokunuşu ve katkısı var.

Bu uzun soluklu süreci gece/gündüz ayırmaksızın benimle paylaşan, günün her saatinde iletişim kurabildiğim, akademik düşünce sistematiği ve ifade başta olmak üzere bilimsel bilgi, görgü ve deneyimlerini aktararak yol gösteren tez danışmanım Sayın Hocam Prof.Dr. Tülay BAKIREL'e,

Akademik yaklaşımları, anlayışları, ve paylaşımlarıyla değerli hissettiren, Değerli Hocalarım Sayın Prof.Dr. Murat YILDIRIM ve Prof.Dr. M. Erman OR'a, Sayın Prof.Dr. Oya ÜSTÜNER AYDAL'a,

Eğitici ve öğretici yaklaşımlarıyla Doktora yeterlilik jüri üyelerim saygıdeğer hocalarım Sayın Prof.Dr. Bünyamın TRAŞ ve Prof.Dr. Kamil ÜNEY'e, Değerli katkıları ve yaklaşımlarıyla tez savunma sınavı jüri üyelerim sayın Prof.Dr.Gülden Zehra OMURTAG, Doç.Dr.Nurullah ÖZDEMİR'e,

Genotoksisite testlerindeki katkılarından ve çalışmalardaki hassasiyetinden dolayı Sayın Dr.Öğr.Üyesi F.Ceren ANLAŞ'a, farklı aşamalarda değerli bilimsel katkılarıyla Sayın Doç.Dr. Fulya ÜSTÜN ALKAN'a, süreç katkılarıyla her aşamada destek olan Araş.Gör.Dr.Yiğit GÜNEŞ'e, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalına,

Mutajenite çalışmaları için Yeditepe Üniversitesi araştırmacıları Sayın Prof.Dr. Ahmet AYDIN ve Doç.Dr.Muhammed HAMİTOĞLU'na,

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisanüstü Eğitim Enstitüsü Personeline, Nilüfer GÜZELBAKAN'a,

Proje olarak destekleyen TAGEM Değerli Yöneticileri/Araştırmacılarına, Dr.Erkan TAÇBAŞ, Dr.Şahin ÇAKIR'a, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü ile Veteriner Sağlık Ürünleri ve Halk Sağlığı Daire Başkanlığı değerli yöneticileri ve çalışanlarına, Daire Başkanı Mustafa BEBEK, Çalışma Grup Sorumluları Mustafa YIKILMAZ ve Arif ÖZKAN'a, Doğan BAYRAK'a,

Böylesi köklü ve değerli, tarihi çalışmalara imza atan, önemli yetkinliklere sahip insan gücü yetiştiren bir kurumda, Bakanlık strateji ve politikaları doğrultusunda kamu yararını artırmak için ülkesel ve evrensel düzeyde mücadele ettiğimiz, her türlü idari, hukuki, bilimsel, beşeri ve teknik konuda 6 yıldır ülkemize ve canlılara hizmet etmekten onur duyduğum İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne, Enstitü Müdüresi Sayın Dr. Fahriye SARAÇ, İlaç Kalite Kontrol Lab.Şefi Dr.Erdim Ozan ÇAKIR, Dr.Ayşe ATEŞOĞLU, Mevlüt DEMİRBAŞ'a,

Analitik kimya, matematik ve problem çözmenin kesiştiği her alanda süreci paylaşan Farah TATAR, hücre kültürü çalışmalarına verdikleri desteklerinden dolayı Dr.Serdar UZAR, Görkem ÇOLAK, Sedat KILIÇ, yazılım, cihaz ve malzeme konularında teknik destekleriyle birlikte, tatil günlerini ve akşamlarını bana ayıran, eğitici-öğretici yönleriyle katkı sağlayan Metin YILDIRIM'a, proje çalışmalarındaki katkılarıyla Ertuğrul GÜNEŞ, ivermektin ve doktora eğitim süreci kaderini paylaştığımız Dr.Nil ERDUR'a,

Manevi destekleri ve katkılarıyla yanımda olan aile fertlerim Arzu, Adem, Ayşe ve Nisa TANDOĞAN, değerli dostlarım Ümit GÖKTEPE, Doç.Dr. M.Sencer KARAGÜL, EDO Dr.Fikret MEMİŞOĞLU, tüm süreçlerde olduğu gibi, kendilerini ve kendimi gerçekleştirebilme yolculuğunda ben yansıtmasam da o güzel kalpleriyle benden daha fazla stres yaşayan, desteklerini, dualarını, sevgilerini esirgemeyen, bu dünyaya göre çok fazla iyi, merhametli ve eşsiz olan, yerleri asla doldurulamaz çok kıymetli Annem Atiye, Babam İsa KESMEN ve моя Саша…

Ve ismini sayamayarak haksızlık ettiğim, geliştirdikleri strateji ve politikalarla, iyileştirdikleri süreçlerle, doğrudan veya dolaylı olarak hayatlarımıza dokunarak gelişimimizi destekleyen, bakış açımızı genişleten, ayrım gözetmeyen, başarılarımızla mutlu olan herkese müteşekkirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI II
BEYAN III
İTHAF IV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VI
TABLOLAR LİSTESİ IX
ŞEKİLLER LİSTESİ XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ XII
ÖZET XIV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 19
2.1. Veteriner Tıbbi Ürünlerde Kalite Standardizasyonu ve Önemi 19
2.2. Veteriner Tıbbi Ürünlerde Safsızlıklar 23
2.2.1. Safsızlıkların Sınıflandırılması 28
2.2.1.1. Organik Safsızlıklar 28
2.2.2. Safsızlık Çalışmalarının Amacı 38
2.2.3. Safsızlıkların Tespiti için Kullanılan Analitik Yöntemler 39
2.3. Tıbbi Ürün Safsızlıklarının Genetik Toksikoloji Yönünden Değerlendirilmesi 41
2.3.1. Genotoksisite Testleri 46
2.3.1.1. Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi 46
2.3.1.2. Tek Hücreli Alkalen Jel Elektororezi (Comet) Testi 47
2.3.1.3. Diğer Genotoksisite Testleri 49
2.4. Sitotoksisite Yönünden İlaç Safsızlıkları 49
2.4.1. Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi 50
2.5. İvermektin 51
2.5.1. İvermektin Safsızlıkları ve Toksisite Potansiyelleri 53
2.6. Epimer Safsızlıklarının Toksisite Potansiyelleri 57
3. GEREÇ VE YÖNTEM 60
3.1. Fiziksel Testler 61
3.1.1. pH Ölçümü 61

3.1.2. Karl Fischer ile Su İçeriği 62
3.2. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürün ve API numunelerinde Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (UHPLC) ile İvermektin Bileşen ve Safsızlıklarının Tayini için Yöntemin Geçerli Kılınması (Analitik Metot Validasyonu) 62
3.2.1. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi 63
3.2.2. Analitik Yöntemin Modifikasyonu 64
3.2.3. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması 64
3.3. İvermektin İçeren Tıbbi Ürünler ve API'lerde İvermektin Bileşenleri ve Safsızlıklarının Miktar Tayini 69
3.4. Tespit Edilen Degradasyon Ürünü Safsızlık 2-epi-ivermektin B1a için Ek Çalışmalar 70
3.4.1. 2-epi-ivermektin B1a için Seçicilik 70
3.4.2. 2-epi-ivermektin B1a için Tespit ve Tayin Alt Sınırı 70
3.4.3. 2-epi-ivermektin B1a için Doğruluk Çalışması 70
3.4.4. 2-epi-ivermektin B1a Kesinlik 71
3.4.5. 2-epi-ivermektin B1a Ara Kesinlik 71
3.5. Toksikolojik Testler 71
3.5.1. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi 72
3.5.2. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Mutajenik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi 74
3.5.3. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Genotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Comet Testi 78
3.5.4. İstatistiksel Analizler 81
4. BULGULAR 82
4.1. Fiziksel test sonuçları 84
4.1.1. pH ölçümü 84
4.1.2. Su içeriği 85
4.2. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması 85
4.2.1. İvermektin H_2B_{1a} için Seçicilik (Specifity) 87
4.2.2. İvermektin H_2B_{1a} için Doğruluk (Accuracy-Trueness) 88
4.2.3. İvermektin H_2B_{1a} için Kesinlik (Precision) 88
4.2.4. İvermektin H_2B_{1a} için Tespit sınırı (Limit of Detection-LOD) ve Tayin alt sınırı (Limit of Quantitation-LOQ) 90

4.2.5. İvermektin H_2B_{1a} için Doğrusallık (Linearity) ve Aralık (Range) 91
4.2.6. İvermektin için Sistem Uygunluk Testi (System Suitability Test) 94
4.3. Test Numunelerin HPLC ile İvermektin H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} Analizi 94
4.4. Tespit Edilen Degradasyon Ürününün Tanımlanması 96
4.4.2. VTÜlerde 2-epi-ivermektin B1a Safsızlığının HPLC ile Analizi ve pH Ölçüm Sonuçları 102
4.5. Toksikolojik Test Sonuçları 103
4.5.1. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi 103
4.5.2. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Mutajenik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi 106
4.5.3. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Genotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Comet Testi 111
5. TARTIŞMA 115
KAYNAKLAR 131
ETİK KURUL KARARI 158
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 159
ÖZGEÇMİŞ 160

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Safsızlık Çalışmasının Amaçları 39
Tablo 2-2 İvermektin Safsızlıkları 54
Tablo 3-1:Analiz Edilen Numunelere Ait Tanımlayıcı Kod Listesi 60
Tablo 3-2: Analiz Edilen Materyal-Standartlar ve Etkin Maddeler 61
Tablo 3-3 : Genetik Toksikoloji Çalışmalarında Kullanılan Materyal 72
Tablo 4-1: Test Numunelerin pH Ölçüm Sonuçları 84
Tablo 4-2: Test Numunelerin Su İçeriği Ölçüm Sonuçları 85
Tablo 4-3 : Değerlendirme Kriterleri 88
Tablo 4-4: İvermektin Doğruluk Çalışması Sonuçları 88
Tablo 4-5 : Değerlendirme Kriterleri 89
Tablo 4-6: İvermektin H_2B_{1a} için Tekrarlanabilirlik Çalışma Sonuçları 89
Tablo 4-7 : Değerlendirme Kriterleri 89
Tablo 4-8: İvermektin H_2B_{1a} için Ara Kesinlik Çalışma Sonuçları 90
Tablo 4-9 : Değerlendirme Kriterleri 90
Tablo 4-10: İvermektin H_2B_{1a} için Tespit ve Tayin Limiti Çalışma Sonuçları 91
Tablo 4-11 : Değerlendirme Kriterleri 91
Tablo 4-12: İvermektin H_2B_{1a} için Doğrusallık ve Aralık Çalışma Sonuçları 92
Tablo 4-13: Test Numunelerinin İvermektin H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} Bileşen Analiz Sonuçları 94
Tablo 4-14: İvermektin Safsızlıkları Alıkonma ve Bağıl Alıkonma Süreleri 96
Tablo 4-15 : Değerlendirme Kriterleri 98
Tablo 4-16: 2-epi-ivermektin B1a için Tespit ve Tayin Limiti Sonuçları 98
Tablo 4-17 : Değerlendirme Kriterleri 99
Tablo 4-18: 2-epi-ivermektin B1a için Doğruluk Çalışma Sonuçları 99
Tablo 4-19 : Değerlendirme Kriterleri 100
Tablo 4-20: 2-epi-ivermektin B1a Kesinlik Çalışma Sonuçları 101
Tablo 4-21 : Değerlendirme Kriterleri 101
Tablo 4-22: 2-epi-ivermektin B1a Ara Kesinlik Çalışma Sonuçları 102
Tablo 4-23: Numunelerde İvermektin H_2B_{1a}+H_2B_{1b}, 2-epi-ivermektin B1a ve pH Değerleri 103
Tablo 4-24: Konsantrasyona Göre % Hücre Canlılığı Sonuçları 104
Tablo 4-25 Test Numunelerinin IC_{50} Değerleri 105

Tablo 4-26: İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının TA98 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda deney sonuçları 107
Tablo 4-27 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde ve standardının TA98 suşunda metabolik aktivasyon varlığında deney sonuçları 108
Tablo 4-28 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının TA100 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda deney sonuçları 109
Tablo 4-29 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde ve standardının TA100 suşunda metabolik aktivasyon varlığında deney sonuçları 110
Tablo 4-30 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının Comet Testi Konsantrasyon Tablosu 111
Tablo 4-31: İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının Comet Test Sonuçları 113

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Tıbbi Ürünlerde Potansiyel Safsızlıklar. 27
Şekil 2-2 : Degradasyon Ürünlerinin Tanımlanması ve Kalifikasyonu Karar Ağacı 30
Şekil 2-3 : Maddelerin Güvenilirlik Değerlendirmesi 44
Şekil 2-4 : İvermektin 2 Boyutlu Molekül Yapısı (Chen ve Kubo, 2018). 53
Şekil 4-1: Tez Çalışması Akış Planı 83
Şekil 4-2: İvermektin Seçiçilik Çalışması Kromatogramı 87
Şekil 4-3: İvermektin H_2B_{1a} için Kalibrasyon Grafiği 93
Şekil 4-4: Artıklar Dağılım Grafiği 93
Şekil 4-5: 2-epi-ivermektin B1a için Seçicilik Kromatogramı 97
Şekil 4-6: 2-epi-ivermektin B1a Yükleme (Spike) Kromatogramı 100
Şekil 4-7 Test Numunelerinin Konsantrasyona Karşı Sitotoksisite Grafiği 105
Şekil 4-8 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının örnek Comet Görüntüleri 112

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AB : Avrupa Birliği

API : Active Pharmaceutical Ingredient /Etkin madde

BSS : Bağıl Standart Sapma

CMR : Carcinogens, Mutagens, Reprotoxic/Karsinojen, Mutajen, Reprotoksik

EC : Europen Commission/Avrupa Komisyonu

EDQM : The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare/Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü

EMA : European Medicines Agency/Avrupa İlaç Ajansı

FDA : U.S.Food and Drug Administration/Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi

GIVIMP : Good *In vitro* Method Practices/İyi *in vitro* Metot Uygulamaları

GLP : Good Laboratoty Principles/İyi Laboratuvar Uygulamaları

GMP : Good Manufacturing Practices/İyi Üretim Uygulamaları

ICH : The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konseyi

IVM : İvermektin

MDBK : Madine Darby Bovine Kidney

OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development/Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Teşkilatı

OMCL : Official Medicines Control Laboratories/Resmi İlaç Kontrol Laboratuvarı

Ph.Eur. : The European Pharmacopoeia/Avrupa Farmakopesi

PIC/S : Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme/Farmasötik Denetim İşbirliği Konvansiyonu

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship/Kantitatif Yapı Aktivite İlişkileri

R^2 : Coefficient of correlation/Korrelasyon katsayısı

REACH : Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals/Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzin verilmesi, Kısıtlanması

SS : Standart Sapma

TTC : Toxicological Thresold Concern/Toksikolojik Kaygı Eşiği

VTÜ : Veteriner Tıbbi Ürün

VICH : International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products-Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı

WHO : The World Health Organisation /Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Kesmen, M. (2020). Türkiye'de Ruhsatlı İvermektin Çözeltilerinin Safsızlık Tayini ve Olası Genotoksik-Sitotoksik Etkilerinin *In vitro* Olarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmakolji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Veteriner tıbbi ürünler; hayvan sağlığı ve refahı üzerinde direk, gıda güvenliği ve çevre üzerindeki dolaylı etkileri nedeniyle Tek Sağlık kavramının vazgeçilmez unsurlarıdır. Tıbbi ürünlerde etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan istenmeyen bileşenler olarak nitelendirilen safsızlıkların tanımlanarak toksisite potansiyellerinin belirlenmesi ilaç güvenilirliğin teminatı açısından önemli bir konudur. Bu yaklaşımla tez çalışmasında safsızlıkların kontrolünde düzenleyici kuruluşların belirlediği esaslar dikkate alınarak, Ülkemizde ruhsatlandırılmış veteriner ivermektin enjeksiyonluk çözeltilerinde (İEÇ) safsızlıkların saptanması ve olası sitotoksik-genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada; 16 İEÇ, 3 referans standart, 5 farklı etkin madde safsızlık potansiyelleri yönünden (UHPLC) ile analiz edilmiştir. Valide edilen bu yöntemin klasik metotlara göre daha hızlı ve duyarlı sonuçlar verdiği saptanmıştır. İvermektin örneklerinde referans monograflarda yer almayan ivermektinin C2 epimeri degradasyon ürünü 2_epi_ivermektin-B1a safsızlığı tespit edilmiştir. Farklı safsızlık düzeylerine sahip ivermektin etkin madde ve çözelti ürünleri ile 2_epi_ivermektin B1a safsızlığı sitotoksisite ve genotoksisite olasılıkları yönünden incelenmiştir. Örneklerin AMES testinde mutajenik indeks değerinin 0,8-1,5 aralığında, mutajenik etkili olmadığı belirlenmiştir. ATP testinde IC_{50} değerlerinin ise 39,26-109,20 µM aralığında olduğu ve sitotoksik etkinin safsızlık düzeylerine paralel artış gösterdiği saptanmıştır. Comet testinde numunelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen düzeylerde DNA hasarına neden olduğu ve hasarın degradasyon ürünü safsızlığı en yüksek olan numunede düşük konsantrasyonda da (3,91 µM) şekillendiği tespit edilmiştir. Ancak bu etkilerin, ivermektinin hedef hayvan türlerinin plazmalarında bulunabileceğinin çok üstündeki konsantrasyonlarda açığa çıkabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, AMES ve Comet test sonuçlarının paralellik göstermediği belirlenmiş, bu doğrultuda, tıbbi ürün safsızlıklarının kontrolünde düzenleyici kuruluşların genotoksisiteyi saptamaya yönelik önerilen test sistemlerinin, veteriner pratikte kullanılan dozlarla ilişkilendirilecek şekilde tekrar ele alınmasının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Epimer, Genotoksisite, İvermektin, Mutajenite, Safsızlık,

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü-TAGEM tarafından TAGEM/HSGYAD/Ü/20/A5/P6/1930 nolu proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Kesmen, M. (2020). Determination of licensed ivermectin solutions' impurity in Turkey and *in vitro* investigation of possible genotoxic-cytotoxic effects. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Pharmacology and Toxicology. PhD Thesis. İstanbul.

Veterinary Medical Products are indispensable elements of the One Health concept due to their direct effects on animal health and welfare and indirect effects on food safety and the environment. Identifying the impurities, which are considered undesirable components other than API and excipients in medicinal products, and determining their toxicity potential is an important issue in ensuring drug safety. This approach is aimed to determine the impurities in veterinary ivermectin injectable solutions (IIS) licensed in our country and to examine their possible cytotoxic-genotoxic effects, taking into account the principles determined by the regulatory institutions for the control of impurities in this thesis study.

In the research; 16 IISs, 3 reference standards, 5 different active substances were analyzed in terms of their impurity potentials (UHPLC). It has been determined that this validated method gives faster and more sensitive results than classical methods. The impurity 2_epi_ivermectin-B1a, the degradation product of the C2 epimer of Ivermectin, which is not included in the reference monographs, was detected in the ivermectin samples. Ivermectin active substance and solution products with different impurity levels and 2_epi_ivermectin B1a impurity were examined in terms of cytotoxicity and genotoxicity possibilities. It was determined that the mutagenic index value of the samples was in the range of 0.8-1.5 in the AMES test, therefore it was not mutagenic. In the ATP test, the IC_{50} values were found to be in the range of 39.26-109.20 µM and the cytotoxic effect increased in parallel with the impurity levels. By comet test, it was found that it caused DNA damage at varying levels depending on the concentrations of the samples, and the damage also occured at a low concentration (3.91 µM) in the sample with the highest degradation product impurity. However, it was concluded that these effects may occur at concentrations well above the ivermectin levels that can be detected in the plasmas of target animal species. Moreover, it was observed that the AMES and Comet test results did not show any correlation, therefore it was concluded that it would be beneficial to reconsider the test systems recommended by the regulatory bodies for detecting genotoxicity for the control of medicinal products' impurities, concerning the doses used in veterinary practice.

Key Words: Epimer, Genotoxicity, Impurity, Ivermectin, Mutagenicity,

The present work was supported by the General Directorate of Agricultural Research and Policy of Ministry of Agriculture and Forestry of Turkey. Project No. TAGEM/HSGYAD/Ü/20/A5/P6/1930

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Veteriner Tıbbi Ürünler (VTÜ); hayvan sağlığı ve refahı üzerinde direk, gıda güvenliği ve çevre üzerindeki dolaylı etkileri nedeniyle Tek Sağlık kavramının vazgeçilmez unsurlarıdır (Bakırel 2020). Dolayısıyla bu ürünlerin etkinlik ve güvenilirliğine ilişkin laboratuvar ve klinik çalışmaların belgelenmelerinin yanı sıra, üretimlerinden tüketime sunulacağı sürece kadar farmasötik kalitesinin güvence altına alınması çok önemli bir husustur. Aksi takdirde tüketime sunulan VTÜ'lerin halk ve hayvan sağlığına yönelik olumsuz etkilerinin, olası yarardan çok zarara neden olabileceği öngörülebilir (Anonim 2012).

Yetersiz kalite özelliklerine sahip ilaçlar, özellikle yükselen ekonomilerde ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunu teşkil edecek önemli bir etkiye sahip olabilir. Farmasötik kalite kriterlerini karşılamayan ilaçlar, üretim sırasında kalite kontrol süreçlerinin yetersiz olması veya hileli uygulamalar yolu ile piyasaya ulaşabilir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için farmasötik kalite kontrolüne yönelik yatırımlarda uygun kaynak tahsisine paralel olarak güçlü, yetişmiş insan gücüne sahip, uygun şekilde yetkilendirilmiş ve iyi finanse edilmiş ulusal düzenleyici kurumlara sahip olmak esastır (Johnston ve Holt 2014). İnsan sağlığında devrim yaratan ilaçlar, yasal gereklilikleri ve spesifikasyon kriterlerini karşılamaları, istenmeyen düzeyde safsızlık içermemeleri ve uygun dozda uygulanmaları durumunda amaçlarına hizmet etmektedir. Bu amaçla çeşitli analitik yöntemler ve iyi uygulamalar geliştirilmiştir. Farmasötiklerin geliştirilme, taşınma ve depolanma aşamalarında istenmeyen bileşenler olan safsızlıklar meydana gelebilir. Bu durum, ürünü hastaya uygulamaya riskli hale getirebilir. Bu nedenle safsızlıkların duyarlı yöntemlerle kesin olarak saptanması ve miktarının belirlenmesi, analitik enstrümantasyon çalışmalarında önemli bir rol oynar (Siddiqui 2016). Uluslararası düzenleyici kuruluşlar tarafından tıbbi ürün safsızlıklarının ele alınışı ve kontrolüne yönelik yaklaşımlar yayımlanan kılavuzlar ile sürekli güncellenmesine rağmen tıbbi ürün safsızlıklarına ilişkin sorunlar hala önemli bir konu niteliği taşımaktadır (Emerce Gürsel 2013). Günümüze değin safsızlıkların değerlendirilmesine dair kısmi veriler bilimsel literatüre aktarılmıştır. Bu kapsamda 2015-2017 yılları arasında Avrupa Birliği'nde gentamisin enjeksiyonluk çözeltisinin atlarda kullanımı sonucu, 9'u ölümle sonuçlanan, anafilaktik tip reaksiyon olarak 154 istenmeyen etkinin rapor edilmesi bunlardan birisidir. Çeşitli analizler doğrultusunda, gentamisin içeren

ürünlerin aynı üreticiye ait etkin madde (Active Pharmaceutical Ingredient-Aktif Farmasötik Madde-API) serilerinde histamin saptanmıştır. İleri kontroller ile yüksek düzeyde histamin safsızlığının, API'nin uygun olmayan koşullarda muhafazasından kaynaklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (EMA 2018a). Düzenleyici kuruluşların büyük önem verdiği, rehberlerin hazırlandığı ve bilimsel yaklaşımların sunulduğu safsızlıklar konusunda çalışmaların her geçen gün artmasına karşılık, tüm dünyada konu üzerine mevcut çalışma ve literatür oldukça kısıtlıdır. Çalışmalar, safsızlıkların belirlenebilmesi için gerekli analitik yaklaşımlar üzerine yoğunlaşmıştır. "Kalifikasyon" olarak adlandırılan, safsızlıkların biyolojik olarak güvenli olduğunu gösteren verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesine yönelik çalışmalar ise çok sınırlıdır (Gürsel 2013). Safsızlıklara ilişkin araştırmalarda bir çok ilaç safsızlığının degradasyon ürünü olarak açığa çıktığı saptanmıştır. Bu nedenle safsızlıkların degradasyon ürünü olup olmadığı önemli bir konudur. Veteriner tıbbi ürünlerde nem ve oksijenin varlığı nedeniyle, bitmiş üründe hidroliz ve oksidasyon tepkimeleri sonucu degradasyon ürünleri açığa çıkabilmektedir (Holm ve Elder 2016; Jacobson-Kram ve McGovern 2007). Daha az sıklıkta olmakla beraber izomerizasyon ve epimerizasyon ile ilişkili degradasyon ürünleriyle de karşılaşılması muhtemeldir (Holm ve Elder 2016). İlaç etkinliğini değiştirme potansiyeli olan safsızlıkların toksisite sorunlarına neden olabileceği kanıtlanmış bir gerçektir. Dolayısıyla safsızlıkların olası toksisiteleri in vivo ve in vitro test sistemlerinde değerlendirilerek risk analizleri yapılabilmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen sitotoksisite/genotoksisite testlerine dayalı veriler doğrultusunda safsızlıkların hedef canlı ve hedef dışı yapılar üzerindeki olası olumsuzlukların en aza indirilmesi mümkündür. Sitotoksisite değerlendirilmeleri ile sitotoksik etkinin belirlenebilmesi ile birlikte, genel ve özel toksisite testleri için konsantrasyon/doz seçimi için veriler elde edilebilmektedir (Waterman ve ark. 2002, Bharate ve ark. 2010; Mahto ve ark. 2010; Wu ve ark. 2011; Adan ve ark. 2016; Elder ve ark. 2016; OECD 2016c; Pindelska ve ark. 2017). Çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde genotoksikoloji çalışmaları önemli bir yere sahiptir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Safsızlıkların genotoksisite potansiyellerinin değerlendirilmesi için uluslararası geçerliliği olan test sistemlerinden yararlanılmaktadır. Toksisitesi bilinmeyen safsızlıklar için hayvan türü ve ürün kullanım süresi göz önünde bulundurularak genel ve özel toksisite testleri yürütülmektedir. (VICH 2007a; 2014, Corvi ve Madia 2017; EMA2018).

Teze konu olan veteriner tıbbi ürünlerin safsızlıkların saptanması ve toksisite testlerine ilişkin çalışmalar önemli olmasına ve günden güne yeni düzenlemeler yapılmasına rağmen, safsızlıklara yönelik araştırmalar dünya genelinde sınırlıdır. Ülkemizde ise safsızlık profilinin ortaya konduğu ve safsızlık düzeyleri belirlenmiş ürün/etkin maddelerde sitotoksik/genotoksik etkilerin incelendiği bir araştırma bulunmamaktadır. Farklı formülasyonlar ve üretim prosesleri ile günden güne artarak çeşitlenen ve VTÜ'lerin raf ömürlerinin farklı evrelerinde saptanabilen safsızlıkların kontrolü, hayvan ve halk sağlığının korunması açısından önemli bir konudur. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı; ülkemizde yaygın kullanımı bulunan çeşitli veteriner ivermektin enjeksiyonluk çözeltilerin Avrupa Farmakopesi (Ph.Eur.) monografı ilişkili maddeler başlığı ile VICH GL11 kılavuzu doğrultusunda safsızlık yönünden analiz edilmesi, safsızlık profilindeki farklılıkların ortaya konması ve safsızlık düzeyleri saptanan test materyalinin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin *in vitro* test sistemlerinde araştırılmasıdır. İvermektin'in yaygın kullanımı, yarı sentetik fermentasyon ürünü olması nedeniyle üretim ve raf ömrü süresince farklı safsızlıkların meydana gelebilmesi, safsızlıkların toksisite bilgisi bulunmaması nedenleriyle tez kapsamında belirlenen amaca ulaşmada aşağıda sunulan hedefler esas alınarak inceleme ve değerlendirilmelerin yapılması planlanmıştır.

-Safsızlıkların tayininde daha hızlı, duyarlı ve ekonomik likit kromatografi yöntemi geliştirilerek, analitik yöntemin geçerli kılınması için çalışmalar gerçekleştirilmesi, yeni nesil likit kromatografi kolonlarının safsızlıkların tespitindeki etkinliğinin incelenmesi,

-VTÜ'lerde degradasyon ürünü oluşumuna neden olabilecek fiziksel özelliklerden pH ve su içeriğinin test edilmesi,

-Potansiyel degradasyon ürünü safsızlık varlığının araştırılması,

-Referans tıbbi ürün, farklı safsızlık düzeyine sahip 2 ürün, farmakope referans standardı, etkin madde ve safsızlığın olası genotoksik-sitotoksik etkilerinin *in vitro* olarak araştırılması,

-Ulaşılan toksitite verileri doğrultusunda saptanan safsızlıkların incelenmesi ve veteriner pratiğe olası etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Veteriner Tıbbi Ürünlerde Kalite Standardizasyonu ve Önemi

Sağlık hizmetlerinin en önemli bileşenlerinden olan ilaç endüstrisi; beşeri ve veteriner hekimlikte tedavi edici, koruyucu ve besleyici olarak, sentetik, bitkisel, hayvansal ve biyolojik kaynaklı kimyasal maddeleri bilimsel standartlara göre belirli doz aralığında farmasötik şekiller haline getiren ve seri olarak üreterek tedaviye sunan bir sanayii dalıdır. Sağlık ve tedaviye yönelik hizmetleri ile stratejik bir rol üstlenen bu endüstride, VTÜ'lerin piyasaya arzı öncesinde etkinlik, güvenilirlik ve farmasötik kalitenin güvence altına alınması bir zorunluluktur (Devlet Planlama Teşkilatı [DPT] 2007; Anonim 2011; Anonim 2012). VTÜ'lerin hedeflenen kalitede üretiminin güvence altına alınması dolayısıyla kamu sağlığının korunması ve ilaç pazarının işleyişinin etkin şekilde sürdürülebilmesi ise resmi otoriteler tarafından yayımlanan düzenlemeler ve gerçekleştirilen denetimler ile sağlanabilmektedir (Mike ve ark. 2013; T. Bakırel 2020).

VTÜ'ler, beşeri tıbbi ürünlere göre uygulandıkları hayvan türlerinin yanı sıra insan sağlığına (gıda değeri olan hayvanların ürünlerinin tüketilmesi) yönelik olası etkileri nedeniyle daha geniş popülasyonlarda risk oluşturma potansiyeline sahiptirler. VTÜ'lerin amaçlanan kullanımlarına ve pazarlama izni veya klinik çalışma izin gerekliliklerine uygun olarak belirli kalite standartlarında üretilmesi, söz konusu risklerin kontrolünde önemli bir aşamadır. Bu süreçte, tıbbi bir ürünün farmasötik kalitesi; kalite kontrol laboratuvar testlerinin gerçekleştirilmesi, farmasötik ürün dökümantasyonun belgelenmesi ve ürün performansının izlenmesini içeren kalite güvence sisteminin teknik ve yönetimsel faaliyetleri ile değerlendirilebilmektedir (Anonim 2012a). VTÜ'lere pazarlama izni verilmesinde uygulanan yönetmelikler, ülkeler bazında farklılık göstermekle birlikte uluslararası geçerliliği olan referans kılavuzlarda (örn; VICH GL3, VICH GL11, VICH GL 39) farmasötik kalitenin standardizasyonuna ilişkin net hükümler belirlenmiştir (VICH 2005; 2007a; 2007b). Günümüzde, teknolojik ilerlemelere paralel bir şekilde yeni ilaç API'lerinin artışı ve tedavi alternatiflerinin çeşitlenip gelişimi, mevcut kılavuzların güncellenmesini gerekli kılmaktadır. Bu kapsamda; FDA, EMA, ICH, VICH gibi uluslararası düzenleyici kuruluşlar ürünlerin tıbbi kalitesinin yanı sıra etkinlik ve güvenirliği konusunda bilimsel temele dayalı standartları geliştirmeye yönelik faaliyetlerine devam etmektedirler (Emerce Gürsel 2013; Amberg ve ark. 2019).

Tıbbi ürünlerin ruhsatlandırılmalarına ilişkin teknik kılavuz ve şartların yorumlanması ve uygulanmasında uluslararası ölçekte uyum sağlanması amacı ile Amerika, Avrupa ve Japonya resmi ilaç otoriteleri 1990 yılında Uluslararası Harmonizasyon Konferansını (ICH) oluşturmuşlardır (Mike ve ark. 2013). Birlik tarafından yeni tıbbi ürünlerin onaylanması için temel olan üç kriteri yansıtacak şekilde kalite, güvenilirlik ve etkinlik konularında uyum çalışmaları başlatılmıştır (ICH 1990). Aynı birlik, VTÜ'ler için, 1993 yılında VICH'i oluşturmuş ve veteriner farmasötiklerin kalitesinin güvence altına alınması için beşeri tıbbi ürün kılavuzlarına paralel olarak analitik metot validasyonu, stabilite, safsızlıklar ve spesifikasyonlara ilişkin kılavuzları yürürlüğe koymuşlardır (VICH 1993). Bugün, 3 büyük pazarda yoğunlaşan dünya ilaç pazarı toplam ticaret hacminin 1.42 trilyon doları aştığı bilinmektedir. Başlıca üç büyük pazarda (ABD, AB, Japonya) yoğunlaşan gelişmiş ülkelerdeki yoğun tüketim, yine gelişmiş ülkelerdeki üretimle karşılanmaktadır. Dünya ilaç ihracat hacmi 2019 yılı verilerine göre 695 milyar ABD dolarıdır. İlaç ihracatında önde gelen ilk 10 ülkenin toplam ihracat içerisindeki payı %77'dir. Dünya ilaç ihracatında önde gelen ilk 5 ülke sırasıyla Almanya, İsviçre, İrlanda, ABD, Belçika'dır. Bu 5 ülkenin ihracatı dünya ilaç ihracatının yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Türkiye ihracat sıralamasında 29. sırada yer almaktadır. Sadece ABD'nin pazar içinde satışların %42'sini, üretimin %33'ünü ve araştırma-geliştirmenin % 49'unu elinde bulundurması gerçeği ICH birliğine üye ülkelerin uluslararası regülasyonların belirlenmesinde etkin rol üstlenmelerinin nedenini açıklayabilir niteliktedir (Anonim 2009a, Anonim 2020b). ICH pazar bölgesinde kılavuzların uygulanması, güvenli ilaç üretim ve tüketimine olanak sağlamasının yanı sıra birliğe ekonomik üretim olanakları da sunmaktadır. Bir API'nin güvenliği ve etkinliği bir ICH pazar bölgesindeki ülkede pazarlama için onaylandıktan sonra, birliğin diğer ülkelerinde ek bir değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaz. Bu durum, ilaç API ve ürünlerinin araştırma ve gelişiminde büyük miktarlarda ekonomik kaynak tahsis etme potansiyeline sahip olan birlik ülkelerinin yanı sıra diğer ülkelerin de ekonomik yatırım ya da sarfiyat yapmasını engellemektedir. Pazarlama izni sürecinin diğer aşamalarında yer alan biyoyararlanım, biyoeşdeğerlik, safsızlıklar ve farmakovijilans dâhil olmak üzere diğer ürün kalite verileri tüm pazar bölgelerinde sürekli olarak izlenmekte ve değerlendirilmektedir (Anonim 2009; Anonim 2012a, Anonim 2015a).

VTÜ'nün AB ilaç pazarına girebilmesi için yetkili bir otorite tarafından pazarlama izni verilmiş olması ön koşuldur. Birlik içerisinde VTÜ'ye pazarlama izni ise

726/2004/EC nolu mevzuatı çerçevesinde Avrupa Parlamentosu ve Konseyinin 2001/82/EC ve 2009/9/EC nolu direktiflerinde yer alan gereklilikler doğrultusunda verilebilmektedir. VTÜ'nün pazarlama iznine yönelik başvurular, EMA ya da üye ülkelerdeki yetkili otoriteler tarafından değerlendirilmekte ve uygun koşullara göre pazarlama izinleri verilmektedir. Pazarlama izni başvurusunun, ürün ve API'lerin özellikleri, üretim yöntemi, etkinlik ve güvenilirliğe ilişkin çalışma sonuçları gibi birçok bilgi ve belgenin eşliğinde yapılması gerekmektedir (EC 2020).

Ülkemizde, VTÜ'lerin ruhsatlandırılmasına ilişkin mevzuatın oluşturulması ve uygulamaların takibi Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yetki ve sorumluluğundadır. Bakanlık 2011 yılında AB'ye uyum süreci ile üretiminden pazarlama izni verilmesi ve kontrolüne kadar VTÜ'ne ilişkin uygulanacak tüm usul ve esaslar hakkında yönetmeliği güncelleyerek Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik yayımlanmıştır (Anonim 2011). Bu yönetmelik ile VTÜ'lerin üretimi, ithalatı, ihracatı, kullanımı, ambalajlanması, etiketlenmesi, tanıtımı, nakliyesi, depolanması, reçeteli ya da reçetesiz satışı, izin verilmesi, kontrolü ve teminine ilişkin uygulamaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Yönetmeliğin ikinci bölümü pazarlama iznine ilişkin olup Madde 5-1'de *"Bir ürünün üretilmesi, ithal edilmesi, piyasaya arzı, depolanması ve uygulanması için kanunun 12'ci maddesinin ikinci fıkrası gereği ve bu yönetmelik hükümlerine göre pazarlama izni almış olması gerekir"* ifadesine yer verilmiştir. Aynı Yönetmeliğin 87. maddesinde ise "*Bakanlıkça yayımlanan kılavuzlarda ürünlerin geliştirilmesi, ürünlere izin verilmesi ve üretilmesi gibi konularda hüküm bulunmaması halinde sırasıyla AB, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Uluslararası Farmasötik Denetim Sözleşmesi (PIC), Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (VICH) ve Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) gibi kurum ve kuruluşların kılavuzları dikkate alınmaktadır*" ifadelerine atıf yapılmıştır (Anonim 2011; Anonim 2012). Bu kapsamda; pazarlama izni sahibi tarafından, başvuru kılavuzu Bölüm 2 de yer alan; A) Bileşenlerin Kalitatif ve Kantitatif Özellikleri, B) Üretim Metodunun Tanımlaması, C) Başlangıç Materyallerinin Kontrolü, D) İmalat Prosesinin Ara Aşamalarındaki Kontrol Testleri, E) Ürünün Kontrolü, F) Stabilite çalışmaları ve G) Diğer Bilgiler hakkında detaylı bir bildirimde bulunarak farmasötik kalitenin nitelik ve niceliksel özelliklerini belgelemesi gerekmektedir (Anonim 2012).

Farmasötik kalitenin standardizasyonunda; uluslararası kabul edilebilirliği olan bir farmakopenin (AB, WHO, ABD, İngiliz Farmakopesi) yanı sıra ilaç üretme ve ihraç etme potansiyeli olan ülkelerde yayımlanmış olan farmakopeler takip edilmektedir. Bölgesel bazda, AB'ye üye ülkelerde ve tıbbi ürünler için benzer ilkeleri benimseyen diğer ülkelerde, farmasötiklerin fiziko kimyasal özelliklerinin yanı sıra analitik tekniklerin ayrıntılı olarak tanımlandığı Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia-Ph.Eur.) standartları uygulanmaktadır (Anonim 2012). Başvuru kılavuzu Bölüm 2'de yer alan gerekliliklerin sağlanması için Ph.Eur.'de ihtiyaç duyulan monografın bulunmaması durumunda AB üyesi ülke farmakopesi monografları dikkate alınabilir. Ph.Eur. ya da AB üyesi ülke farmakopesindeki bir monografta mevcut bir spesifikasyonun, maddenin kalitesini garanti etmeye yetmemesi durumunda, ulusal otorite başvuru sahibinden valide edilmiş test prosedürleri ile birlikte, spesifik safsızlıkların limitlerini içeren daha uygun spesifikasyonlar talep edebilir. Bir API'nin hem Ph.Eur. hem de bir AB üyesi ülkenin farmakopesinde yer almadığı durumlarda, uygunluğu gösterilebilirse, bir üçüncü ülke farmakopesi monografına uygunluk kabul edilebilir (Anonim 2012).

Pazarlama izni başvurusu için başlangıç materyallerinin spesifikasyonlarına uygunluk kontrolü, API'nin yardımcı madde ve ambalaj materyali ile etkileşimlerinin değerlendirilmesi, süreç (proses) validasyonu ile üretim standardizasyonu, ürüne özgü test ve analizler için metot validasyonu ve belirlenen saklama koşullarında ürünün spesifikasyonunda belirtilen sınırlarda kaldığının doğrulandığı stabilite çalışmaları yürütülür. Üründeki API miktarındaki kabul edilebilir maksimum sapma üretim sırasında ±%5'i geçmemelidir. Ürünün üretimi sırasında degradasyon oluşursa, bireysel ya da toplam degradasyon ürünlerinin kabul edilebilir maksimum seviyeleri belirtilmelidir. Tıbbi ürünün üretiminde API'nin önemli ölçüde kayba uğradığı ve fazla kullanıldığı (Eksez), ya da stabilite verileri API miktarının azaldığını gösteriyorsa; bu maddenin uğradığı değişiklikler bildirilir. Bildirimlerde, degredasyon ürünlerinin mümkünse kimyasal yapısı, farmakolojik ve toksikolojik özellikleri ile bu ürünlerinin tanımlanması ve/veya tayinine yönelik bilgiler de yer almalıdır. Yürütülen tüm çalışmalarda, API ve dojaz formalarının uygunluk değerlendirmesi farmakope monografları esas alınarak oluşturulan, ürünün tanımlama, saflık, potens, güç ve diğer özellikleri ile ilişkili spesifikasyonları ile sağlanır. Bu spesifikasyonlar üretici tarafından oluşturularak teklif edilen ve otorite tarafından onaylanan, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik test ve analizleri içeren kritik kalite kontrol standartlarıdır. Spesifikasyonu karşılamayan ürünler

fiziksel ve kimyasal değişikliklere maruz kalır. Bu değişiklikler istenmeyen degradasyon ürünü safsızlıkların oluşumuyla sonuçlanır (Anonim 2012; 2015a). Bir ürünün istenen kalite standartlarını karşılamaması terapötik etkinin kaybı sonucu uzun süreli hastalık ya da ölüm, istenmeyen veya toksik etkiler, sınırlı mali kaynakların israfı ve sağlık hizmetleri sisteminin güvenilirliğini yitirmesine yol açar (Anonim 2012a). Sağlık hizmetlerindeki başarısızlıklar, antibiyotik direnci, ek hastalıklar, hastalıkların yayılımı şeklinde halk ve hayvan sağlığı yönünden tehdit oluşturur (Johnston ve Holt 2014). Bu gerçeğe dayanarak mevcut standartlar ve düzenlemeler, ilaç endüstrisinin yalnızca oldukça saf API ve ürün üretmesini değil, aynı zamanda eşlik eden safsızlıkların izlenmesi ve limitlerinin belirlenmesi için tam olarak aydınlatmasını gerektirmektedir. Bu gereksinim nedeniyle, safsızlık profilinin ortaya konması modern farmasötik analizin en ilgi çekici ve aktif alanlarından biridir. Bu alandaki aktiviteler, API ile farmasötik formülasyonlardaki safsızlıklar ve degradasyon ürünlerinin tanımlanmasını, yapılarının aydınlatılmasını ve kantitatif olarak tespitini içerir (Maggio 2014). Safsızlıkların uygun analitik yöntemlerle tespiti sonrası risk/fayda değerlendirmesinin yapılması gerekir. Bu değerlendirmede, hedef popülasyon için uygun fiyatlı ilaçların tedarik edildiği ve safsızlıklardan kaynaklanan risklerin hasta için en aza indirildiği, yani 'riskin tolere edilebilirliği' güvence altına alınmalıdır (Bouder ve Löfstedt 2008).

2.2. Veteriner Tıbbi Ürünlerde Safsızlıklar

Dünya Sağlık Örgütü, ilacı ‘‘hastalığa ait durumları veya biyolojik işlevleri, alıcının yararına değiştirilmesi veya incelenmesi amacıyla kullanılan bir madde’’ olarak tanımlamaktadır (Alp ve ark. 2018, WHO 2021). Ancak, alıcının yararına olacak şekilde hastalıkların tanısı, tedavisi, hafifletilmesi ve koruma amaçlı kullanılan bu maddelerin, hedef türlere göre değişen derecede beklenen ya da beklenmeyen nitelikte yan etki potansiyelleri bulunabilmektedir (Riviere ve Papich 2017). Yan etkiler; ilaç API’leri ve bileşimdeki diğer kimyasal maddelerin (eksipiyan maddeler vb.) doğal yapılarından kaynaklanabileceği gibi ilaç madde ve ürünlerinde fizyolojik olarak aktif özellikteki safsızlıkların şekillenmesiyle açığa çıkabilirler (Görög 2006). Olası yan etkileri nedeniyle ilaç kullanımı bir risk/fayda değerlendirmesini gerektirmektedir (Cok ve Emerce Gürsel 2012). İlaç madde ve ürünleri için sadece risk faktörü olan safsızlıklar, tıbbi ürünün etkinlik, güvenirlik ve stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilen istenmeyen maddeler

olarak kabul edilirler (Jacobson-Kram ve McGovern 2007; Riviere ve Papich 2017). Bazıları toksik özellikte olan bu bileşiklerin; türlerine, sayılarına ve konsantrasyonlarına bağlı olarak ilaca ilişkin genel riskleri artırma potansiyelleri vardır (Erkekoğlu ve ark. 2014; Gosar ve ark. 2018). Farmasötik ürünün güvenilirliği, etkin ilaç maddesinin toksikolojik özelliklerine ve çeşitli kimyasal dönüşümler sırasında oluşan safsızlık karakterine bağlı olduğu için ilaç maddesi ve ilaç ürünündeki safsızlıkların tanımlanması, miktar tayini ve kontrolü, pazarlama onayı almak için ilaç geliştirmenin önemli parçalarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, farmasötik sponsorlar ve düzenleyici otoriteler, farmasötiklerdeki safsızlıkların kontrolüne önem vermektedir (Basak 2007; Anonim 2012; Cok ve Emerce Gürsel 2012; Dhangar ve ark. 2017).

Günümüzde, terapötik amaçla kullanılan ilaç etken maddelerinin önemlik bir kısmı sentetik olarak üretilmektedir (Emerce Gürsel 2013). Sentez ürünlerinin ve dozaj formlarının oluşturulması sürecinde sentez yöntemi, yetersiz saflaştırma, bozunma, başlangıç maddelerinin kalitesi gibi çeşitli kaynaklardan şekillenebilen safsızlıklar (Dhangar ve ark. 2017), API'nin stabilitesini, görünümünü ve toksisitesini olumsuz yönde etkileyebilir, dolayısıyla, ilacın hedef hayvan türlerinde biyoyararlanımın değişimine, toksisite artışına ve etkinliğin azalmasına neden olabilirler (Riviere ve Papich 2017). Beşeri tıbbi ürünlere göre VTÜ'lerin hayvan, tüketici ve kullanıcı güvenliğinin yanı sıra çevresel güvenilirlik ve antimikrobiyal direnç yönleriyle risk değerlendirmesi daha fazla çeşitliliği barındırmaktadır. Bu nedenle VTÜ'ne yansıma potansiyeli olan safsızlıkların kapsamlı olarak ele alınması kalite standardizasyonu ve güvenirlik açısından önem arz etmektedir (EMA 2007a). Safsızlıkların belirlenmesi, miktar tayini ve kontrolü, geliştirme faaliyetleri ve düzenleyici değerlendirmenin önemli bir parçası olup (Basak 2007), safsızlık değerlendirmeleri başlıca yeni API'ler ve ürünlerinin pazarlama izni başvurularında talep edilmektedir (VICH 2007; 2007a). Ayrıca orjinal ürüne göre düşük maliyetle üretilen, ancak etkinliği ve güvenirliği dolayısıyla kalitesi güvence altına alınmış jenerik ürünlerin üretimleri sırasında da orijinal ilaçtan farklı yapıda ve miktarda safsızlık şekillenebilmekte ve değişen safsızlık profillerinin belirlenmesi gerekmektedir (Cameron ve ark. 2012). Bu kapsamda Avrupa İlaç Ajansının jenerik ilaçlara ilişkin 2009 yılında yayımlanan önerilerine yönelik bildirisinde "jenerik ürünlerde safsızlık profilindeki farklılıkların, referans ürünle kıyaslandığında etkinlik ve güvenilirlik yönünden farklılıkları başlatmaması gerekmektedir" bilgisine yer vermiştir (EMA 2009). Diğer taraftan, yasadışı ve sahte ürünlerin GMP koşullarında üretilenlere

göre daha büyük miktarda ve sayıda safsızlıkları barındırabileceği gerçeğine dayanarak yasadışı ve sahte ilaçlarla mücadele kapsamında safsızlık profil çalışmalarının gerekliliğine dikkat çekilmektedir (Görög 2015).

İlaç maddelerinde API, tıbbi ürünlerde ise etkin ve yardımcı maddeler dışında kalan tüm bileşenler olarak tanımlanan safsızlıklar, ilaç güvenirlik değerlendirmelerinin önemli bir bileşenini oluşturur (VICH 2007; 2007a). Günümüze değin FDA ve EMA gibi uluslarası ilaç otoriteleri safsızlıklar konusunda bir çok kılavuz yayımlamışlardır. Hedef canlı türü ve halk sağlığı açısından önem arz eden tıbbi ürünlerin güvenirliğine ilişkin kritik düzenlemeler, güncel safsızlık kılavuzlarının şekillenmesine katkı sağlamışlardır. Kronolojik bir sırayla, kritik düzenlemelerin geçmişine kısaca bakıldığında; Avrupa'da ilk farmakopenin İspanya'da (1581) yayımlanmasından 1938 yılına değin piyasaya giriş öncesi ilaçlar için herhangi bir güvenirlik testinin yapılmadığı belirlenmiştir. İlk düzenleme, sülfanilamid eliksir isimli üründe çözücü olarak kullanılan dietilen glikol'un ölümlere neden olduğunun saptanması ile gündeme gelmiş ve 1938 yılında tıbbi ürünlere piyasaya sürülme öncesi bildirim zorunluluğu getirilmiştir (Rägo ve Santoso 2008). Çeşitli ülkelerde 1958-1960 yılları arasında piyasaya sürülen talidomidin 10.000 bebeğin fokomeli ve diğer deformitelerinden sorumlu olduğunun hükmü ile ilaç güvenilirlik çalışmalarında milat niteliğinde olan düzenlemeler yeniden şekillendirilmeye başlanmıştır. 1962 yılında FDA yeni ilaçların etkinlik ve güvenilirliğini kanıtlamasının gerekliliğine yönelik yasayı onaylamıştır. Benzer şekilde, AB'de ilaçlara yönelik ilk düzenleme 1965 yılında 65/65/EEC sayılı Direktif ile hayata geçirilmiş, bu direktif ile kamu sağlığının yüksek düzeyde korunmasının sağlanması ve sürdürülmesi amaçlanmıştır. Özellikle 1968 yılında talidomidin (R)-enantiyomerinin sedatif, (S)-enantiyomerinin ise teratojenik etkili olduğunun ispatlanması ile birçok ilaç API'sinin kiral olduğu ve biyolojik etkilerinin farklılık gösterebileceği gerçeğine dayanarak 1993 yılında (75/318/EEC, 1993) kiral API'lerin araştırılmasına ilişkin kılavuz yayımlanmıştır. Bu kılavuz ile stereokimyasal olarak tanımlanmış aktif maddelerin incelenmesinin yolu açılmış ve yeni aktif maddelere stereojenik merkezler ile kiralite açısından kontrol zorunluluğu getirilmiştir. AB Komisyonu 2001 yılında ilaçlara ilişkin yasal düzenlemelerin kapsamını genişleterek, hayvan sağlığının daha iyi korunmasını sağlamaya yönelik veteriner ilaçları için de bir direktif yayımlamıştır. Günümüze değin AB'de beşeri ve veteriner ilaçların da güvenirliği ve kalitede standardizasyonunu sağlamaya yönelik bir çok düzenleme yapılarak uygulamaya geçirilmiş olmakla birlikte,

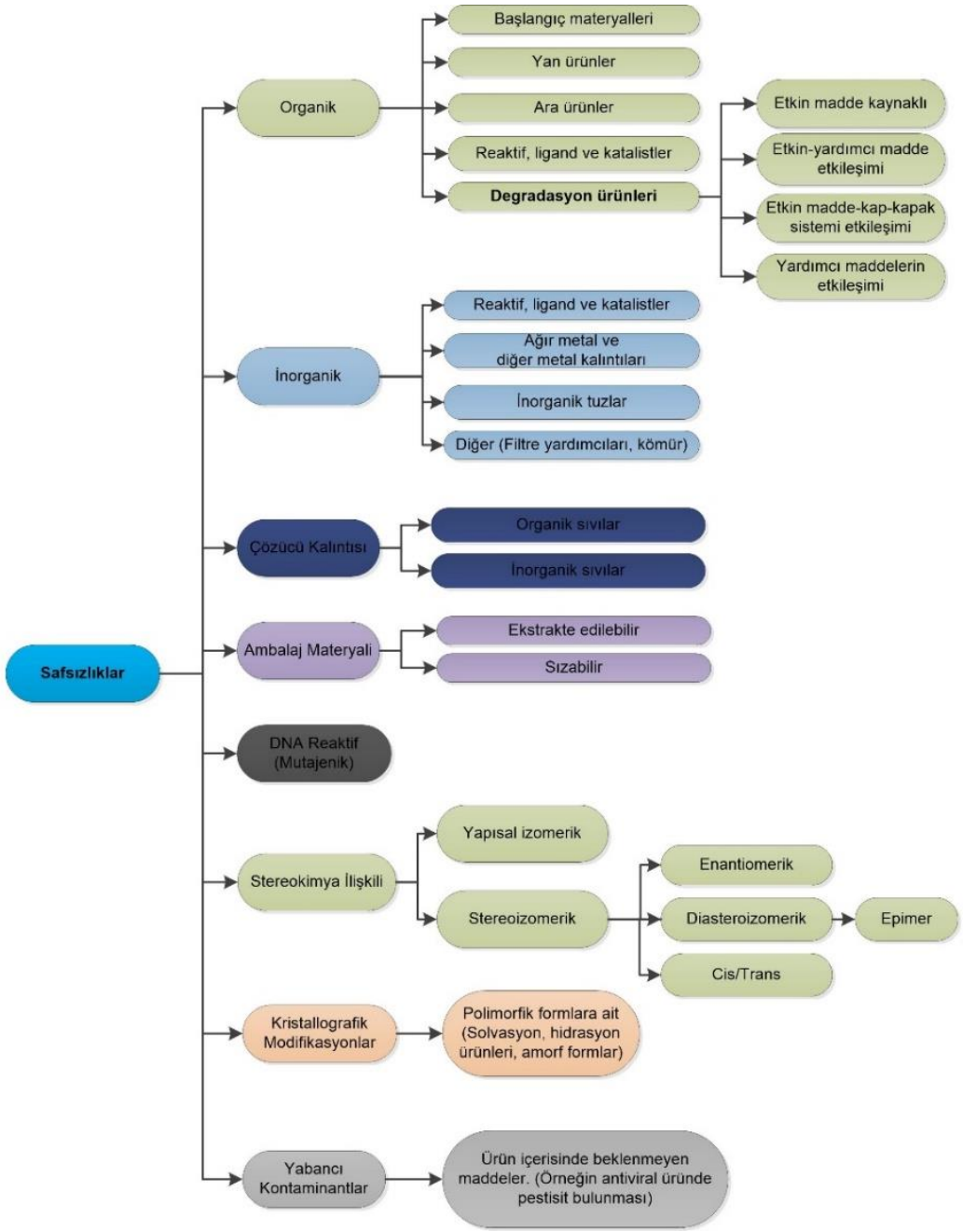
safsızlık kontrolüne yönelik çalışmalar halen dinamik bir süreçte ilerlemektedir (EMA 1993; Rägo ve Santoso 2008; Smith 2009; American Chemical Society [ACS] 2014; Vargesson 2015).

Türkiye'de VTÜ'lerde pazarlama izni verilmesi, safsızlıkların izlenmesi ve kontrolüne yönelik uygulamaların belirlenmesine yönelik otorite Tarım ve Orman Bakanlığı'dır. Bakanlık, yayımlamış olduğu Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmeliğin (Resmî Gazete Tarihi: 24.12.2011 Resmî Gazete Sayısı: 28152) 15. Maddesi ikinci fıkra b bendine göre "*Deneme üretimi yaptırarak, ürünün kendisini, başlangıç maddelerini ve gerekirse ara ürünlerle diğer bileşenlerini, üreticinin uyguladığı ve başvuruda belirttiği test metotlarının 8 inci maddenin birinci fıkrasının (i) bendine uygun olup olmadığını tespit etmek amacıyla analiz edebilir, ettirebilir*". Ulusal otorite tarafından yayımlanan kılavuzlarda ruhsatlandırmaya ilişkin net hükümlerin bulunmaması durumunda ise; Avrupa Birliği, WHO, PIC/S, VICH ve ICH gibi kurum ve kuruluşların kılavuzları dikkate alınmaktadır (Anonim 2011; Anonim 2012).

VTÜ'lerin safsızlık sorunlarının ne şekilde ele alınacağı bilgisine, düzenleyici kuruluşların analitik ve toksikolojik yaklaşımların genel çerçevesini sundukları rehberler aracılığı ile ulaşılmaktadır. Bu doğrultuda; VICH GL11 (2007a) kılavuzunda VTÜ'lerin safsızlıkları; API'den kaynaklanan safsızlıklar, yardımcı maddelerden kaynaklı safsızlıklar, ekstrakte edilebilir-sızabilir safsızlıklar ile degradasyon ürünlerini kapsayacak şekilde değerlendirilmektedir (VICH 2007; 2007a). İlave olarak EMA tarafından 2018 yılında yayımlanan *"Veteriner Tıbbi Ürünlerde DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Kontrolü ve Değerlendirilmesine Yönelik Kılavuz"* ile safsızlıkların kontrolüne ilişkin düzenlemenin kapsamı genişletilmiştir. Bu kılavuzda düşük dozlarda yüksek toksisiteye sahip, DNA hasarı oluşturma potansiyeli olan DNA reaktif safsızlıkların; başlangıç materyali kaynaklı, API-yardımcı madde-kap/kapak sistemi etkileşimi kaynaklı oluşabileceği gibi degradasyon ürünü olarak da meydana gelebileceği belirtilerek bu tip safsızlıklar için izlenecek yol tanımlanmıştır (EMA 2018).

İlaç maddesi veya ilaç ürününde sentez/üretim süreçleri, bozunma, saklama koşulları, kap, yardımcı maddeler veya kontaminasyon nedeniyle ortaya çıkabilen safsızlıkların kaynaklarına göre sınıflandırılmaları, yönetimsel stratejilerinin belirlenmesi için ilk ve önemli bir basamaktır (Liu ve Chen 2019). VICH GL10 ve GL11 kılavuzlarında veteriner ilaç safsızlıkları; temel olarak organik, inorganik ve çözücü kalıntıları şeklinde sınıflandırılmaktadır (VICH 2007; 2007a). Oysa ki, tıbbi ürünlerde

kristalizasyonla (polimorfik formlar) ve stereokimya ilişkili (stereoizomer, diastereoizomer, epimer, cis/trans safsızlıkları) safsızlıkların yanı sıra ile yabancı kontaminant kaynaklı safsızlıklar (Şekil 2.1) da bulunmaktadır (VICH 2007a; EMA 2012).



Şekil 2-1 : Tıbbi Ürünlerde Potansiyel Safsızlıklar (VICH 2007a; EMA 2012).

2.2.1. Safsızlıkların Sınıflandırılması

VICH GL10 ve GL11 kılavuzlarına göre yeni API ve VTÜ'lerde safsızlıklar; temel olarak organik, inorganik ve çözücü kalıntıları şeklinde sınıflandırılmaktadır (VICH 2007; 2007a).

2.2.1.1. Organik Safsızlıklar

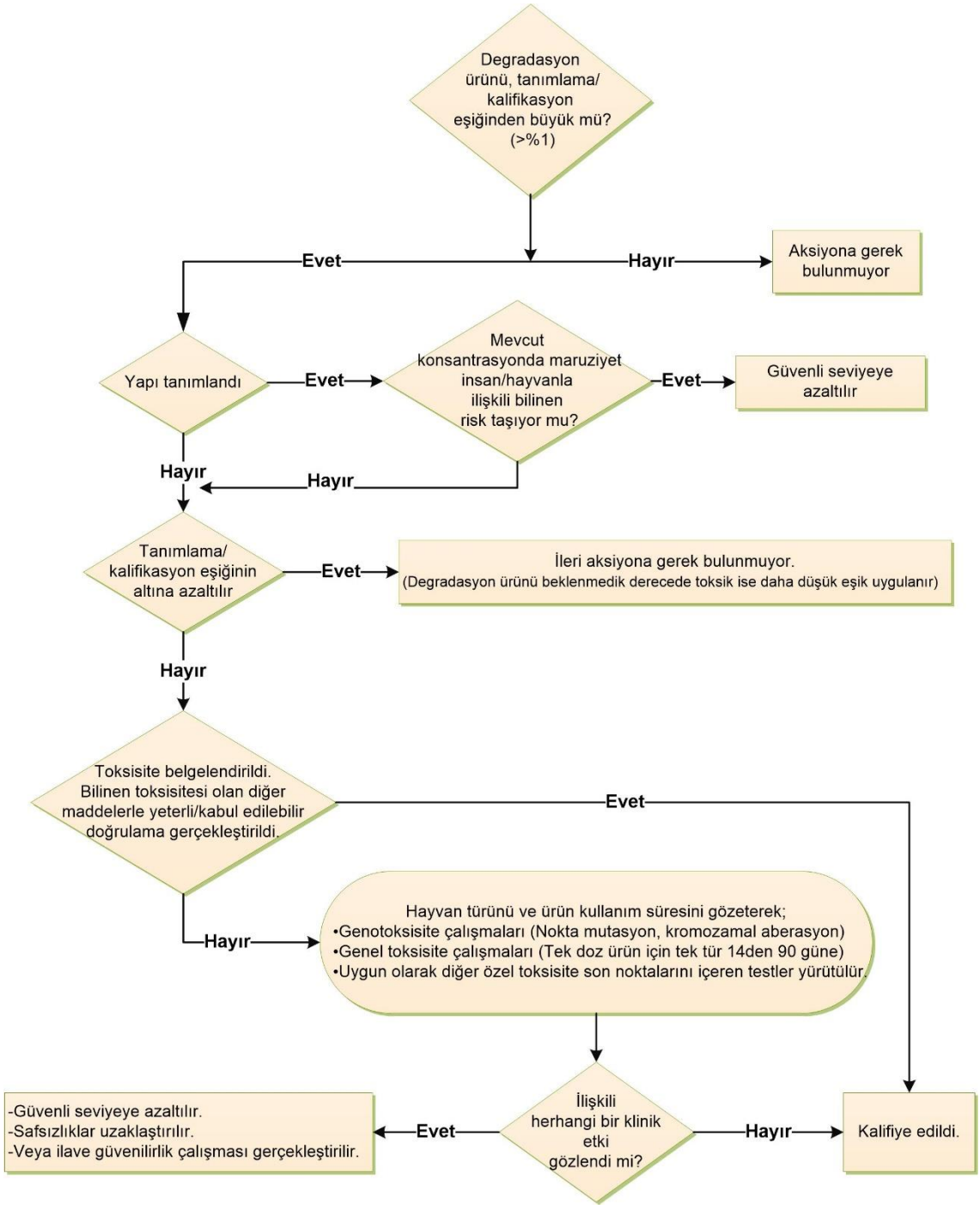
Organik safsızlıklar üretim süreci ve/veya depolanması sırasında ortaya çıkabilir. Bu safsızlıklar tanımlanmış/tanımlanmamış, uçucu/ uçucu olmayan bileşikler olabilirler. Organik safsızlıklar başlangıç materyali, ara/yan ürün, reaktif, ligand, katalist ve degradasyon ürünlerini içermektedir (VICH 2007). Organik safsızlıklar kapsamındaki degradasyon ürünü safsızlıklar, ürün etkinliği ve güvenirliğine etkileri nedeniyle farmasötik kalitenin kritik bileşenleri olup, yalnızca API'de değil aynı zamanda tıbbi ürünlerde takibi zorunlu olan safsızlıklardır (VICH 2007a).

2.2.1.1.1 Veteriner Tibbi Ürünlerde Degradasyon Ürünü Safsızlıklar

Degradasyon ürünleri; ambalaj materyali veya yardımcı maddeler ile reaksiyon, pH, su, ışık, sıcaklık gibi değişimlerin etkisi aracılığıyla ürünlerin depolanması ve üretimi süresince oluşan, API'lerde kimyasal değişikliklerden kaynaklanan safsızlıklar olarak nitelendirilmektedir (VICH 2007; 2007a). Ülkemizdeki mevzuatta API tanımı; *"hayvanları hastalıklardan korumak, tedavi etmek, fizyolojik fonksiyonları istenen yönde değiştirmek ve/veya hayvan organizmasındaki organik ve fonksiyonel bozuklukları düzeltmek veya bir hastalığı teşhis etmek amacıyla kullanılan farmakolojik aktif maddeler"* şeklindedir (Anonim 2011). Avrupa Komisyonunun EC 470/2009 sayılı düzenlemesinde ise farmakolojik olarak aktif maddelerin tanımında; hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan API, yardımcı maddeler, degradasyon ürünleri ve onların metabolitleri arasında ayrım yapılmamaktadır (Anonim 2009).

VICH GL11 kılavuzunda VTÜ'lerde bulunmasına izin verilen organik safsızlıklar için limitler belirlenmiştir. Bu kapsamda; degradasyon ürünü olarak tanımlanan API-yardımcı madde reaksiyon ürünleri, API-ambalaj materyali reaksiyon ürünleri ve API'lerin degradasyon ürünlerinin belirli limit aralığında olması öngörülmektedir (VICH 2007a). İlgili kılavuz VICH GL11'de, son üründe % 0,3 (Raporlama limiti) üzerindeki degradasyon ürünü safsızlıkların raporlanmasını, % 1 üzerindeki degradasyon ürünlerinin tanımlanmasını ise zorunlu kılmaktadır. % 1 altındaki degradasyon ürünlerinin tanımlanmasına gerek bulunmamakla birlikte ve sınır değerler

verilmesine rağmen bazı özel durumlarda daha düşük veya yüksek eşik değerlerin uygun olabileceğine de dikkat çekilmektedir. Safsızlıkların olağan dışı etkin, toksik veya farmakolojik etki gösterdiği durumlara bağlı olarak düşük sınır değerler ele alınırken, bazı durumlara göre bilimsel gerekçeler sağlanarak yüksek değerler de kullanılabilmektedir. İlgili rehberlerde kalifikasyon sınırını aşan safsızlıklarda yapının tanımlanması, maruziyet yönünden risk değerlendirmesi yapılması önerilmektedir. VTÜ'ye ait safsızlığın toksisitenin ortaya konamaması durumunda hayvan türü ve ürün kullanım süresi göz önünde bulundurularak genel toksisite ve özel toksisite testlerinin yürütülmesi vurgulanmaktadır. Bu testlerde minimum tarama; gen mutasyon analizini (bakteride ters mutasyon testi) ve *in vitro* kromozomal aberasyon testini içermektedir. İhtiyaç duyulması halinde genel toksisite çalışmaları (tek türde, genellikle 14 veya 90 gün) ve diğer özel toksisite son nokta çalışmalarının da yapılabileceği belirtilmektedir. VICH GL11 nolu kılavuzda pazarlama izni başvurularında degradasyon ürünü safsızlıkların toksisitesinin belgelenmesinde gerekli bilgi içeriği, analitik yaklaşımlar, karar süreçleri ve kalifikasyonu hakkında bilgiler sunulmaktadır. Bu kapsamda degradasyon ürünlerinin tanımlanması ve kalifikasyonu için karar ağacı Şekil 2-2'de verilmiştir (VICH 2007a; EMA 2012).



Şekil 2-2 : Degradasyon Ürünlerinin Tanımlanması ve Kalifikasyonu Karar Ağacı (VICH 2007a; EMA 2012).

Pratik olarak tüm VTÜ'ler, hastanın kabul edebilirliği, stabilitenin iyileştirilmesi, salınımın kontrol edilmesi vb. amaçlarla formülasyona eklenen yardımcı maddeler içerir. Yardımcı maddeler tipik olarak, API'den nispeten küçük miktarlarda mevcut olduğu bir tıbbi ürününün ana bileşenleridir. Tıbbi ürünlerin ana bileşenleri olarak yardımcı

maddeler ilaçların stabilitelerini değiştirebilirler (Elder ve ark. 2016). Ayrıca bir tıbbi ürünün fiziksel ve kimyasal stabilitesi yalnızca API'ye değil, aynı zamanda fiziksel formlara, üretim süreçlerine, etkin-yardımcı madde uyumluluğuna, kap kapak sistemlerine ve nihai ürünün muhafaza koşullarına bağlıdır. Renk, koku, tat, polimorfik form veya kristalizasyon değişikliğine neden olabilecek fiziksel etkileşimler, dozaj formlarının üretimi sırasında sıklıkla meydana gelir. Bu etkileşimler API'nin fiziksel parametrelerinin ve ürün biyoyararlanımının değişimi ile sonuçlanır. Formülasyonlarda inaktif bileşenler olarak görülen yardımcı maddelerin çoğu uygun dozda farmakolojik olarak aktif değildir. Ancak API-yardımcı madde arasındaki kimyasal etkileşimler sonucu meydana gelen reaksiyonlar, ürünlerin stabilitesini etkileyebilir, formülasyon kalitesini değiştirebilen kayda değer API degradasyonuna neden olabilir, farmakolojik olarak aktif yeni bozunma ürünlerinin veya safsızlıkların oluşumuna neden olabilir. Açığa çıkan degradasyon ürünleri API ve tıbbi ürünün terapötik etkinliğini değiştirebileceği gibi toksisiteyle ilişkili olarak güvenirliğini etkileyebilir (Bharate ve ark. 2010; Wu ve ark. 2011; Elder ve ark. 2016; Pindelska ve ark. 2017). FDA'e ait veri tabanında tıbbi ürünler için farmakolojik olarak aktiflik esas alınarak, belirli dozaj formu ve potens için onaylanan konsantrasyon ve formda inaktif olduğu kabul edilen yardımcı maddelere ilişkin bilgiler yer almaktadır (FDA 2020). Avrupa İlaç Ajansı tarafından; VTÜ'lerin jenerik ürünler için referans ürüne karşı risk/fayda değerlendirmesinde biyoeşdeğerliğin ana ilke olduğu vurgulanmaktadır. Bu kapsamda; orijinal ve jenerik ürünler arasında risk/fayda dengesinin benzer olduğunun göz önünde bulundurulduğu belirtilmekle birlikte istisnai koşullarda bu dengenin kısmi olarak yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir (EMA 2007a). Buna ek olarak mevcut/bilinen aktif maddeleri içeren tıbbi ürünlerin kalitesinin değerlendirilmesi hakkında EMA tarafından yayımlanan bildirimde; orijinal ve jenerik ürünlerdeki safsızlıklar ve kullanılan yardımcı maddelerdeki farklılıkların, güvenilirlik ve etkinlik yönünden önemli farklılıkları başlatmaması gerektiği bildirilmekte olup, güvenilirlik yönünden önemli derecede fark olması durumunda biyoeşdeğerlikten bahsedilemeyeceği bilgisine yer verilmektedir (EMA 2009). Özellikle yeni bir yardımcı madde kullanımının, yeni toksisite bilgilerine neden olabileceği hususuna dikkat çekilmiştir (EMA 2007a). VTÜ'lere ilişkin kılavuzlarda yardımcı maddelerin toksisite potansiyeline ilişkin kapsamlı atıflara yer verilmemesine rağmen, beşeri tıbbi ürünlerde kullanılan karsinojenik, mutajenik ve reprotoksik (CMR) potansiyeli olan yardımcı maddelerin tespiti durumunda, yerine başka maddelerin

kullanımı önerilmektedir. Herhangi bir yardımcı maddenin bir API veya yeni bir uygulama şekli ile ilk kez kullanılacak olması durumunda ise API formatında değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle, farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri olan yardımcı maddelerin bitmiş ürün formülasyonu üzerinden güvenilirlik değerlendirmesinin yapılması öngörülmektedir. Yardımcı maddelerin her zaman mümkün olan en düşük miktarda kullanılması önerilmekle birlikte, bilinen yardımcı maddenin yeni bir uygulama yolunda kullanıldığında beklenmeyen reaksiyonlar gözlemlenebileceği de gözardı edilmemelidir. Standart yardımcı madde, bilinen bağlamdan daha yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ise güvenilirlik yönüyle değerlendirilmelidir. Pazarlama izni sürecinde safsızlıkların değerlendirilmesi sadece yeni ilaç API ve ürünleri ile sınırlı değildir. Jenerik ilaçların da üretimleri aşamasında orijinal ilaçtan farklı yapıda ve miktarda safsızlık şekillenebilmekte ve farklılık gösteren safsızlık profillerinin saptanması gerekmektedir (EMA 2007b).

Farmasötik ürünlerin sentezi, sıklıkla reaktif ayıraçların kullanılmasını ara ürünler ile yan ürünlerin oluşumunu içerir (Müller ve ark. 2006). Çok aşamalı, karmaşık bir süreç sonunda üretilen API'lerde, sentezden kaynaklanan düşük ancak kontrollü seviyelerde safsızlık olacağı kabulü, tıbbi ürünler için de geçerlidir. Yardımcı maddelerin seçimi, formülasyon geliştirme, üretim prosesleri ve uygun primer ve sekonder ambalaj seçimini optimize etmek için çalışmalar yapılmasına ve önlemler uygulanmasına rağmen; nem ve oksijenin mevcudiyeti nedeniyle, son üründe sıklıkla hidroliz ve oksidasyon tepkimeleri sonucu bozunma ürünleri açığa çıkabilir (Holm ve Elder 2016; Jacobson-Kram ve McGovern 2007). Daha az sıklıkta olmakla beraber izomerizasyon ve epimerizasyon ile ilişkili bozunma ürünleriyle de karşılaşılması muhtemeldir (Holm ve Elder 2016). Hidrolize duyarlı bir ilacın oral veya parenteral solüsyon formülasyonu geliştirmek için, pH ve tamponların etkilerinin anlaşılması önemlidir (Waterman ve ark. 2002). Amoksilin trihidrat, amoksisilinin serbest baz ve sodyum tuzuna göre daha stabil olmasına rağmen sıcaklık ve neme duyarlıdır. Ayrıca alkol ve poliollerde degradasyon gösterir. Amoksisilin çözeltilerinin yıkımlanma ürünü olarak değerlendirilen pirazinin pH değeri 1-4 arasında olmasına rağmen formaldehit varlığında pH 2-7 aralığında daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (Anonim 2018). Hidroliz mekanizmaları iyi bilinse bile, dozaj formunun heterojenliği, her ürün için formülasyon geliştirmeyi benzersiz kılmaktadır (Waterman ve ark. 2002). Yardımcı maddeler aktif farmasötik bileşenler ile doğrudan etkileşime girebilen fonksiyonel gruplara sahip olabilir. Alternatif olarak, ilaç

maddesinin bozulmasına neden olan safsızlıklar içerebilirler, kalıntılar veya bozunma ürünleri oluşturabilirler. Bu tür istenmeyen ve maliyetli senaryoların olasılığını azaltmak mümkündür. Böyle bir farkındalık, istenmeyen etkileşimleri önceden tahmin ederek bunların meydana gelmesini önlenmesine yardımcı olabilir (Fathima ve ark. 2011). Yardımcı maddelerin nem afiniteleri hidrolizi etkileyebilir. Stabilite çalışmalarının başlatılmasından önce yardımcı maddelerin su içeriğini değerlendirmek yararlı olabilir. Tampon olarak kullanılan yardımcı maddeler, sudan bir protonu çıkarmak için baz görevi görerek baz katalizli hidrolize neden olabilir. Tıbbi ürünlerde yardımcı maddeler sıklıkla yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Böylece küçük bir degradasyon yüzdesi bile tıbbi ürünün özelliklerini, saflığını ve dozaj formunun performansını etkileyebilir (Waterman ve ark. 2002). Bu degradasyon ürünleri formülasyonun kalite, etkinlik ve güvenilirliğini değiştirebilir. Stabil ve güvenilir dozaj formları geliştirme olasılığını artırmak için, erken dönem API-yardımcı madde uyumluluk testleri çok yardımcıdır (Pindelska ve ark. 2017).

API ve tıbbi ürünlerin üretim aşamalarında ürün kalitesini ve tutarlılığını sağlamak için tasarlanmış kontrol stratejisinin bir parçası olarak özel spesifikasyonların takip edilmesi önemli bir süreçtir. Spesifikasyonlar, yasal düzenlemeler esas alınarak üretici tarafından gerekçelendirilen ve önerilen, düzenleyici otoriteler tarafından onaylanan kritik kalite standartlarıdır. Kontrol stratejinin diğer bir bölümünde ise kapsamlı ürün karakterizasyonu; örneğin uygun tesisler, doğrulanmış bir üretim süreci, onaylanmış test prosedürü, hammadde testi, proses içi testler, stabilite testi gibi İyi Üretim Uygulamaları altında gerçekleştirilen kontroller yer alır. Spesifikasyonlar, tam anlamıyla karakterizasyon oluşturmaktan ziyade tıbbi ürünün güvenilirliğini ve etkinliğini sağlamada yararlı olduğu bilinen, tıbbi ürünün kalitesini doğrulamak için seçilen özelliklere odaklanmaktadır (VICH 2005). Spesifikasyonlar oluşturulurken yürütülen çalışmalarda bazı değişikliklerle karşılaşılmaktadır. Bu değişiklikler içerisinde, spesifikasyon kriterlerini karşılayamama önemli değişiklik olarak tanımlanır. Tıbbi ürünlerde fiziksel (görünüm vb.) ve fonksiyonel (tablet sertliği vb.) değişikliklerin dışında, API miktarında % 5'lik değişim, spesifikasyon dışı pH değeri, kabul kriterini aşan herhangi bir degradasyon ürünü oluşumu önemli değişiklik olarak değerlendirilir (VICH 2005). Spesifikasyonlar için evrensel testler, tüm yeni API veya tıbbi ürünlerine potansiyel olarak uygulanabilir olduğu kabul edilen testlerdir. Örnek olarak evrensel testlerden su içeriği, susuz formüle edilen veya sulandırılarak uygulanan parenteral ürünlerin higroskopik olması nedeniyle nemle bozunduğu veya stokiyometrik bir hidrat

olduğu bilindiğinde önemlidir. Kurutma kaybı prosedürü yeterli kabul edilmekle birlikte bazı durumlarda suya özgü daha spesifik bir saptama prosedürü (örneğin, Karl Fischer titrasyonu) tercih edilir (VICH 2005).

Nihai dozaj formundan bağımsız olarak, ilaç çözeltilerinin asidik veya bazik koşullara maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilen zorlamalı degradasyon çalışmaları, birincil hidrolitik ilaç bozunma ürünlerini tahmin etmek için yararlıdır. Bu tür çalışmalar, bozunma ürünlerinin kromatografik olarak tanımlanabilmesini sağlar. Böylelikle stabilite numunelerindeki degradasyon ürünlerinin varlığı tespit edilerek, ürünün hidrolize girme eğilimine dair bazı göstergeler verir (Waterman ve ark. 2002; EMA 2007; 2008; Jamrógiewicz ve Pieńkowska 2019). Hidroliz, izolasyon prosedürlerinde, formülasyon stratejilerinde ve hidrolize uğrayabilen çok sayıda fonksiyonel grupta suyun yaygınlığı nedeniyle ilaç degradasyonunun en yaygın şeklidir. Hidroliz genellikle asit veya bazla katalize edilen bir mekanizma yoluyla gerçekleşir, ancak suyun bir baz görevi görebildiği nötr koşullar altında da meydana gelebilir (Lieberman ve Vemuri 2015). Ürünün belirlenmiş raf ömrü boyunca formülasyon, bileşim veya üretim sürecindeki değişiklikler, yeni bozunma ürünleri oluşumu ile sonuçlanabilir. Mutajenik olarak karakterize edilen potansiyel bir bozunma ürünü için, bozunma yolunun API ve tıbbi ürün üretim süreçleri ve/veya bunların önerilen paketleme ve saklama koşulları ile ilgili olup olmadığını anlamak önemlidir. Potansiyel bozunma ürününün düzeyini belirlemek için, önerilen ambalajda uygun analitik prosedürlerle iyi tasarlanmış bir hızlandırılmış stabilite çalışması (örneğin, 40°C /% 75 bağıl nem, 6 ay) önerilir. Alternatif olarak, daha yüksek sıcaklıklarda iyi tasarlanmış kinetik olarak eşdeğer kısa dönem stabilite çalışmaları, uzun dönem stabilite çalışmaları başlatılmadan önce bozunma yolunun ilişkisini belirlemek için kullanılabilir. Bu tür bir çalışma, özellikle potansiyel bozunma yollarının bilgisine dayanan, ancak henüz tıbbi üründe gözlenmeyen potansiyel bozunma ürünlerinin ilişkisini anlamak için yararlı olacaktır (EMA 2008). Ürünlerin stabiliteleri pH değerlerine göre değişkenlik gösterebilir. Özellikle paranteral ürünlerin stabilitesinin korunmasında önem arz eden pH değerinin vücut sıvılarının pH'da farklılık göstermesi enjeksiyon yerinde presipitasyon, irritasyon ve ağrıyla sonuçlanan istenmeyen etkilere de neden olabilir. Bu problemler genellikle pH, fizyolojik pH'tan önemli ölçüde farklı olduğunda ortaya çıkar. Özellikle pH farklılığına bağlı olarak, enjeksiyon yeri presipitasyonunun ilacın farmakokinetik profilde bir değişikliğe yol açabileceği de göz ardı edilmemelidir (Waterman ve ark. 2002).

Formüle edilmiş üründeki degradasyonun ilaç etkinliği, güvenilirliği ve muhafaza koşulları üzerinde önemli istenmeyen etkileri şekillenebilir. Bu nedenle saptanan degradasyon ürünlerinin tanımlanmasının farmasötik ürün geliştirmede kritik önemi bulunmaktadır (Pan ve ark. 2006). Buna karşın bir API'nin farklı tuzları, esterleri, eterleri, izomerleri, izomer karışımları, kompleksleri veya türevleri, güvenilirlik ve/veya etkinlik yönünden özelliklerinde önemli ölçüde farklılık göstermedikçe, aynı etkin madde olarak kabul edilir (EMA 2017). Bununla birlikte bu moleküller kaynama ve erime noktaları gibi farklı fiziksel özelliklere sahip olabilir. Diasteriomerlerin protein hedeflerine bağlanmalarındaki davranışı çarpıcı biçimde farklılık gösterebilir (Brooks ve ark. 2011).

2.2.1.2. İnorganik Safsızlıklar

Üretim prosesinden kaynaklanan inorganik safsızlıklar kapsamında reaktifler, ligandlar, katalizörler, ağır metaller, diğer artık metaller, inorganik tuzlar ve diğer malzemeler (filtre yardımcıları gibi) bulunabilir (VICH 2007; 2007a). Avrupa farmakopesinde revizyonlar doğrultusunda, monograflardan ağır metal testleri kaldırılarak olası elemental safsızlıkların risk değerlendirmesine yönelik geçiş sürecini içeren düzenlemeler getirilmiştir. Bu kapsamda risk değerlendirmelerinin, üretim prosesinde reaktif ve katalizör amaçlı kullanılan element safsızlığı bulunan tüm ürünler için 2021 yılına, piyasaya arz edilen tüm VTÜ'ler için ise 2022 yılına kadar adapte edilmesinin gerekliliği belirtilmiştir (EDQM 2016; EMA 2020).

2.2.1.3. Çözücü Kalıntısı Safsızlıklar

Çözücüler, ilaç maddesinin sentezinde çözeltilerin veya süspansiyonların hazırlanması için bir araç olarak kullanılan inorganik veya organik sıvılardır. VTÜ'lerin, aktif ve yardımcı maddelerin sentez ve üretim prosesinde kullanılan organik uçucu kimyasallar ise son üründe çözücü kalıntısı olarak tanımlanmakta olup, toksisite riski nedeniyle kalite kontrolü yapılan safsızlıklar kategorisinde yer almaktadırlar. Bunlar; bilinen insan karsinojenleri, güçlü şekilde karsinojen olduğundan şüphelenilen ve çevresel tehlike oluşturduğundan sakınılması gereken çözücüler (Class 1), genotoksik olmayan hayvan karsinojenleri, teratojenite ve nörotoksisite gibi geri dönüşümsüz toksik etkisi muhtemel ajanlar ile geri dönüşümlü fakat ciddi toksisiteden şüphelenilen ve sınırlanması gereken çözücüler (Class 2) ve düşük toksik potansiyeli bulunan çözücüler

(Class 3) olarak sınıflandırılır. Çözücü kalıntılarının herhangi bir terapötik yararı olmadığı için ürün spesifikasyon, iyi üretim uygulamaları ve diğer kalite gerekliliklerini karşılayabilmek için mümkün olduğunca uzaklaştırılması gerekir. İlaç maddelerinin üretim prosesinde kullanılan çözücü kalıntılarının kontrolü VICH GL18 kılavuzuna göre gerçekleştirilir (VICH 2011).

2.2.1.4. Safsızlıklarla İlişkili Diğer Hususlar

Uluslararası ilaç otoriteleri tarafından yayımlanmış ve safsızlıklara yönelik yaklaşımlarda temel olan VICH GL11 ve GL12 kılavuzlarında, API ve Tıbbi Ürünlerindeki safsızlıklar üstte de belirtildiği gibi temelde üç kategoride (organik, inorganik ve çözücü kalıntıları) sınıflandırılmıştır. Ancak mevcut kılavuzların güncellenmesiyle, temel sınıflandırma çeşitlendirilerek günümüzde ilave safsızlık gruplarına (sterokimya ve yabancı kontaminantlar gibi safsızlıklar) da yer verilmiştir (VICH 2007; 2007a). Aşağıdaki hususlar tez çalışması kapsamına girmemekle birlikte, safsızlıkların ele alınmasına ilişkin geniş perspektifi özetlemesi amacıyla verilmiştir.

Kimyasal tepkime sonucu DNA hasarını indükleme potansiyeli bulunan maddeler, DNA reaktifler olarak tanımlanmakta olup, uygun test yöntemleriyle mutajenik potansiyeli gösterilen safsızlıklar, DNA reaktif (Mutajenik) safsızlık olarak isimlendirilmektedir. Tıbbi ürünlerde saptanmaları durumunda ise düzeylerinin toksikolojik kaygı eşiğinin altına indirilmesi gerekmektedir (EMA 2018). Bilinen mutajenik karsinojenler için (Class I) bileşene özgü kabul edilebilir limit, karsinojenik potansiyeli bilinmeyen mutajenler için (Class (II) toksikolojik kaygı eşiğinin altına indirme, mutajenite verisi bulunmayan, API ile ilişkisiz safsızlıklar için (Class (III) yapı-aktivite ilişkisi değerlendirmesiyle bakteri ters mutasyon testi (AMES) yürütülerek pozitif bulunması halinde toksikolojik kaygı eşiğinin altına indirme ve mutajenik potansiyeli aydınlatmak için opsiyonel olarak *in vivo* testler ile ileri tehlike değerlendirmesi önlemleri uygulanır (EMA 2018). 2018 yılında beşeri ürün olarak hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan valsartan etkin maddeli ilaçların bazı serilerinde mutajenik safsızlık tespit edilmesi nedeniyle başlayan süreçte, tıbbî ürün serilerinde geri çekme uygulanmış olup, safsızlık profili çalışmaları kapsamında üründe beklenmeyen safsızlık olarak N-Nitrozodimetilamin (NDMA) tespit edilmiştir (EMA 2018b; FDA 2018; Türkiye İlaç ve Tıbbî Cihaz Kurumu [TİTCK] 2018). Genişletilen

çalışmalar ile tetrazol grubu içeren ajanlar valsartan, losartan, irbesartan, H2 reseptör antagonisti ajanlar ranitidin ve nizatidine, oral antidiyabetik ajan metformin API'leri içeren bazı beşeri tıbbî ürün serilerinde, mutajenik safsızlık olarak NDMA, N-Nitrozodietilamin (NDEA), N-Nitroso-N-Metil-4-Aminobütirik asit (NMBA) tespit edildiği bildirilmiştir (FDA 2018; EMA 2019a; WHO 2019; FDA 2020a;). Bu gelişmeler üzerine safsızlıkların kök nedenlerinin araştırma çalışmaları ile politika geliştirme çalışmalarının devam ettiği bildirilmiş olup, farmasötik kullanım amaçlı maddelerde Ph.Eur. genel monografında nitrozamin safsızlıklarının kontrolüne dair güncelleme süreci başlatılmıştır (EDQM 2019).

Ambalaj materyalinden sızabilir *(Leachable)* safsızlıklar, ürün formülasyonunun direk temas halinde bulunduğu ambalajdan ürüne geçen safsızlıklar, ekstrakte edilebilir *(Extractable)* safsızlıklar ise ambalajdan uygun çözücüler kullanılarak elde edilen safsızlıklardır. Plastik ambalaj materyallerinden sızabilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve nitrozaminler gibi toksik maddelerin izlenmesi amacıyla testler gerçekleştirilmektedir. Enjeksiyonluk çözelti formundaki ürünler için ürün-ambalaj etkileşim çalışması yapılır. Farmakopede tanımlanmayan materyaller için ek olarak ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirilerek toksikolojik potansiyel ortaya konulmaktadır (EMA 2005; FDA 2011).

Stereokimya, bir molekülün üç boyutlu görünümüdür. İlişkili bileşikler; "benzer kimyasallara sahip olan bileşikler", API'lerde safsızlık olarak kabul edilir. Günümüzde kiral maddelerin tek enantiomerik formu daha iyi farmakolojik ve daha yüksek bir terapötik indeks profil ile gelişmiş bir kimyasal madde olarak kabul edilmektedir. İzomer safsızlıklarına en çarpıcı örnek Talidomid'dir. Talidomid'in iki izomeri vardır. (R)-(+) Talidomid sedatif ve hipnotik etkiye sahipken (S)-(-) Talidomid mutajenik aktivite gösterir (ACS 2014; Vargesson 2015; Dhangar ve ark. 2017).

Kristalizasyon, ilaç endüstrisinde partikül formasyonu için önemli bir teknolojik süreçtir. Buna ek olarak, nihai dozaj formlarının stabilitesi ve ilaç salım özelliklerini tanımlamada çok önemli bir rol oynar. Yarı sentetik olarak üretilen antibiyotik ampisilin'in kristalizasyonla ilişkili safsızlıkları fenilglisin ve 6-aminopenisilanik asit API ve üründe olumsuz etkiye sahiptir. Bu nedenle API ve degradasyona uğrayan tıbbi ürünlerde kontrol edilir (Dhangar ve ark. 2017).

Ph.Eur'e göre bitkisel kaynaklı ürünler, karsinojenik etkileri ortaya konan aristolohik asit, pirolizidin alkaloidleri ve aflatoksinler ile kontamine olma riski taşımakta

ve bu maddeler son üründe safsızlık olarak değerlendirilmektedir (Ph.Eur. 2020c; 2020d; 2020e).

Biyolojik ve biyoteknolojik ürünler için ise konak hücre DNA'sı, hücre kültürü medyum bileşenleri, enzimler, ligandlar, izomerizasyon, asetilasyon, metilasyon, glikolizasyon gibi modifikasyonlar meydana gelebileceği için, safsızlık profili daha karmaşık olabilmekte ve daha fazla safsızlık meydana gelebilmektedir. Bu safsızlıkların VTÜ'lerden ayrı düzenlemeler ile kontrolü sağlanmaktadır (Anonim 2011a).

Tıbbi ürünlerde gaz ile sterilizasyon amacıyla alkilleyici ve oksitleyici olarak 2 ana kategoride ajanlar kullanılmaktadır. Alkilleyici ajanlar oldukça reaktif bileşenler olup nükleik asitlerin pürin bazları, proteinlerin amino, sülfidril ve hidroksil gruplarıyla etkileşir. Alkilleyici ajan etilen oksit sitotoksik, karsinojenik ve mutajenik etkilere sahiptir. Oksitleyici ajanlar oldukça reaktif ve toksik bileşikler olup hidrojen peroksit ve perasetik asidi içeren ajanlar halihazırda kullanılmaktadır (EMA 2019).

Tıbbi ürünlerin tip II varyasyonları, etkinlik, güvenilirlik ve kalite üzerinde kayda değer etkiye sahip olabilen majör değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Varyasyon başvurularında en az 2 seri stabilite verisi yeterli görülmekle birlikte, bitmiş ürünün stabilitesinde etkisi olabilen API'lerin safsızlık profilinde değişiklik meydana gelmesi durumunda en az 3 seri uzun dönem ve hızlandırılmış stabilite verisi gerekmektedir (EMA 2014).

Birleşmiş Milletler (The United Nations [UN]) Silahsızlanma Araştırmaları Enstitüsü (Institute for Disarmament Research [UNIDIR] tarafından, toksisitesi yüksek olduğu bilinen savaş ajanı kimyasalların safsızlıkları ve bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktar tayini için üye ülkelerde laboratuvar kapasitesinin geliştirilmesi önerilmektedir (UN 2019).

2.2.2. Safsızlık Çalışmalarının Amacı

Safsızlık çalışmaları; API ve tıbbi ürünlere dair yönetmelik gerekliliklerinin ve bilimsel/teknik taleplerin (Tablo 2-1) yerine getirilmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir (Liu and Chen 2019).

Tablo 2-1: Safsızlık Çalışmasının Amaçları (Liu ve Chen 2019).

Yönetmelik Gereklilikleri	Bilimsel/Teknik Talepler
• Ürünün kalite ve güvenirliği • Metot validasyonu • Kabul kriterlerinin tesbiti • Son kullanım/retest tarihi, raf ömrünün değerlendirilmesi • Stabilite ve depolama koşulları çalışması • Eşik sınırların değerlendirmesi (toksikolojik endişe eşiği ve izin verilen günlük maruziyet gibi)	• Sentez ve ürün proses optimizasyonu • Formulasyon geliştirme ve optimizasyonu • Etkinliğin geliştirilmesi • Farmakokinetik ve toksikoloji çalışmaları • Referans materyallerin üretimi • Stabilitenin iyileştirilmesi • Degradasyon ürün/yolaklarının tahmini • Maliyetin dikkate alınması

Bu çalışmalar ile API ve tıbbi ürünlerin pazarlama ve satış izni olanakları dışında, bilimsel temele dayalı yaklaşımlar ile analitik metot geliştirilmesi, potansiyel degradasyon ürünlerinin tahmini, sentez yöntemi ve formülasyonun gelişimi, ilaç ürünlerinin daha iyi koşullarda saklanması ve stabilitesinin korunması, degradasyon ürün/yolakları hakkında bilgi edinme ve deneysel metotların özgünlüklerinin değerlendirilmesi gibi olanaklar doğabilmektedir (VICH 1998a; Alsante ve ark. 2014; Liu ve Chen 2019).

2.2.3. Safsızlıkların Tespiti için Kullanılan Analitik Yöntemler

İlaç endüstrisinde ilaç geliştirme sürecinin tüm yaşam döngüsü boyunca analitik test ve kontrol stratejisi kritik bir rol oynar (Wang ve ark. 2015). API'lerin ve tıbbi ürünlerinin saflığı, farmasötik kalitenin bir göstergesi olup, tedavinin güvenilirliğini doğrudan etkiler. Etkin madde ve tıbbi ürünlerin safsızlık profillerinin çeşitli analitik yöntemlerle belirlenmesi, farmasötik kalitesinin ve tedavi güvenilirliğinin değerlendirilmesi açısından önemli bir aşamadır. Tanımlama ve miktar tayinine yönelik analizler doğrultusunda ürünlerdeki safsızlıkların istenmeyen etkileri ve düzeyleri kontrol altına alınabilmektedir (Dhangar ve ark. 2017; Liu ve Chen 2019).

Son 25 yıldan önceki klasik farmasötik analiz döneminde safsızlık analizleri, gelişmiş analitik yöntemlerin bulunmaması nedeniyle ihmal edilmiştir. Analitik yöntemlerin geliştirilmesi ile kalite standardizasyonu için devrim niteliğinde olan safsızlık profilinin tanımlanması mümkün olmuş, API ve tıbbi ürün düzenlemelerine ait

güncel kılavuzlarda safsızlıkları izole etmek ve karakterize etmek zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde, ilaç etken maddelerinin safsızlık profilleri kromatografik, spektroskopik ve titrasyon temeline dayalı teknikler ile belirlenebilmektedir. Bu kapsamda element safsızlıkların analizi için indüktif eşleşmiş plazma/atomik emisyon spektrometri ve atomik absorbsiyon spektrometre (ICP MS/AES), uçucu organik safsızlıklar için gaz kromatografi kütle spektrometri kullanılabilirken (GC-MS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)'ın kullanımı API ile kimyasal olarak ilişkili safsızlıkların varlığı/yokluğunun tespitinde fonksiyoneldir. Bunlarla birlikte daha karmaşık analizlerde likit kromatografi nükleer manyetik rezonans (LC-NMR), likit kromatografi kütle/kütle spektrometri (LC-MS/MS), gaz kromatografi alev iyonlaşmalı/kütle spektormetre (GC-FID/MS), kapiller elektroforez kütle spektrometri (CE-MS) gibi yöntemlerin kombinasyonu kullanılır. USP ve Ph. Eur'daki monografların neredeyse tamamında safsızlık kontrollerine yönelik çeşitli yöntemlere yer verilmiştir. Bu kapsamda, en sık kullanılan yöntem HPLC'dir (Görög 2006; 2007; 2012; Emerce Gürsel 2013; Dhangar ve ark. 2017; Liu ve Chen 2019). HPLC yöntemi; miktar tayini, çözünme analizi, safsızlık profili, zorlamalı degradasyon, proses kontrolleri ve ilaç metabolizması çalışmaları dahil olmak üzere farmasötik analizin tüm yönlerinde kullanılır (Wang ve ark. 2015).

Farmakopelerde ilaç API'lerinin tanımlanmış safsızlıkları hakkında bilgilere ulaşılmakla birlikte tanımlanmayan nitelikte olan çoğunluğu degradasyon (bozunma-yıkımlanma) ürünü olarak açığa çıkan safsızlıkların ise duyarlı analitik yöntemlerle belirlenmesi gereklidir (VICH 1998; 1998a; 2007b). Tanımlama ve tayin amacıyla kullanılan bu yöntemler günden güne gelişmekte olup, yeni nesil kolonlar (monolitik, kiral, core-shell, poroshell, fused core vb.) ve çeşitli ekstraksiyon teknikleri ile birlikte, FT-IR, farklı dedektörlere sahip sıvı (UV, DAD, FL, RI, PAD, ELSD, CAD vb.), süperkritik akışkan (SFC), ince tabaka (TLC), gaz (Headspace FID, MS-MS vb.) kromatografi, farklı iyonizasyon teknikleri ile birlikte (Kimyasal, Elektrospray, Electron impact, MALDI, FAB, TSP, FB-FI) plazma ve kütle spektrometri (ICP-MS, LC-HR-MS/MS, MALDI-TOF-MS, IMS-MS vb.), nükleeer manyetik rezonans (NMR) ve kapiller elektroforez yöntemlerini veya bu yöntemlerin kombinasyonunu içerir (Pilaniya ve ark. 2010; Maggio ve ark. 2014; Holm ve Elder 2016; Liu ve Chen 2019; Abdin ve ark. 2020).

2.3. Tıbbi Ürün Safsızlıklarının Genetik Toksikoloji Yönünden Değerlendirilmesi

Genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen toksikolojinin alt dalıdır ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Bu kapsamda endüstriyel kimyasallardan, pestisitler, biyositler, gıda katkı maddeleri, kozmetikler, beşeri ve veteriner tıbbi ürünlere kadar bir çok ürünün DNA hasarı oluşturma ve karsinojenik etki potansiyelleri incelenerek insan ve hayvan sağlığına katkı sağlanabilmektedir. Yeni ilaç moleküllerinin ruhsatlandırma öncesinde olası mutajenik ve genotoksik etkilerinin araştırılması ve sağlık açısından risklerin kabul edilir düzeye indirilmesi yasal bir zorunluluktur (Ziegelbauer ve ark. 2009; Gosar ve ark. 2018). Benzer şekilde tıbbi ürünlerin hidrolize olabilen su, küçük miktarda elektrofil ve oksidasyonu katalizleyen metaller gibi reaktif türler içerebilme potansiyelleri nedeniyle mutajenik ve genotoksik yönlerinin araştırılması, meydana gelebilecek risklerin kabul edilir düzeye indirilerek güvenilirliğinin değerlendirilmesi son derece önemli kabul edilmektedir (Pilaniya ve ark. 2010).

Kimyasalların toksikolojik risk değerlendirmesi tipik olarak dört adımdan oluşur:

1. Tehlike tanımlama (örn. belirli koşullar altında maruziyet doğal olarak olumsuz etkilere sahip olabilir).

2. Tehlike karakterizasyonu (toksikokinetik, etki mekanizmaları ve doz-yanıt ilişkileri gibi tehlikenin doğasının kalitatif ve kantitatif şekilde açıklaması).

3. Maruziyet değerlendirmesi (Belirli bir popülasyonun belirli bir maddenin ne kadarına maruz kalacağı kantitatif soruyu ele alır.)

4. Risk karakterizasyonu (kanıtların birleştirilmesi, muhakeme, diğer adımlarında elde edilen ve toplanan sonuçlar ile çeşitli belirsizlikleri de gözönünde bulundurarak belirli bir popülasyonda istenmeyen etkilerin ortaya çıkma olasılığının tahmini hesabı) (Cartus ve Schrenk 2017).

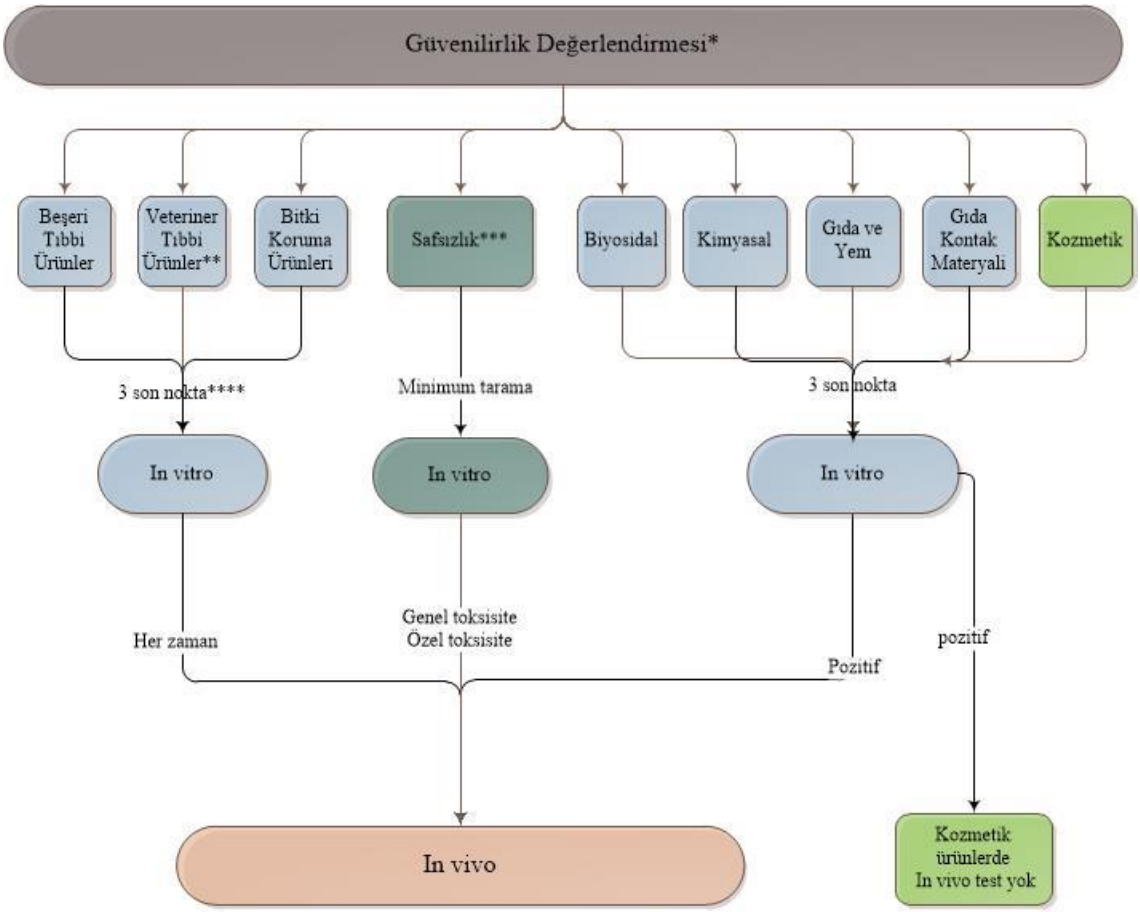
Eksojen maddelerin organizmaya etkilerinin değerlendirilmesinde iki tür genetik toksikoloji çalışması önemli kabul edilir; bir sonraki hücre nesline aktarılabilen, DNA'da geri döndürülemez doğrudan hasarı ölçenler (mutajenite) ve DNA'ya erken, potansiyel olarak geri döndürülebilir etkileri veya genomun bütünlüğünün korunmasında yer alan mekanizmaları ölçenler (genotoksisite). Mutajenite, genotoksisitenin bir bileşenidir.

Mutajenite, DNA ve/veya kromozomal yapıyı değiştiren ve sonraki nesillere aktarılan olaylarla sonuçlanır. Genotoksisite daha geniş bir terimdir. Mutajeniteyi içerir. Bir hücre veya soyundaki yapı veya bilgi içeriğinde kalıcı veya kalıcı olmayan değişikliklere yol açabilen DNA hasarını içerir. Bu nedenle, genotoksisite testleri, DNA'da indüklenen hasarı değerlendiren testleri de kapsamaktadır (Kirsch-Volders ve ark. 2003; OECD 2015). Bu testler ile DNA'da oluşan, geri dönüşümlü birincil hasarların ölçümü, geri dönüşümsüz hasarlara neden olarak germ hücrelerinde meydana gelen, sonraki jenerasyonlara aktarılabilen gen mutasyonları ile yapısal ve sayısal kromozom anomalileri saptanabilmektedir (VICH 2014; OECD 2015). Tıbbi ürün üreticileri tarafından bu çalışmaların İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practices [GLP]) koşullarında gerçekleştirilmesi gerekmektedir (EMA 2018).

Son 10 yılda genotoksisite testi için stratejileri optimize etmek amacıyla dünya çapında önemli faaliyetler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda çeşitli *in vitro* testler geliştirilmiş ve genotoksisiteyi tahmin etmek için başarıyla kullanılmıştır. Ancak mevcut olarak hayvan testlerinin tamamen yerini alması düşünülemez. Mevcut *in vitro* yöntemler, yüksek hassasiyet sayesinde düşük hatalı negatif oranına sahipken, nispeten düşük özgüllük nedeniyle yüksek hatalı pozitif oranına sahiptir. Hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuçlar, bu sonuçların doğrulanması için gereksiz yere *in vivo* takip testlerini başlatmaktadır (Corvi ve Madia 2017). Pozitif *in vitro* sonucu değerlendirmek için *in vivo* testler yürütülür. Bu sonuçların bir kısmı *in vivo* genotoksisite veya kemirgen karsinojenite verileri ile karşılaştırıldığında yanıltıcı sonuçlarla karşılaşılmaktadır (Fowler ve ark. 2012). Bu yanıltıcı pozitif sonuçlar çeşitli nedenlerin tanımlanmasına neden olmuş ve artık bunları sınırlamanın, p53-yetkin insan hücreleri kullanılarak, hücre proliferasyonuna dayalı olarak sitotoksisite ölçümlerinin seçilmesi, İyi Hücre Uygulamaları altında araştırmaların yürütülmesi, hücrelerin kaynak ve karakterizasyonunun dikkatlice kontrol edilmesi ve azaltılmış maksimum konsantrasyonda test gerçekleştirilmesi ile mümkün olduğu bilinmektedir (Fowler ve ark. 2012; Lorge ve ark. 2016; Corvi ve ark. 2017). *In vivo* genotoksisite deneyleri için kullanılan en yaygın hedef hematopoietik hücreler gibi hızla çoğalan ve mikronükleus gibi sitogenetik son noktaların ölçümüne izin veren hücre popülasyonlarıdır. Genotoksisiteyi değerlendirmek için eşit derecede önemli hedef organ, reaktif olmayan kimyasalların reaktif metabolitlere metabolik aktivasyonu için birincil bölge olan

karaciğerdir. Bununla birlikte, bu organ terminal olarak farklılaşmış sitogenetik son noktaların değerlendirilmesi için hazır olmayan hücreler içerir (Morita ve ark. 2015).

Genotoksik tehlikenin değerlendirilmesinde genel olarak, sırasıyla *in siliko* tarama testlerinden, *in vitro* test dizilerinden ve ihtiyaç durumuna göre *in vivo* test sistemlerinden yararlanılmaktadır (Beedanagari ve ark. 2014; Corvi ve Madia 2017). *In siliko* tarama testlerinde kullanılan yapı aktivite ilişkisi (SAR) yaklaşımı bir molekülün yapısının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden sorumlu özellikleri içerdiğini varsayar. Kimyasalı, 2 boyutlu yapısı olan bir veya daha fazla tanımlayıcıyla sunma yeteneğine dayanır. Bu çalışmalarda belirsizlik, moleküler düzeyde farklılıkların nasıl tanımlanacağıdır; çünkü her tür aktivite farklı moleküler benzerliklere bağlı olabilir (OECD 2020). Genotoksik tehlikenin değerlendirmesinde benzer metodoloji ile farklı yaklaşımlar takip edilmektedir. Endüstriyel kimyasallar ve biyosidal ürünler için *in vitro* testlerin pozitif sonuç vermesi halinde *in vivo* testlere ihtiyaç duyulurken, kozmetik ürünlerde bir tek testte pozitif sonuç elde edilmesi yeterlidir. Gıda katkıları için negatif sonuç alınması halinde ilave testlere gerek duyulmamakta birlikte *in vitro* testlerin pozitif sonuç vermesi durumunda *in vivo* test sonuçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Tıbbi ürünler ve bitki koruma ürünlerinin ruhsat alabilmesi için her koşulda *in vitro* testleri takiben *in vivo* testlerin uygulanması zorunludur. Safsızlıkların kontrolünde, degradasyon ürünlerinin tanımlanması ve kalifikasyonu sağlanır. Uyarıcı yapısı bulunan, API yapısına benzemeyen, mutajenite bilgisi olmayan safsızlıklar için AMES testi yürütülür. Pozitif sonuç vermesi durumunda *in vivo* test opsiyoneldir. Negatif sonuç mutajenik olmayan safsızlık olarak değerlendirilir. Maddelerin güvenilirlik değerlendirmesinde izlenecek yol Şekil 2-3'de sunulmuştur (VICH 2009; European Food Safety Authority [EFSA] 2011; VICH 2014; Corvi ve Madia 2017).



*Bilinmeyen veya güvenilirlik verisi bulunmayan maddeler için kantitatif yapı aktivite ilişkilerinin değerlendirilmesi (QSAR), tüm çalışmalarda yol gösterici olmaktadır.

**Veteriner tıbbi ürünlerin gıdalardaki kalıntıları da aynı şekilde değerlendirilir.

***Uyarıcı yapısı bulunan, etkin madde yapısına benzemeyen, mutajenite bilgisi olmayan safsızlıklar için AMES testi yürütülür. Pozitif olması halinde in vivo test opsiyoneldir. Negatif sonuç mutajenik olmayan safsızlık olarak değerlendirilir.

****Beşeri tıbbi ürünler için 2 opsiyon bulunmaktadır;
-2 in vitro + 1 in vivo
-1 in vitro (AMES) + 2 farklı dokuda 2 son noktanın değerlendirilmesi

Şekil 2-3 : Maddelerin Güvenilirlik Değerlendirmesi (VICH 2009; EFSA 2011; VICH 2014; Corvi ve Madia 2017).

API'lerdeki safsızlıkların kontrolü için 2007 yılında yayımlanan VICH GL10 nolu kılavuz ile birlikte Ph.Eur. monografları uygulanmaktadır. VTÜ'lerde degradasyon ürünü safsızlıkların kontrolü için yine 2007 yılında yayımlanan VICH GL11 nolu kılavuz esas alınmaktadır. VICH GL11'de, VTÜ'lerde saptanan degradasyon ürünlerinin % 1 eşiğini aştığı durumlarda tanımlanması ve kalifikasyonu önerilmektedir (VICH 2007; 2007a). 2018 yılında EMA tarafından yayımlanan Veteriner Tıbbi Ürünlerde DNA Reaktif (Mutajenik) safsızlıkların değerlendirilmesi ve kontrolü kılavuzuna göre, VICH GL10/11

tanımlama eşiğinin altında bulunan degradasyon ürünleri de mutajenite değerlendirmesinde potansiyel bozunma ürünleri olarak kabul edilmektedir. Bu durumda bakteri mutajenite ve karsinojenisite yönünden veritabanı ve literatür taraması yapılarak tehlike tanımlanması ve risk karakterizasyonu önerilmektedir. Veri bulunamaması durumunda kantitatif yapı aktivite ilişkisine dayalı değerlendirilmesi önerilmektedir. Yapısal uyarı (Structural alert) ve karsinojenik-mutajenik potansiyelini göstermek için yeterli veri bulunmayan veya API ile benzer şekilde yapısal uyarı bulunmakla birlikte mutajenik olmadığı gösterilen safsızlıklar, mutajenik olmayan safsızlık olarak kabul edilmektedir. Mutajenite ve karsinojenite potansiyeli taşıyan safsızlıklara yönelik kabul edilebilir alım miktarını türetmede iki temel risk karakterizasyon yöntemi kullanılması önerilmektedir. Bu yöntemler toksikolojik endişe eşiği (TTC) ve kabul edilebilir alım (ADI) bazlı bileşen spesifik risk karakterizasyonu ana başlığı altında sunulmaktadır. TTC'ye göre sınıf 2 ve sınıf 3 safsızlıklar için 0,025 µg/kg/gün hesabına göre limit oluşturulmaktadır. Tercihen gözlenebilen hiçbir (yan) etki göstermeyen düzeyden (NO(A)EL) izin verilen günlük maruziyet (PDE) türetilmektedir (EMA 2018).

Veteriner sağaltımda kullanılan API safsızlıklarına yönelik sınırlı sayıda bilgi bulunmakta olup, API'lerde safsızlık limitleri toksisite verilerine göre belirlenmektedir. VTÜ'lerde yaygın olarak kullanılan amoksisilin, ampisilin, sefaleksin, sefapirin, sefazolin, seftriakson, sefuroksim, kloksasilin, dikloksasilin API'lerinde potansiyel safsızlık N,N-dimetilanilin için maksimum 20 ppm limiti bulunmakta olup N,N-dimetilanilin, Avrupa Kimyasallar Ajansı (European Chemical Agency [ECHA]) tarafından karsinojenik olduğundan şüphelenilen madde sınıfındadır (Ph.Eur. 2019, ECHA 2020a;). Benzer şekilde 2,6-Ksilidin, veteriner hekimlikte lokal anestezik olarak kullanılan lidokain'in metaboliti olup *in vivo* koşullarda genotoksik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. 2,6-Ksilidin ayrıca veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ksilazin'in farmakope monografında A olarak tanımlanmış safsızlığıdır ve % 0,01 limitle kontrolü gerekmektedir (EMA 2015; Ph.Eur. 2019a). Sülfametaksazol API'lerindeki dapson safsızlıklarına uzun dönem oral maruziyet karsinojenik etki göstermiş olup % 0,1 limiti bulunmaktadır. Diğer sülfonamidlerin de dapson safsızlıkları ile kontamine olabileceği, bu nedenle takip edilmesi bildirilmiştir (EMA 2012a).

2.3.1. Genotoksisite Testleri

API ve tıbbi ürünler ile safsızlıkların genotoksisite potansiyellerinin değerlendirilmesi için uluslararası geçerliliği olan test sistemlerinden yararlanılmaktadır. Toksisitesi bilinmeyen safsızlıklar için hayvan türü ve ürün kullanım süresi göz önünde bulundurularak genel ve özel toksisite testleri yürütülür. *In vitro* testlerin pozitif veya şüpheli sonuçlar vermesi durumunda safsızlığın bir *in vivo* gen mutasyon yöntemi ile test edilmesi tavsiye edilir. Dolayısı ile *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri, düşük dozlardaki genotoksik kimyasalların risk değerlendirmesi için kritik öneme sahiptir (EMA 2018; Nohmi 2019). Bu kapsamda; genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; AMES (OECD 471), kromozom aberasyon (OECD 473), memeli mikronükleus (OECD 487), memeli eritrosit mikronükleus (OECD 474), memeli kromozom kemik iliği aberasyon (OECD 475), transgenik rodent germ ve somatik hücre gen mutasyon (OECD 488) ve memeli alkali comet (OECD 489) testleridir. Bununla birlikte test maddesinin fizikokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak farklı test yöntemleri de kullanılmaktadır (VICH 2007a; 2014, Corvi ve Madia 2017; EMA2018).

2.3.1.1. Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi

DNA reaktif safsızlıklar kılavuzunun (EMA 2018) odak noktasını, düşük seviyelerde mevcut olduklarında bile doğrudan DNA hasarına yol açarak kanser oluşturma potansiyeline sahip maddeler oluşturmaktadır. Bu tip mutajenik karsinojenler, genellikle bakteriyel ters mutasyon testi ile tespit edilebilirler. Tıbbi ürünlerde safsızlıklar eşik limitlere sahiptir ve izin verilen düzeylerde bulunması karsinojenik risk oluşturmaz. İlaç etken madde ve ürünlerindeki safsızlık seviyeleri izin verilen düzeylerde kontrol edilemediğinde, bakteriyel mutajenite testinin uygulanması öngörülür. Bakteriyel ters mutasyon testi hızlıdır, ucuzdur ve nispeten gerçekleştirilmesi kolaydır. Test suşlarının birçoğu, onları mutasyonların saptanması için daha hassas hale getiren çeşitli özelliklere sahiptir. Test suşlarının özgüllüğü, genotoksik ajanlar tarafından indüklenen mutasyon tipleri hakkında bazı yararlı bilgiler sağlayabilir. Çok çeşitli yapılar için geniş bir veri tabanı mevcuttur ve uçucu bileşikler de dahil olmak üzere farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip maddeler AMES ile test edilebilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; OECD 2020a).

AMES/*Salmonella* test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde test parametreleri açısından iyi standardize edilmiş, mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği kabul edilmiş, duyarlılığı yüksek, canlı hayvan kullanımına gerek olmaksızın uygulanabilen bakteriyel test sistemlerinden biridir. Ucuz, uygulanabilirliği hızlı ve diğer testlere göre kolay olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir testtir. AMES testi ile hemen hemen tüm yeni farmasötik ve kimyasal maddeler test edilir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; Föllmann ve ark. 2013).

Bakteriyel ters mutasyon testi ile bir veya birkaç DNA baz çiftinin yer değiştirmesini, eklenmesini veya silinmesini içeren nokta mutasyonlar saptanabilmektedir. Nokta mutasyonları birçok insan genetik hastalığının sebebidir ve onkojenlerdeki nokta mutasyonlarının ve somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinin insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda rol oynadığına dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. Kontrol grubuna kıyasla test kimyasalıyla işlenmiş besiyerinde artan sayıda geri dönüşlü koloni, test kimyasallarının mutajenik potansiyelinin bir göstergesidir. Testin prensibi, *S. typhymurium*'un, yapay olarak mutasyona uğratılarak histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinsiz ortamda çoğalması esasına dayanır. Geri dönüşlü bakteriler, ana test suşu tarafından gerekli olan amino asidin yokluğunda büyüme yetenekleri ile tespit edilir. Ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; OECD 2020a). Uluslararası referans niteliğinde olan bu testin uygulanma prensipleri hakkındaki bilgiler OECD 471 kılavuzunda ayrıntılı olarak sunulmuştur (OECD 2020a). TA 98 ve TA 100 suşları mutajenik potansiyelin tespiti için genel tarama yöntemi olarak önerilmektedir (Mc Cann ve ark. 1975).

2.3.1.2. Tek Hücreli Alkalen Jel Elektororezi (Comet) Testi

Genetik hasar, oksidatif solunum ve metabolizmanın bir sonucu olarak hücrelerde endojen olarak meydana gelen doğal bir olaydır, ancak bu hasar, tüm hücrelerde bulunan çeşitli DNA onarım süreçleri ile sürekli olarak onarılmaya çalışılmaktadır. Bununla birlikte, hasarlar onarım süreçlerinden çok büyük hale geldiğinde, genetik lezyonlar

birikir. Apoptoz, değişmiş hücre bölünmesi, proliferasyonu, DNA replikasyonu, karsinogenezle sonuçlanan mutagenez gibi çok çeşitli olumsuz sonuçlara yol açabilir. Karsinogenez çok adımlı bir süreçtir, ancak DNA hasarı karsinojenezin başlamasında önemli bir rol oynar. Bir karsinojen veya aktif metabolite DNA'ya bağlanır; onarılabilir veya hücre bölünmesini takiben mutasyon olarak sabit hale gelerek DNA sekansında kalıcı değişiklikleri başlatır (Beedanagari ve ark. 2014; Plošnik ve ark. 2016).

DNA'da kuyruk terimi ilk kez Östling ve Johanson (1984) tarafından Cook ve ark. nükleoid modeline atıf yaparak kulanılmıştır. Singh ve ark (1988) tarafından revize edilen tek hücreli alkalen jel elektroforezi (Comet testi), DNA hasarının belirlenmesinde standart testlerden birisi olmuştur. Comet testi ile tek veya çift zincir kırıkları tespit edilebilir. Herhangi bir dokuya ait hücrelerde veya ölümsüz hücre hatlarında yürütülebilir. Düşük seviyedeki DNA hasarını ve test materyaline yanıtta hücreler arası farklılıkları ölçmede duyarlılığı, az sayıda hücre gerekliliği, düşük maliyeti, uygulama kolaylığı, göreceli olarak kısa süreli oluşu ve az miktarda test materyali ile çalışılabilmesi yöntemin üstünlüğü olarak kullanım alanlarını artırmaktadır (Singh ve ark. 1998; Tice ve ark. 2000; Collins 2004; Singh 2016). Comet yöntemi; alkali pH koşullarında, farklı molekül ağırlıkları ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin, elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yönteme göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agaroza yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar. Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir. Comet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Uluslararası referans niteliğinde olan bu testin uygulanma prensipleri hakkındaki bilgiler OECD 489 *In vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay kılavuzunda ayrıntılı olarak sunulmuştur (OECD 2016c). *In vitro* koşullarda metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğu koşulları göz önünde bulundurularak 3 ve 6 saat test maddesi ile inkubasyon uygulanır (Tice ve ark. 2000). OECD kılavuzuna göre, test maddelerinin sitotoksisiteye neden olan dozlarının öncelikle belirlenmesi gerekmektedir (OECD 2016c).

2.3.1.3. Diğer Genotoksisite Testleri

In vitro ve *in vivo* memeli kromozomal aberasyon testlerinin amacı, memeli hücre kültüründe yapısal kromozomal anormalliklerine neden olan maddeleri belirlemektir. Yapısal anormallikler kromozom ve kromatidde olmak üzere iki tipte olabilir. Deneyde poliploidi (endoreduplikasyon dahil) iki durumda ortaya çıkabilir. Yavru hücrelerin anormal kromozom sayısına sahip olmasına neden olan maddeler (Aneugen) poliploidiyi indükleyebilirken, poliploidi tek başına bu potansiyeli göstermez. Basit bir şekilde hücre döngüsü bozulmasını veya sitotoksisiteyi gösterebilir. Bu nedenle anöploidi tespiti için *in vitro*/*in vivo* mikronükleus testi önerilmektedir (OECD 2016; 2016a).

In vitro mikronükleus (MNvit) testi, interfazdaki hücrelerin sitoplazmasındaki mikronükleusların (MN) saptanmasında kullanılır. Mikronükleus, sentromerden yoksun kromozom parçalarından ya da hücre bölünmesinin anafaz aşaması sırasında kutuplara göç edemeyen bütün haldeki kromozomlardan kaynaklanabilir. Bu nedenle MNvit testi, hem anöjen hem de klastojenler tespit edilebildiğinden, kromozoma zarar verme potansiyelini araştırmak için kapsamlı bilgi sağlayan *in vitro* bir yöntemdir. Test, aktin polimerizasyon inhibitörü sitokalasin B içeren ve içermeyen protokollerin kullanılmasına izin verir. *In vivo* mikronükleus testinde genellikle rodent periferal kan hücresi veya kemik iliğinden örneklenen eritrositlerdeki mikronükleus oluşumu değerlendirilir (OECD 2014; 2016b)

Comet testi ile pre-mutajenik lezyonlar saptanabilirken transgenik rodent germ ve somatik hücre gen mutasyon testi ile endojen genlerdeki mutasyonlar tespit edilebilmektedir. Kemirgenin hemen hemen her dokusundan elde edilen genetik olarak nötr genlerde indüklenen mutasyonları ölçebilme kapasitesinden dolayı endojen genlerdeki *in vivo* gen mutasyonunun incelenmesiyle ilişkili mevcut sınırlamaların (sınırlı doku varlığı, mutasyonlara karşı negatif/pozitif seçimi vb.) üstesinden gelebilmektedir (OECD 2020b).

2.4. Sitotoksisite Yönünden İlaç Safsızlıkları

İlaç araştırmalarında toksisite testlerinde hatalı sonuçların maliyeti çok büyük olabilmektedir. İlaç şirketleri, toksisiteleri nedeniyle başarısız olan bileşiklere diğer endüstriyel alanlardan daha fazla harcama yapmaktadır. Başlangıçta bu risklerin öngörülebilme gerekliliği nedeniyle emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksikoloji

ile ilgili yaklaşımlar erken faz toksisite testlerine daha fazla ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Geleneksel hayvan temelli yöntemler, yoğun emek ve yüksek maliyetli olup uzun süreçler gerektirmektedir. Bu sınırlamalarla birlikte hayvan refahına yönelik gelişmeler kapsamında alternatif yöntemlere yönelik düzenlemeler artmaktadır. Bu nedenle, *in vitro* sitotoksisite testleri ilaç endüstrisi tarafından ciddi şekilde kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Slater 2001; Anonim 2010). Bir kimyasal ile ilişkili potansiyel riskler sitotoksisite mekanizmasına ve büyük ölçüde kimyasal maruziyet süresine bağlıdır. Sitotoksisite hücre ölümüyle sonuçlanan değişikliklere neden olur. Hücre canlılığı, ilaçlara veya kimyasal ajanlara yanıt olarak, canlı ve çoğalan hücrelerin miktarını ölçmede çok önemli bir gösterge olarak kullanılır. Bir maddenin etkileri, sitotoksik (hücre ölümü ve toksisite) veya sitostatik (hücre büyümesinin inhibisyonu) olarak ortaya çıkabilir. Sitotoksisite testi, hücre ölümü ve proliferasyonunda uygulanan alternatif *in vitro* bir çalışmadır. Hücre temelli testlerde hayvan çalışmalarına göre deneysel koşulların tekrar üretilebilirliği ve kontrolünün daha kolay olması nedeniyle avantajlı özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca etik açıdan belirsizlikler daha az ve çalışma daha ekonomiktir. Ölçümlerin çoğu hücre proliferasyonu, canlılığı ve ölümü, sinyal iletim yolakları, transkripsiyonel/translasyonel ve DNA seviyesinde hücresel yanıtı tahmin etmek için dizayn edilir (Mahto ve ark. 2010; Adan ve ark. 2016). Buna ek olarak genotoksisite çalışmalarında, test maddelerin sitotoksik konsantrasyonlarının güvenilir bir yöntemle belirlenmesi ve hatalı pozitif/negatif sonuçların önüne geçilmesi için sitotoksisite testleri büyük önem taşımaktadır (OECD 2016c).

2.4.1. Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi

Sitotoksik etkinin belirlenmesinde uygun maliyetli ve yaygın olarak kullanılan mitokondriyal aktivite ölçümüne dayalı testlerin çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar düşük hassasiyet, test prosedüründeki basamakların çokluğu, uzun inkubasyon süresi, kullanılan kimyasalların hücrelere toksik etkisi, sitotoksik ve sitostatik etkinin ayırt edilememesidir. Tetrazolium ve Alamar Blue esaslı sitotoksisite testlerinin çoğunluğu, çok örnekli analizler için yüksek verimli sonuç sağlamada kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin zayıf duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. Hücre canlılığını ölçmede kullanılan luminometrik bir yöntem olan ATP testi lusiferinin, lusiferaz enzimi tarafından mono-oksijenasyon katalizi prensibine dayanır. Bu kataliz ATP ve Mg^{++} varlığında hücreler ve moleküler oksijenin katkılarıyla gerçekleşir. Kısa süreli protokolü,

düşük düzeydeki toksisiteyi saptamak için çok iyi duyarlılığı (sensitivity), geniş kullanım alanı ile avantaj sağlamaktadır (Slater 2001; Mahto ve ark. 2010, Adan ve ark. 2016). ATP testinin, sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemler Rezasurin ve adenilat kinaz salınım oranı testlerine göre daha duyarlı ve üstün olduğu ifade edilmiştir (Peternel ve ark. 2009). Ayrıca daha az sayıda hücre gerekliliği, duyarlılık ve tekrar üretilebilirlik yönlerinden MTT testine göre daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Petty ve ark. 1995).

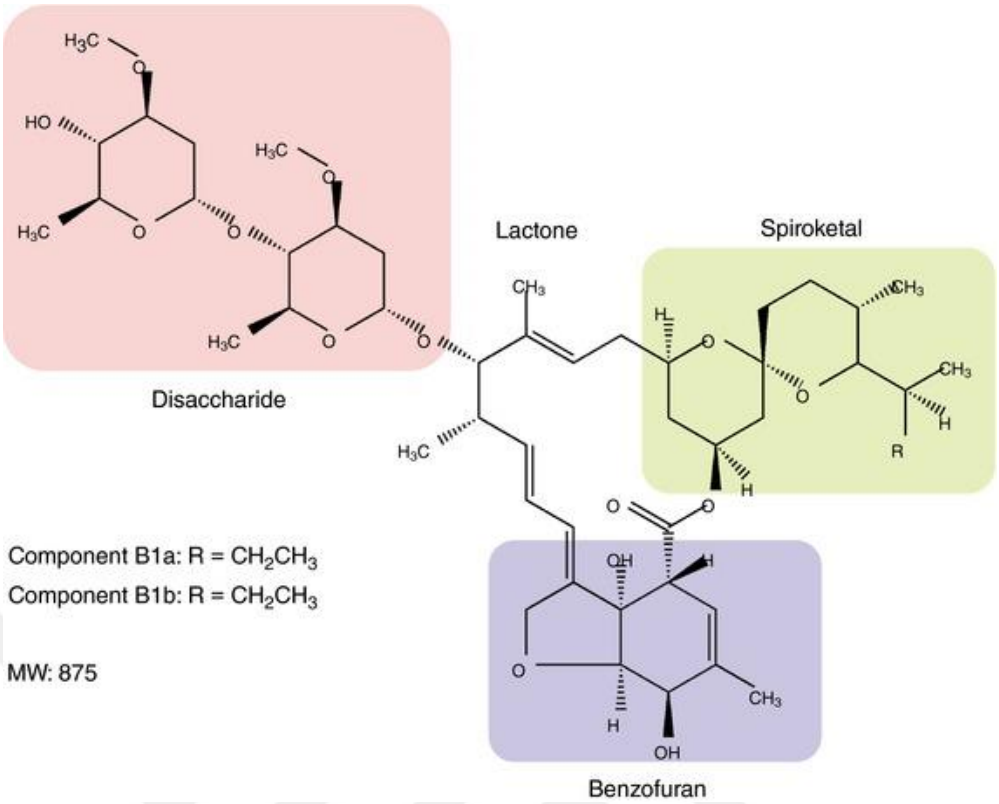
2.5. İvermektin

Avermektinlerin üyesi olan İvermektin, hayvan ve insanlarda yaygın olarak kullanılan antiparaziter ilaçlardan birisidir. Bu bileşik 1970'li yıllarda keşfedilmiş olup (Miller ve ark. 1979) 1981 yılında veteriner sağaltımda kullanılmak üzere satışa sürülmüştür (Laing ve ark. 2017). Güçlü anthelmentik, insektisit ve akarisit etkisiyle veteriner sağaltımda yaygın kullanımı bulunan bu ilk endektoksitin (endoparaziter ve ektoparaziter aktiviteye sahip) etken madde olarak yer aldığı dünya genelinde bir çok VTÜ bulunmaktadır. Ülkemizde ilk ürünün ruhsat tarihi ise 1997 yılına dayanmaktadır Ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğünce pazarlama izni düzenlenen ivermektinlerin farklı farmasötik formlarının sığır, koyun, at ve köpek için endikasyon alanı bulunmaktadır (Anonim 2018a). Farklı hayvan türlerinde oral, kas içi, deri altı veya topikal kullanımı bulunmaktadır (Canga ve ark. 2009). İvermektin formülasyonlarındaki küçük farklılıklar, ürünün antiparaziter aktivitesinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir. Formüle edildiği taşıt maddeler, emilim kinetiği ve hedef dokuda konsantrasyonunu etkilemektedir (Erdur 2021). Lo ve ark. (1985) tarafından, ivermektinin sığırlarda parenteral yolla uygulandığı çalışmada, su içeren taşıt maddeyle emilimin, propilen glikol:gliserol formal (60:40 v/v) formülasyonuna göre daha fazla ve hızlı olduğu, biyolojik yarılanma ömrünün ise daha kısa olduğu gösterilmiştir (Lo ve ark. 1985). Lifschitz ve ark. (1999a) tarafından sığırlarda yağ bazlı formülasyon kullanıldığı bir çalışmada emilimin, kas içi uygulamada subkutan uygulamaya göre daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, subkutan uygulama sonrasında emilimin, yağ bazlı taşıt madde kullanıldığında propilen glikol:gliserol formal formülasyonuna kıyasla daha yavaş gerçekleştiği bildirilmiştir (Lifschitz ve ark. 1999a). Bununla beraber aynı taşıt maddeyi (propilen glikol: gliserol formal 60:40 v/v) içeren iki ticari formülasyonu sığırlara derialtı uygularak emilimlerinin karşılaştırıldığı bir

çalışmada; formülasyonlar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemişken (Lifschitz ve ark. 1999), aynı taşıt maddeyi içeren dört formülasyonun kıyaslandığı buzağılarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada emilim derecesi ve hızında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Lifschitz ve ark. 2004). İvermektin yüksek lipofilik doğasından dolayı yağ dokuda birikir. Sığırlarda deri altı yolla uygulandığında en yüksek konsantrasyon yağ doku ve karaciğerde, yüksek konsantrasyonda böbrek ve kaslarda tespit edilmiştir. Bu nedenle gıdalarda kalıntıları bu dokular yönünden izlenmektedir (Canga ve ark. 2009).

İvermektin sayesinde 1987 yılında Dünya Sağlık Örgütü ve Merck işbirliğiyle başlatılan Mectizan Donation Program ile 2017 yılına kadar ihmal edilen tropikal hastalıklardan (Neglected Tropical Diseases) onkoserkiyazis ve lenfatik filaryazis'e karşı insanlar için 2,8 milyar doz kullanım ile tedavi sağlanmıştır (Anonim 2017a). 2015 yılına gelindiğinde William C. Campbell and Satoshi Ōmura ivermektin'i keşiflerinden dolayı 2015 Fizyoloji ya da Tıp Nobel Ödülünü Artemisin'i keşfeden Tu Youyou ile paylaşmışlardır (Anonim 2015). İvermektin nüfusun öncelikli ihtiyaçlarını karşılayan, hastalık prevalansı, halk sağlığı ilişkisi, etkinlik ve güvenilirlik, maliyet etkinliği gibi kriterlere göre seçilen temel ilaçlardan birisidir (WHO 2020).

İvermektin API'si beyaz/sarımsı beyaz renkli görünümlü, biraz higroskopik kristal toz yapıdadır. Suda pratik olarak çözünmeyen bu bileşik diklorometan'da serbestçe çözünürken etanol'de % 96 oranında çözünür. Ph.Eur'a göre API için su içeriği için en fazla % 1 limiti bulunmaktadır. *Streptomyces avermitilis*'ten fermentasyon ile elde edilen avermektin B1'in kimyasal modifiye bir türevi olarak yarı sentetik üretim prosesleri ile üretilen ivermektin; 22,23-dihydroavermectinB1a (H_2B_{1a}) ve 22,23-dihydroavermectinB1b (H_2B_{1b})'den oluşmaktadır (Ph.Eur. 2020k). Ana molekül H_2B_{1a}, disakkarit, benzofuran ve kimyaca spiroket fonksiyonel gruplarıyla 16 üyeli makrosiklik lakton türevidir. İvermektin molekülüne ait 2 boyutlu yapı Şekil 2-4'de verilmiştir (Chen ve Kubo 2018).



Şekil 2-4 : İvermektin 2 Boyutlu Molekül Yapısı (Chen ve Kubo, 2018).

2.5.1. İvermektin Safsızlıkları ve Toksisite Potansiyelleri

İvermektin iyi bilinen kullanıma sahip, toksisite potansiyeli test sistemlerinde değerlendirilmiş, yaklaşık 40 yıldır veteriner kullanımı bulunan bir molekül olup safsızlık potansiyeli ile ilişkilendirilmiş güvenilirlik çalışması bulunmamaktadır. İvermektin monografı ilk olarak Avrupa Farmakopesi'nin üçüncü baskısı olan 1999 ekinde yayınlanmıştır. Bu baskıya göre H_2B_{1a} bileşeni ivermektinin en az yüzde 90'ını içerir. Güncel Avrupa Farmakopesi monografına göre ivermektin safsızlıklarının tanımlanması gerekli değildir. Bu nedenle, EDQM'de hiçbir safsızlık standardı veya safsızlıkların bağıl alıkonma süresi mevcut değildir (EDQM[1] kişisel yazışma, 05 Aralık 2018). Güncel Avrupa Farmakope (Ph.Eur.10) monografında homolog karışımındaki bileşenlerin (H_2B_{1a}/(H_2B_{1a}+H_2B_{1b}) oranının minimum % 90 düzeyinde olmasının gerekliliği bildirilmiştir. İvermektin molekülü için 4'ü sentezle ilişki olan 11 adet organik safsızlık tanımlanmıştır (Miller ve ark. 1979; WHO 2018; Ph.Eur. 2020k). Avrupa Kimyasallar

[1] EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, kişisel yazışma, Strasbourg, 05 Aralık 2018

Ajansı tarafından REACH kapsamında kimyasalların sınıflandırma, etiketleme ve ambalajlama çalışmaları gerçekleştirilmekte olup üretici veya ithalatçılar tarafından gerekleştirilen bildirimler doğrultusunda, ivermektin safsızlıkları tarafından madde sınıflandırmasının değişeceğini vurgulamıştır (ECHA 2020). İvermektin safsızlıklarına ait bilgiler Tablo 2-1'de sunulmuştur (WHO 2018; Ph.Eur. 2020k).

Tablo 2-2 İvermektin Safsızlıkları (WHO 2018; Ph.Eur. 2020k)

Safsızlık adı	**Safsızlık kaynağı**
Safsızlık A (5-O-demethylavermectin A1a (avermectin B1a)	Sentezle ilişkili
Safsızlık B (5-O-demethyl-25-de(1-methylpropyl)-25-(1-methyl ethyl) avermectin A1a (avermectin B1b)	Sentezle ilişkili
Safsızlık C (23S)-5-O-demethyl-23-hydroxy-22,23-dihydro avermectin A1a (avermectin B2a),	Sentezle ilişkili
Safsızlık D (5-O-demethyl-28-oxo-22,23-dihydroavermectin A1a (28-oxo H_2B_{1a})	Degradasyon ürünü
Safsızlık E (5-O,12-didemethyl-12-ethyl-22,23-dihydroavermectin A1a (12-demethyl-12-ethyl-H_2B_{1a})	Degradasyon ürünü
Safsızlık F (5-O,12-didemethyl-25-de(1-methylpropyl)-12-ethyl-25-(1-methylethyl)-22,23-dihydroavermectin A1a (12-demethyl-12-ethyl-- H_2B_{1b})	Degradasyon ürünü
Safsızlık G (6R,13S,25R)-5-O-demethyl-28-deoxy-6,28-epoxy-13-hydroxy-25-[(1S)-1-methylpropyl]milbemycin B (H_2B_{1a} aglycone)	Degradasyon ürünü
Safsızlık H (4.-O-de(2,6-dideoxy-3-O-methyl-.-L-arabino-hexo pyranosyl)-5-O-demethyl-22,23-dihydroavermectin A1a)	Degradasyon ürünü
Safsızlık I (2,3-didehydro-5-O-demethyl-3,4,22,23-tetrahydro avermectin A1a ($\Delta 2,3$ H_2B_{1a})	Degradasyon ürünü
Safsızlık J (2,3-didehydro-5-O-demethyl-25-de(1-methylpropyl)-25-(1-methylethyl)-3,4,22,23-tetrahydroavermectin A1a ($\Delta 2,3$ H_2B_{1b}),	Degradasyon ürünü
Safsızlık K (4R) and (4S)-5-O-demethyl-3,4,22,23-tetrahydro avermectin A1a (H4B1a isomers).	Sentezle ilişkili

İvermektin safsızlıklarının analitik olarak değerlendirildiği sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Gianelli ve ark tarafından Preparatif HPLC ile izole edilen HPLC ile doğrulanan NMR ve MS aracılığı ile toplanan veri karşılaştırması aracılığıyla karakterize edilen Avermektinlerin iki yeni derivatifi 25-de(1-methylpropyl)-25-(1-ethylpropyl) Ivermectin B_1a ve 12-demethyl-12-ethyl Ivermectin B_1a 'nın tanımlandığı bildirilmiştir (Gianelli ve ark. 2000). Almanya, Avustralya, Çin, İngiltere, Tayland, Türkiye, Yunanistan Ulusal Metroloji Enstitüleri ile birlikte özel enstitüler tarafından ivermektin API üzerinden safsızlıklarının değerlendirildiği bir çalışmada, ilişkili madde safsızlıkları 42.57 ile 67.22 mg/g olarak bulunmuştur. İvermektin safsızlıklarının tespitine yönelik bu

araştırmada; Avusturalya Ulusal Metroloji Enstitüsü tarafından avermektin B_{1}a'nın C-26 pozisyonunda bir diastereoizomeri tespit edilmiştir. Bu izomer, Çin Ulusal Metroloji Enstitüsü tarafından HPLC-IT-TOF-MS ve NMR analizinden elde edilen verilerin bir kombinasyonun kullanımıyla tanımlanmıştır. Ayrıca bu araştırmada inceleme altına alınan ivermektin örneklerinin su içeriği 14 ile 21 mg/g aralığında bulunmuştur (Anonim 2017). Beasley ve arkadaşları (2006), tarafından ivermektin API'sinde yürütülen bir diğer çalışmada, 24a-hydroxy B_{2}a isomer, 3-demethyl $H_{2}B_{1a}$, 3-demethyl $H_{2}B_{1a}$ ve 24-demethyl $H_{2}B_{1a}$ safsızlıkları LC/MS ve NMR kullanılarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu safsızlıkların ivermektin sentezinin başlangıç materyali B_{1}a and B_{2}a ya da degradasyon ürünleri 2-epimer $H_{2}B_{1a}$ and delta_2,3- $H_{2}B_{1a}$'den köken alabileceği bildirilmiştir (Beasley ve ark. 2006). Abamektin *Streptomyces avermitilis*'in doğal bir fermentasyon ürünüdür. İvermektin ise abamektinin sentetik bir türevidir. Abamektinin kimyasal yapısı ivermektinden sadece 22 ve 23 karbonları arasındaki bağda farklılık gösterir; abamektin, ivermektinin tek bir bağa ve ek hidrojenlere sahip olduğu C-22 ve C-23 üzerinde bir çift bağa sahiptir. Her iki bileşik de B_{1}a ve B_{1}b bileşenleri ile homolog ürünlerin bir karışımıdır. B_{1}b bileşeni, 26-karbon konumunda sadece 1 metilen birimi kadar B_{1}a bileşeninden kimyasal olarak farklılık gösterir: Etil grubu ($C_{2}H_{5}$), B_{1}b formunda bir metil grubudur (CH_{3}). Abamektin ve ivermektin minimum % 80 B_{1}a ve maksimum % 20 B_{1}b bileşeni içerecek şekilde tanımlanır. Çalışmalar, bileşenlerin benzer biyolojik ve toksikolojik özelliklere sahip olduğunu, tüm pratik amaçlar için eşdeğer kabul edilebileceğini göstermektedir (Lankas ve Gordon 1989).

İvermektin API'si toksisite potansiyeli yönünden değerlendirildiğinde genellikle güvenli kabul edilen bir endektosittir. Günümüze değin bu API ve ürünlerinin genotoksisite ve sitotoksite potansiyellerinin değerlendirilmesine yönelik çeşitli çalışmalara ulaşılmıştır (Aleksic ve ark. 1996; Molinari ve ark. 2009).

Aleksic ve ark tarafından (1996), fitohemaglutininle aktive edilmiş insan lenfosit hücrelerinde yürütülen 0,3 mg/mL doz ve üzerinde kardeş kromatid değişim sıklığının kayda değer derecede arttığı, bununla birlikte mikronukleus testinde ivermektinin genotoksik etkileri hakkında kanıt bulunmadığı bildirilmiştir (Aleksic ve ark. 1996). Molinari ve arkadaşları tarafından Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücre hattında IVM API ve VTÜ kullanılarak çeşitli sitotoksisite ve genotoksisite testleri yürütülmüştür. Çalışmada *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi negatif sonuç verirken, tek hücre jel elektroforezi testinde API için 5-50 µg/mL dozlarında, ticari formülasyon için 50 µg/mL

dozda DNA iplik kırılmalarını indükleyerek pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Her iki test maddesi 25 µg/mL dozda hücre siklus progresyonu testinde gecikmeye, Mitotik indekste ve proliferatif replikasyon indeksi testinde azalmaya neden olurken, 50 µg/mL üzeri dozlarda hücre siklus progresyonu (CCP) ve proliferatif replikasyon indeksi (PPI) testinde sitotoksik etkili olduğu, nötral red ve MTT testlerinde 0.25–250.0 µg/ml dozlarda hücre büyümesi inhibisyonu saptanmıştır. Ulaşılan veriler doğrultusunda CHO-K1 hücrelerinde saf ivermektinin sitotoksisiteyi indüklemede, ticari formülasyonundan daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Molinari ve ark. 2009). CHO-K1 hücrelerinde API ve ticari formülasyon ile DNA hasarı kinetiği aştırılmış ve hücre canlılığının 3 saate kadar değişmeden kaldığı, 6 saatten sonra arttığı, 12 ve 24.saatler içinde değişmeden kaldığı, inkübasyon sırasında DNA hasarında bifazik davranış meydana geldiği tespit edilmiştir. 18 saat inkübasyon sonrasında DNA hasarında zamana bağlı azalma, hafif hasarlı hücrelerin kademeli olarak azalması, hasar görmemiş hücrelerin sıklığındaki artışla eşzamanlı hasarlı hücrelerin var olmadığı gözlenmiştir. Akış sitometrisi analizine göre, her iki bileşiğin de erken ve geç apoptoz yönünden belirgin bir artışa neden olabileceğini ortaya çıkarmıştır. DNA lezyonlarındaki azalmanın bir onarım sürecinden ziyade ivermektinle indüklenmiş sitotoksisite ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Molinari ve ark. 2013).

Sweify ve arkadaşları tarafından IVM'nin tek doz ve 14 gün sonra tekrarlayan doz olmak üzere her bir grupta 9-12 haftalık 30 adet erkek fare kemik iliği hücrelerinde üzerinde gerçekleştirilen kromozomal aberasyon ve mikronükleus testlerinde, ivermektinin yüksek seviyede klastojenik ve genotoksik potansiyelinin olduğu ortaya konmuştur (Sweify ve ark. 2015) 200 µg/kg IVM tek enjeksiyon uygulanan erkek farelerde germ hücrelerinde önemli derecede kromozomal hasar belirtileri ürettiği, bu sonuçlara göre ivermektinin yüksek klastojenik etkisini ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Sweify ve ark. 2018). Farelerde kan serumunun protein fraksiyonlarındaki varyasyonlar, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak ortaya konmuş, IVM'nin mayotik aberasyonlarda kontrole karşı önemli bir artış ortaya çıkardığı, tek doz enjeksiyonun ayrılmış proteinin yüzde alanında çift doza kıyasla daha fazla varyasyona neden olduğu, sonuç olarak bu bulguların IVM'nin mutajenitesini desteklemesi nedeniyle dikkatli kullanımı tavsiye edilmiştir (Sweify ve ark. 2019). İvermektinin sperm morfolojisi üzerindeki etilerinin değerlendirildiği *in vivo* bir çalışmada; bileşiğin sperm başı anormalliklerini indüklemekle birlikte, bu artışın negatif

kontrol değerinin üzerinde olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, sperm başı anormalliklerinin doza bağımlı olmadığı, uygulanan ilacın doz seviyesi ile anormal sperm vakası arasında korelasyon olmadığı, ulaşılan veriler doğrultusunda ivermektinin mutajenik etkisinin olmayacağı sonucuna varılmıştır (Otubanjo ve ark. 2007). İvermektinin kan lenfositleri üzerinde genotoksik etkilerini değerlendirmek üzere sitotoksisite temelli seçilen 3 dozda (250, 500 ve 1000 µg/ml) araştırma gerçekleştirilmiştir. İvermektinin, mikronükleusa sahip iki çekirdekli lenfositlerin frekanslarında ve sayısında doza bağlı artışa neden olduğunu, iki çekirdekli lenfositlerin oranının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ek olarak, IVM'in düşük dozunda toplam kromozomal anormallik sıklığında kontrole göre anlamlı olmayan artışa, orta ve yüksek dozlarda ise anormal hücrelerin frekanslarında önemli seviyede artışa neden olduğu tespit edilmiştir (El-makawy ve Mahrous 2008). Zebu sığırlarında (3-4 yaşındaki ortalama 350 kg, vücut kondüsyonu 3 ve 3.5 arasında skorlanan) gerçekleştirilen çalışmada % 1 ve % 3.15 olarak uygulanan ivermektinin konsantrasyonundan bağımsız olarak % 75'in üzerinde hücrede DNA'da basit zincir kırıkları oluşturduğu gösterilmiştir (Montes-Vergara ve ark. 2017).

2.6. Epimer Safsızlıklarının Toksisite Potansiyelleri

Kiral kimya, 1848'de sodyum amonyum tartratın iki izomerini ilk kez ayırdığında, Fransız kimyager ve biyolog Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir. Bununla birlikte, kiralite olgusunun yalnızca bitki ve hayvanların yaşamında değil, aynı zamanda ilaç, tarım ve diğer kimya endüstrilerinde de kilit bir rol oynadığını bulmak için yaklaşık bir yüzyıla ihtiyacı olmuştur. İlaç endüstrisinde, halihazırda kullanılmakta olan ilaçların % 56'sı kiral ürünlerdir. Farmakoterapötik olarak aktif maddeler kiral olabilir veya reseptör yüzeyinde kiral bir konformasyona gelebilir (EMA 1993; 1997; Nguyen ve ark. 2006).

Kiral sentetik ürünlerin aksine, tüm doğal bileşikler tek bir enantiyomerik formdadır. Moleküler düzeyde kiralite proteinlerin, karbonhidratların, nükleik asitlerin, lipidlerin ve steroidlerin yapı taşlarında bulunur. Örneğin, tüm doğal amino asitler L-izomeri (levorotatör), tüm doğal şekerler (karbonhidratlar) D-izomeridir (dekstrorotatör). Kiral maddeler, özdeş moleküler formüllere, atomdan atoma bağlara ve bağlanma mesafelerine rağmen üst üste konulamayacakları şekilde benzersiz bir mimariye sahiptir. Bu nedenle, belirli yapı-aktivite ilişkilerinin etki için gerekli olabileceği canlı sistemlerde, kiral kimyasalların biyolojik moleküllerle etkileşimlerinde (örneğin, enzimler, reseptörler, taşıyıcılar ve DNA) stereoseçicilik beklenebilir. Rasemik karışımların ve ayrı

ayrı stereoizomerlerin fizyokimyasal, biyokimyasal, farmakolojik ve toksikolojik özellikleri önemli ölçüde farklılık sergileyebilir (EMA 1993; EMA 1997; Sewell ve ark. 1998, Nguyen ve ark. 2006; Smith 2009; Song ve ark. 2020). Diastereomerler, iki veya daha fazla kiral merkeze sahip moleküllerdir. Enantiyomerlerin aksine, diastereomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri farklılık gösterebilir. Kimyasal yönden karakterizasyonları kolay olmakla birlikte, biyolojik aktiviteleri genellikle farklı olmaktadır.. Epimerler ise, birden fazla kiral merkez içeren, yalnızca bir kiral merkezde farklı konfigürasyona sahip iki diastereoizomerdir (Nnguyen ve ark. 2006; Anonim 2020a).

İvermektin epimer'inin toksikolojik etkisine yönelik çalışmaya ulaşılamıştır. Epimerlerin farmakolojik ve toksikolojik çalışmalarına bakıldığında; C57BL/6 farelerde gerçekleştirilen çalışmada %10 seviyesinde 7-epimer dosetaksel içeren formülde; daha yüksek düzeyde sistemik toksisite gözlendiği, kilo kaybının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Manjappa ve ark. 2013). D vitamininin 10 farklı formunun analizi sonucu, 3-epi-25 (OH) D3 formunun, Alzheimer hastalığı, tip 1 diyabet hastaları, ve romatoid artrit hastalarında önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde mevcut olduğu (sağlıklı kontroller 6.093 ± 6.711 nmol/L; kombine hastalık = 22.433 ± 13.535 nmol/L), bu sonuçlar doğrultusunda daha büyük ölçekli çalışmalar ile epimerin miktarı ve oranının kronik hastalıklardaki rolünün araştırılması önerilmektedir (Karras ve ark. 2015). (R)- ve (S)-epimerlerinden oluşan ergot alkaloidlerinin (S) –epimerleri biyolojik olarak aktiftir ve (R) -epimerlerine benzer şekilde zararının olası olduğu, (S)-epimer seviyelerinin dünya çapında insan ve hayvan diyetlerinde dikkatle izlenmesi önerilmektedir (Cherewyk ve ark. 2020). Safra asitleri, farnesoid X nükleer reseptörü (FXR) ve G proteini kenetli safra asidi reseptörü 1 (GPBAR1) aracılığıyla hareket eden önemli sinyal moleküleridir. Safra asitlerinin dekonjugasyonunun yanı sıra, kolonik bakterilerin ve hepatositlerin oksidoredüktif enzimleri, safra asitlerinin epimerlerine veya dehidrojenize formlarına dönüştürülmesini sağlar. Obetikolik asit (OCA), primer biliyer kolanjit tedavisi için onaylanmış, safra asitlerinden türetilmiş FXR agonistidir. OCA türevleri 7-keto, 6-etiliden ile 3β-epimerleri sentezlenerek, GPBAR1 ile FXR etkileşimler ve FXR hedef gen ekspresyonu yönünden C57BL/6 fare ve insan hepatositlerinde değerlendirilmiş, sadece 3p-hidroksi epimerinin, hepatik hücrelerde ve farelerde FXR'ye karşı önemli aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 3β-isoOCA'nın hepatositlerde ve fare karaciğerinde OCA'ya kolayca epimerize olduğunu gözlemlenmitşir (Stefela ve ark. 2020).

Ursodeoksikolik asit benzer şekilde, karaciğerde sentezlenen kenodeoksikolik asidin terapötik amaçlı kullanılan 7b-OH epimer'idir (Lepercq ve ark. 2004). En tehlikeli zehirlenmelerden biri, alg toksinleri ile kontamine deniz ürünlerinden kaynaklanan paralitik etkili kabuklu intoksikasyonlardır (Jaime ve ark. 2001). Kabuklu deniz ürünlerinde birikebilen, Azadinium ve Amphidoma fitoplanktanlarından köken alan deniz biyotoksinleri Azaspirasid'in epimeri 37-epi-AZA1 ile Jurkat T hücrelerinde gerçekleştirilen toksisite çalışmasında, epimerin AZA1'den 5.1 kat daha toksik olduğu sonucu bildirilmiştir (Kilcoyne ve ark. 2014). Alg kökenli bir diğer toksin olan gonyatoksin'in 2/3 epimerlerinin kedilere oral olarak uygulandığında, 35 µg/kg doz ve 36 ng/mL plasma konsantrasyonunda ölümcül olduğu rapor edilmiştir (Andrinolo ve ark. 2002).

Güncel literatür taramalarında; ivermektinin epimeri ve safsızlık profili ortaya konan API ve VTÜ'lerine ilişkin herhangi bir toksisite değerlendirme çalışmasına ulaşılamamıştır. Araştırmamız kapsamında antiparaziter etkisiyle sahada yaygın ve periyodik olarak kullanılan ivermektinin EPİ safsızlığı ile safsızlık profili ortaya konulacak farklı API ve VTÜ'lerin genotoksisite ve sitotoksisite potansiyelleri karşılaştırmalı olarak ilk kez incelenecek olup, ulaşılacak sonuçların bilimsel literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Türkiye piyasasında ivermektin API'si içeren VTÜ'lerde fiziksel test ve UHPLC ile safsızlık analizlerinin gerçekleştirilmesi için, Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne 2019 yılında gönderilen ivermektin enjeksiyonluk çözeltilerden test numuneleri seçilmiştir. Test numuneleri olarak son kullanım tarihleri dolmamış olan (raf ömrünün 6. ve 41. ayları arasında) 10 farklı firmaya ait ambalaj boyutu ve seri numaraları farklı toplam 16 adet ivermektin enjeksiyonluk çözeltisi çalışılmıştır. İthal ve yerli üretim kapsamında yer alan VTÜ'ler üretim parti numaraları ve raf ömürleri dikkate alınarak kodlandırılmış ve her numuneden ikişer örnek alınarak analiz edilmiştir. Numunelere ait kod numaraları Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3-1:Analiz Edilen Numunelere Ait Tanımlayıcı Kod Listesi

Ürün Kodu	Pazarlama İzin Sahibi	Ambalaj Boyutu (mL)	Raf Ömrü (Analizi esnasında kaçıncı Ay)
A1	A	250	6.
A2	A	250	8.
A3	B	250	7.
A4	C	50	13.
A5	D	20	18.
A6	E	100	21.
A7	F	250	31.
A8	F	100	30.
A9	G	100	11.
A10	B	100	7.
A11	H	50	30.
A12	I	50	29.
A13	J	100	9.
A14	D	100	11.
A15*	H	50	41.
A16	A	250	10.

*Referans tıbbi ürün

Tablo 3-2: Analiz Edilen Materyal-Standartlar ve Etkin Maddeler

Materyal Kodu	Açıklama	Üretici
Ref.Std1	Sertifikalı Referans Standart	EDQM (I8000010)
Ref.Std2	Sertifikalı Referans Standart	Sigma (PHR1380)
Ref.Std3	Sertifikalı Referans Standart	Sigma (PHR1380)
API-1	Etkin madde	X1
API-2	Etkin madde	X2
API-3	Etkin madde	X3
API-4	Etkin madde	X4
API-5	Etkin madde	X5
EPİ	2-epi-ivermektin-B1a	TRC

3.1. Fiziksel Testler

Enjeksiyonluk tıbbi ürünlerin safsızlık profilleri, fiziksel özelliklerindeki (asidik/ alkali koşullara ve su içeriği) farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Waterman ve ark. 2002). Test numuneleri, ilaç ürünlerinin stabilitesi ve degradasyonunda etkin rol oynayan faktörlerden pH ve su içerikleri yönünden analiz edildi. Numunelerin pH ve Karl Fischer cihazı ile su içeriği 2 ölçüm ortalaması alınarak saptandı. Analiz öncesi doğrulama ve test güvenilirliği için; pH metre ile sertifikalı tampon çözelti ölçümü, su içeriği testi için titrant tayini gerçekleştirildi. pH ölçümünde sıcaklığa bağlı değişimlerden kaçınmak için test numuneleri oda ısısında 1 saat bekletildi.

3.1.1. pH Ölçümü

pH değerlerinin, degradasyon ürün oluşumu üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi için test numunelerinin (Tablo 3-1) pH ölçümleri Avrupa Farmakopesi 10.1, 2.2.3. pH'ın potansiyometrik ölçümü monografına göre yapıldı (Ph.Eur. 2020).

3.1.1.1. Kullanılan Ekipman ve Malzeme

pH metre (WTW terminal 740)

Ultrasaf su cihazı (Veolia Purelab Flex)

15 mL polipropilen tüp (VWR),

3.1.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

ReferansBuffer çözelti pH 4,00 (20°C'de) – (Merck 109435)

ReferansBuffer çözelti pH 7,00 (20°C'de) – (Merck 109439)

ReferansBuffer çözelti pH 9,00 (20°C'de) – (Merck 109461)

ReferansBuffer çözelti pH 12,00 (20°C'de) – (Merck 109892)

3 mol/L KCl elektrolit daldırma çözeltisi (Sigma 1.01254)

3.1.2. Karl Fischer ile Su İçeriği

Tıbbi ürünlerdeki olası safsızlıkların oluşumu üzerine nem düzeylerinin etkilerinin değerlendirilmesi için test numunelerinin (Tablo 3-1) nem düzeyleri Karl Fischer yöntemi ile hassas olarak saptandı. Test Avrupa Farmakopesi 10.1, 2.5.12 semi-mikro su tayini monografına göre yapıldı (Ph.Eur. 2020b).

3.1.2.1. Kullanılan Ekipman ve Malzeme

Karl Fischer Titratörü (SI Analytics Titroline)

Analitik terazi (Ohaus)

2 ml steril enjektör (Hayat)

3.1.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Titrant (Merck)

Dry metanol (Merck)

3.2. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürün ve API numunelerinde Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (UHPLC) ile İvermektin Bileşen ve Safsızlıklarının Tayini için Yöntemin Geçerli Kılınması (Analitik Metot Validasyonu)

Ph.Eur. İvermektin API monografı dikkate alınarak, VICH GL11 kılavuzu doğrultusunda İvermektin enjeksiyonluk çözelti numunelerinin (Tablo 3-1) toplam safsızlık düzeyleri UHPLC sisteminde analiz edilmiştir. Ayrıca tıbbi ürünlerin safsızlık düzeylerinin değerlendirilmesinde referans standart ve API'lerinin safsızlık düzeylerinin bilinmesi önem arz etmektedir (Ph.Eur. 2020k). Bu yaklaşımla araştırmamızda; İvermektin enjeksiyonluk çözelti numunelerinin (Tablo 3-1) yanı sıra, 3 adet referans standart, 5 farklı üreticiye ait API (Tablo 3-2) safsızlık düzeyleri UHPLC sisteminde analiz edilmiştir. Numune analizleri esnasında A16 nolu çözelti numunesinde saptanan 1 adet degradasyon ürününe ilişkin metot verifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

UHPLC çalışmaları için; Ph.Eur. IVM monografında yer alan likit kromatografi yöntemi esas alınmakla birlikte ayrım tekniğinde kabul edilebilir nitelikte modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu modifakasyonların dayanağı ise;

Ph.Eur. 10.0 ve Türk Farmakopesi (TF)-Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu *"2.2.46. Chromatographic separation techniques"* (Kromatografik Ayırım Teknikleri) bölümünde likit kromatografide, Farmakope metodu kullanıldığında, sistem uygunluk parametrelerinin uygun olduğunun gösterilmesi halinde bazı değişikliklere izin verilmektedir (Ph.Eur. 2020a).

İzokratik ayrım koşullarında,

-Mobil fazın bileşiminde; minör solvent % 30 rölatif veya % 2 mutlak düzenleme (hangisi büyükse), diğer bileşenlerin mutlak % 10'dan fazla değiştirilmemesi,

. *-Kolon partikül boyutunda % 50'ye kadar azaltma* (Farmakope metodunda bu boyut 5 mikron olarak verilmiştir).

-Kolon boyutları; Avrupa Farmakopesinde uzunlukta %70, iç çapta %25 değişikliğe izin verilmektedir; (Farmakope metodunda 250x4.6 mm olarak verilmiştir).

-Enjeksiyon hacmi;

Tekrarlanabilirlik ve pik saptama sonuçlarının tatmin edici olması halinde enjeksiyon hacminin artırılması/düşürülmesine izin verilmektedir (Ph.Eur. 2020a).

3.2.1. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

3.2.1.1. Kullanılan Ekipman ve Malzeme

UHPLC sistemi (Thermo Dionex Ultimate 3000),
Hassas terazi (Mettler Toledo AG204),
Pipet seti (Eppendorf research plus 0.5-10 uL, 20-300 uL, 0,1-1 mL, 1-5 mL, 1-10 mL),
Vorteks (Heidolph Multi Reax, Heidolph Reax Control),
Ultrasonik degasser (Bandelin Sonorex),
Ultra saf su cihazı (Veolia Purelab Flex),
Likit kromatografi kolonu Poroshell 120 EC-C18 150x3.0 mm, 2.7 mikron (Agilent),
HPLC için viyal (Labmarker)
Pipet ucu (Eppendorf)
15 ve 50 mL Polipropilen tüp (VWR),
Şırınga ucu 0,45 u Filtre (Alwsci),

3.2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

HPLC grade Metanol (J.T.Baker),

HPLC grade Asetonitril (J.T.Baker),

2-propanol, (Sigma)

3.2.1.3. Yöntemin Geçerli Kılınması Çalışmaları için Analizi Yapılan Bileşikler

Tablo 3-1'de sunulan ivermektin enjeksiyonluk çözelti numuneleri (1-16) ile Tablo 3-2'de yer alan IVM API'leri ve referans standartları için metod validasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.2. Analitik Yöntemin Modifikasyonu

Safsızlıkların tespitine uygun analiz yöntemi geliştirilebilmesi için farklı likit kromatografi kolonları, çözücüler ve mobil fazlar ile deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Deneme çalışmalarında kolon kompartman sıcaklığı, dedektör dalga boyları, enjeksiyon hacimleri, akış hızları, veri toplama oranlarında varyasyonlar uygulandı. Varyasyonlar doğrultusunda en iyi sonuç alınan kolon, çözücü, mobil faz, akış hızı, kolon kopartman sıcaklığı, dedektör dalga boyu, veri toplama hızı, akış hızına karar verilerek metot validasyon parametreleri ve sistem uygun kriterleri dikkate alınarak yöntem geçerli kılındı.

3.2.3. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması

Analitik yöntemler uygulayıcı, cihazlar, kullanılan kimyasallar, ortam koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Analitik çalışmalarda ürünlerin keşfi, geliştirilmesi ve raf ömrü süresince tıbbi ürünlerin istenen spesifikasyonda olduğunu doğrulamak, yöntemin planlanan amaca uygun olduğunun gösterilmesi, uluslararası ölçekte güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar alınması için, uygulanan tüm prosedürlerin çeşitli parametrelerle geçerli kılınarak güvence altına alınması gerekmektedir. Bu parametreler ICH/VICH kılavuzları ile çeşitli farmakopelerde tanımlanmıştır. Safsızlık analizlerinde limit testler için seçicilik ve tespit sınırı, kantitatif testlerde ise ek olarak doğruluk, doğrusallık, kesinlik, aralık ve tayin sınırı parametreleri değerlendirilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

IVM H_2B_{1a} bileşeni için yöntemin geçerli kılınması, IVM H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} bileşenleri için sistem uygunluk testleri gerçekleştirildi. Ön çalışmalar süresince

degradasyon ürünü safsızlık tespit edilerek, metot ile ölçümünün validasyon kriterlerine uygun şekilde analiz edilebilirliği ek doğrulama çalışmaları ile gösterildi.

Referans çözelti ve test numunelerinin hazırlanmasında Ülkemizin taraf olduğu ve katılmamızın uygun bulunduğu 10/10/1993 tarihli ve 21724 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan "Bir Avrupa Farmakopesi Geliştirilmesine Dair Sözleşme" kapsamında Güncel Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia 10.0), Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi İvermektin ve İvemektin Enjeksiyonluk Çözelti Monografları, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından yayımlanan Türk Farmakopesi (TF)-II Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu İvermektin monografı esas alındı. (Anonim 1993, TF 2018; Ph.Eur. 2020k). Bu doğrultuda monograflar kapsamında sistem uygunluk parametrelerini hesaplamaya imkan verecek şekilde 0,4, 8, 40, 400, 640, 720, 800, 880 ve 960 µg/mL konsantrasyonda olmak üzere test çözeltileri hazırlandı.

3.2.3.1. Seçicilik

Bir yöntemin seçiciliği, analitte tayini istenen ve maddeyle girişim yapabilecek diğer bileşenlerin (yardımcı madde, safsızlıklar, bozunma ürünleri) varlığında, analizi istenen maddenin tartışmasız biçimde ölçülebilme yeteneğidir. Bu bileşenler API'ler, safsızlıklar ve ürünün yardımcı maddelerinin de yer aldığı matriks olabilir. Tayini veya tespiti yapılmak istenen uygun seviyede safsızlık ürüne ilave edilir. Numune matriksi veya diğer bileşenlerden bireysel olarak ayrımı gösterilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Yöntemin seçiciliğinin gösterilebilmesi için mobil faz (Asetonitril, Metanol, Su), çözücü (Metanol) ve yardımcı maddeler (Propilen glikol, Gliserol formal) ile seçicilik çalışması gerçekleştirilerek, matrikste yer alan maddelerin ölçüm sonucuna kromatografik olarak girişimleri olmadığı gösterildi.

3.2.3.2. Doğruluk

Gerçek değer veya kabul edilen referans değer ile elde edilen sonuçtaki uyuşmanın yakınlığını ifade eder. Tayini veya tespiti yapılmak istenen uygun seviyede madde/safsızlık ürüne ilave edilerek hesaplanır. Doğruluk, analit miktarının geri kazanım yüzdesi veya güven aralıkları ile birlikte ortalama ve kabul edilen gerçek değer arasındaki fark olarak değerlendirilir. Doğruluk, belirlenen aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon seviyesi üzerinden üç tekrar olmak üzere, en az dokuz ölçüm kullanılarak değerlendirilir.

Belirli safsızlıklar veya bozunma ürünlerinden numune elde etmenin imkansız olduğu durumlarda, bağımsız başka bir prosedürle elde edilen sonuçların karşılaştırılması kabul edilebilir. Yanıt (cevap) faktörü, pik saflığı sonuçları değerlendirilebilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Yöntem doğruluk parametresi çalışmasında belirlenen test konsantrasyonunun %80-120'si aralığında, 640, 800 ve 960 µg/mL olmak üzere üç konsantrasyon üç tekrarlı şekilde çalışıldı. Tekil ve ortalama % geri kazanım ile bağıl standart sapma (BSS) hesaplandı.

3.2.3.3. Kesinlik

Aynı homojen numunedeki analitin belirlenen koşullar altında, bir dizi ölçümü sonucunda elde edilen sonuçtaki uyuşmanın istatistiksel olarak tekrarlanabilir şekilde yakınlığını ifade eder. Kesinlik tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde ebilebilirlik olmak üzere üç düzeyde değerlendirilir. Genellikle varyans, standart sapma, bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) ve güven aralığı şeklinde ifade edilir. Tekrarlanabilirlik kısa zaman aralığında, aynı çalışma koşulları altında kesinliği ifade eder. Analiz içinde kesinlik olarak da isimlendirilir. Belirlenen aralığı kapsayan en az 3 konsantrasyon seviyesi üzerinden üç tekrar olmak üzere, en az dokuz ölçüm veya %100 test konsantrasyonu üzerinden altı ölçüm tekrarı kullanılarak değerlendirilir.

Ara kesinlik; farklı gün, farklı analist, farklı cihaz gibi laboratuvar içinde gerçekleştirilen varyasyonları ifade eder. Tüm varyasyonların çalışılmasına gerek yoktur. Koşullara göre belirlenir. Tekrar elde edilebilirlik, Genellikle yöntemlerin standardize edilmesi için işbirliği çalışmalarında laboratuvarlar arası kesinliği ifade eder (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Yöntem kesinlik parametresi çalışmasında belirlenen test konsantrasyonunun %80-120'si aralığında, 640, 800 ve 960 µg/mL olmak üzere üç konsantrasyon üç tekrarlı şekilde çalışıldı. Bağıl standart sapma (BSS) hesaplandı.

Yöntem ara kesinlik parametresi çalışmasında, farklı günde belirlenen test konsantrasyonu 800 µg/mL altı tekrarlı şekilde çalışıldı. Bağıl standart sapma (BSS) hesaplandı.

3.2.3.4. Tespit sınırı

Analizi yapılan örnekte, uygulanan deneysel koşullar altında, tespit edilecek maddenin yerinin belirlendiği, fakat miktarın kesin olarak tayin edilemediği en düşük konsantrasyondur. Farmasötik ürünler için Sinyal:Gürültü oranı yaklaşımı benimsenmiştir. Sinyal:Gürültü oranı 3:1 veya 2:1 genellikle yeterli kabul edilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Tespit sınırı çalışmasında, API için farmakopeye göre daha alt seviyede ölçüm gerekliliği bulunmayan ihmal limiti (% 0,05) 0,4 µg/mL seviyesinde 10 tekrarlı ölçümler gerçekleştirildi. Bu konsantrasyon dikkate alınarak sinyal/gürültü oranı hesaplandı. Metot ile daha düşük konsantrasyonda beklenen sinyal/gürültü oranına ulaşılabileceği tespit edilmekle birlikte ihmal limiti altında çalışma gerekliliği bulunmadığı için daha düşük seviye çalışılmadı.

3.2.3.5. Tayin alt sınırı

Numunedeki analitin en düşük miktarının, uygun seviyede doğruluk ve kesinlik ile kantitatif olarak tayin edilebildiği sınırı ifade eder. Numune matriksindeki düşük seviyede olan safsızlıklar ve bozunma ürünlerinin kantitatif tayininde bir parametre olarak kullanılır. Farmasötik ürünler için Sinyal:Gürültü oranı yaklaşımı benimsenmiştir Sinyal:Gürültü oranı 10:1 genellikle yeterli kabul edilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Tayin sınırı çalışmasında API için farmakopeye göre daha alt seviyede ölçüm gerekliliği bulunmayan ihmal limiti (% 0,05) 0,4 µg/mL seviyesinde 10 tekrarlı gerçekleştirilen ölçüm sonuçları dikkate alınarak sinyal/gürültü oranı hesaplandı. Metot ile daha düşük konsantrasyonda beklenen sinyal/gürültü oranına ulaşılabileceği tespit edilmekle birlikte ihmal limiti altında çalışma gerekliliği bulunmadığı için daha düşük seviye çalışılmadı.

3.2.3.6. Doğrusallık

Yöntem ile hedeflenen aralıkta, numunedeki analitin miktarı ile doğru orantılı olarak ölçüm sonucu elde etme yeteneğidir. En az beş konsantrasyon önerilir. Korrelasyon katsayısı, slope (Eğim), y-intercept (Kesme noktası), slope of the regression line (regresyon hattının eğimi) and residual sum of squares (Kareler toplamı artıkları) değerlendirilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Doğrusallık çalışmasında, belirlenen test aralığı ihmal limiti test konsantrasyonunun % 0,05'i 0,4 µg/mL'de ile test konsantrasyonunun % 120'si 960 µg/mL'nde üç tekrarlı dokuz konsantrasyon çalışıldı. Doğrusallık denklemi, eğim, kesme noktası, korrelasyon katsayısı değerleri ile artıklar dağılım grafiği değerlendirildi.

3.2.3.7. Aralık -Range

Analitik prosedürün uygun bir kesinlik, doğruluk ve doğrusallık seviyesi ile analitin ölçülebilen üst ve alt miktarlarının tayin edildiği aralıktır. Safsızlıkların ölçümü için aralık ve doğrusallık birlikte değerlendirilebilir. Bu durumda aralık ve doğrusallık raporlama sınırından spesifikasyondaki değerin % 120'sine kadardır. Yalnızca standart kullanılarak, miktar tayini ve saflık testleri birlikte uygulanacak olursa aralık ve doğrusallık, safsızlıkların raporlama sınırından başlayarak, API miktarının spesifikasyon değerinin % 120'sine kadar değerlendirilir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

Aralık çalışması doğrusallık çalışması ile birlikte değerlendirildi. Belirlenen test aralığı ihmal limiti test konsantrasyonunun % 0,05'i 0,4 µg/mL'de ile test konsantrasyonunun % 120'si 960 µg/mL'nde üç tekrarlı dokuz konsantrasyon çalışıldı.

3.2.3.8. Sistem uygunluk testi

Sistem uygunluk testleri birçok analitik prosedürün ayrılmaz bir parçasıdır. Her bir analitik prosedürün asgari kabul edilebilirlik parametrelerini içerir. Testler, ekipman, analitik işlemler ve numunelerin entegre bir sistem oluşturduğu kavramına dayanmaktadır. Sistem uygunluk testi parametrelerine prosedürün türüne bağlı olarak karar verilir. Ayırım gücü, kesinlik, pik kuyruklama faktörü, bağıl alıkonma, kolon teorik plaka katsayısı gibi faktörlerle değerlendirilir. En az iki parametrenin sağlanması gerekir (VICH 1998; 1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017).

İvermektin farmakope monografında yer alan, IVM analizi için sistem uygunluk parametreleri olan; H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} komponentlerine ait pikler arasında rezolüsyon, H_2B_{1a} komponenti için ihmal limitinde (Test konsantrasyonunun % 0,05'i 0,4 µg/mL) Sinyal/Gürültü oranı ve H_2B_{1a} için simetri faktörü sistem uygunluk testi parametreleri olarak değerlendirildi.

3.3. İvermektin İçeren Tıbbi Ürünler ve API'lerde İvermektin Bileşenleri ve Safsızlıklarının Miktar Tayini

Sistematik olarak gerçekleştirilen denemeler sonucu, IVM H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} bileşenleri ile toplam safsızlık ve için geçerli kılınan yöntem ile Tablo 3.1 ve 3.2'de verilen 19 adet test numunesinde gerçekleştirildi. Test numuneleri iki tekrar olarak hazırlandı. Ref.Std ve API için 8 mg test materyali 10 mL metanolle çözüldü. 10 mg/mL ivermektin içeren ürünler için 8 mg numuneye eşdeğer 0,8 mL ürün 10 mL metanol ile, 20 mg/mL ivermektin içeren ürünler için 8 mg numuneye eşdeğer 0,4 mL ürün 10 mL metanol ile 15 mL'lik flakonda seyreltildi. (Böylece son konsantrasyon 800 µg/mL elde edildi). Test çözeltileri, UHPLC viyaline aktarılırken şırınga ucu 0,45 µm filtreden geçirildi. Elde edilen kromatogramlardan miktarları belirlendi. Çalışmada, miktar tayini sonuçlarından safsızlıkların rehberlerde belirtilen tanımlama/kalifikasyon sınır değerlerini aşıp aşmadığı belirlendi.

3.3.1.1. Deneyin Yapılışı

Deneme çalışmaları sonrası geçerli kılınan yönteme ait UHPLC Cihaz Koşulları

-Kolon; Poroshell 120 EC-C18 150x3.0 mm, 2.7 mikron

-Çözücü; Metanol

-Mobil faz; 54:31:15 V/V/V Asetonitril:Metanol:Ultra saf su

-Kolon fırını sıcaklığı 25°C (Ortam sıcaklığı 22°C'de sabit tutulmuştur)

-Akış hızı 1.0 ml/dakika

-Veri toplama oranı; 5 hertz

-Dalga boyu; 254 ve 245 nm iki kanal

-Enjeksiyon hacmi; 5 µL

-Enjeksiyon yıkama 50:50 V/V izopropil alkol/Ultra saf su

-Rear Seal Wash 90:10 V/V Ultra saf su/Metanol

-Analiz süresi; 20 dakika

Analizler sonunda analitik yöntem geçerli kılındı. İvermektin bileşenleri olan H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} ile H_4B_{1a} izomerleri ve Δ2,3-H_2B_{1a} bağıl alıkonma sürelerine göre (Tespit edilen pikin alıkonma süresi/Ana pikin alıkonma süresi) isimlendirildi.

3.4. Tespit Edilen Degradasyon Ürünü Safsızlık 2-epi-ivermektin B1a için Ek Çalışmalar

Yöntemin geçerli kılınması amacıyla EPİ referans standardı kullanılarak 2-epi-ivermektin-B1a için seçicilik, kesinlik, doğruluk, tespit ve tayin alt sınırı çalışmaları gerçekleştirildi. Safsızlıkların çoğu için instabilite sorunu nedeniyle analiz ve tespitleri için referans standart materyal hazırlığında zorluklar bulunmakta olup, 1 mg olarak % 98 saflıkta sertifikalı olarak temin edilebilen 2-epi-ivermektin B1a, hata ve kayıp olmaması için kendi viyali içerisinde 0,625 mL metanol ile seyreltilerek 1600 µg/mL stok çözelti elde edildi. Daha sonra seyreltmelerle safsızlıklar için tespit ve tayin limitlerinde IVM için ihmal limiti olan 0,4 µg/mL, ürün içerisindeki miktarını doğru ölçülebildiğini gösterebilmek için 4, 8 ve 9,6 µg/mL yükleme (spike) olarak dört konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler üç tekrarlı çalışıldı.

3.4.1. 2-epi-ivermektin B1a için Seçicilik

EPİ safsızlığının UHPLC ile geliştirilen yöntem ile seçiciliğinin gösterilebilmesi için mobil faz (Asetonitril, Metanol, Su), çözücü (Metanol) ve yardımcı maddeler (Propilen glikol, Gliserol formal) ile seçicilik çalışması gerçekleştirilerek, matrikste yer alan maddelerin ölçüm sonucuna kromatografik olarak girişimleri olmadığı gösterildi

3.4.2. 2-epi-ivermektin B1a için Tespit ve Tayin Alt Sınırı

Tespit ve tayin alt sınırı çalışmasında, EPI için Ph.Eur. ye göre daha alt seviyede ölçüm gerekliliği bulunmayan ihmal limiti (% 0,05) 0,4 µg/mL seviyesinde 10 tekrarlı ölçümler gerçekleştirildi. Bu konsantrasyon dikkate alınarak sinyal/gürültü oranı hesaplandı. Metot ile daha düşük konsantrasyonda beklenen sinyal/gürültü oranına ulaşılabileceği tespit edilmekle birlikte ihmal limiti altında çalışma gerekliliği bulunmadığı için daha düşük seviye çalışılmadı.

3.4.3. 2-epi-ivermektin B1a için Doğruluk Çalışması

EPİ safsızlığının UHPLC ile geliştirilen yöntem ile doğruluk parametresi çalışmasında belirlenen test konsantrasyonunun tanımlama ve kalifikasyon limiti (%1) 8 µg/mL'nin % 50-120'si aralığında, 4, 8 ve 9,6 µg/mL olmak üzere üç konsantrasyon üç tekrarlı şekilde çalışıldı. Tekil ve ortalama % geri kazanım ile bağıl standart sapma (BSS) hesaplandı.

3.4.4. 2-epi-ivermektin B1a Kesinlik

EPİ safsızlığının UHPLC ile geliştirilen yöntem ile kesinlik parametresi çalışmasında belirlenen test konsantrasyonu tanımlama ve kalifikasyon limiti (%1) 8 µg/mL'nin % 50-120'si aralığında, 4, 8 ve 9,6 µg/mL olmak üzere üç konsantrasyon üç tekrarlı şekilde çalışıldı. BSS hesaplandı.

3.4.5. 2-epi-ivermektin B1a Ara Kesinlik

EPİ safsızlığının UHPLC ile geliştirilen yöntem ile ara kesinlik parametresi çalışmasında farklı günde, belirlenen test konsantrasyonu tanımlama ve kalifikasyon limiti (%1) 8 µg/mL'nin % 50-120'si aralığında, 4, 8 ve 9,6 µg/mL olmak üzere üç konsantrasyon üç tekrarlı şekilde çalışıldı. BSS hesaplandı.

3.5. Toksikolojik Testler

Analitik çalışmalar sonucunda test materyalinin safsızlık profilindeki farklılıkların sitotoksik ve genotoksik potansiylerini değerlendirmek üzere IVM Ph.Eur. referans standardı (Std1), ve Std1 ile karşılaştırmak üzere en yüksek safsızlığa sahip etkin madde (API-4), ideal pH'a sahip (Awasthi ve ark. 2012), referans tıbbi ürün (A15), pH değeri ideal aralığın dışında olup, farklı üreticiler bazında tespit edilen degradasyon ürünü EPİ safsızlığı en yüksek olan iki ürün (A10 ve A16), çalışmalar süresince tespit edilen ve herhangi toksisite bilgisine ulaşılamayan degradasyon ürünü 2-epi-ivermektin B1a safsızlığı (EPİ) olmak üzere toplam 6 farklı test materyali seçilmiş (Tablo 3-3), Bakteri Ters Mutasyon (AMES), Hücre Canlılığı ve Comet Testleri uygulanmıştır.

IVM tüm türlerde karaciğer ve böbrekler (< %2) aracılığıyla elimine edilen bir antiparaziter ilaçtır (Canga ve ark. 2009). *In vivo* deneysel çalışmalarda, bileşiğin glomerular filtrasyon düzeyini azaltarak ve renal tubullerde fonksiyon bozukluğu ile ilişkili nefrotoksisiteye neden olabileceği bildirilmektedir (Arise ve Malomo 2009; Al-Jassim ve ark. 2016). MDBK hücre hattı; çift tırnaklı türe ait olup, p53 yetkin (Devireddy ve Jones 1999; Fiorito ve ark. 2011), hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve hücre iskeleti gibi işlevlerde yer alan genlerinin karaciğere göre daha yüksek olduğu (Bionaz ve ark. 2008) bildirilmiştir. Bu bilgiler ve IVM preparatlarının endike olduğu türler dikkate alınarak *in vitro* sitotoksisite ve Comet testi çalışmalarında MDBK hücre hattı kullanılmıştır.

Tablo 3-3 : Genetik Toksikoloji Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Tanımlayıcı Kod	Numune No	Açıklama	Üretici
N1	Ref.Std1	Sertifikalı Referans Standart	EDQM
N2	API-4	Etkin madde	X
N3	A10	Test numunesi1	X1
N4*	A15	Test numunesi2	X2
N5	A16	Test numunesi3	X3
N6**	EPİ	2-epi-ivermectin-B1a	TRC

*Referans tıbbi ürün

**Test maddesi safsızlığın yetersiz olması nedeniyle mutajenite çalışmalarında yalnızca metabolik aktivasyon yokluğunda çalışılmıştır.

3.5.1. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi

Hücre canlılığı testi, analitik çalışmalar sonucunda seçilen ivermektin test numuneleri ve EPI safsızlığı (Tablo 3-3) ile gerçekleştirildi. Doz belirleme ve çözünürlük çalışmaları yürütüldü. Çözücü olarak propilen glikol kullanıldı. Hızlı sonuç alınan, pratik, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek Cell Titer Glo ATP Viability Assay (Promega 2020) kiti kullanarak ölçümler gerçekleştirildi.

3.5.1.1. Kullanılan Ekipman ve Malzeme

Laminar akım kabini (Esco)

Mikroplaka okuyucu (Perkin Elmer)

Inverted Işık Mikroskobu (Olympus)

Pipet Seti (Eppendorf)

-80˚C Derin Dondurucu (Arctico)

-20˚C Derin Dondurucu (Arctico)

+4˚C Buzdolabı

Hücre Kültürü İnkübatörü (Thermo)

3.5.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler

MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre hattı (Sigma, ECACC 90050801),
Cell Titer Glo ATP Canlılık Kiti (Promega),
Fetal Bovine Serum (Hyclone),
96 well plate (Greiner)
6 well plate (Greiner)
Penisilin/Streptomisin (Applichem Panreac)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (Sigma)
Flask (Greiner)
Trypan Blue solüsyonu (Sigma)
Propilen glikol (Scharlau)
Triton X-100 (Sigma)
Mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf)
Steril santrifüj tüpü (Greiner)
L-Glutamine (Gibco),
Trypsin-EDTA (Gibco),
Toma lamı (Marienfeld superior)
Steril pipet ucu (100, 250, 1000 µL-Eppendorf)

3.5.1.3. Analizi Yapılan Bileşikler

Tablo 3-3'de sunulmuştur.

3.5.1.4. Deney prosedürü;

-18°Cdeki reagent +4°C bir gün önceden çözdürmeye bırakıldı.
-MDBK hücre hattı 96'lık kültür plakalarına kuyu başına 1 x 10^5 olacak şekilde ekildi.
-Hücrelerin tutunması için 37˚C'de % 5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
-Test maddesi çözeltileri (6 adet) 8 konsantrasyonda, besiyerinde 3 tekrarlı hazırlandı. (7,81 µM, 15,63 µM, 31,25 µM, 62,50 µM, 125,00 µM, 250,00 µM, 500,00 µM, 1000,00 µM)
-Plakalardaki besiyeri atıldı.

-Plakaların dış kenarlarında kalan kuyucuklara sinyal yanısmasının önüne geçmek için yalnızca besiyeri, 2. ve 11. kuyucuklara negatif kontrol (%4 Propilen glikol içeren besiyeri), 3-10 arasındaki kuyucuklara besiyerinde taze hazırlanan test maddesi eklendi. (Ayrı bir plakada pozitif kontrol olarak % 1 Triton-X-100 kullanıldı).
- 37°C, % 90 nem, %5 CO_2 inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
-ATP kitinin oda ısısına gelmesi için 15 dakika beklendi.
-Buffer, 1 dakika içerisinde amber liyofilize substrata eklendi.
-Homojenize çözelti elde etmek için nazikçe çalkalandı.
-Test maddesine maruz kalan her bir kuyucuğa 100 µL bu çözeltiden eklendi.
-Lizisi indüklemek için 2 dakika orbital shaker ile çalkalandı.
-Luminesans sinyali stabilize etmek için 10 dakika beklendi.
-Luminesans sinyal, luminometrik mikroplaka okuyucuda okutuldu.
-Elde edilen luminesans (Relative Light Unit-RLU) değerleri ile yüzde sitotoksisite aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\%\ \text{Sitotoksisite} = 100 - \frac{\text{Test numunesi RLU} - \text{Besiyeri RLU}}{\text{Çözücü içeren negatif kontrol RLU} - \text{Besiyeri RLU}} x100$$

-Doğrusal olmayan regresyon ile inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerleri hesaplandı.

3.5.2. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Mutajenik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi

Mutajenitenin belirlenmesi için Maron ve AMES (1983) tarafından geliştirilen ve safsızlıkların toksikolojik etkilerinin değerlendirilmesi için referans yöntem olan OECD 471 no'lu Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi kullanıldı (OECD 2020a). Mutajenite deneyi 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak, ve 1000 µg/plak olmak üzere test maddelerinin çözünürlüğü esas alınarak dört farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi. Tekrar için her bir dozda 3 plak kullanıldı.

3.5.2.1. AMES Testi için Kullanılan Ekipman ve Malzeme

Class II Biyolojik Güvenlik Kabini (Esco-AC2-4E8),
Çalkalayıcı inkübatör (Heidolph-Inkubator 1000),
Steril petri kutusu (Isolab)
-80°C Derin Dondurucu
-20°C Derin Dondurucu

+4°C Buzdolabı

3.5.2.2. AMES Testi için Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Suşlar

S. typhimurium suşları (TA100, TA98-Moltox),

Minimum glukoz agar (MGA),

Glukoz_6_fosfat (Roche)

Magnezyum sülfat (Sigma)

Sitrik asit monohidrat (Sigma)

Sodyum amonyum fosfat (Sigma)

Mikrozomal enzim ekstresi (Yeditepe Üniversitesi In-House S9 Fraksiyonu),

Dimetilsülfoksit (Honeywell)

Agar (Sigma)

B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Free (NADP-Alfa Easer),

Aroclor 1254 ampul (Dr.Ehrenstorfer),

Potasyum fosfat dibazik (Fisher Scientific)

3.5.2.3. AMES testi yapılan bileşikler

Tablo 3-3'de sunulmuştur.

3.5.2.4. AMES Testi için Çözelti ve Plakların Hazırlanması

-Dondurulmuş örneklerin hazırlanması,

S. typhimurium suşları, sıvı besiyerinde mL'de 1-2x10^9 bakteri olacak şekilde üretildi. mL'sine 0,09 mL DMSO eklenerek yavaşca karıştırıldı. 2 mL'lik cryo tüplere aktarıldı. Önce -20°C, daha sonra –80°C'da derin dondurucuya kaldırıldı.

(0.05 mM) Histidin/Biyotin Çözeltisi 250 mL için:

D-Biyotin: 0.0309 g

L-Histidin: 0.024 g

Distile su: 250 mL

100 mL üst agara 10 mL histidin/biyotin çözeltisi eklendi.

Üst Agar 100 mL için:

Agar: 0.6 g

NaCl: 0.5 g

Distile su : 100 mL

Karışım 20 dakika 121°C' de steril edildi.

Ampisilin Çözeltisi (8 mg/mL) 100 ml için:

Ampisilin trihidrat: 0. 8 g

Sodyum hidroksit (0.02N): 100 mL

Minimum Glukoz Agarlı Ortam (MGA) 1000 mL için:

Agar: 15 g

50xVB tuzları: 20 mL

% 40 glikoz çözeltisi: 50 mL

Distile su: 930 mL

Distile su ve agar ve karışımı otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi. % 40 glukoz solüsyonu, 50xVB tuzları ile karıştırıldı. Petri kutularına 25-30 ml olarak dağıtıldı. Agarın katılaşması beklendi.

Master plakların hazırlanması;

TA98 ve TA100 suşları, histidin/biyotin/ampisilin içeren plaklara ekildi.

-Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve Çözeltiler

Vogel Bonner Tuz Çözeltisi (50xVB) 1000 mL için:

Magnezyumsülfat ($MgSO_4.H_2O$) : 10 g

Sitrik asit monohidrat: 100 g

Potasyumfosfat (K2HPO4): 500 g

Sodyumamonyumfosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$) : 175 g

Distile su: 670 mL

Tuzlar verilen sırayla sıcak distile suya eklendi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak otoklavda steril hale getirildi.

Numunelerin hazırlanması;

Numuneler DMSO'da çözülerek/seyreltilerek 0,1 µg/plaka, 10 µg/pleyt, 100 µg/pleyt, 1000 µg/pleyt olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda çözeltiler elde edildi.

3.5.2.5. AMES Testinin Uygulanışı

-Deneyden bir gün önce, içerisinde 50 ml nutrient broth bulunan falkon tüplere master plaklardan tek koloni alınarak ekim yapıldı.

-Çalkamalı inkubatörde 37°C' 140 rpm'de 12-16 saat inkübe edildi.

-Deney günü , 45°C' de tutulan histidin-biyotinli materyalin farklı konsantrasyonlarını içeren top agar tüplere çoğaltılan bakterilerden 0,1 ml eklendi.

-Kısa süre vorteks sonrası hızlı bir şekilde MGA petrilerine yayıldı.

-Plaklar 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası koloniler sayıldı.

-Kontrol plaklarındaki bakteri sayıları ile karşılaştırıldı.

-Test maddesi metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak amacıyla mikrozomal enzim ekstresi (S9 fraksiyonu) kullanıldı.

-45°C'lik su banyosunda tutulan ve içerisine 2 mL histidin ve biyotin eklenmiş top agar bulunan tüplere;

-0,1 mL 12-16 saatlik bakteri kültürü,

- 0,5 mL S9 karışımı ve son hacim 0,1 mL test maddesi konuldu. Bu karışım MGA plaklarına döküldü. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası koloniler sayıldı.

-Mutajenik etkinin değerlendirilmesinde aşağıdaki förmül kullanıldı.

$$\text{Mutajenik indeks} = \frac{\text{Test maddesi uygulanan plaklarda koloni sayısı}}{\text{Negatif kontrol plaklarda koloni sayısı}}$$

Mutajenik indeks < 2 mutajen değil;

Mutajenik indeks ≥ 2 mutajen.

Pozitif kontrol olarak; TA98 suşu ile metabolik aktivasyon yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamin (20 µg/petri), TA100 suşu ile metabolik aktivasyon yokluğunda sodyum azid (1 µg/petri), TA98 ve TA100 için metabolik aktivasyon varlığında 2-aminofluorene (5 µg/petri) kullanıldı.

3.5.3. İvermektin İçeren Tıbbi Ürün ve API'ler ile EPİ numunelerinde Genotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Comet Testi

İvermektin safsızlıklarının genotoksisite potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla Singh ve ark. (1988) tarafından geliştirilen tek hücreli alkali jel elektroforez (Comet assay) yöntemi kullanıldı.

3.5.3.1. Comet testi için Kullanılan Ekipman ve Malzeme

Laminar akım kabini (Esco)
Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter)
Mikroplaka okuyucu (Perkin Elmer)
Inverted Işık Mikroskobu (Olympus)
Floresans mikroskop (Olympus)
Su Banyosu (Memmert),
Pipet Seti (Eppendorf)
Comet tankı (Clever scientific)
Mikrodalga fırın (Samsung)
-80˚C Derin Dondurucu (Arctico)
-20˚C Derin Dondurucu (Arctico)
+4˚C Buzdolabı
Hücre Kültürü İnkübatörü (Thermo)

3.5.3.2. Comet Testi için Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler

MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre hattı (Sigma, ECACC 90050801),
Fetal Bovine Serum (Hyclone),
Tripan Blue (Sigma),
96 well plate (Greiner)
6 well plate (Greiner)
Penisilin/Streptomisin (Applichem Panreac)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (Sigma)
Flask (Greiner)
Tris (VWR)
NACl (VWR)

LMA (Sigma)

NMA (Sigma)

KCl (Sigma)

Etidyum bromür solüsyonu (Applichem Panreac)

Trypan Blue solüsyonu (Sigma)

Hidrojen peroksit (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Sodyum Hidroksit (Sigma)

Metanol (J.T.Baker)

Propilen glikol (Scharlau)

Dimetilsülfoksit (Honeywell)

Mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf)

Steril santrifüj tüpü (Greiner)

Lam (İnterlab)

Lamel (İnterlab)

Dik şale (İnterlab)

L-Glutamine (Gibco),

Trypsin-EDTA (Gibco),

Toma lamı (Marienfeld superior)

Steril pipet ucu (100, 250, 1000 uL-Eppendorf)

3.5.3.3. Comet Testi Yapılan Bileşikler

Tablo 3-3'de sunulmuştur.

3.5.3.4. Comet Testi için Çözeltilerin Hazırlanması

Tüm çözeltiler analize kadar +4˚C'de tutuldu.

%1 NMA çözeltisi; 1 gr NMA 100 mL PBS ile çözdürüldü.

% 0,65 LMA çözeltisi; 650 mg LMA 100 mL PBS ile çözdürüldü.

Stok lizis çözeltisi; 146,1 gr NACl, 37,2 gr disodyum EDTA, 1,2 gr TRIS, 8 gr NAOH 1000 mL ultrasaf suda çözdürüldü. pH HCl ile 10'a ayarlandı.

Çalışma lizis çözeltisi; 70 mL stok lizis çözeltisine 8 mL DMSO ve 800 µL Triton X-100 eklendi.

Stok elektroforez çözeltisi**;** 1- 14.9 gr EDTA 200 mL ultrasaf suda çözdürüldü. 10 M NAOH ile pH 10'a ayarlandı.

2- 10 M NAOH; 400 gr NAOH 1000 mL ultrasaf suda çözdürüldü.

Çalışma elektroforez çözeltisi; 30 mL stok 10 M NAOH çözeltisi, 5 mL stok EDTA çözeltisi ultrasaf su ile 1000 mL hacme tamamlandı.

Nötralizasyon tamponu; 48,456 gr TRIS 1000 mL ultrasaf suda çözdürüldü. pH HCl ile 7,5'e ayarlandı.

Etidyum bromür çözeltisi; 80 µL stok etidyum bromür solüyonu 40 mL ultrasaf su ile hacme tamamlandı.

3.5.3.5. Comet Testinin Yapılışı

Hücre canlılığı belirlendikten sonra Comet testi % 70 üzeri hücre canlılığı olan (Tice ve ark. 2000) 3 dozda (Tablo 4-30) yapıldı.

-MDBK hücre hattı 96'lık kültür plakalarına kuyu başına 1 x 10^5 olacak şekilde ekildi.

-Hücrelerin yapışması için 37˚C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

-Yıkama yapılarak Mmdyumda taze hazırlanan test maddesi plakalara eklendi. (Her bir doz için 3 tekrar çalışıldı).

- 37˚C, % 90 nem, %5 CO_2 inkübatörde 3 saat inkübe edildi.

-Medyum atılıdı.

-100 µL PBS ile yıkandı. PBS aspire edildi.

50 µL Tripsin eklendi. 5 dakika inkube edildi.

50 µL medyum eklendi. 2-3 kez karıştırılıp buz içerisindeki falkonlara alındı.

1500 RPM 'de 5 dakika santrifüj edildi.

-40 µL PBS eklendi. 40 mL %0.65'lik LMA ile karıştırıldı.

-Işık olmayan ortamda farklı noktalara damlatarak, önceden %1 NMA ile kaplanan lam üzerine yayıldı. (Her bir kuyu için 2 farklı lam)

-Lamel kapatılarak 15 dakika +4°C inkubasyona bırakıldı.

-Lameli atılan lamlar soğuk lizis solüsyonu içerisinde 1 saat +4°C alüminyum folyo kaplı dik şalede inkübe edildi.

-Lamlar lizisten alınarak soğuk elektroforez solüsyonu ile dolu tankta 20 dakika bekletildi.

-30 dakika 25 V, 300 mA elektroforez uygulandı.

-5’er dakika 2 kez Tris ile nötralize edildi.

-Soğuk metanole daldırarak fikzasyon yapıldı.

-80 µl etidyum bromid solüsyonu ile boyandı.

-Floresan mikroskop altında her bir doz için 100 hücre görüntüsü alındı.

-Alınan görüntüler kuyruktaki DNA yüzdesi yönünden görüntü işleme programı ile analiz edildi.

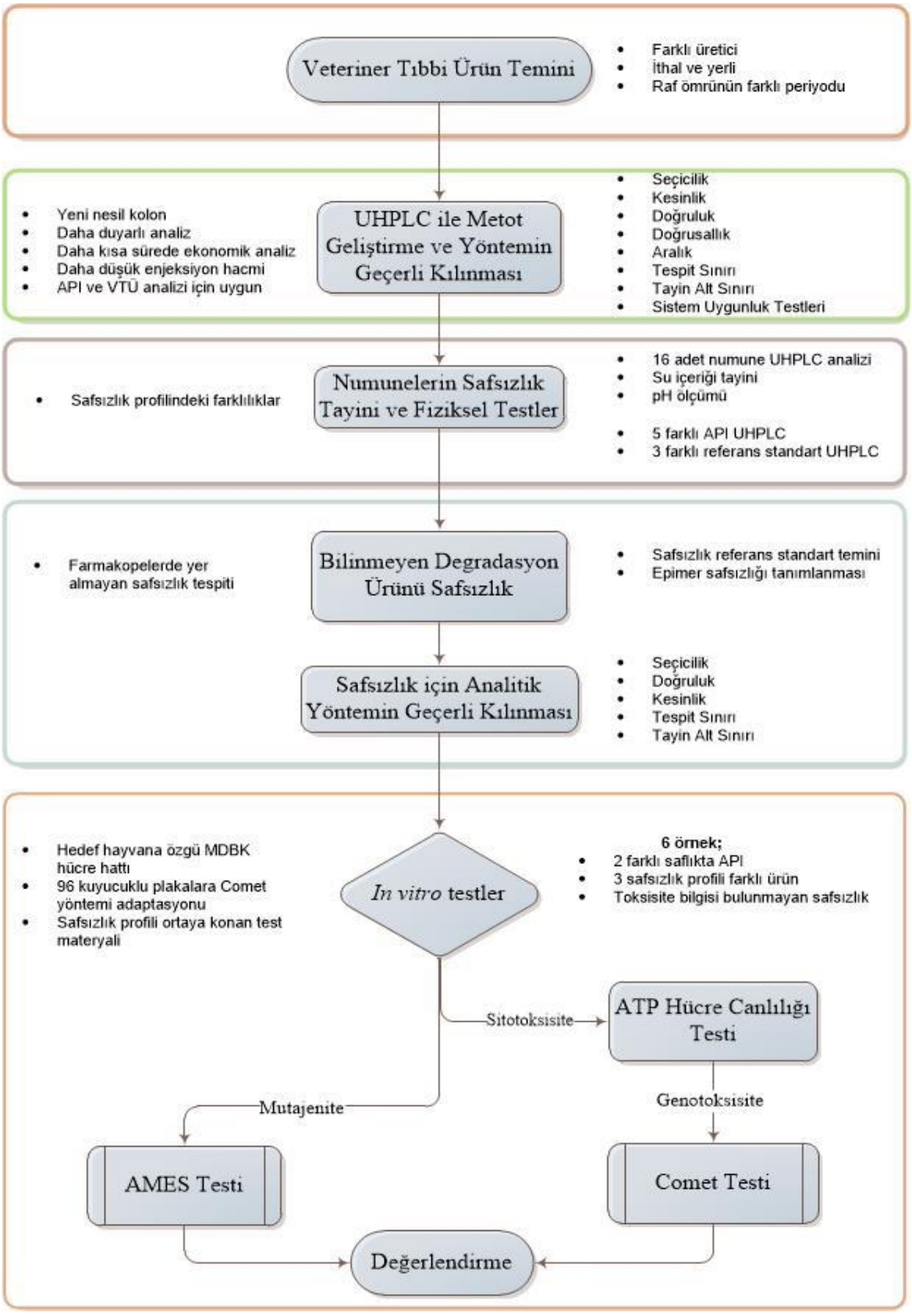
Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) 250 µg/mL dozda kullanıldı.

3.5.4. İstatistiksel Analizler

Analitik çalışmalarda VICH GL1 ve GL2 kılavuzları doğrultusunda hesaplamalar esas alındı. Doğruluk çalışmasında % geri kazanım ve BSS, kesinlik ve ara kesinlik, çalışmasında BSS, doğrusallık ve aralık çalışmalarında korrelasyon katsayısı ve artıkların dağılımı, tespit alt sınırı ve tayin alt sınırı çalışmalarında Sinyal/Gürültü Oranı, sistem uygunluk testlerinde Sinyal/Gürültü Oranı, rezolüsyon ve simetri faktörü parametreleri değerlendirildi. İki farklı test numunesi hazırlanarak ortalama değer alındı (VICH 1998; 1998a). Sitotoksisite testinde elde edilen RLU değerleri ile dozlara göre saptanan hücre canlılığı esas alınarak doğrusal olmayan regresyon (Graphpad 2020) ile IC_{50} değerleri hesaplandı. Tek yönlü varyans analizi ile Dunnett’in çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılarak gruplar arası karşılaştırma yapıldı. AMES testi için Dunnett’in çoklu karşılaştırma yöntemi kullanıldı (Dunnett ve Crisafio 1955). Comet testi için tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ve Dunnett’in çoklu karşılaştırma yöntemi uygulanarak Graphpad Prism 9.0.0 ile istatistiksel hesaplama yapıldı. *In vitro* çalışmalarda $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi (Graphpad 2020).

4. BULGULAR

Araştırmamızda tıbbi ürünlerin temin edilmesi sonrasında numunelere kod numarası verilmiş ve tüm değerlendirmeler numunelerin kod numaralarına göre gerçekleştirilmiştir. İnceleme altına alınan numunelerin miktar tayini ve safsızlık analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla Avrupa farmakopesi ivermektin monografı referans alınarak metot geliştirilmiştir. Ayrıca araştırma kapsamında tüm numunelerin pH ve su içeriği için nem tayini testleri gerçekleştilmiş ve UHPLC ile safsızlıkları yönünden analiz edilmiştir. Bilinmeyen degradasyon ürünü safsızlık tespit edilmesi üzerine, safsızlık referans standardı temin edilerek doğrulama çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmalar sonrasında Std, API, EPİ ve VTÜ düzeyinde AMES ile mutajenite, ATP testi ile sitotoksite, Comet testi ile genotoksisite potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmamızda farklı düzeyde Std, API, referans tıbbi VTÜ ile epimer safsızlığı miktarı yüksek iki VTÜ incelenmiştir. Ülkemizde ruhsatlandırılmış ivermektin enjeksiyonluk çözeltilerinin safsızlık potansiyellerinin yanı sıra olası genotoksik ve sitotoksik etkilerinin *in vitro* test sistemlerinde belirlenmesine yönelik araştırmanın çalışma akış planı Şekil 4-1'de sunulmuştur.



Şekil 4-1: Tez Çalışması Akış Planı

4.1. Fiziksel test sonuçları

4.1.1. pH ölçümü

Farklı raf ömrüne sahip test numunelerinin pH değerleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucu pH değerlerinin 6,21 – 9,21 aralığında olduğu tespit edilmiştir. A1, A2 ve A16 nolu numuneler aynı üreticiye ait olmakla birlikte pH değerlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Test numunelerinin ölçülen pH değerleri tablo 4-1 de sunulmuştur.

Tablo 4-1: Test Numunelerin pH Ölçüm Sonuçları

Numune No	Hacim	Raf Ömrü (Ay)	pH	Sıcaklık ^{0}C
A1	250	6.	6,21	20.6
A2	250	8.	8,79	20.6
A3	250	7.	8,98	20.9
A4	50	13.	7,43	21.1
A5	20	18.	6,48	20.9
A6	100	21.	6,40	20.8
A7	250	31.	6,73	20.8
A8	100	30.	6,94	20.8
A9	100	11.	7,10	20.8
A10	100	7.	8,78	20.8
A11	50	30.	7,00	21.0
A12	50	29.	6,67	20.9
A13	100	9.	6,75	20.8
A14	100	11.	6,55	20.7
A15	50	41.	6,53	20.7
A16	250	10	9,21	22,4

4.1.2. Su içeriği

Farklı raf ömrüne sahip test numunelerinin su içeriği düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4-1'de sunulmuştur. Su içeriği'nin % 0,08 ile % 1,2 arasında olduğu tespit edilmiştir. En yüksek su içeriğine sahip numunenin A15 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-2: Test Numunelerin Su İçeriği Ölçüm Sonuçları

Numune No	Hacim	Raf Ömrü (Ay)	1.Ölçüm	2.Ölçüm	Ortalama (% Su İçeriği)
A1	250	6.	0,074	0,105	0,090
A2	250	8.	0,067	0,088	0,078
A3	250	7.	0,084	0,085	0,085
A4	50	13.	0,098	0,104	0,101
A5	20	18.	0,159	0,166	0,163
A6	100	21.	0,264	0,273	0,269
A7	250	31.	0,196	0,195	0,196
A8	100	30.	0,194	0,198	0,196
A9	100	11.	0,107	0,111	0,109
A10	100	7.	0,139	0,154	0,147
A11	50	30.	0,860	0,875	0,868
A12	50	29.	0,235	0,249	0,242
A13	100	9.	0,121	0,124	0,123
A14	100	11.	0,230	0,237	0,234
A15	50	41.	1,203	1,221	1,212
A16	250	10.	0,086	0,100	0,093

-Ortam Koşulları; Ortam Sıcaklığı 20,9°C, Ortam nemi %32

4.2. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması

Çalışmada; hem ivermektin API, hem de VTÜ'lerde H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} bileşenleri miktar tayinine yönelik kullanılan yöntem farmasötik ürünler için validasyon kabul kriterlerine göre değerlendirilmiş olup yöntem geçerliliği sağlanmıştır (VICH 1998;

1998a; EDQM 2000; Engin ve ark. 2017). Bu kapsamda Avrupa farmakopesinde ivermektin analizine yönelik metotta aşağıda sunulan modifikasyonlar uygulanmıştır.

Avrupa Farmakopesi metodunda kolon boyutları 250x4.6 mm olarak verilmiş olup, çalışmada 150x3.0 mm boyutlu kolon kullanılmıştır. Analizlerde kullanılması öngörülen kolon iç çapının Ph.Eur'da izin verilen limitler dışında kalması nedeniyle, tercih edilen kolon için ek verifikasyon çalışması gerekmiştir (Birleşik Devletler Farmakopesine göre doğrusal akış hızı sabit tutulabildiği sürece sınırlama olmaksızın izin verilmektedir). Deneme çalışmalarında farklı enjeksiyon hacmi uygulanmış, tekrarlanabilirlik yönünden en iyi sonuç elde edilen 5 µL enjeksiyon hacmine karar verilmiştir.

Avrupa Farmakopesinde ivermektin API analizi için 51:34:15 V/V/V Asetonitril:Metanol:Su olarak verilen mobil faz oranları 54:31:15 V/V/V Asetonitril:Metanol:Su olarak modifiye edilmiştir. Böylece analitin alıkonma süresinde meydana gelen küçük sapmalar önlenebilmiştir. *Ayrıca Mobil fazın bileşiminde; minör solvent %30 rölatif veya % 2 mutlak düzenleme (hangisi büyükse), diğer bileşenlerin mutlak % 10'dan fazla değiştirilmemesi,* ilkesine uygun olarak, solvent oranlarındaki modifikasyonların, Ph.Eur. ve Birleşik Devletler Farmakopesinin (USP) (İvermektin enjeksiyonluk çözelti için 53:27.5:19.5 V/V/V Asetonitril:Metanol:Su olarak önerilen) izin verdiği değişikliklere uyumlu olduğu belirlenmiştir (USP 2011; Ph.Eur. 2020k).

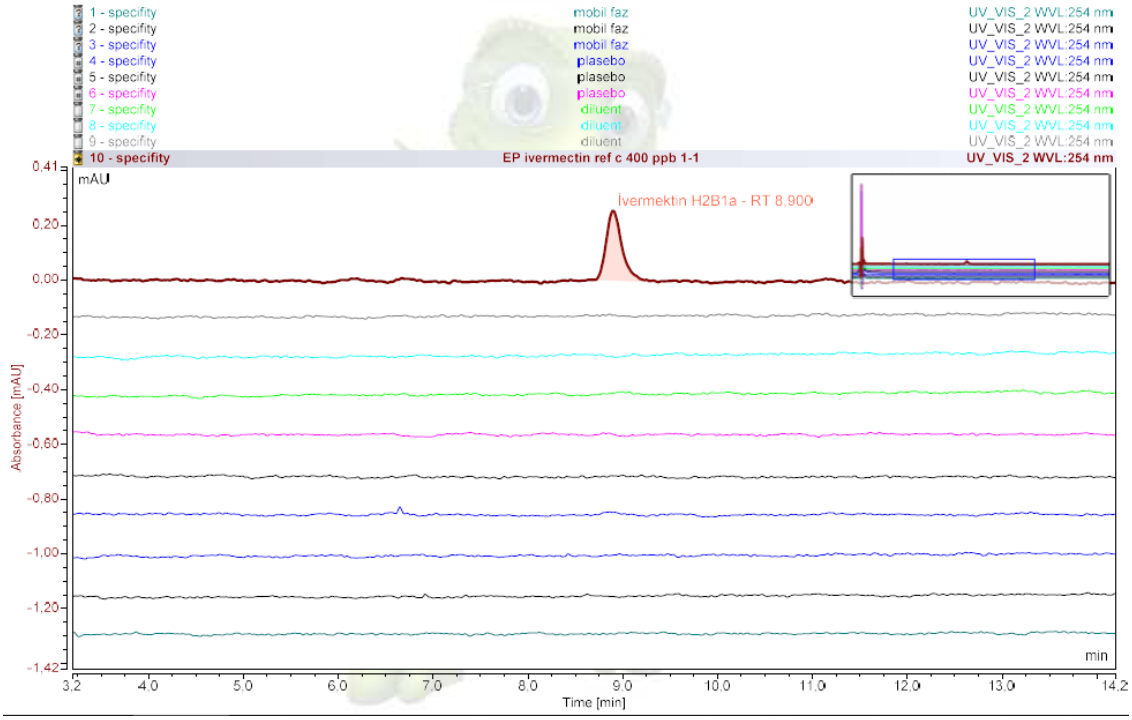
Su yerine asetik asit çözeltisi kullanıldığında analiz süresinin kısaldığı fakat safsızlık piklerinin ayrımının güçleştiği gözlenmiştir. Farklı üreticilere ait benzer özellikteki kolonlar kullanıldığında yeterli ayrım sonuçlarına ulaşılmıştır. 1 mL/dak akış hızında 20 dakika, 0,6 mL/dak akış hızında 25 dakikalık analiz metodu piklerin uygun şekilde ayrılmasına imkan vermiştir. Deneme amacıyla sodyum hidroksit, hidroklorik asit ve hidrojen peroksit ile referans standart, API ve ürün stres koşullarına maruz bırakıldığında degradasyon ürünlerinin gözlendiği tespit edilmiştir.

Hazırlanan her bir standart çözelti üç tekrarlı çalışılmıştır. Çalışmalar sonucunda metodun 0,4 – 960 µg/mL çalışma aralığına (range) sahip olduğu gösterilmiştir. Korelasyon katsayısı 0,9998 olarak elde edilmiş olup metodun, belirtilen çalışma aralığında lineer olduğunu göstermektedir. Yükleme yapılan örneklerde IVM H_2B_{1a} bileşeni için %98-%102 arasında geri kazanım elde edilmiş olup yalnızca API için değil, ürünler için de uygun olduğu gösterilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmasında yöntemin geçerli kılınması için % BSS değeri beklenen limitler içerisinde bulunmuştur. Seçicilik çalışmasında çözücü, mobil faz, yardımcı maddeler olan propilen

glikol ve gliserol formal analiz edilmiş olup, herhangi bir girişim olmadığı gösterilmiştir. Tüm parametreler değerlendirildiğinde metotta gerçekleştirilen modifikasyonlar sayesinde farmakope metoduna göre süre, enjeksiyon hacmi, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik kriterleri yönünden iyileştirilmiştir Avrupa Farmakopesi ivermektin monografında belirtilen Sinyal/gürültü oranı, rezolüsyon, simetri faktörü gibi sistem uygunluk parametreleri değerlendirilmiş ve uygun bulunmuştur.

4.2.1. İvermektin H_2B_{1a} için Seçicilik (Specifity)

Yöntemin geçerli kılınması için gerçekleştirilen seçicilik çalışmasında çözücü, mobil faz ve yardımcı madde kaynaklı girişim olmadığı tespit edilmiş, seçicilik çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-2'de sunulmuştur.



Şekil 4-2: İvermektin Seçicilik Çalışması Kromatogramı

4.2.2. İvermektin H_2B_{1a} için Doğruluk (Accuracy-Trueness)

Üç konsantrasyonda üç tekrarlı doğruluk çalışmasında geri kazanım (%2) ve bağıl standart sapma (En fazla 2) yönünden sonuçlar değerlendirme kriterlerine uygun bulundu. Yöntemin geçerli kılınması için değerlendirme kriterleri Tablo 4-3'de, İvermektin H_2B_{1a} için doğruluk çalışma sonuçları Tablo 4-4'de sunulmuştur.

Tablo 4-3 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	**İvermektin H_2B_{1a}**
Alt sınır (Tekil Değerler)	(%) 98,00
Üst sınır (Tekil Değerler)	(%) 102,00
Alt Sınır (Ortalama Değer)	(%) 98,00
Üst sınır (Ortalama değer)	(%) 102,00
Maksimum BSS	2,0000
Aralık	% 80,00 - %120,00

Tablo 4-4: İvermektin Doğruluk Çalışması Sonuçları

No.	**Adı**	**Seviye (%)**	**Beklenen Miktar (mg/mL)**	**Ölçülen Miktar (mg/mL)**	**Geri Kazanım (%)**	**Geri Kazanım (Tekil Değer)**	**Ortalama Geri Kazanım (%)**	**Geri Kazanım (Ortalama değer)**	**BSS (%)**	**BSS <%2**
1	1-1	80,00	640,00	640,57	100,1	uygun	100,3	uygun	0,3691	uygun
2	1-2	80,00	640,00	640,93	100,1	uygun				
3	1-3	80,00	640,00	644,85	100,8	uygun				
4	2-1	100,00	800,00	799,11	99,9	uygun	100,0	uygun	0,1011	uygun
5	2-2	100,00	800,00	800,20	100,0	uygun				
6	2-3	100,00	800,00	800,69	100,1	uygun				
7	3-1	120,00	960,00	941,00	98,0	uygun	98,5	uygun	0,4190	uygun
8	3-2	120,00	960,00	948,02	98,8	uygun				
9	3-3	120,00	960,00	947,70	98,7	uygun				

4.2.3. İvermektin H_2B_{1a} için Kesinlik (Precision)

4.2.3.1. İvermektin H_2B_{1a} için Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Üç konsantrasyonda üç tekrarlı kesinlik çalışmasında sonuçlar bağıl standart sapma (en fazla % 2) değerlendirme kriterlerine uygun bulundu. Yöntemin geçerli

kılınması için değerlendirme kriterleri Tablo 4-5'de, İvermektin H_2B_{1a} için tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Tablo 4-6'da sunulmuştur.

Tablo 4-5 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	İvermektin H_2B_{1a}
Maksimum BSS	2,0000
Aralık	% 80,00 - %120,00

Tablo 4-6: İvermektin H_2B_{1a} için Tekrarlanabilirlik Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Seviye (%)	Ölçülen Miktar (mg/mL)	Ortalama	SS	BSS (%)	BSS <%2
1	1-1	80,00	640,57	642,12	2,3700	0,3691	Uygun
2	1-2	80,00	640,93				
3	1-3	80,00	644,85				
4	2-1	100,00	799,11	800,00	0,8088	0,1011	Uygun
5	2-2	100,00	800,20				
6	2-3	100,00	800,69				
7	3-1	120,00	941,00	945,57	3,9621	0,4190	Uygun
8	3-2	120,00	948,02				
9	3-3	120,00	947,70				

4.2.3.2. İvermektin H_2B_{1a} için Ara kesinlik (Intermediate Precision)

Altı tekrarlı ara kesinlik çalışmasında sonuçlar bağıl standart sapma (En fazla %3) değerlendirme kriterlerine uygun bulundu. Yöntemin geçerli kılınması için değerlendirme kriterleri Tablo 4-7'de, İvermektin H_2B_{1a} için ara kesinlik çalışma sonuçları Tablo 4-8'de sunulmuştur.

Tablo 4-7 : Değerlendirme Kriterleri

Değerlendirme Kriterleri	
Komponent Adı	İvermektin H_2B_{1a}
Maksimum BSS	3,0000
Aralık	% 100

Tablo 4-8: İvermektin H_2B_{1a} için Ara Kesinlik Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Seviye (%)	Ölçülen Miktar (mg/mL)	Ortalama	SS	BSS (%)	BSS <%3
1	1-1	100,00	802,06	801,12	7,1777	0,8991	Uygun
2	1-2	100,00	804,92				
3	1-3	100,00	804,75				
4	1-4	100,00	790,13				
5	1-5	100,00	803,49				
6	1-6	100,00	801,37				

4.2.4. İvermektin H_2B_{1a} için Tespit sınırı (Limit of Detection-LOD) ve Tayin alt sınırı (Limit of Quantitation-LOQ)

Tespit (En az 3,0) ve tayin (En az 10,0) alt sınırında sinyal/gürültü oranı en düşük 34,8 olmak üzere ortalama 42,0 bulunmuş olup izin verilen limitin üzerindedir. Belirlenen konsantrasyon ivermektin analizinde ihmal limiti olduğu için daha alt konsantrasyona yönelik çalışma yapılmadı. Yöntemin geçerli kılınması için değerlendirme kriterleri Tablo 4-9'da, İvermektin H_2B_{1a} için tespit ve tayin alt sınırı sonuçları Tablo 4-10'da sunulmuştur.

Tablo 4-9 : Değerlendirme Kriterleri

Değerlendirme Kriterleri	
Komponent Adı	İvermektin H_2B_{1a}
Konsantrasyon	0,4 µg/mL
Sinyal/Gürültü Oranı (Tespit Sınırı)	3,0
Sinyal/Gürültü Oranı (Tayin Sınırı)	10,0

Tablo 4-10: İvermektin H_2B_{1a} için Tespit ve Tayin Limiti Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Alan mAU*dakika	Sinyal/Gürültü Oranı	Ortalama Sinyal/Gürültü Oranı
1	1-1	0,0793	34,8	42,0
2	1-2	0,0773	46,6	
3	1-3	0,0774	45,8	
4	1-4	0,0773	41,6	
5	1-5	0,0775	39,3	
6	1-6	0,0810	40,9	
7	1-7	0,0807	48,6	
8	1-8	0,0802	44,5	
9	1-9	0,0790	37,6	
10	1-10	0,0789	40,3	

4.2.5. İvermektin H_2B_{1a} için Doğrusallık (Linearity) ve Aralık (Range)

Belirlenen aralık 0,4-960 µg/mL'de korrelasyon katyayısı 0,999'un üzerinde elde edilmiştir. Yöntemin geçerli kılınması için değerlendirme kriterleri Tablo 4-11'de, İvermektin H_2B_{1a} için üç tekrarlı dokuz konsantrasyon çalışma sonuçları Tablo 4-12'de verilmiştir.

Tablo 4-11 : Değerlendirme Kriterleri

Değerlendirme Kriterleri	
Komponent Adı	İvermektin H_2B_{1a}
Korrelasyon katsayısı etkin madde	≥ 0.999
Korrelasyon katsayısı kantitatif safsızlık testi	≥ 0.99

Tablo 4-12: İvermektin H_2B_{1a} için Doğrusallık ve Aralık Çalışma Sonuçları

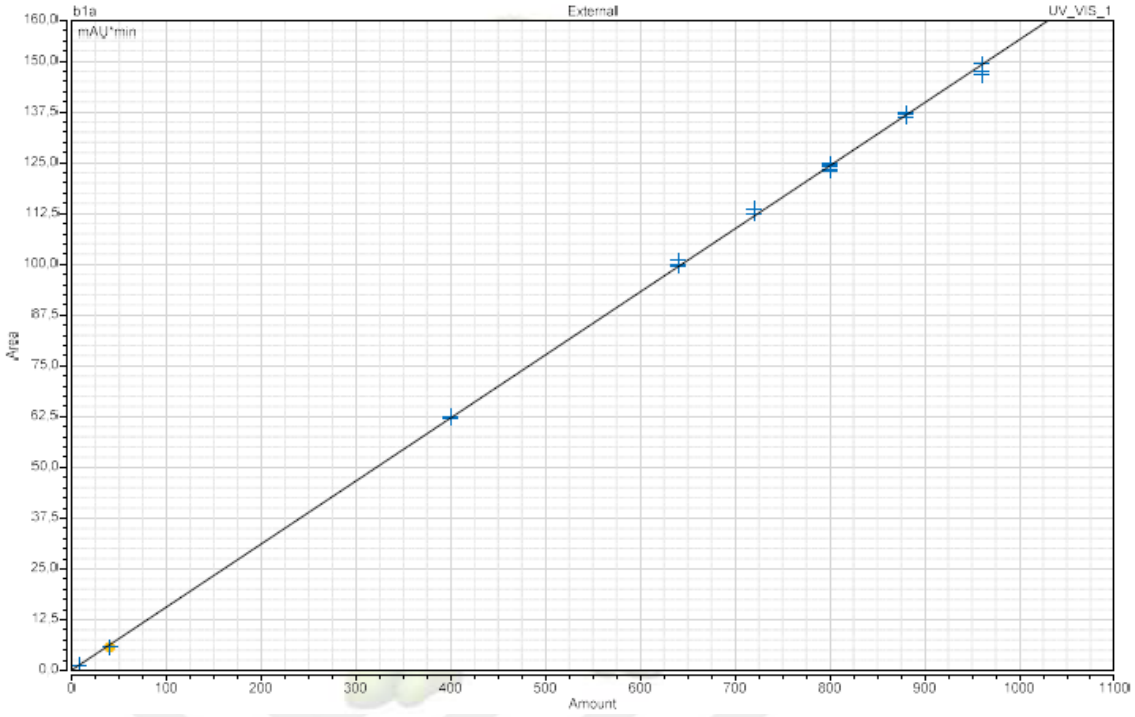
No.	Adı	Seviye %	X Değeri (µg/mL)	Y Değeri mAU*dakika	Ortalama Y değeri
1	1-1	0,05	0,4	0,0759	0,075667
2	1-2	0,05	0,4	0,0770	
3	1-3	0,05	0,4	0,0741	
4	2-1	1	8	1,3770	1,381167
5	2-2	1	8	1,3836	
6	2-3	1	8	1,3829	
7	3-1	5	40	5,7363	5,7318
8	3-2	5	40	5,7274	
9	3-3	5	40	5,7317	
10	4-1	50	400	62,0847	62,3682
11	4-2	50	400	62,4509	
12	4-3	50	400	62,5690	
13	5-1	80	640	99,5609	100,1546
14	5-2	80	640	99,7645	
15	5-3	80	640	101,1383	
16	6-1	90	720	112,3497	113,1999
17	6-2	90	720	113,5427	
18	6-3	90	720	113,7073	
19	7-1-1	100	800	123,0363	123,4898
20	7-1-2	100	800	123,3419	
21	7-1-3	100	800	124,0912	
22	7-2-1	100	800	124,0460	124,463
23	7-2-2	100	800	124,6921	
24	7-2-3	100	800	124,6510	
25	8-1	110	880	136,2563	136,8964
26	8-2	110	880	137,0666	
27	8-3	110	880	137,3662	
28	9-1	120	960	146,5303	147,7937
29	9-2	120	960	147,5870	
30	9-3	120	960	149,2639	

$y=0,1553x + 0,1057$

Eğim (Slope) = 0,1553

Kesme noktası (intercept) = 0,1057

Korrelasyon katsayısı R^2: 0,9998



Şekil 4-3: İvermektin H_2B_{1a} için Kalibrasyon Grafiği

Artıklar rasgele dağılım göstermektedir. Artıklar (Residual) dağılım grafiği Şekil 4-4'de verilmiştir.



Şekil 4-4: Artıklar Dağılım Grafiği

4.2.6. İvermektin için Sistem Uygunluk Testi (System Suitability Test)

Farmakopeye göre sistem uygunluk parametreleri; ihmal (yok sayma) limiti için; Ph.Eur.'e göre referans solüsyon (c) (0,4 µg/mL) ile elde edilen alanın altındaki oran seçilmiştir (Ph.Eur. 2020k).

Rezolüsyon; Ph.Eur.'e göre referans çözelti (a) (800 µg/mL) ile elde edilen kromatogramda H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} komponentlerine ait pikler arasında en az 3.0 olması gerekmekte olup 8,59 elde edilmiştir.

Sinyal/Gürültü Oranı; Ph.Eur.'e göre referans çözelti (c) (0,4 µg/mL) ile elde edilen kromatogramda ana pik için en az 10 olması gerekmekte olup, 34,8 elde edilmiştir. Ayrıca, bu konsantrasyon tespit limiti olduğu için 10 tekrarlı gönderilmiş olup ortalama 42,0 elde edilmiştir. Böylece sağlanan sinyal gürültü oranında, tayin limiti olarak da kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Simetri faktörü; Ph.Eur.'e göre referans solüsyon (a) (800 µg/mL) ile elde edilen kromatogramda ana pik için en fazla 2.5 olması gerekmekte olup 0,96 elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile IVM H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} bileşenlerinin UHPLC analizi için sistem uygunluk parametreleri yönünden uygunluk sağlandı.

4.3. Test Numunelerin HPLC ile İvermektin H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} Analizi

İvermektin bileşen analiz sonuçları Tablo 4-13'de verilmiştir.

Tablo 4-13: Test Numunelerinin İvermektin H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} Bileşen Analiz Sonuçları

Numune No	**Hacim**	**Raf Ömrü (Ay)**	H_2B_{1b}	H_2B_{1a}	$H_2B_{1a}+H_2B_{1b}$	$H_2B_{1a}/(H_2B_{1a}+H_2B_{1b})$	**Toplam safsızlık**
Std-1	---	---	0,71	96,41	97,12	99,3	2,88
Std-2	---	---	1,33	95,85	97,18	98,6	2,82
Std-3	---	---	2,17	95,23	97,40	97,8	2,60
API-1	---	---	1,70	94,67	96,37	98,2	3,63
API-2	---	---	2,73	94,34	97,07	97,2	2,93
API-3	---	---	2,30	93,83	96,13	97,6	3,87
API-4	---	---	2,58	92,32	94,90	97,3	5,10
API-5	---	---	2,93	93,98	96,91	97,0	3,09
A1	250	6.	2,77	90,58	93,35	97,0	6,65
A2	250	8.	1,60	93,70	95,30	98,3	4,70
A3	250	7.	1,54	93,89	95,43	98,4	4,57

A4	50	13.	2,35	93,69	96,04	97,6	3,96
A5	20	18.	2,25	93,77	96,02	97,7	3,98
A6	100	21.	2,07	94,02	96,09	97,8	3,91
A7	250	31.	2,30	93,71	96,01	97,6	3,99
A8	100	30.	2,33	93,71	96,04	97,6	3,96
A9	100	11.	2,30	95,07	97,37	97,6	2,63
A10	100	7.	1,53	93,72	95,25	98,4	4,75
A11	50	30.	1,78	94,46	96,24	98,2	3,76
A12	50	29.	3,33	92,95	96,28	96,5	3,72
A13	100	9.	1,82	94,04	95,86	98,1	4,14
A14	100	11.	1,57	94,32	95,89	98,4	4,11
A15	50	41.	2,18	94,51	96,69	97,7	3,31
A16	250	10.	1,59	88,81	90,40	98,2	9,60

Avrupa farmakopesi monografına göre (Ph.Eur. 2020k) IVM API $H_2B_{1a}/(H_2B_{1a}+H_2B_{1b})$ bileşen oranının minimum % 90 olması gerekmektedir. İvermektin API ve VTÜ'leri için tez çalışması kapsamında geçerli kılınan yöntem ile bileşen analizleri gerçekleştirilmiş olup, en düşük oranın A12 nolu üründe % 96,5 olduğu tespit edilmiştir. Bu üründe H_2B_{1b} bileşeninin analizi yapılan test numunelerinde en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. H_2B_{1a} + H_2B_{1b} bileşeni toplamı en az % 95,0 düzeylerinde olması gerekirken, farklı üreticilere ait 5 API'de gerçekleştirilen analizler sonucunda API-4 nolu numunede bu değerin % 94,9 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca A9 nolu üründe referans tıbbi ürüne (A15) kıyasla daha düşük düzeyde safsızlık tespit edilmiştir.

Avrupa farmakopesinde tıbbi ürünlere yönelik ivermektin için monograf bulunmamaktadır. Ancak Ph.Eur'de ivermektin API'lerinde bulunması olası 11 adet safsızlık tanımlanmıştır. USP'ye göre ivermektin enjeksiyonluk çözeltilerde toplam safsızlıklar için en yüksek % 6,0 limiti verilmektedir (USP 2011; Ph.Eur. 2020k). Toplam safsızlık yönünden USP monografı limitleri dışında kalan A1 (% 6,65) ve A16 (% 9,60) nolu olmak üzere 2 ürün tespit edilmiştir. Ayrıca aynı üreticiye ait A1, A2 ve A16 nolu numunelerde safsızlık profili ve miktarları yönünden farklılıklar bulunmaktadır. A16 nolu numunenin toplam safsızlığı yüksek olarak saptandığından detaylı değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucu "4.4. Tespit Edilen Degradasyon Ürününün

Tanımlanması" başlığında referans standart ile karşılaştırmalı şekilde detaylı olarak incelenmiştir.

İvemektin safsızlıklarının alıkonma ve bağıl alıkonma süreleri Tablo 4-14'de sunulmuştur.

Tablo 4-14: İvermektin Safsızlıkları Alıkonma ve Bağıl Alıkonma Süreleri

No	Safsızlık	Alıkonma Süresi (Dakika)	Bağıl Alıkonma Süresi (Oran)
1	Bilinmeyen safsızlık-1	1,07	0,12
2	Bilinmeyen safsızlık-2	2,04	0,23
3	Bilinmeyen safsızlık-3	4,05	0,46
4	Bilinmeyen safsızlık-4	4,34	0,49
5	Bilinmeyen safsızlık-5	4,56	0,51
6	Bilinmeyen safsızlık-6	5,04	0,57
7	H_2B_{1b} bileşeni	6,74	0,76
8	Bilinmeyen safsızlık-7	7,45	0,84
9	H_2B_{1a} Ana bileşen	8,88	1,00
10	2-epi-ivermektin B_1a	10,10	1,14
11	H_4B_{1a} izomerleri*	11,35	1,28
12	Δ2,3 H_2B_{1a} *	12,20	1,37
13	Bilinmeyen safsızlık-8	16,58	1,87
14	Bilinmeyen safsızlık-9	18,61	2,10

*Referans standart bulunmadığından, USP monografına göre bağıl alıkonma sürelerine göre isimlendirilmiştir (USP 2011).

WHO tarafından yayımlanan taslak monografa göre H_4B_{1a} izomerleri sentezle ilişkili safsızlık iken, Δ2,3 H_2B_{1a} degradasyon ürünü olarak belirtilmiştir (WHO 2018). Bununla birlikte referans standartlarda H_4B_{1a} ve Δ2,3 H_2B_{1a} safsızlıkları değişen oranlarda tespit edilmiştir.

4.4. Tespit Edilen Degradasyon Ürününün Tanımlanması

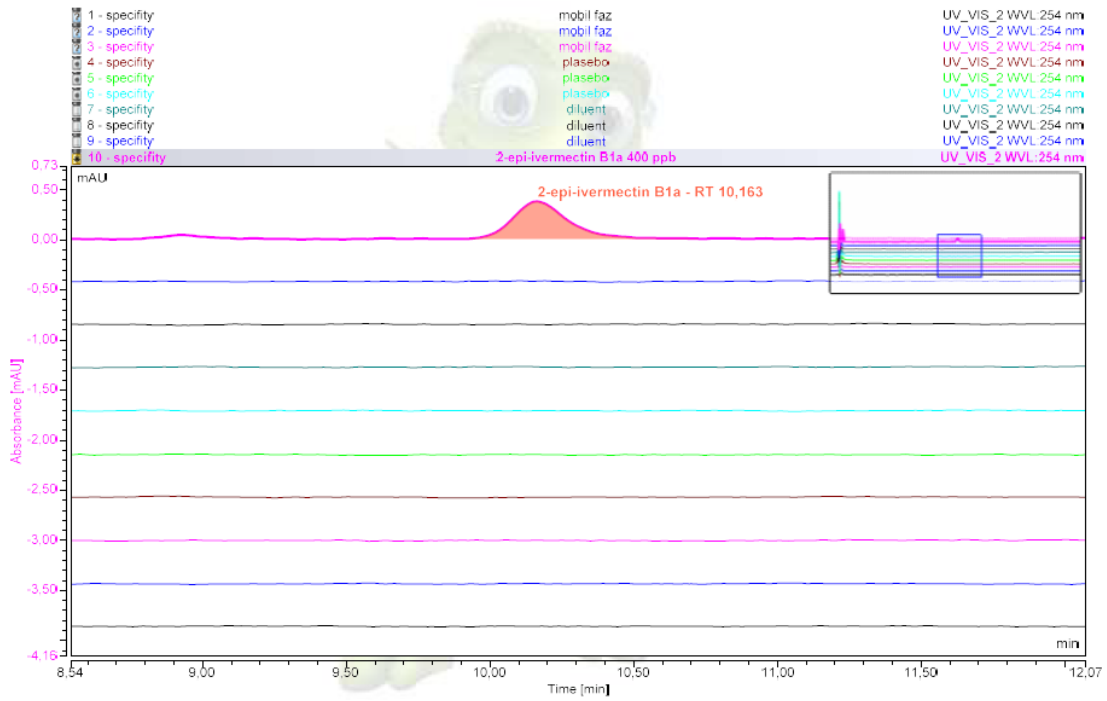
Ph.Eur'de ivermektin API'lerinde bulunması olası 11 adet safsızlık tanımlanmıştır (Ph.Eur 2020k). WHO ivermektin taslak monografında bu safsızlıkların dört tanesinin sentezle ilişkili, diğer yedi tanesinin ise degradasyon ürünü olduğu bildirilmektedir (WHO 2018). API bileşenleri ya da safsızlıklar yönünden analiz edilen 16 numuneden, A16 kod nolu örnekte UHPLC yöntemi ile 10. dakikada açığa çıkan bir

pik saptanmıştır. Mevcut pikin Ph.Eur ve USP'de tanımlanan safsızlıklar arasında yer almadığı belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında alkali koşullarda oluşma potansiyeli bulunan bu pik'in, pH'ı yüksek olan ürünlerde daha yüksek seviyede var olduğunun tespit edilmesi üzerine ivermektin'in epimeri 2_epi_ivermektin_B1a referans standardı eşliğinde doğrulanması yapılmıştır.

Degradasyon ürünü niteliğinde olduğu düşünülen bu safsızlığın doğrulanmasına yönelik metodolojik çalışmalar doğrultusunda, saptanan pikin 2_epi_ivermektin_B1a olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca mevcut safsızlığın alkali koşullarda miktarının yükseliş gösterdiği ve izin verilir limitlerin dışına çıktığı belirlenmiştir.

4.4.1.1. 2-epi-ivermektin B1a için Seçicilik

Mobil faz, çözücü ve yardımcı maddeler ile seçicilik çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerden pikin analiz edilmesini etkileyecek herhangi bir girişim olmadığı gösterilmiştir. 2_epi_ivermektin_B1a seçicilik çalışmasına ait kromatogram Şekil 4-5'de sunulmuştur.



Şekil 4-5: 2-epi-ivermektin B1a için Seçicilik Kromatogramı

4.4.1.2. 2-epi-ivermektin B1a için Tespit ve Tayin Alt Sınırı

2-epi-ivermektin B1a için tespit ve tayin alt sınırını analiz etmek üzere ihmal limiti esas alınmıştır. Tespit (En az 3,0) ve tayin (En az 10,0) alt sınırında sinyal/gürültü oranı en düşük 68,9 olmak üzere ortalama 75,4 elde edilmiş olup izin verilen limitin üzerindedir. 2-epi-ivermektin B1a için tespit ve tayin alt sınırı için değerlendirme kriterleri Tablo 4-15'de, tespit ve tayin limiti çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4-16'da sunulmuştur.

Tablo 4-15 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	2-epi-ivermektin $B_{1}a$
Konsantrasyon	0,4 µg/mL
Sinyal/Gürültü Oranı (Tespit Sınırı)	3,0
Sinyal/Gürültü Oranı (Tayin Sınırı)	10,0

Tablo 4-16: 2-epi-ivermektin B1a için Tespit ve Tayin Limiti Sonuçları

No.	Adı	Alan mAU*dakika	Sinyal/Gürültü Oranı	Ortalama Sinyal/Gürültü Oranı
1	1-1	0,1097	70,1	75,4
2	1-2	0,1076	68,9	
3	1-3	0,1077	69,3	
4	1-4	0,1083	76,5	
5	1-5	0,1100	90,0	
6	1-6	0,1092	66,9	
7	1-7	0,1112	70,3	
8	1-8	0,1104	81,5	
9	1-9	0,1104	77,7	
10	1-10	0,1125	83,1	

4.4.1.3. 2-epi-ivermektin B1a için Doğruluk Çalışması

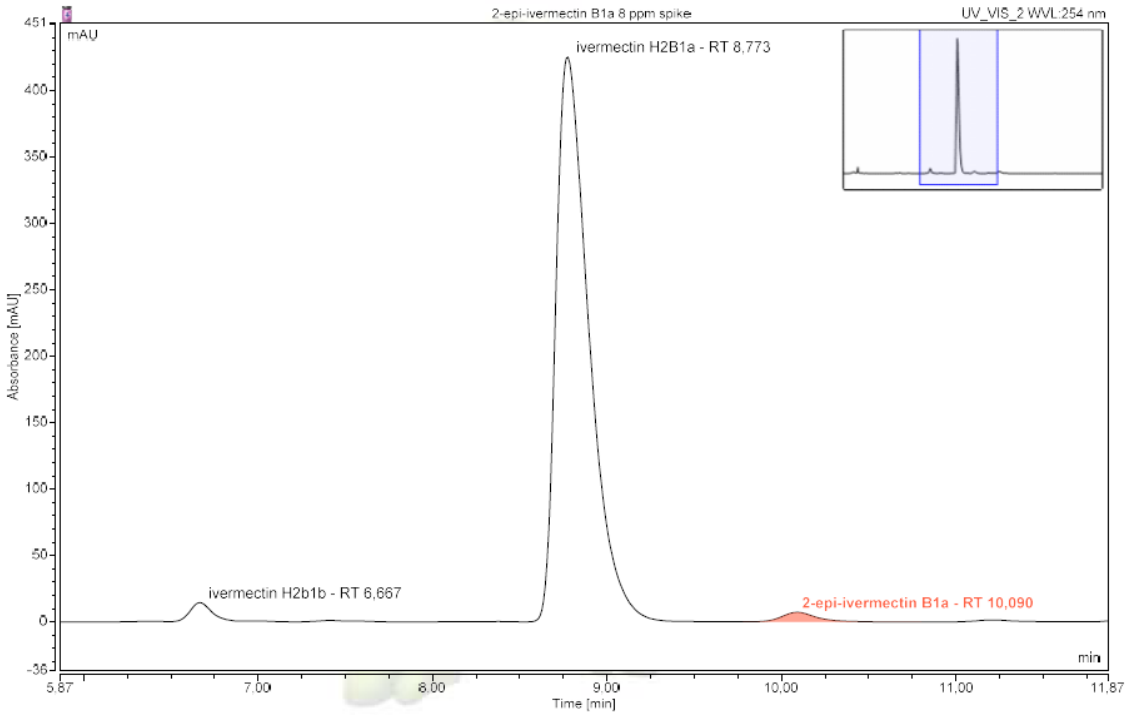
2-epi-ivermektin B1a safsızlığının ürün içerisinde doğru şekilde ölçülebildiğini göstermek için doğruluk çalışması yürütüldü. Geri kazanım oranı (%15) ve maksimum bağıl standart sapma (7,0) yönünden yöntemin geçerli kılınması kriterlerine uygun olduğu gösterildi. 2-epi-ivermektin B1a doğruluk çalışması değerlendirme kriterleri Tablo 4-17'de, analiz sonuçları Tablo 4-18'de, yükleme (Spike) kromatogramı Şekil 4-6'da sunulmuştur.

Tablo 4-17 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	2-epi-ivermektin B_{1a}
Alt sınır (Tekil Değerler)	(%) 85,00
Üst sınır (Tekil Değerler)	(%) 115,00
Alt Sınır (Ortalama Değer)	(%) 85,00
Üst sınır (Ortalama değer)	(%) 115,00
Maksimum BSS % 0.1 ≤ C < %1.0	(%) 7,0000
Aralık	% 50,00 - %120,00

Tablo 4-18: 2-epi-ivermektin B1a için Doğruluk Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Seviye (%)	Beklenen Miktar (mg/mL)	Ölçülen Miktar (mg/mL)	Geri Kazanım (%)	Geri Kazanım (Tekil Değer)	Ortalama Geri Kazanım (%)	Geri Kazanım (Ortalama değer)	BSS (%)	BSS <%7
1	1-1	50,00	4,00	4,35	108,9	uygun	109,5	uygun	0,5436	uygun
2	1-2	50,00	4,00	4,38	109,6	uygun				
3	1-3	50,00	4,00	4,40	110,0	uygun				
4	2-1	100,00	8,00	7,98	99,8	uygun	100,0	uygun	0,1908	uygun
5	2-2	100,00	8,00	8,01	100,2	uygun				
6	2-3	100,00	8,00	8,00	100,0	uygun				
7	3-1	120,00	9,60	9,57	99,7	uygun	99,4	uygun	0,2845	uygun
8	3-2	120,00	9,60	9,51	99,1	uygun				
9	3-3	120,00	9,60	9,54	99,4	uygun				



Şekil 4-6: 2-epi-ivermektin B1a Yükleme (Spike) Kromatogramı

4.4.1.4. 2-epi-ivermektin B1a Kesinlik

2-epi-ivermektin B1a safsızlığının tekrarlanabilir şekilde ölçülebildiğini göstermek için kesinlik çalışması yürütüldü. Bağıl standart sapma yönünden yöntemin geçerli kılınması kriterlerine uygun olduğu gösterildi. 2-epi-ivermektin B1a kesinlik çalışması değerlendirme kriterleri Tablo 4-19'da, çalışma sonuçları Tablo 4-20'de sunulmuştur.

Tablo 4-19 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	2-epi-ivermektin-B_1a
Maksimum BSS %1 ≤ C	5,0000
Maksimum BSS % 0.1 ≤ C < %1.0	7,0000
Aralık	% 50,00 - %120,00

Tablo 4-20: 2-epi-ivermektin B1a Kesinlik Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Seviye (%)	Ölçülen Miktar (µg/mL)	Ortalama	SS	BSS (%)	BSS <%5
1	1-1	50,00	3,99	4,04	0,0370	0,9169	Uygun
2	1-2	50,00	4,06				
3	1-3	50,00	4,06				
4	2-1	100,00	8,77	8,76	0,0103	0,1180	Uygun
5	2-2	100,00	8,75				
6	2-3	100,00	8,76				
7	3-1	120,00	10,12	10,12	0,0372	0,3672	Uygun
8	3-2	120,00	10,16				
9	3-3	120,00	10,08				

4.4.1.5. 2-epi-ivermektin B1a Ara Kesinlik

2-epi-ivermektin B1a safsızlığının farklı günde tekrarlanabilir şekilde ölçülebildiğini göstermek için ara kesinlik çalışması yürütüldü. Bağıl standart sapma yönünden yöntemin geçerli kılınması kriterlerine uygun olduğu gösterildi. 2_epi_ivermektin_B1a ara kesinlik çalışması değerlendirme kriterleri Tablo 4-21'de, çalışması sonuçları Tablo 4-22'de sunulmuştur.

Tablo 4-21 : Değerlendirme Kriterleri

Komponent Adı	2-epi-ivermektin-$B_{1}a$
Maksimum BSS % 0.5 ≤ C < %1.0	15,0000
Maksimum BSS % 0.1 ≤ C < %0.5	20,0000
Aralık	% 50,00 - %120,00

Tablo 4-22: 2-epi-ivermektin B1a Ara Kesinlik Çalışma Sonuçları

No.	Adı	Seviye (%)	Ölçülen Miktar (mg/mL)	Ortalama	SS	BSS (%)	BSS <%15
1	1-1	50,00	4,35	4,38	0,0238	0,5436	Uygun
2	1-2	50,00	4,38				
3	1-3	50,00	4,40				
4	2-1	100,00	7,98	8,00	0,0153	0,1908	Uygun
5	2-2	100,00	8,01				
6	2-3	100,00	8,00				
7	3-1	120,00	9,57	9,54	0,0271	0,2845	Uygun
8	3-2	120,00	9,51				
9	3-3	120,00	9,54				

4.4.2. VTÜlerde 2-epi-ivermektin B1a Safsızlığının HPLC ile Analizi ve pH Ölçüm Sonuçları

2-epi-ivermektin B1a safsızlığının UHPLC ile analiz sonuçları ve pH ölçüm değerleri Tablo 4-23'de sunulmuştur.

EPİ'nin analiz edilen tüm numunelerde düşük seviyelerde bulunduğu tespit edilmekle birlikte, test edilen 16 numuneden A2, A3, A10 ve A16 nolu örneklerde 2-epi-ivermektin B1a düzeyinin belirgin şekilde yüksek olduğu belirlendi. Bu örneklerin pH değerlerine yönelik incelemelerde dört örneğin de alkali pH'ya sahip olduğu saptandı.

Tablo 4-23: Numunelerde İvermektin H_2B_{1a}+H_2B_{1b}, 2-epi-ivermektin B1a ve pH Değerleri

Numune Kodu	Ambalaj Boyutu	Raf Ömrü	EPİ (%)	H_2B_{1a}+H_2B_{1b}	pH
A1	250	6.	0,11	93,35	6,21
A2	250	8.	0,52	95,30	8,79
A3	250	7.	0,56	95,43	8,98
A4	50	13.	0,32	96,04	7,43
A5	20	18.	0,01	96,02	6,48
A6	100	21.	0,08	96,09	6,40
A7	250	31.	0,20	96,01	6,73
A8	100	30.	0,22	96,04	6,94
A9	100	11.	0,05	97,37	7,10
A10	100	7.	0,57	95,25	8,78
A11	50	30.	0,03	96,24	7,00
A12	50	29.	0,12	96,28	6,67
A13	100	9.	0,05	95,86	6,75
A14	100	11.	0,07	95,89	6,55
A15	50	41.	0,04	96,69	6,53
A16	250	10.	6,30	90,40	9,21

4.5. Toksikolojik Test Sonuçları

4.5.1. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Sitotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Hücre Canlılığı Testi

İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde ve standartlarının safsızlık düzeylerinin saptanması sonucunda seçilen test örneklerinin (Tablo3-3) sitotoksisite potansiyelleri ATP hücre canlılığı testi ile değerlendirildi. Değişen konsantrasyonlarda MBDK hücre hattına uygulanan test örneklerinin 24 saat sonunda sitotoksisite düzeyi % değer olarak 3 tekrar ortalaması alınarak Tablo 4-24'de sunulmuştur. Tüm test örneklerinde doz artışına paralel şekilde sitotoksik etkinin yükseliş gösterdiği saptandı. Hücre canlılığının belirgin düzeyde azalmaya başladığı seviyenin ise tüm numunelerde 31,25 µM dozda olduğu tespit edildi. Tek yönlü varyans analizi kullanılarak Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile yapılan istatistiksel analizde sitotoksik etki; N1 (Std-1) ve N4 (A15) nolu numunelerde 62,50 µM, N2 (API-4) nolu numunede 15,63 µM, N3 (A10), N5

(A16) ve N6 (EPİ) nolu numunede 31,25 µM ve üzeri dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Tablo 4-24: Konsantrasyona Göre % Hücre Canlılığı Sonuçları

Kons. (µM)	N1* (Std-1)	±SD**	N2* (API -4)	±SD**	N3* (A10)	±SD**	N4* (A15)	±SD**	N5* (A16)	±SD**	N6* EPI	±SD**
1000	100,00[a]	0	100,00[a]	0	96,13[a]	0,53	99,01[a]	1,16	99,49[a]	3,57	100,00[a]	0
500	100,00[a]	0	100,00[a]	0	92,27[a]	1,32	100,00[a]	0	100,00[a]	0	100,00[a]	0
250	100,00[a]	0	97,53[a]	1,67	76,02[a]	3,55	96,61[a]	2,17	100,00[a]	0	100,00[a]	0
125	91,45[a]	6,14	72,18[a]	8,64	66,96[a]	7,78	86,26[a]	3,98	94,91[a]	0,57	55,74[a]	15,75
62,50	27,39[a]	10,59	35,38[a]	6,81	50,40[a]	11,79	56,39[a]	8,29	75,84[a]	0,13	25,46[a]	12,34
31,25	12,03[c]	7,85	21,36[a]	7,93	16,50[b]	11,81	14,76[c]	3,52	34,92[a]	2,07	15,40[b]	8,55
15,63	0,00[c]	0	15,86[b]	4,82	1,90[c]	12,43	2,44[c]	4,93	5,03[c]	4,92	0,00[c]	0
7,81	0,00[c]	0	6,13[c]	7,76	0,00[c]	0	1,57[c]	1,51	0,00[c]	0	0,00[c]	0

*3 tekrarlı ölçüm ortalaması

±SD **: Standart sapma

[a] P≤0.001

[b] P≤0.01

[c] anlamlı değil (P > 0.05).

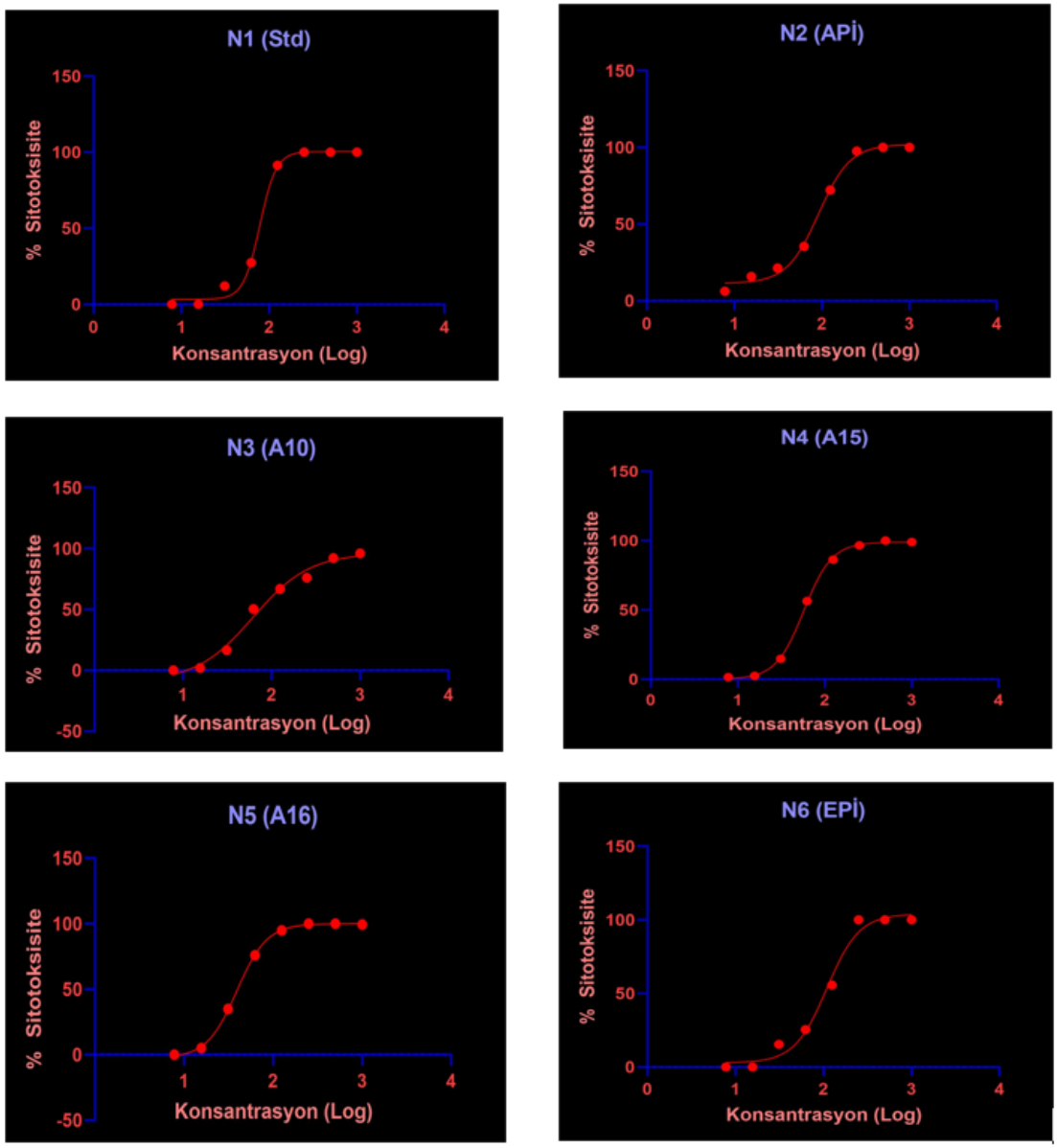
Sonuçlar, her bir dozun Dunnett'in çoklu karşılaştırması yöntemine göre negatif kontrol ile kıyaslanmasına dayanmaktadır (Dunnett ve Crisafio 1955).

Test numunelerinin negatif kontol ile karşılaştırılması ile elde edilen konsantrasyona göre hücre canlılığı değerleri kullanılarak doğrusal olmayan regresyon ile hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 4-25'de, test numunelerinin konsantrasyona karşı sitotoksisite grafiği Şekil 4-7'de sunulmuştur. Tüm numuneler için 7,81-1000 µM konsantrasyon aralığında gerçekleştirilen testler sonucunda IC_{50} değerleri; Std-1 için (N1) 78,42 µM olarak, API-4 (N2) ve EPİ (N6) için sırasıyla 91,73 µM ve 109,20 µM olarak tespit edildi. Enjeksiyonluk çözeltilerin IC_{50} değerleri ise N3 (A10) için 61,88 µM, N4 (A15) için 57,58 µM, degradasyon ürünü safsızlığı yüksek olan N5 (A16) için 39,26 µM olarak saptandı. IC_{50} değerleri esas alınarak gerçekleştirilen değerlendirmede; EPİ (N6) nolu numuneye göre, A16 (N5) nolu numunenin 2.78 katlık bir farkla sitotoksik etki oluşturma potansiyelinin en yüksek düzeyde açığa çıktığı belirlenmiştir. Std-1 (N1) API-4'ün (N2) ve EPİ'nin (N6) enjeksiyonluk çözeltilere göre daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu olduğu saptanmıştır. N3 (A10) nolu ürün, referans tıbbi ürüne (A15/N4)

göre daha yüksek düzeyde safsızlığa sahip olmasına rağmen IC_{50} değerinin daha yüksek konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-25 Test Numunelerinin IC_{50} Değerleri

Numune	N1 (Std-1)	N2 (API-4)	N3 (A10)	N4 (A15)	N5 (A16)	N6 (EPİ)
IC_{50} (µM)	78,42	91,73	61,88	57,58	39,26	109,20



Şekil 4-7 Test Numunelerinin Konsantrasyona Karşı Sitotoksisite Grafiği

4.5.2. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Mutajenik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Bakteri Ters Mutasyon (AMES) Testi

Çalışmada tıbbi ürünlerin mutajenitelerinin saptanmasında kullanılan önemli bir mutajenite testi olan AMES *Salmonella*/mikrozom testi uygulanarak 6 adet test materyalinin (Tablo 3-3) mutajenik etkileri araştırıldı. Deneyler S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde yapıldı. Test sonuçlarının ortalaması alınarak negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldı ve mutajenik indeks hesaplandı. TA98 ve TA100 suşları ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 varlığında ve yokluğunda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları spontan revertant koloni sayılarından daha fazla bulunmadı ($p>0.05$). Pozitif kontrol gruplarında koloni sayısının daha yüksek olduğu belirlendi ($P\leq0.05$). Ayrıca, tüm çalışma konsantrasyonlarında mutajenik indeks değeri mutajenik etki için limit olan 2 değerini aşmadı. Çalışmamızda, test materyalinin 2 farklı *S. typhimurium* suşu ile S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkiye sahip olmadığı gösterildi. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına ait deney sonuçları, metabolik aktivasyon (S9) yokluğunda ve varlığında Tablo 4-26, 4-27, 4-28 ve 4-29'da sunulmuştur.

Tablo 4-26: İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının TA98 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda deney sonuçları

		Revertant koloni sayısı/plak		
Test Materyali	**Konsantrasyon**	**Ortalama**	**±Standart Sapma**	**Mutajenik indeks**
Negatif Kontrol	---	31,8	5,7	---
Pozitif Kontrol (4-nitro-o-fenilendiamin)	20 µg/petri	611,3**	23,2	---
N1 (STD-1)	1 µg/petri	36,3 *	7,6	**1,1**
	10 µg/petri	33,5*	6,4	**1,1**
	100 µg/petri	31,5*	2,1	**1,0**
	1000 µg/petri	38,3*	5,7	**1,2**
N2 (API-4)	1 µg/petri	33,3 *	1,7	**1,0**
	10 µg/petri	25,0*	5,7	**0,8**
	100 µg/petri	34,0*	6,7	**1,1**
	1000 µg/petri	32,0*	2,9	**1,0**
N3 (A10)	1 µg/petri	31,0*	1,4	**1,0**
	10 µg/petri	34,5*	7,8	**1,1**
	100 µg/petri	32,0*	2,8	**1,0**
	1000 µg/petri	30,7*	4,0	**1,0**
N4 (A15)	1 µg/petri	31,7 *	3,1	**1,0**
	10 µg/petri	34,0*	5,3	**1,1**
	100 µg/petri	31,7*	4,0	**1,0**
	1000 µg/petri	36,3*	3,1	**1,1**
N5 (A16)	1 µg/petri	36,5 *	0,7	**1,1**
	10 µg/petri	34,5*	2,1	**1,1**
	100 µg/petri	36,5*	4,9	**1,1**
	1000 µg/petri	39,5*	10,6	**1,2**
N6 (EPİ)	1 µg/petri	29,5*	7,8	**0,9**
	10 µg/petri	27,0*	7,1	**0,8**
	100 µg/petri	32,5*	4,9	**1,0**
	1000 µg/petri	36,0*	5,7	**1,1**

*(p>0.05)

**(P≤0.05)

Pozitif kontrol gruplarında koloni sayısının; TA98 suşu ile metabolik aktivasyon yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamin ile negatif kontrol grubuna göre yaklaşık 19 kat daha yüksek olduğu belirlendi (P≤0.05). IVM enjeksiyonluk çözelti, API, EPİ ve STD test numunelerindeki koloni sayıları negatif kontrol numune gruplarında koloni sayısı ile karşılaştırılması sonucu mutajenik indeks değeri tüm test numunelerinde 0,9 ve 1,0 olarak

birbirine çok yakın değerlerde bulundu. TA98 suşu ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 yokluğunda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları spontan revertant koloni sayılarından istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

Tablo 4-27 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde ve standardının TA98 suşunda metabolik aktivasyon varlığında deney sonuçları

		Revertant koloni sayısı/plak		
Test Materyali	**Konsantrasyon**	**Ortalama**	**±Standart Sapma**	**Mutajenik indeks**
Negatif Kontrol	---	26,7	1,5	---
Pozitif Kontrol (2-aminofluorene)	5 µg/petri	922,3**	28,0	---
N1 (STD-1)	1 µg/petri	26,0*	4,0	**1,0**
	10 µg/petri	25,0*	3,6	**0,9**
	100 µg/petri	25,3*	5,1	**0,9**
	1000 µg/petri	25,3*	3,2	**0,9**
N2 (API-4)	1 µg/petri	24,3*	3,2	**0,9**
	10 µg/petri	24,7*	4,0	**0,9**
	100 µg/petri	23,0*	1,0	**0,9**
	1000 µg/petri	23,7*	3,5	**0,9**
N3 (A10)	1 µg/petri	25,7*	2,9	**1,0**
	10 µg/petri	28,0*	6,2	**1,0**
	100 µg/petri	26,3*	6,8	**1,0**
	1000 µg/petri	25,3*	3,1	**0,9**
N4 (A15)	1 µg/petri	25,3*	3,5	**0,9**
	10 µg/petri	25,7*	5,7	**1,0**
	100 µg/petri	25,0*	2,6	**0,9**
	1000 µg/petri	23,7*	4,7	**0,9**
N5 (A16)	1 µg/petri	25,3*	2,1	**0,9**
	10 µg/petri	26,0*	5,3	**1,0**
	100 µg/petri	24,3*	3,8	**0,9**
	1000 µg/petri	27,0*	5,3	**1,0**

*(p>0.05)

**(P≤0.05)

Pozitif kontrol gruplarında koloni sayısının; TA98 suşu ile metabolik aktivasyon varlığında 2-aminofluorene ile negatif kontrol grubuna göre yaklaşık 34 kat daha yüksek olduğu belirlendi (P≤0.05). IVM enjeksiyonluk çözelti, API ve STD test numunelerindeki

koloni sayıları negatif kontrol numune gruplarında koloni sayısı ile karşılaştırılması sonucu mutajenik indeks değeri tüm test numunelerinde 0,9 ve 1,0 olarak birbirine çok yakın değerlerde bulundu. TA98 suşu ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 varlığında tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları spontan revertant koloni sayılarından istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

Tablo 4-28 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının TA100 suşunda metabolik aktivasyon yokluğunda deney sonuçları

		Revertant koloni sayısı/plak		
Test Materyali	**Doz**	**Ortalama**	**±Standart Sapma**	**Mutajenik indeks**
Negatif Kontrol	---	162,8	28,1	---
Pozitif Kontrol (Sodyum azid)	1 µg/petri	743,3**	42,7	---
N1 (STD-1)	1 µg/petri	172,0 *	26,5	**1,1**
	10 µg/petri	166,5 *	29,1	**1,0**
	100 µg/petri	168,8 *	27,5	**1,0**
	1000 µg/petri	168,0 *	32,4	**1,0**
N2 (API-4)	1 µg/petri	157,3 *	18,3	**1,0**
	10 µg/petri	161,0 *	24,3	**1,0**
	100 µg/petri	167,0 *	19,5	**1,0**
	1000 µg/petri	171,3 *	25,2	**1,1**
N3 (A10)	1 µg/petri	161,5 *	10,8	**1,0**
	10 µg/petri	164,5 *	18,6	**1,0**
	100 µg/petri	158,8 *	12,8	**1,0**
	1000 µg/petri	162,0*	9,3	**1,5**
N4 (A15)	1 µg/petri	163,7 *	15,2	**1,0**
	10 µg/petri	165,0 *	10,8	**1,0**
	100 µg/petri	160,7 *	22,3	**1,0**
	1000 µg/petri	162,7 *	14,2	**1,0**
N5 (A16)	1 µg/petri	158,5 *	32,6	**1,0**
	10 µg/petri	160,8 *	27,3	**1,0**
	100 µg/petri	166,0 *	27,3	**1,0**
	1000 µg/petri	158,3 *	30,7	**1,0**
N6 (EPİ)	1 µg/petri	145,8*	7,8	**0,9**
	10 µg/petri	136,5 *	20,5	**0,8**
	100 µg/petri	152,5 *	21,9	**0,9**
	1000 µg/petri	139,0 *	1,4	**0,9**

*(p>0.05)

**(P≤0.05)

Pozitif kontrol gruplarında koloni sayısının; TA100 suşu ile metabolik aktivasyon yokluğunda sodyum azid ile negatif kontrol grubuna göre yaklaşık 4,5 kat daha yüksek olduğu belirlendi (P≤0.05). IVM enjeksiyonluk çözelti, API, EPİ ve Std test numunelerindeki koloni sayıları negatif kontrol numune gruplarında koloni sayısı ile karşılaştırılması sonucu mutajenik indeks değeri tüm test numunelerinde 0,8 ve 1,5 aralığında bulundu. En yüksek mutajenik indeks değeri N3 (A10) nolu numunenin en yüksek test kosnantrasyonu olan 1000 µg/plaka konsantrasyonda bulundu. TA100 suşu ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 yokluğunda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları spontan revertant koloni sayılarından istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

Tablo 4-29 : **İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde ve standardının TA100 suşunda metabolik aktivasyon varlığında deney sonuçları**

		Revertant koloni sayısı/plak		
Test Materyali	**Doz**	**Ortalama**	**±Standart Sapma**	**Mutajenik indeks**
Negatif Kontrol	---	142,0	17,0	**---**
Pozitif Kontrol (2-aminofluorene)	5 µg/petri	579,0**	27,9	---
N1 (STD-1)	1 µg/petri	143,5 *	26,2	**1,0**
	10 µg/petri	138,0 *	14,1	**1,0**
	100 µg/petri	145,5 *	19,1	**1,0**
	1000 µg/petri	143,5*	20,5	**1,0**
N2 (API-4)	1 µg/petri	127,0 *	7,1	**0,9**
	10 µg/petri	134,5 *	19,1	**0,9**
	100 µg/petri	131,0 *	7,5	**0,9**
	1000 µg/petri	132,3*	7,6	**0,9**
N3 (A10)	1 µg/petri	135,3 *	12,3	**1,0**
	10 µg/petri	137,0*	9,5	**1,0**
	100 µg/petri	144,0 *	11,8	**1,0**
	1000 µg/petri	138,3*	13,3	**1,0**
N4 (A15)	1 µg/petri	130,5 *	7,8	**0,9**
	10 µg/petri	131,5 *	10,6	**0,9**
	100 µg/petri	145,5 *	4,9	**1,0**
	1000 µg/petri	145,5 *	20,5	**1,0**
N5 (A16)	1 µg/petri	136,0 *	11,5	**1,0**
	10 µg/petri	134,0 *	14,1	**0,9**
	100 µg/petri	136,7 *	11,0	**1,0**
	1000 µg/petri	140,0 *	11,5	**1,0**

*Anlamlı değil (P > 0.05)

**(P≤0.05)

Pozitif kontrol gruplarında koloni sayısının; TA100 suşu ile metabolik aktivasyon varlığında 2-aminofluorene ile negatif kontrol grubuna göre yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu belirlendi (P≤0.05). IVM enjeksiyonluk çözelti, API ve STD test numunelerindeki koloni sayıları negatif kontrol numune gruplarında koloni sayısı ile karşılaştırılması sonucu mutajenik indeks değeri tüm test numunelerinde 0,9 ve 1,0 olarak birbirine çok yakın değerlerde bulundu. TA100 suşu ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9 varlığında tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları spontan revertant koloni sayılarından istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

4.5.3. İvermektin Etkin Maddesini İçeren Tıbbi Ürünler ve API'ler ile EPİ numunelerinde Genotoksik Potansiyelin Değerlendirilmesi için Comet Testi

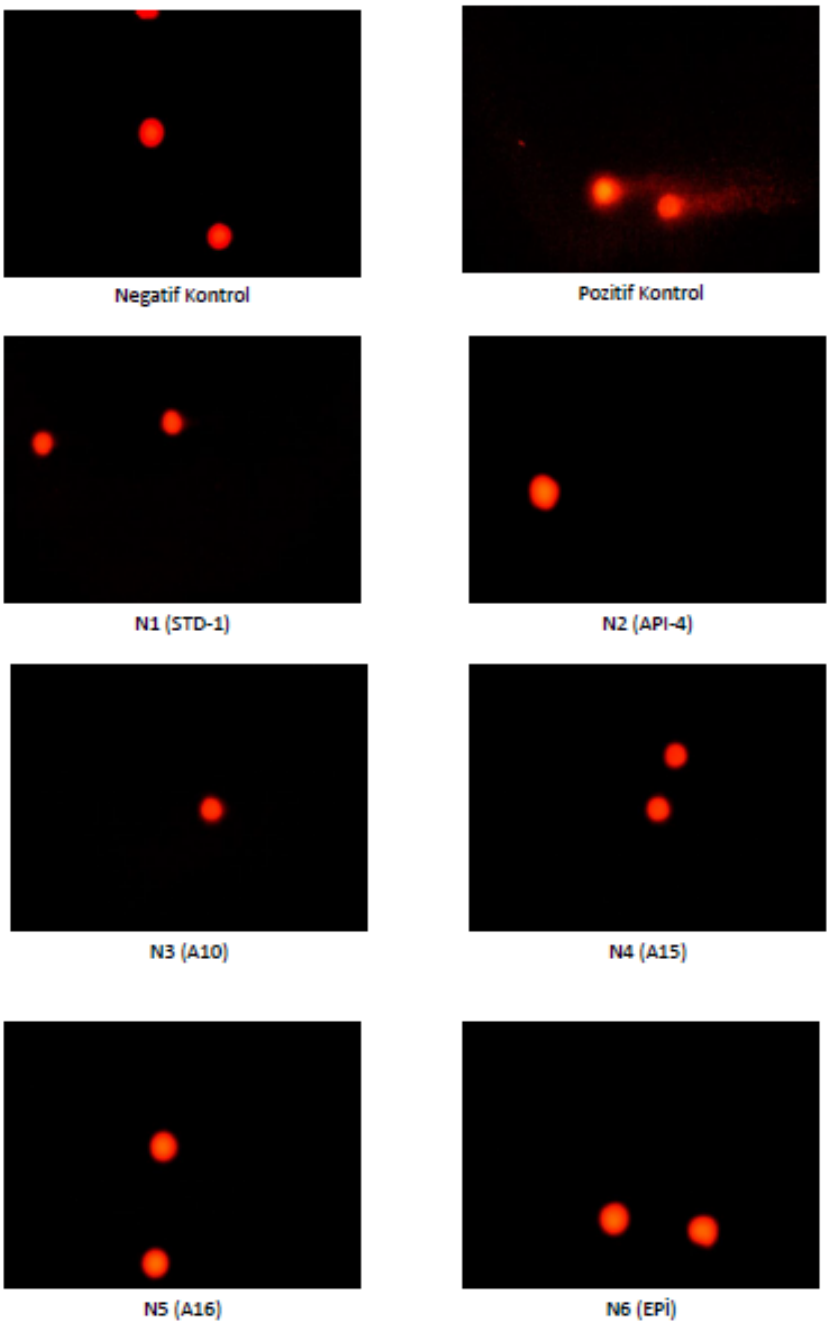
İvermektin etkin madde, standart, safsızlık ve enjeksiyonluk çözelti örneklerinin MDBK hücre hattında olası genotoksisite potansiyeli in vitro Comet test yöntemi ile incelendi. Bu kapsamda MDBK hücrelerine uygulanan numune konsantrasyonları, ATP Hücre canlılığı test sonuçlarına göre (hücrelerin en az % 70'in canlı kalabildiği en düşük konsantrasyon esas alınarak) belirlenmiş ve her bir numuneye ait Comet testi konsantrasyonları Tablo 4-30'da sunulmuştur.

Tablo 4-30 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının Comet Testi Konsantrasyon Tablosu

Numune	Düşük (L) (µM)	Orta (M) (µM)	Yüksek (H) (µM)
N1 (Std-1)	7,81	15,63	31,25
N2 (API-4)	15,63	31,25	62,50
N3 (A10)	7,81	15,63	31,25
N4 (A15)	7,81	15,63	31,25
N5 (A16)	3,91	7,81	15,63
N6 (EPİ)	15,63	31,25	62,50

Floresans mikroskop ile kaydedilen görüntülerde değişen kuyruk oluşumları izlendi. Hasarsız hücrelerin ortası parlak, kenarları daha az yoğun şekilde görülürken,

hasar gören hücrelerde değişen kuyruk oluşumları izlendi. Örnek görüntüler Şekil: 4-8'de sunulmuştur.



Şekil 4-8 : İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının örnek Comet Görüntüleri

Test sonucunda görüntü işleme analizi çalışmaları ile kuyruktaki DNA yüzdesi (% DNAt) hesaplandı. %DNAt Tablo 4-31'de sunuldu.

Tablo 4-31: İvermektin enjeksiyonluk çözelti, etkin madde, epimer ve standardının Comet Test Sonuçları

		% DNAt	
Test Materyali	**Konsantrasyon**	**Ortalama**	**±Standart Sapma**
Negatif Kontrol	(%4 Propilen glikol içeren medyum)	27,03	3,26
Pozitif Kontrol (Hidrojen peroksit)	250 µg/mL	77,48	6,03
N1 (Std-1)	Düşük (L)	30,71[a]	2,74
	Orta (M)	30,92[a]	3,46
	Yüksek (H)	32,61[b]	4,46
N2 (API-4)	Düşük (L)	32,42[b]	5,07
	Orta (M)	30,85[a]	3,70
	Yüksek (H)	31,45[b]	3,23
N3 (A10)	Düşük (L)	32,63[b]	5,45
	Orta (M)	35,62[b]	3,23
	Yüksek (H)	32,46[b]	3,94
N4 (A15)	Düşük (L)	29,35[c]	3,34
	Orta (M)	24,94[c]	5,79
	Yüksek (H)	28,89[c]	3,10
N5 (A16)	Düşük (L)	32,40[b]	3,64
	Orta (M)	33,12[b]	4,34
	Yüksek (H)	40,10[b]	6,41
N6 (EPİ)	Düşük (L)	31,85[b]	4,55
	Orta (M)	33,06[b]	6,51
	Yüksek (H)	31,10[b]	3,27

[a]*** P≤0.001
[b]****P≤0.0001
[c] anlamlı değil (P > 0.05).

N4 (A15) nolu numunede % DNAt değerlerinin en düşük, N5 (A16) nolu numunede en yüksek seviyede olduğu saptandı. Diğer numunlerde yakın seviyede DNA hasarı oluştuğu gözlendi. N4 (A15) nolu numunede 31,25 µM konsantrasyona kadar DNA'da hasar oluşmadığı gözlenirken, N5'de (A16) 3,91 µM, N1 (Std-1) ve N3'de (A10) 7,81 µM, N2 (API-4) ve N6'da (EPİ) 15,63 µM konsantrasyondan itibaren DNA hasarı oluştuğu gözlendi. Pozitif kontrolde % DNAt değeri kontrole göre % 186,6 daha yüksek düzeyde saptandı. 6 farklı test numunesinin 3 farklı konsantrasyondaki sonuçlarının karşılaştırmasında % DNAt; negatif kontrol grubuna göre % 7,73 altı ile % 48,35 aralığında değişen oranlarda bulundu. Test sonuçlarının tek yönlü varyans ve Dunnett testi sonuçlarına göre istatistiksel değerlendirmesi doğrultusunda pozitif kontrol grubu olan hidrojen peroksit grubunda ortalama % DNAt değerleri tüm diğer deney

gruplarına göre istatistiki önem gösterdi (P≤ 0,0001). Yardımcı madde içermeyen Std-1, API-4 ve EPİ (N1, N2 ve N6) numunelerinde DNA hasar oranları birbirine yakınken, VTÜ numunelerinde (N3, N4 ve N5) DNA hasarı sonuçlarının değişen oranlarda olduğu tespit edildi. % DNAt parametresine göre 6 farklı test materyalinin MDBK hücre hattında belirtilen deney koşullarında N4 (A15) hariç olmak üzere 5 test numunesinde gözlenen DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Comet testi sonuçlarına göre uygulanan aynı konsantrasyonda (15,63 µM) N4 (A15) nolu VTÜ test numunesinin en düşük, N5 (A16) nolu VTÜ test numunesinin en yüksek seviyede DNA hasarı oluşturduğu, diğer test numunelerinin benzer düzeyde DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde VTÜ'lerin üretimi, ithalatı, ihracatı, kullanımı, reçeteli ya da reçetesiz satışı, izin, kontrol ve teminine ilişkin uygulamaların belirlenmesine yönelik yasal düzenleyici otorite Tarım ve Orman Bakanlığıdır. Ulusal ölçekte henüz yeni geliştirilen molekül bulunmaması nedeniyle Bakanlık, VTÜ'lere ait pazarlama izni (ruhsatlandırma) sürecinde, etkisi iyi bilinen ve güvenilirlik seviyesi kabul edilebilir ürünler için güvenilirlik ve etkinliğine dair detaylı bir bibliyografya ile farmasötik kalite çalışmalarının yanı sıra idari bilgi ve belgelerin sunulmasını yeterli görmektedir. Ancak Ulusal otorite tarafından yayımlanan kılavuzlarda ruhsatlandırmaya ilişkin net hükümlerin bulunmaması durumunda; Avrupa Birliği, WHO, Uluslararası Farmasötik Denetim Sözleşmesi (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme [PIC/S]), VICH ve ICH gibi kurum ve kuruluşların kılavuzları dikkate alınmaktadır (Anonim 2011; 2012). Ulusal otorite Tarım ve Orman Bakanlığı ruhsata tabi olan ürünlerin ruhsatlandırma sürecinde, ürün safsızlık potansiyellerini yayımlamış olduğu kılavuzlara uygunluk yönünden değerlendirmekte ve pazarlama sonrası kontrollerini gerçekleştirmektedir (Anonim 2011). Böylece ilaçların safsızlıklarla ilişkili kalitesinin, dolayısıyla da etkinlik ve güvenilirliğinin güvence altına alınması mümkün olabilmektedir.

Kimyasal olarak ele alındığında "safsızlıklar" ilaç etken ve ürünlerinde küçük miktarlarda açığa çıkan ve az endişe yaratan bileşikler olarak değerlendirilmektedir. Oysaki, tıbbi boyutları ile değerlendirildiklerinde safsızlıklar; hedef canlıda ilaca bağlı yan etkilerin artışına neden olmalarının yanı sıra sağlık riski oluşturabilen, istenmeyen maddeler niteliğinde kabul edilirler (Abdin ve ark. 2020). Farmasötik ürün niteliğinde olmayan tüm kimyasalların safsızlık potansiyelleri, modern analitik yöntemlerle saptanabilmekte ve bu ürünlerin kullanım izinleri kimya yönünden spesifikasyonlara uygun olabilmektedir. Oysa ki, farmasötik ürünlerde saptanan safsızlıkların, her bir maddeye özgü şekilde risk yönetimi ve toksikolojik endişe eşikleri yönünden analiz edilmeleri gerekmektedir (Brooks ve ark. 2011). Safsızlıklara ilişkin hususlar ICH tarafından aydınlatılmış olmasına rağmen, halen standartların geliştirilmesine ve konunun bütüncül olarak değerlendirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (Pilaniya ve ark. 2010). İlaç yan etkilerinin, ilaç madde ve ürünlerinde fizyolojik olarak aktif özellikteki safsızlıkların şekillenmesiyle açığa çıkabileceği ileri sürülmektedir (Görög 2006). Düzenlemelere ve resmi kontrollere rağmen FDA tarafından sadece 07.06.2018-05.10.2020 tarihleri

arasında tıbbi ürünlerde 221 geri çekme uygulanmış olup, bunlardan 59'unun geri çekilme nedeni olarak safsızlıklar gösterilmiştir (FDA 2020b).

Farmasötik safsızlıkların tanımlanmasının amacı, ilaç maddelerinde veya ilaç ürünlerinde belirli bir eşiğin üzerindeki bulunan maddelerin kimyasal yapılarının tam olarak aydınlatılmasıdır. Tanımlama, ilaç geliştirme sürecinde kritik bir analitik faaliyettir. Bir safsızlığın kimyasal yapısının bilinmesi, toksikolojik etkilerini değerlendirmek ve oluşum mekanizmasını anlamak için gereklidir. Bu mekanizma bilgisi ile sentetik kimyasal süreçlerin iyileştirilmesi, safsızlığı azaltmak veya ortadan kaldırmak için ilaç formülasyonunun optimize edilmesi için kritiktir (Qiu ve Norwood 2007). Bu yaklaşımla piyasaya sürülmüş ürünlerde de raf ömrü süresince safsızlıklarının kontrol edilmesi önemlidir. Araştırmamızda ülkemizde veteriner hekimlikte yaygın kullanımı olan ve farklı firmalar tarafından üretilen antiparaziter ivermektin enjeksiyonluk çözelti preparatları safsızlık profilleri yönünden inceleme altına alınmıştır. Yeni ilaç maddelerinde safsızlıklarının saptanmasına yönelik analitik metot geliştirme çalışmaları üretici firmanın sorumluluğundadır. Üretici, pazarlama onay süreci öncesi safsızlıklarının belirlenmesi için valide bir yöntem geliştirerek deklare etmek zorundadır. Yeni nitelikte olmayan ilaç API'deki safsızlıklar ise uluslararası geçerliliği olan çeşitli farmakopelerde yer alan analitik metodlar eşliğinde saptanabilir. Ancak üretim esnasında beklenmeyen ve tanımlanmayan safsızlıklarla da karşılaşılması olasıdır ve farmakopelerde bu tip safsızlıkların tespitine yönelik metotlar yer almamaktadır (Ph.Eur. 2020). Dolayısıyla ilaç etkin madde ve ürünlerinde safsızlıkların tanımlanması bir çok araştırmacı için güncel bir araştırma konusu olmuştur.

İvermektin dünya genelinde beşeri ve veteriner hekimlikte yaygın kullanımı olan bir antiparaziter olmasına rağmen safsızlıklarının analitik olarak değerlendirildiği sınırlı sayıda bilimsel araştırmaya ulaşılmaktadır. Gianelli ve ark. (2000) ivermektin safsızlıklarının tanımlanması amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında; ivermektin etkin maddesinde preparatif HPLC aracılığıyla izole edilen, HPLC ile doğrulanan, MS aracılığı ile toplanan veri karşılaştırması aracılığıyla karakterize edilen çeşitli safsızlıklar tespit etmişlerdir. Bunlardan avermektinlerin 2 yeni derivatifi 25-de(1-methylpropyl)-25-(1-ethylpropyl) Ivermectin B1a ve 12-demethyl-12-ethyl Ivermectin B1a ilk kez tanımlanmıştır (Gianelli ve ark. 2000). Bir diğer araştırmada ise Beasley ve arkadaşları (2006) ivermektin etkin maddesinde safsızlıkların saptanmasına yönelik çalışmalarında; 24a-hydroxy B2a isomer, 3-demethyl H_2B_{1a}, 3-demethyl H_2B_{1a} ve 24-demethyl H2B1a

safsızlıklarını LC/MS ve NMR kullanılarak tanımlanmış ve karakterize etmişlerdir. Ülkemizde, veteriner tıbbi ürünlerde safsızlıkların tanımlanmasına yönelik kapsamlı bir araştırmaya ulaşılamamıştır. Beşeri alanda ise bu nitelikte gerçekleştirilen çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, Gürsel (2013) tarafından insanlarda astım tedavisinde kullanımı bulunan montelukast API'si içeren tabletlerde safsızlıkların tespitine yönelik bir metot geliştirilmiş ve ICH kriterlerine göre geçerli kılınmıştır. Araştırmacı tarafından 11 ayrı firmaya ait 20 ilaç ürününün farklı parti analizlerinde sülfoksit safsızlığının 9 firmada limitlerin üzerinde bulunduğu, gerçekleştirilen test sonuçlarına göre bu safsızlığın genotoksik olmayan safsızlık olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Dünya literatürüne giren safsızlıklara yönelik benzer nitelikteki farklı çalışmalara bakıldığında ise Fujimura ve ark. (2017) tarafından 6 piperasilin+tazobaktam kombinasyonu içeren jenerik ürünün güvenilirliğini değerlendirmek için gerçekleştirilen *in siliko* analizde; içerdiği organik azid grubu nedeniyle safsızlık A'nın mutajenik madde olarak kabul edildiği bildirilmiştir. Bu mutajenin, patent süresi sona eren tazobaktamın sentez prekürsörünün bir azido grubu olduğu tahmin edilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerde beş üründe bu safsızlığın bulunduğunun tespit edildiği ve pazarlama izni sahiplerinin ürünlerini piyasaya sürmeden önce bu mutajenik maddeyi kontrol etmesi önerilmiştir (Fujimura ve ark. 2017). El-Shahenyve arkadaşları (2019) tarafından gerçekleştirilen bir başka araştırmada; Nizatidin için WHO tarafından önerilen deney koşullarında 160 dakika sonra % 18 nitrozasyon gözlenirken, mide sıvısı deneysel modelinde 10 dakika içerisinde % 100 oranında N-nitrozo derivativinin oluştuğu, *in siliko* toksikoloji çalışmasında mutajenik ve toksik etkisinin doğrulandığı bildirilmiştir (El-Shaheny ve ark. 2019).

Araştırmamızda ise ülkemizde veteriner sağaltımda yaygın olarak kullanımı olan ivermektin API'sini içeren enjeksiyonluk çözelti (n=16) ile farklı üreticilere ait etkin maddesinin (API; n=5) ve referans standardın (Std; n=3) safsızlık tayini gerçekleştirilmiş ve safsızlık profilleri karşılaştırılmıştır. Metodun temel prensipleri Ph.Eur. güncel monografı esaslarına dayanmakla birlikte, metotta safsızlıkların saptanma duyarlılıklarının artırılması, analiz süresinin kısaltılması ve enjeksiyon hacminin düşürülmesine yönelik modifikasyonlar yapılmıştır. Bu kapsamda farklı uzunluk, çap ve partikül boyutuna sahip klasik, monolitik ve fused core (core-shell, superficially porous) kolonlar, farklı mobil faz kompozisyonu, kolon kompartman sıcaklığı, akış hızı, veri toplama oranı, enjeksiyon hacmi gibi parametrelerdeki değişiklikler test edilerek

yöntemin uygulanabilirliği optimize edilmiştir. Yönteme ilişkin modifikasyonların kabul edilebilirliğinin ölçütü olarak Avrupa Farmakopesi limitleri esas alınmıştır. Farmasötik ürünlerin kalitesinin değerlendirilmesi ve izlenmesinde referans bir kaynak olan Ph.Eur. 10.0'da kromatografik ayırma teknikleri bölümünde farmakopede yer alan bir metod kullanıldığında, sistem uygunluk parametrelerinin uygunluğunun kanıtlanması durumunda bazı değişikliklere izin verileceği ifadelerine yer verilmektedir. Denemeler sonrası tercih edilen kolon ve gerçekleştirilen modifikasyonlar sayesinde analiz süresi standart metoda göre % 50'nin üzerinde kısaltılmış, enjeksiyon hacmi 4 kat düşürülmüş ve safsızlıklar için validasyon kriterleri ve sistem uygunluk parametreleri yönünden kabul edilir ayrım sonuçlarına ulaşılmıştır. Yeni nesil partikül teknolojilerine sahip, daha yüksek basınçlar ile çalışmaya izin veren kolonların analize yararlı etkisi ortaya konmuştur. Seçicilik çalışmasında analiz sonucunu etkileyecek mobil faz, çözücü ve yardımcı madde kaynaklı girişim olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, doğruluk çalışmasında güncel kılavuzlara göre % 98-102 arasında olması gereken geri kazanım oranı % 98,5-100,3 arasında, tekrarlanabilirlik çalışmasında % 2 altında olması beklenen BSS değeri % 0,1011-0,4190 arasında ara kesinlik çalışmasında % 2 altında olması beklenen BSS değeri % 0,8991 olarak elde edilmiştir. Avrupa Farmakopesine göre ihmal limiti olarak kabul edilen 0,4 µg/mL konsantrasyonda tespit alt sınırı için üç ve tayin alt sınırı için 10 olarak beklenen sinyal/gürültü oranı 10 tekrar ortalamasında 42 olarak elde edilmiş olup, daha düşük seviyelere inilebileceği tespit edilmiştir. Çalışma aralığı olan 0,4-960 µg/mL konsantrasyonda en az 0,999 olması beklenen korrelasyon katsayısı 0,9998 olarak edilmiş ve artıkların rastgele dağılım gösterdiği ortaya konmuştur. Sistem uygunluk parametrelerinde H_2B_{1a} ve H_2B_{1b} komponentlerine ait pikler arasında en az 3,0 olması gereken rezolüsyon 8,59, ana pik için en az 10 olması gereken sinyal/gürültü oranı; 34,8, kromatogramda ana pik İvermektin H_2B_{1a} için en fazla 2,5 olması gereken simetri faktörü 0,96 elde olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar ile yöntem, ivermektin bileşenleri ve safsızlıkları için Avrupa Farmakopesi ve VICH kılavuzlarına göre geçerli kılınmıştır (VICH 1998; 1998a, TFD 2017, Ph.Eur 2020). İvermektin safsızlıklarının analitik olarak çalışıldığı sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Wimalasinghe ve ark. (2021) tarafından İvermektin API ve ilişkili maddelerinde HPLC ile yürütülen çalışmada yeni nesil likit kromatografi kolonu kullanılarak 25 dakika süreli metot geliştirilmiştir. Çalışmamız ile karşılaştırıldığında kolon, metot ve süre farklılığı bulunmaktadır. Ayrıca çalışmamızda API'ler yanında VTÜ'ler de analiz edilmiş ve araştırmacıların çalışmasından farklı olarak

EPİ safsızlığı tanımlanmış ve geliştirilen metotla analiz edilebilirliği için doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Padivitage ve ark. (2021) tarafından ivermektin enjeksiyonluk çözelti örneklerinde çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ivermektin ve safsızlıkları tanımlanmıştır. Çalışmamız ile Mobil faz, kolon ve analiz süresi yönüyle farklılıklar bulunmakta olup çalışmamızdaki analiz süresi daha kısadır. Ayrıca çalışmamızda EPİ safsızlığının geliştirilen metotla analiz edilebilirliği için doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. HPLC çalışmaları dışında Gianelli ve ark. (2000) tarafından ivermektin etkin maddesinde parçalanma yolağı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada safsızlıklar preparatif HPLC aracılığıyla izole edilmiş ve HPLC ile doğrulanan bileşenlerde NMR ve MS kullanılmıştır. Beasley ve arkadaşları (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada MS ve NMR kullanılmış olup, çalışmamızda olduğu gibi farklı safsızlığa sahip API ve tıbbi ürünlere yönelik analiz gerçekleştirilmemiştir. Her iki çalışma da miktar tayini kapsamında olmayıp, çalışmamız ile karşılaştırıldığında hem test materyali hem de yöntemsel farklılıklar bulunmaktadır.

İlaç etkin madde ve ürünlerinde pazarlama izni sürecinin kritik bileşeni olarak fiziksel testlerin yapılması ve sonuçların bildirilmesi bir zorunluluktur. Özellikle pH ve su içeriğinin tayinine yönelik test sonuçları, API ve VTÜ'lerin safsızlık düzeyleriyle/profilleriyle ilişki olabilen önemli veriler niteliğinde kabul edilebilirler. Araştırmamızda ivermektin örneklerinin su içerikleri ile safsızlık profili arasında korrelasyon kurulamamıştır. İvermektin enjeksiyonluk çözeltilerde pH ve su içeriği ölçümlerine yer verilen başka araştırmaya ise ulaşılamamıştır. Bununla birlikte Roy ve ark. (2001) diklofenak sodyumun parenteral dozaj formunun üretiminde 1-(2,6-diklorofenil)indolin-2-1 safsızlığının formülasyonun başlangıç pH'sına bağlı olarak şekillendiği bilgisine yer vermişlerdir. Benzer şekilde Larsen ve ark. (2009) tarafından su içeriğinin etkisine yönelik; sitrik asit ve karvedilol arasındaki katı hal reaksiyonunun üç farklı sitrik asit esteri oluşturduğunu, anhidröz sitrik asit kullanıldığında ise ester oluşumunun 8 kata kadar azaldığını bildirmiştir. Düşük miktarlarda su varlığının bu reksiyonu hızlandırdığı saptanmıştır. Bu yaklaşımla çalışmamızda tüm test numuneleri pH ve su içerikleri yönünden analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen fiziksel testler kapsamında ürünlerin su içeriğinin % 0,08 ile % 1,2 arasında, pH değerlerinin 6,21–9,21 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Farklı üreticilere ait ürünlerin fiziksel özellikleri yönüyle önemli farklılıklar taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca aynı üreticiye ait ürünlerde de **(**A1, A2 ve A16 nolu numuneler) pH değerlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Test

numuneleri arasında raf ömürleri ileri dönemde olan örneklerin, su içeriği miktarlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Avrupa Farmakope monografına göre ivermektin API'sinde 11 safsızlık belirtilmekle birlikte, ihmal limiti esas alınarak yapılan değerlendirmeye göre çalışmamızda ivermektin HPLC spektrumuyla uyumlu 12 farklı safsızlık tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmamızda ivermektin numunelerinde ihmal limitinin altında kalan farklı safsızlıklar da saptanmıştır. Avrupa Farmakope monografında ivermektin H_2B_{1a} + H_2B_{1b} bileşeni en az % 95,0 düzeylerinde olmasının gerekliliği vurgulanmakta olup, farklı üreticilere ait 5 API'de gerçekleştirdiğimiz analizler sonucunda API-4 nolu numunede bu değerin % 94,9 olduğu tespit edilmiştir. İvermektin enjeksiyonluk çözeltilerinde gerçekleştirilen (16 VTÜ) analizlerde USP monografına göre ivermektin saflığı % 94,0 olması gerekirken, A1 nolu numunede; % 93,35, A16 nolu numunede; % 90,40 olarak izin verilen limitlerin dışında olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte VICH kılavuzlarına göre ürünlerin raf ömrü spesifikasyonlarında %10 sapmaya izin verilmektedir. Toplam safsızlığı (% 9,60) kalifikasyon limitlerinin üzerinde olduğu saptanan A16 nolu numunenin HPLC analizinde tanımlanamayan nitelikte bir safsızlık piki saptanmıştır. Miktar tayinine dayalı incelemeler sonucunda bu safsızlığın % 6,30 düzeyinde olduğu belirlenmiştir.

İvermektin'in 2. karbonu C(2) üzerindeki alilik protonun zayıf asiditesinden dolayı bazik çözelti içinde izomerizasyon şekillenebilir. Bu bazik koşullardaki izomerizasyon, C (2) 'de protonun ayrışmasından kaynaklanan delokalize karbanyondan (Karbonu 3 değerlikli, nagetif yüklü anyon) türeyebilir. Reprotanasyon C2'de olduğunda epimer, C4'de olduğunda ise izomeri açığa çıkar. C2 (epimerizasyon) konumundaki stereokimyasal değişiklikler biyolojik aktivitede önemli azalmalara neden olur (Fink 1988). Ayrıca, avermektinlerin 6.20–6.35 pH aralığında en kararlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, formülasyonlar pH 6.25 civarında tasarlandığında, bazik hidroliz esaslı bozunmadan kaçınma olasılığı bulunmaktadır (Awasthi ve ark. 2012). A16 kodlu numunede tespit edilen, farmakope kayıtlarında yer almayan bu safsızlığın, Fink'in (1988) ileri sürdüğü gibi alkali koşullarla ilişkili olarak şekillenebilen bir epimer olabileceği kanaatine ulaşılmış, incelenen A16 kodlu ürünün diğer formülasyonlara göre en yüksek pH değerine sahip olması bu görüşü desteklemiştir. Ayrıca bu varsayım, 2-epi-ivermektin B_1a standardı eşliğinde gerçekleştirilen analitik ispatlama çalışmasıyla da

doğrulanmıştır. Çalışmamızda, 16 adet enjeksiyonluk çözelti numuneleri 2-epi-ivermektin B1a safsızlığı yönünden kapsamlı şekilde incelenmiş ve pH değerleri 7,4 üzeri olan A2, A3, A10 ve A16 nolu numunelerde bu safsızlığın daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Raf ömrünün 41.ayında bulunan A15 nolu numunede bu safsızlık ihmal limiti altında bulunmasına karşılık A16 nolu numune raf ömrünün 6.ayındadır. Bu durum ürün formülasyonlarının önemiyle birlikte, safsızlık profili yönünden ürünlerin raf ömrü süresince incelenmesinin önemini vurgulamaktadır. Degradasyon ürünü safsızlıkların toksisite potansiyellerinin değerlendirilmesi ilaç güvenirliği açısından önemlidir (VICH 2007a). Degradasyon ürünü 2-epi-ivermektin B_1a safsızlığı için toksisite bilgisine ulaşılamamış olup, yalnızca Pivnichny ve ark. (1988) tarafından, ivermektin epimer ve izomerinin iki noktalı örümcek akarı *(Tetrunychus urticue)* üzerine etkinliğinin değerlendirildiği çalışmaya ulaşılmıştır. Çalışmada ivermektinin 0,05 ppm'de, izomerin 1,25 ppm'de, epimerin 6,25 ppm dozda örümcek akarına karşı etkin olduğu bildirilmiştir (Pivnichny ve ark. 1988).

VTÜ'lerde; ürünlerin kalitesi, güvenilirliği ve etkinliği ile ilgili hayvan veya insan sağlığına ilişkin her türlü risk ile çevre üzerinde herhangi istenmeyen etki değerlendirilir (EMA 2007a). FDA tarafından 1992 yılında kiral maddelere yönelik ilk kılavuz yayımlanmıştır. Bu kılavuzda tanımlanan sorunlar kapsamında; izomerlerin kiral miktarlar ve farklılıklarını hesaba katan farmakokinetik değerlendirmeler (farklı doz-yanıt eğrileri), hayvan modellerinde insanlardan farklılık gösteren farmakokinetik verilerinin doğru yorumlanması, uygun üretim kontrolleri (diastereomerik safsızlıkların hariç tutulması) ile ürün stabilitesini (muhafaza sırasında rasemizasyon) içermektedir (FDA 1992; Smith 2009). Bu kılavuz doğrultusunda araştırmamızda ivermektin epimerinin miktar tayini öncelikli hale gelmiştir. Avrupa Farmakopesinde ilaç etkin maddelerinde epimer safsızlık limitlerine ilişkin tanımlamalara yer verilmiştir. Bu kapsamda; ivermektin gibi iki farklı bileşenden oluşan neomisindeki epimer miktarı % 3±15 ile sınırlandırılmıştır (Görög 2000). Farmakope monograflarında yer alan diğer API'lerdeki epimer safsızlıkları ile limit değerleri ise; Siklesonid safsızlık A (S-epimer) limiti %1, linkomisin hidrokloride safsızlık A (α-amide epimer) % 0.5, triamsilonon heksasetonid safsızlık B (Epimer 1 ve 2) % 0.15, iminepem safsızlık B (Epimer 1 ve 2) % 0.3, silastatin sodium safsızlık A (Epimer 1 ve 2) % 0.5, safsızlık G % 0.1, sisatrakuryum besilat safsızlık I için K, L ve M safsızlıkları ile beraber % 0.3, diritromisin 15S-epimer'i % 1.5, misoprostol safsızlıkları 8-epimisoprostol % 0.3, 12-epimisoprostol

% 0.1, paklitaksel safsızlık E (7-epi-paklitaksel) % 0.4, Prednisolon safsızlık F (11-epi-prednisolone) % 0.5, Perindopril safsızlık F epimeri % 0.2, Fusidik asit safsızlık I (16-epi-deacetylfusidic acid) % 0.2, Testosteron safsızlık C (17-epi-testosterone) % 0.3, Vankomisin safsızlık J (26-epi-vancomycin B) % 1.6, Oksitetrasiklin safsızlık A (4-epioxytetracycline) % 0.7 olarak özetlenebilir (Ph.Eur 2020f; 2020g; 2020h; 2020ı; 2020i, 2020j; 2020l; 2020m; 2020n; 2020o; 2020p; 2020r; 2020s; 2020t; 2020u). API monograflarına göre limitleri bulunan bu epimerlerin, degradasyon ürünü olması halinde tıbbi ürünlerde de kontrolü gerekmektedir. Daha potent olmaları durumunda ise toksikolojik değerlendirme esaslı daha düşük limitler belirlenmektedir (VICH 2007; 2007a; 2007b; EMA 2012). Farmakope monograflarında birçok API'nin epimer limitleri düşük sınırlar dahilinde olmasına rağmen fulvestrant için terapötik etkinliğe sahip epimer A ile epimer B için, sırasıyla (%42-48) ve (% 52-58) limit değerleri belirlenmiştir (Ph.Eur. 2020i). İvermektin için farmakope monografında 11 adet bilinen safsızlık yer almakta olup, epimer bu safsızlıklar arasında yer almamaktadır (WHO 2018; Ph.Eur. 2020k).

Numunelerde ihmal limiti altında kalan safsızlıklar ile raporlama sınırını aşan safsızlıkların varlığı da saptanmış olup, referans standart ve API'ler ile karşılaştırma yapıldığında, bu safsızlıkların degradasyon ürünü olmadığı ve kalifikasyon limitini aşmadığı belirlenmiştir. Tez kapsamında ivermektin referans standart (n=3) ve API'leri (n=5) safsızlık düzeyleri yönünden de incelenmiştir. Üç farklı ivermektin referans standardının H_2B_{1b} bileşeninin % 0,71-2,17, H_2B_{1a} bileşeninin %95,23-96,41, toplam saflığının % 97,12-97,40 aralığında olduğu tespit edilmiştir. API'lerin H_2B_{1b} bileşeninin % 1,70-2,93, H_2B_{1a} bileşeninin % 92,32-94,67, toplam saflığının ise % 94,90-97,07 aralığında farklılık gösterdiği saptanmıştır. API'ler ve standartlardaki safsızlık oranları Ph.Eur. monografında kabul edilebilir limitlerde olduğunu göstermesine rağmen bu farklılıklar ürün safsızlıklarına yönelik izleme çalışmalarında farmakopeye uygun referans standart ve API kullanımının önemini gösterir niteliktedir.

Araştırmamızda, safsızlık düzeyleri analiz edilen ivermektin test örneklerinin sitotoksisite/genotoksisite potansiyeli *in vitro* test sistemlerinde incelenmiştir. OECD kılavuzunda test maddeleri için "Hedef hayvana özgü, genetik karakterizasyonu yapılmış, metabolik özellikler ile birlikte hücre döngüsü hakkında da sonuca ulaşmayı sağlayacak hücre türlerinin kombine edilerek kullanımı, uygulanan yöntemlerin iyi uygulamalar doğrultusunda standardize edilmesi, *in vitro* dozun *in vivo* doza uyarlandığındaki

farmakokinetik ve toksikokinetik korrelasyon değerlendirmesi" koşulları dikkate alındığında genotoksik etkinin kalıcı veya geçici olduğunun tespit edilmesinin yararlı olduğu bildirilmiştir (OECD 2018). *In vivo* testler son nokta testleri olmakla birlikte, *in vitro* testlerle karşılaştırıldığında test kimyasallarının seçiminde fazla miktarda kimyasalın kullanılması, daha yüksek maliyetler ve bazen aynı seriden yeterli miktarda test maddesi bulunamaması gibi bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından deneylerde hayvanların kullanımının azaltılması stratejileri ve (Anonim 2010) önerileri doğrultusunda, toksisite testleri *in vitro* test sistemlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda analitik çalışmalar sonucunda safsızlık profilleri farklılık gösteren ivermektin test materyalleri olası sitotoksik ve genotoksik potansiyelleri yönünden incelemeye tabi tutulmuşlardır. Araştırma kapsamında; IVM Ph.Eur. referans standardı (Std-1) ve etkin maddenin (API-4) yanı sıra, ideal pH'ya (Awasthi ve ark. 2012) sahip referans tıbbi ürün (A15), tespit edilen degradasyon ürünü safsızlığı en yüksek olan ürünler (A10 ve A16) ile çalışmalar süresince tespit edilen degradasyon ürünü 2-epi-ivermektin B1a safsızlığı (EPİ) olmak üzere toplam 6 farklı test materyali seçilmiştir (Tablo3-3).

IVM tüm türlerde karaciğer ve böbrekler (<%2) aracılığıyla elimine edilen bir antiparaziter ilaçtır (Canga ve ark. 2009). *In vivo* deneysel çalışmalarda, bileşiğin glomerular filtrasyon düzeyini azaltarak ve renal tubullerde fonksiyon bozukluğu ile ilişkili nefrotoksisiteye neden olabileceği bildirilmektedir (Arise ve Malomo 2009; Al-Jassim ve ark. 2016). Bu bilgiler ve IVM preparatlarının endike olduğu türler dikkate alınarak *in vitro* sitotoksisite ve Comet testi çalışmalarında MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücre hattı kullanılmıştır. Ayrıca MDBK'nın sığır türüne ait olması, p53 yetkin (Devireddy ve Jones 1999; Fiorito ve ark. 2011), hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve hücre iskeleti gibi işlevlerde yer alan genlerinin karaciğere hücre hatlarına göre daha yüksek olması (Bionaz ve ark. 2008) bilgisi araştırmada bu hattın seçiminde etkin rol oynamıştır.

Araştırmamızda ivermektin numunelerinin sitoroksiste potansiyelleri in vitro ATP hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiş ve MDBK hücre hattında sitotoksisiteye neden olan konsantrasyonlar belirlenmiştir. Ulaşılan veriler, MDBK hücre hattına uygulanan tüm test numunelerinin konsantrasyon artışına paralel bir şekilde hücre canlılık düzeylerinde azalmalara neden olduğunu göstermiştir. Sitotoksik etkinin test maddelerinin 31,25 µM konsantrasyonu ile belirgin düzeyde başladığı saptanmış ve IC_{50}

düzeylerinin her test numunesi için farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu kapsamda IC_{50} değerleri; Std-1'de (N1) 78,42 µM, API-4 (N2) 91,73 µM, EPİ (N6) 109,20 µM olarak hesaplanmıştı. Enjeksiyonluk çözeltilerin IC_{50} değerleri ise N3 (A10) için 61,88 µM, N4 (A15) için 57,58 µM olarak belirlenmiş ve degradasyon ürünü safsızlığı yüksek olan N5 (A16)'in 39,26 µM IC_{50} değeri ile sitotoksik etkisi en güçlü numune olduğu tespit edilmiştir. Safsızlık analizlerine dayalı veriler doğrultusunda, test numuneleri arasında N5 (A16) nolu ivermektin enjeksiyonluk çözeltisinin sitotoksik etki gücünün, ürünün içerdiği total safsızlıklarının yüksek düzeyi ile ilişkili olabileceği kanaatine ulaşılmıştır. Diğer taraftan, sitotoksik etkinin API'ye göre test edilen tıbbi ürünlerin daha düşük konsantrasyonlarda bile belirgin düzeyde farklılık gösterdiği ve güçlü olduğu saptanmıştır. Sitotoksik etki düzeyindeki bu farklılığının ise, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sitotoksik etki; N1 (Std-1) ve N4 (A15) nolu numunede 62,50 µM ve üzeri konsantrasyonlarda $P<0.001$, N2 (API-4) nolu numunede 15,86 µM'da $P<0.05$ olmak üzere daha üzeri konsantrasyonlarda $P<0.001$, N3 (A10) ve N6 (EPİ) nolu numunelerde 31,25 µM'da $P<0.05$ olmak üzere daha üzeri konsantrasyonlarda $P<0.001$, N5 (A16) nolu numunede 31,25 µM ve üzeri konsantrasyonlarda $P<0.001$ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda sitotoksik etki istatistiksel olarak anlamlı ($P > 0.05$) bulunmamıştır. Araştırmamızda ivermektin numunelerininin *in vitro* sitotoksisiteye neden olan dozları hedef hayvan türlerinde olası etki yönünden değerlendirilmeye çalışılmıştır. İvermektinin deri altı yolla sığır ve koyunlarda (200-400 µg/mL) kullanılan rasyonel dozlarına ilişkin maksimal plazma konsantrasyon değerleri sırasıyla 13-133,2 ng/mL ve 11,9-111,7 ng/mL olarak belirlenmiştir (Canga ve ark 2019). Bu değerlerin mikromolar karşılığı sığırlar için 0,015-0,152 µM koyunlar için 0,014-0,127 µM olarak hesaplanmıştır. Farmakokinetik/Farmakodinamik modelleme esasına dayalı değerlendirmede; ivermektinin hedef hayvan türlerinin plazmasında bulanabilecek düzeyinin çok üstünde olduğu, sitotoksik etkinin belirgin olarak açığa çıktığı en düşük konsantrasyonun (31,25 µM) bile maksimal plazma konsantrasyonundan yaklaşık 200 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İvermektinin MDBK hücre hatlarında sitotoksisite potansiyeli farklı araştırmacılar tarafından da değerlendirilmiştir (Batiha ve ark. 2019; Raza ve ark. 2020). Bu kapsamda; Batiha ve ark. (2019) tarafından MDBK hücre hattında kolorimetrik hücre canlılığı yöntemi olan Cell Counting Kit-8 (CCK-8) ile gerçekleştirilen çalışmada; ivermektinin 24 saatte 138.9 ± 4.9 µg/mL konsantrasyonunun hücrelerin % 50'sinde

sitotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir. Batiha ve ark. (2019) tarafından aynı hücre hattında gerçekleştirilen çalışma ile karşılaştırıldığında yüksek dozda gözlenen sitotoksik etki uyumlu olmakla birlikte araştırmamızda daha düşük dozda IC_{50}'ye ulaşılmıştır. Bu uyumsuzluğun kullanılan farklı test yöntemlerinden kaynaklabileceği değerlendirilmiştir. Bir diğer çalışmada, Raza ve ark. (2020) tarafından MDBK hücre hattında MTT testi ile ivermektinin sitotoksik etkisinin 48 saatte 25 µM konsantrasyona kadar hücre proliferasyon oranının etkilenmediği bildirilmiştir. Raza ve ark. (2020) çalışması ile aynı hücre hattında farklı test sistemi ile gerçekleştirilen çalışma ile karşılaştırıldığında; 25 µM'a kadar sitotoksik etki gözlenmediği bulgusu çalışma sonuçlarımızla kısmen uyumlu olup, N5'de (A16) bu konsantrasyonda hücre canlılığında belirgin düşme gözlenmiştir. İvermektinin farklı hücre hattlarında sitotoksisite potansiyelinin değerlendirildiği sınırlı çalışmalarda; kullanılan ürüne ve konsantrasyona bağlı değişen derecelerde sitotoksik etkinin bulunduğu bildirilmiştir. Bu kapsamda Molinari ve ark. (2009) ivermektinin hem API ve ticari formunu (1-250 µg/mL) sitotoksik etki yönünden Çin hamster yumurtalık (CHO(K1)) hücrelerinde çeşitli testlerle [hücre döngüsü ilerlemesini (CCP), mitotik indeks (MI), proliferatif replikasyon indeksi (PRI), 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve nötr kırmızı (NR)] değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar her iki formunda 25 µg/mL'de hücre siklus progresyonunda gecikmeye, Mitotik indekste ve proliferatif replikasyon indeksinde azalmaya neden olurken, 50 µg/mL üzeri dozlarda CCP ve PRI testinde sitotoksik etkili olduğu, neutral red ve MTT testlerinde 0.25–250.0 µg/ml dozlarda hücre büyümesi inhibisyonu saptamışlardır. Araştırmacılar ulaştıkları bulguları doğrultusunda; CHO-K1 hücrelerinde saf IVM'nin sitotoksisiteyi indüklemede, ticari formülasyonundan daha fazla daha aktif olabileceğini vurgulamışlardır (Molinari ve ark. 2009). Çalışmamızda ulaşılan sonuçların Molinari ve ark. (2009) sonuçlarına kısmı olarak benzerlik gösterdiği, ancak araştırmamızda sitotoksik etkinin ivermektinin API formuna göre enjeksiyonluk çözelti formunda daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Bu durumun test yöntemleri, test maddelerinin safsızlıkları yardımcı maddeleri ile hücre hattı farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızda ivermektin test numunelerinin mutajenite potansiyeli, AMES *Salmonella*/mikrozom testi sisteminde değerlendirilmiştir. Bu kapsamda altı farklı test numunesinin 0,1-1000 µg/plaka konsantrasyon aralığında dört farklı dozu *Salmonella*/ TA98 ve TA100 suşlarında S9 varlığında ve yokluğunda relevant koloni sayıları yönünden incelenmiştir. Test edilen konsantrasyonlarda tüm revertant koloni sayılarının

spontan revertant koloni sayılarından daha fazla bulunmadığı saptanmıştır. N6 nolu test materyali tespit edilen degradasyon ürünü safsızlık olup, safsızlık standardının yetersiz olması nedeniyle metabolik aktivasyon yokluğunda değerlendirilememiştir. Ayrıca, altı farklı test numunesinin test edilen tüm konsantrasyonlarda mutajenik indeks değerlerinin 0,8-1,5 aralığında olduğu ve mutajenik etki için 2 olan limit değeri aşmadığı belirlenmiştir. Ulaşılan veriler doğrultusunda, ivermektin örneklerinin 2 farklı *S. typhimurium* suşları ile S9 varlığı ve yokluğunda mutajenik etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. İvermektine ait API, farklı safsızlık profiline sahip ürün ve EPİ safsızlığı düzeyinde AMES testi ile gerçekleştirilen benzer bir araştırmaya ise ulaşılamamıştır.

Araştırmamızda ivermektin test örneklerinin genotoksiste potansiyelleri AMES test sisteminin yanı sıra tek hücreli alkalen jel elektroforezi (Comet) test sisteminde de incelenmiştir. Bu doğrultuda AMES test sonuçlarının doğrulanması ve her iki test sisteminin ivermektin yönünden uygunluğunun değerlendirilmesi imkanı doğmuştur. Comet testi ile genotoksisite çalışmasında; MDBK hücre hattında, altı farklı test materyalinin sitotoksisite testleri sonucunda % 70 ve üzeri hücre canlılığı olan üç konsantrasyonun etkinliği incelenmiştir. Bu doğrultuda; sitotoksisite test sonuçlarında hücre canlılığı oranlarının farklı düzeylerde olması nedeniyle N2 (API-4) ve N6 (EPİ) nolu numunelerde 62,50, 31,25 ve 15,63 µM, N1 (Std-1), N3 (A10) ve N4 (A15) nolu numunelerde 31,25, 15,63 ve 7,81 µM, N5 (A16) nolu numunede 15,63, 7,81 ve 3,91 µM konsantrasyonda testler gerçekleştirilmiştir. Numunelerdeki % DNAt, görüntü işleme ve analiz programı ile hesaplanmıştır. Çalışmamızda pozitif kontrolde % DNAt değeri negatif kontrole göre % 186,6 daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Altı farklı test numunesinin üç farklı konsantrasyondaki sonuçlarının karşılaştırmasında % DNAt negatif kontrol grubuna göre % 7,73 altı ile % 48,35 aralığında değişen oranlarda bulunmuş, N4 (A15) nolu numunede % DNAt değerlerinin en düşük, N5 (A16) nolu numunede en yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. N4 (A15) nolu numunede 31,25 µM konsantrasyona kadar DNA'da hasar oluşmadığı gözlenirken, N5'de (A16) 3,91 µM, N1 (Std-1) ve N3'de (A10) 7,81 µM, N2 (API-4) ve N6'da (EPİ) 15,63 µM konsantrasyondan itibaren DNA hasarı oluştuğu gözlenmiştir. N1'de (Std-1) plazma konsantrasyonunun yaklaşık 50 katında, N2 (API-4) ve N6'da (A16) yaklaşık 100 katında DNA hasarı gözlenmeye başlanmış olup, IVM API ile EPİ yönünden değerlendirildiğinde tespit edilen degradasyon ürünü safsızlığın API'ye göre daha düşük düzeyde DNA hasarı

oluşturduğu gözlenmiştir. Safsızlıkların VTÜ'lerdeki limitleri ele alındığında (%1 altında) analitik yöntemlerle kontrolü gerçekleştirilen EPİ safsızlığının plazmada DNA hasarı oluşturacak seviyeye ulaşamayacağı sonucuna ulaşılmıştır. İvermektinin hedef hayvan türlerinde ulaşabileceği IVM konsantrasyonu dikkate alındığında N4 (A15) nolu VTÜ numunesinde plazma konsantrasyonunun yaklaşık 200 katına kadar DNA hasarı gözlenmezken, N5 (A16) no'lu VTÜ'de plazma konsantrasyonunun yaklaşık 25 katında, N3 (A10) no'lu numunede yaklaşık 50 katında DNA hasarı gözlenmeye başlanmıştır. Test sonuçlarının tek yönlü varyans ve Dunnett testi sonuçlarına göre istatistiksel değerlendirmesi doğrultusunda pozitif kontrol grubu olan hidrojen peroksit grubunda ortalama % DNAt değerleri tüm diğer deney gruplarına göre istatistiki önem ($P< 0,0001$) gösterdiği saptanmıştır. İvermektin test numunelerinin/örneklerinin % DNAt değerlerinin ise negatif kontrol grubuna konsantrasyonlarına bağlı değişen düzeylerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Test örneklerinden N4 (A15) dışındaki tüm numunelerdeki % DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P<0.001$ve $P<0.0001$) olduğu saptanmıştır. En yüksek DNA hasarının degradasyon ürünü safsızlığı en yüksek olan N5 (A16) nolu numunede en yüksek test konsantrasyonunda, negatif kontrol grubuna göre % 48,35 oranında daha fazla olduğu saptanmıştır. VTÜ'ler arasındaki bu farklar fizikokimyasal analiz sonuçları ile birlikte ele alındığında N4 (A15) no'lu ürünün hem pH değeri yönünden ideal aralıkta olması (Awasthi ve ark. 2012) hem de UHPLC çalışma sonuçlarımıza göre daha düşük düzeyde safsızlığa sahip olması nedeni ile DNA hasarı oluşturmadığı, N3 (A10) ve N5 (A16) no'lu numunelerin pH değerinin alkali koşullarda, ideal pH değerinden yüksek olması yanında daha yüksek seviyede safsızlığa sahip olmalarının DNA hasarı oluşumunda etkisi olabileceği değerlendirilmiştir.

İvermektin'in genotoksisite potansiyelinin değerlendirildiği sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Molinari ve arkadaşları (2009) tarafından CHO-K1 hücre hattında API ve ticari ürün kullanılarak genotoksisite testleri yürütülmüştür. Çalışmaya göre tek hücre jel elektroforezi testinde API için 5-50 µg/mL konsantrasyonlarda dozlarında, ticari formülasyon için 50 µg/mL konsantrasyonda DNA iplik kırılmalarını indükleyerek pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir (Molinari ve ark. 2009). Aynı araştırmacılar tarafından farklı zaman periyotlarında CHO-K1 hücrelerinde API ve ticari formülasyon ile DNA hasarı kinetiğinin araştırıldığı çalışmada; hücre canlılığının 3 saate kadar değişmeden kaldığı, 6 saatten sonra arttığı, 12 ve 24. saatler içinde değişmeden kaldığı, inkübasyon sırasında DNA hasarında bifazik davranış meydana geldiği

saptanmıştır. Hücrelerde 18 saat inkübasyon sonrasında DNA hasarında zamana bağlı azalma, hafif hasarlı hücrelerin kademeli olarak azalması, hasar görmemiş hücrelerin sıklığındaki artışla eşzamanlı hasarlı hücrelerin yokluğu gözlenmiştir. Akış sitometrisi analizine göre, her iki bileşiğin de erken ve geç apoptoz belirgin bir artışa neden olabileceğini ortaya çıkarmıştır. DNA lezyonlarındaki azalmanın bir onarım sürecinden ziyade ivermektinle indüklenmiş sitotoksisiteyle ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Molinari ve ark. 2013). Çalışma sonuçlarımız ile karşılaştırıldığında Molinari ve ark. (2009) çalışması ile kısmen uyumlu olup, çalışmamızda yakın konsantrasyon aralığında, N4 (A15) nolu ticari formülasyonda DNA hasarı gözlenmezken, N3 (A10) ve N5 (A16) olmak üzere iki ticari formülasyonun API'ye göre daha yüksek seviyede hasar oluşturduğu görülmüştür. Bu farkın hücre hattından, test maddelerinin saflığından ve yardımcı maddelerinden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Araştırmamız, Molinari ve ark. (2013) çalışması ile N4 (A15) nolu numune yönünden uyumlu, diğer 5 numune yönünden uyumsuzdur. Bu farkın, farklı hücre hatlarından ve test materyalinden kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Vergara ve ark (2017) tarafından 3-4 yaşındaki ortalama 350 kg, vücut kondüsyonu 3 ve 3.5 arasında skorlanan Zebu sığırlarında gerçekleştirilen çalışmada % 1 ve % 3.15 olarak uygulanan ivermektinin konsantrasyonundan bağımsız olarak % 75'in üzerinde hücrede DNA'da basit zincir kırıkları oluşturduğu gösterilmiştir (Vergara ve ark. 2017). Vergara ve ark. (2017) tarafından Zebu sığırlarında gerçekleştirilen çalışma ile araştırma sonuçlarımızdaki kısmi uyumsuzluğun nedeninin, uygulanan test ile *in vitro-in vivo* koşul farklılığı olabileceği değerlendirilmiştir.

Ülkemizde veteriner tıbbi ürünlerin safsızlık profillerinin değerlendirildiği herhangi bir bilimsel yayına ulaşılamamıştır. Ayrıca dünya literatürüne yönelik taramalarda Veteriner ivermektin preparatlarının safsızlık içerikleriyle ilişkilendirilerek sitotoksisite ve genotoksisite potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışma da bulunamamıştır. Bu nedenle, tez kapsamında inceleme altına alınmış veteriner ivermektin çözelti örnek, API ve standartlarının safsızlık profillerinin belirlenerek safsızlık düzeyleri yüksek ivermektin örnekleri ile 2-epi-ivermektin B1a'nın sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar, bu alanda ilk olma niteliği taşımaktadır. Uluslararası ilaç otoriteleri tarafından safsızlıkların genotoksisite potansiyellerinin değerlendirilmesinde AMES testi birincil referans test aracı (VICH GL10, GL11, DNA Reaktif Safsızlıkların Değerlendirilmesi ve Kontrolü Kılavuzu) olarak gösterilmesine rağmen, ivermektin çözelti ve safsızlıklarının genotoksisite

potansiyelinin incelenmesinde Comet test sisteminin daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca tez çalışmaları kapsamında, 96'lık kültür plakalarına adapte edilen (Bajpayee ve ark. 2013) Comet testi uygulanmasının, özellikle çok düşük düzeylerde bulunan safsızlıklar ve çok sayıda numunenin karşılaştırılması gereken çalışmalar söz konusu olduğunda genotoksik potansiyelinin değerlendirmesi için yarar sağlayabileceği sonucuna da ulaşılmıştır. Comet test sistemine dayalı incelemeler, ivermektin numunelerinin DNA hasarını başlatıcı konsantrasyonlarının safsızlık potansiyelleri ile ilişkili olarak farklılık gösterebileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte araştırmamızda comet test sonuçları ivermektin test örneklerinin pratikte kullanılan dozlarıyla ulaşılan plazma konsantrasyonlarının çok üstündedir. AMES ve Comet test sistemlerinde farklı sonuçlar ele alındığında ise bakteri/memeli hücre farkı, test sistemlerinde göreceli olarak karşılaştırılması mümkün olmayan doz veya konsantrasyon, test sistemlerinin ivermektine karşı duyarlılık farkından kaynaklanabileceği ileri sürülebilir. Araştırma sonuçlarımız AMES testinde negatif sonuca ulaşılırken diğer genotoksisite test sistemlerinde pozitif sonuç elde edilen benzer araştırmalarla bu yönüyle uyumludur (Li ve ark. 2012; Butler ve ark. 2015; Guncum ve ark. 2021). AMES testi kimyasalların analizi için güvenilir, referans genotoksisite tarama yöntemi olmasına rağmen, yüksek derecede bakterisidal etkili bileşenler (Örneğin çeşitli antibiyotikler), memeli hücre replikasyon sistemleri ile girişim (interferens) yaptığı bilinen veya düşünülen çeşitli kimyasallar (Bazı topoizomeraz inhibitörleri, bazı nükleosit analogları) için uygun bir test yöntemi olmayabileceği bildirilmektedir (OECD 2020a). Test organizması için doğasında toksik etkileri bulunan maddelerde test duyarlılığının azalması, antimikrobiyal etkiye sahip maddeler için AMES testinin hatalı negatif sonuç vermesi de olasıdır (Doak ve ark. 2012, Li ve ark. 2012; Guncum ve ark. 2021). Bu sonuçlara göre ivermektin ve safsızlıklarının genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesinde her iki test sisteminin de, genotoksik etkilerin değerlendirilmesi açısından karşılaştırmalı olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Farklı formülasyonlar ve üretim prosesleri ile günden güne artarak çeşitlenen VTÜ'lerin yaşam döngülerinin farklı evrelerinde saptanabilen safsızlıkların kontrolü, hayvan ve halk sağlığının korunması açısından önemli bir konudur. Dolayısıyla API'lerin eldesinden tıbbi ürünlerin tüketimini kapsayan bu süreçte, düzenleyici otoriteden kullanıcıya kadar geniş bir yelpazede sorumluluklar düşmektedir. VTÜ'lerin etkinlik ve güvenilirliğine yönelik olumsuz etkileri olan safsızlıkların kontrol altına alınmasında

takip edilebilinecek metodoloji dikkate alınarak araştırmamız kapsamında yürütülen çalışmalar sonucunda;

İncelen test örneklerinden pH değeri ideal aralığın dışında en yüksek seviyede olan numunenin toplam safsızlık düzeyinin de yüksek olduğu belirlenmiştir. pH değeri en yüksek olan numunede UHPLC çalışmalarında ivermektin Avrupa Farmakopesine monografına göre bilinmeyen safsızlık saptanmış, bu bilinmeyen safsızlığın, ivermektin alkali koşullara maruz kaldığında ortaya çıkabilen 2-epi-ivermektin B1a safsızlığı olduğu doğrulanmıştır. *In vitro* testlerde safsızlık düzeyi, profili ve pH değeri farklı olan numunelerde sitotoksik ve genotoksik etkilerin değişen oranlarda olduğu saptanmıştır. Ayrıca 96'lık kültür plakalarına adapte edilen Comet yönteminin düşük miktarlarda bulunan safsızlıkların genotoksik potansiyelinin araştırılması için kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Tez kapsamında ulaşılan veriler doğrultusunda tüm veteriner tıbbi ürünlerin piyasaya arzı ve sonrasındaki süreçlerde safsızlık potansiyelleri yönünden incelenmesinin halk ve hayvan sağlığı açısından önemli olabileceği ve tez çalışmalarının benzer araştırmalar için bir örnek teşkil edebileceği, safsızlık düzeyleri ve profilleri ile birlikte pH gibi kritik fiziksel testlerin ve degradasyona potansiyel etkisi nedeniyle yardımcı maddelerin değerlendirilmesinin önemli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

Abdin, A. Y., Yeboah, P., & Jacob, C. (2020). Chemical impurities: An epistemological riddle with serious side effects. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(3), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijerph17031030

ACS (2014). Molecule of the Week Archive. Thalidomide. American Chemical Society, Erişim 07.08.2021. https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/thalidomide.html

Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Current Pharmaceutical Biotechnology, 17(14), 1213–1221. https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513

Al-Jassim, K. B., Jawad, A. A. D. H., Al-Masoudi, E. A., & Majeed, S. K. (2016). Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). Basrah J Vet Res, 14, 110-24.

Aleksić, N., Milutinović, M., & Bakrac, T. (1996). Investigation of the genotoxic effects of ivermectin on human lymphocytes. Acta Veterinaria-Beograd, 46(1), 51-55.

Alp, H,. Türk S., Yılmaz, S., Tiryaki, Ü.M., YİĞİTBAŞI, M. (2018). Akılcı İlaç Kullanımı. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi. 2018; 9(33): 33-41.

Alsante, K. M., Huynh-Ba, K., Baertschi, S. W., Reed, R. A., Landis, M. S., Kleinman, M. H., Foti, C., Rao, V.M., Meers, P., Abend, A., Reynolds, D.W., Joshi, B. K. (2014). Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 1: predicting degradation related impurities and impurity considerations for pharmaceutical dosage forms. AAPS PharmSciTech. 2014;15(1).

Amberg, A., Andaya, R. V., Anger, L. T., Barber, C., Beilke, L., Bercu, J., ... & Myatt, G. J. (2019). Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate

results as part of ICH M7 recommended (Q) SAR analyses. Regulatory toxicology and pharmacology, 102, 53-64.

Andrinolo, D., Iglesias, V., García, C., & Lagos, N. (2002). Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. Toxicon, 40(6), 699-709. Anonim, (1993). Resmi gazete 10/10/1993 tarihli ve 21724.

Anonim (1993). Milletlerarası Sözleşme. Bir Avrupa Farmakopesi Geliştirilmesine Dair Sözleşme. 10/10/1993 tarihli ve 21724 sayılı Resmi Gazete. Erişim: 14.05.2020

Anonim, (2009). Regulation (EC) No 470/2009. European Commision. Erişim 07.08.2021. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32009R0470

Anonim, (2009a). Türk Eczacıları Birliği. Dünya İlaç Sanayi ve Pazarının Genel Durumu ile Türkiye İlaç Sektörünün Durumu. Ankara.

Anonim (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. Erişim 07.08.2021. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32010L0063

Anonim, (2011). Veteriner Tıbbi Ürünler Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete, 24.12.2011-28152. Erişim Tarihi: 07.08.2021.

Anonim, (2011a). Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

Anonim, (2012). İmmünolojik Veteriner Tıbbi Ürünler Dışındaki Veteriner Tıbbi Ürünlerin Başvuru Dosyası Kılavuzu. Erişim 07.08.2021, https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/2058/VTU_basvuru_dosyasi_hazirlama_kilavuz_talimat

Anonim, (2012a). Quality Assurance for Pharmaceuticals. Management Science for Health. Erişim: 07.08.2021. https://www.msh.org/sites/msh.org/files/mds3-ch19-qualityassurance-mar2012.pdf

Anonim, (2015). The Nobel Prize. Erişim: 07.08.2021 https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/summary/

Anonim (2015a). Veterinary medicinal products, Notice to applicants, Presentation and content of the dossier. European Commission.

Anonim, (2017). Dai X., Zhang W., Li H., Huang T., Li M., Quan C., Zhang Q., Davies S. R. , Warren J., Lo M., -CCQM-K104 key comparison (avermectin B(1)a) on the characterization of organic substances for chemical purity. METROLOGIA, cilt.54, 2017

Anonim, (2017a). Merck Newsroom Home. Erişim: 07.08.2021. https://mectizan.org/wp-content/uploads/2018/06/MerckNewsroomHome-MerckCommemorates30YearsofMECTIZAN%C2%AEDonationProgramProgress-2017-11-30.pdf

Anonim (2018). Product Information Report: Amoxicillin. U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland. Erişim: 07.08.2021 https://www.usp-pqm.org/sites/default/files/pqms/article/amoxicillin-pir-jul2018.pdf

Anonim (2018a). Tarım ve Orman Bakanlığı, Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler, Erişim Tarihi; 07.08.2021. https://hbsapp.tarbil.gov.tr/Modules/RECEIPT/Pages/Product/ProductSearch.aspx

Anonim, (2020a). Epimers. Contributed by Gamini Gunawardena. Erişim 07.09.2020. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Organic_Chemistry_Glossary/Epimers#:~:text=Epimers%20are%20diastereomers%20that%20contain,at%20only%20one%20chiral%20center.&text=Thus%2C%201%20and%202%20are,are%20called%20the%20epimeric%20carbons.

Anonim, (2020b). Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı. İlaç Sektörü Raporu (2020).

Arise, R. O., & Malomo, S. O. (2009). Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats. African Journal of Biochemistry Research, 3(5), 190-197.

Awasthi, A., Razzak, M., Al-Kassas, R., Harvey, J., & Garg, S. (2012). An overview on chemical derivatization and stability aspects of selected avermectin derivatives. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 60(8), 931–944. https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00258

Bajpayee, M., Kumar A., Dhawan, A. (2013). Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols. Chapter 17 The Comet Assay: Assessment of *İn vitro* and *İn vivo* DNA Damage, 325-345.

Bakırel, T. (2020). Hayvansal Gıdalarda İlaç Kalıntıları ve Veteriner Tıbbi Ürünlerin Ruhsatlandırılması. Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, 198-225.

Basak, A. K., Raw, A. S., Al Hakim, A. H., Furness, S., Samaan, N. I., Gill, D. S., Patel, H. B., Powers, R. F., & Yu, L. (2007). Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. Advanced Drug Delivery Reviews, 59(1), 64–72. https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.10.010

Batiha, G. E. S., Beshbishy, A. M., Tayebwa, D. S., Adeyemi, O. S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Evaluation of the inhibitory effect of ivermectin on the growth of Babesia and Theileria parasites *in vitro* and *in vivo*. Tropical medicine and health, 47(1), 1-12.

Beasley, C. A., Hwang, T. L., Fliszar, K., Abend, A., McCollum, D. G., & Reed, R. A. (2006). Identification of impurities in ivermectin bulk material by mass spectrometry and NMR. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(4), 1124–1134. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.021

Beedanagari, S. R., Vulimiri, S. V., Bhatia, S. P., & Mahadevan, B. (2014). Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. Içinde Biomarkers in Toxicology. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9

Bharate, S. S., Bharate, S. B., & Bajaj, A. N. (2010). Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: A comprehensive review. Journal of Excipients and Food Chemicals, 1(3), 3–26.

Bionaz, M., Everts, R. E., Lewin, H. A., Drackley, J. K., & Loor, J. J. (2008). Bovine kidney (MDBK) cells and liver tissue of periparturient cows share remarkable similarity in gene expression profiles. 2.

Bouder, F., Löfstedt, R. (2008). Tolerability of risk approach and the management of pharmaceutical risks. Expert review of clinical pharmacology, 1(2), 187-190. https://doi.org/10.1586/17512433.1.2.187

Brooks, W. H., Guida, W. C., & Daniel, K. G. (2011). The Significance of Chirality in Drug Design and Development HHS Public Access. Curr Top Med Chem, 11(7), 760–770.

Butler, K.S., Peeler, D.J., Casey, B.J., Dair, B.J., Elespuru, R.K., 2015. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. Mutagenesis 30, 577–591. https://doi.org/10.1093/mutage/gev020

Cameron, A., Mantel-Teeuwisse, A. K., Leufkens, H. G., & Laing, R. O. (2012). Switching from originator brand medicines to generic equivalents in selected developing countries: how much could be saved?. Value in health, 15(5), 664-673.

Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Liébana, M. J. D., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. The Veterinary Journal, 179(1), 25-37.

Cartus, A., & Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. Food and Chemical Toxicology, 106, 574–582. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.012

Chen, I. S., Kubo, Y. (2018). Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. The Journal of physiology, 596(10), 1833-1845.

Cherewyk, J. E., Parker, S. E., Blakley, B. R., & Al-Dissi, A. N. (2020). Assessment of the vasoactive effects of the (S)-epimers of ergot alkaloids *in vitro*. Journal of Animal Science, 98(7), 1–6. https://doi.org/10.1093/jas/skaa203

Cok, I., Emerce Gürsel, E. (2012). Overview of impurities in pharmaceuticals: Toxicological aspects. Asian Chem. Lett, 16, 87-97.

Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Molecular biotechnology, 26(3), 249-261.

Corvi, R., & Madia, F. (2017). *İn vitro* genotoxicity testing–Can the performance be enhanced? Food and Chemical Toxicology, 106, 600–608. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.024

Devireddy, L. R., & Jones, C. J. (1999). Activation of Caspases and p53 by Bovine Herpesvirus 1 Infection Results in Programmed Cell Death and Efficient Virus Release. Journal of Virology, 73(5), 3778–3788. https://doi.org/10.1128/jvi.73.5.3778-3788.1999

Dhangar, K. R., Jagtap, R. B., Surana, S. J., & Shirkhedkar, A. A. (2017). Impurity profiling of drugs towards safety and efficacy: theory and practice. Journal of the Chilean Chemical Society, 62(2), 3543-3557.

DPT (2007). Devlet Planlama Teşkilatı. Dokuzuncu kalkınma planı (2007-2013): İlaç Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu.

Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., & Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 745(1-2), 104-111.

Dunnett, C. W., & Crisafio, R. (1955). The operating characteristics of some official weight variation tests for tablets. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7(1), 314-327.

EC, (2020). European Commission. Safe and Effective Veterinary Medicinal Products. Erişim: 07.08.2021. https://ec.europa.eu/food/animals/health/veterinary-medicines-and-medicated-feed/veterinary-medicinal-products_en

ECHA (2020). Substance Infocard. Ivermectin. European Chemical Agency. Erişim 07.08.2021 https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.067.738

ECHA (2020a). Substance Infocard. N,N-dimethylaniline. European Chemical Agency. Erişim: 07.08.2021. https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.004.085

EDQM (2000). Validation/Verification of Analytical Procedures PA/PH/OMCL (13) 82 R5. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.

EDQM, (2016). Deletion of the test for heavy metals in individual monographs. the 9th Edition, Pharmeuropa. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.

EDQM, (2019). Response on Nitrosamines Contamination. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 18.02.2020. https://www.edqm.eu/en/edqms-response-nitrosamine-contamination

EFSA, (2011), Scientific Opinion, Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, European Food Safety Authority, EFSA Journal, 2011;9(9):2379. Erişim: 07.08.2021 https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2379

Elder, D. P., Kuentz, M., & Holm, R. (2016). Pharmaceutical excipients - Quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 87, 88–99. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.018

El-makawy, A. I., & Mahrous, K. F. (2008). Antimutagenic Activity of Some Natural supplements on Ivermectin genotoxicity in Lymphocytes of Buffalo. Egyptian Journal of Hospital Medicine, 30, 115–125.

El-Shaheny, R., Radwan, M., Yamada, K., & El-Maghrabey, M. (2019). Estimation of nizatidine gastric nitrosatability and product toxicity via an integrated approach combining HILIC, in silico toxicology, and molecular docking. Journal of Food and Drug Analysis, 27(4), 915–925. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.08.001

EMA (1993). Investigation of Chiral Active Substances. 3CC29A. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/investigation-chiral-active-substances_en.pdf

EMA (1997). Note for Guidance: Investigation of Chiral Active Substances. EMEA/CVMP/128/95-FINAL. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-investigation-chiral-active-substances_en.pdf

EMA (2005). Guideline On Plastic Immediate Packaging Materials. EMEA/CVMP/205/04, European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plastic-immediate-packaging-materials_en.pdf

EMA (2007). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Medicinal Products. EMEA/CVMP/VICH/899/99-Rev.1. European Medicine Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl3-stability-testing-new-veterinary-drug-substances-medicinal-products-step-7-after-revision_en.pdf

EMA (2007a). Recommendation On The Evaluation of The Benefit-Risk Balance Of Veterinary Medicinal Products. EMEA/CVMP/248499/2007 European Medicine Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/recommendation-evaluation-benefit-risk-balance-veterinary-medicinal-products_en.pdf

EMA (2007b). Opinion. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/chmp-scientific-article-53-opinion-potential-risks-carcinogens-mutagens-substances-toxic_en.pdf

EMA (2008). Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products. EMEA/CVMP/QWP/846/99-Rev.1. European Medicine Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en.pdf

EMA (2009). Recommendation on the Assessment of the quality of medicinal products containing existing/ known active substances Doc. Ref. EMA/CHMP/CVMP/QWP/450653/2006 European Medicine Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/recommendation-assessment-quality-medicinal-products-containing-existing/known-active-substances_en.pdf

EMA (2012). Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics. EMA/CHMP/CVMP/QWP/199250/2009 corr. European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/adopted-guideline-setting-specifications-related-impurities-antibiotics_en.pdf

EMA (2012a). CVMP assessment report under Article 30(3) of Regulation (EC) No 726/2004 for dapsone as an impurity in veterinary medicinal products containing sulphamethoxazole or other sulphonamides. European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/cvmp-assessment-report-under-article-303-regulation-ec-no-726/2004-dapsone-impurity-veterinary-medicinal-products-containing-sulphamethoxazole-other-sulphonamides_en.pdf

EMA (2014). Guideline on stability testing for applications for variations to a marketing authorisation. EMA/CHMP/CVMP/QWP/441071/2011- Rev.2 European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/overview-comments-received-guideline-stability-testing-applications-variations-marketing_en.pdf

EMA (2015). CVMP assessment report regarding the request for an opinion under Article 30(3) of Regulation (EC) No 726/2004 In relation to the potential risk for the consumer resulting from the use of lidocaine in food producing species. European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/cvmp-

assessment-report-regarding-request-opinion-under-article-303-regulation-ec-no-726/2004-relation-potential-risk-consumer-resulting-use-lidocaine-food-producing-spec_en.pdf

EMA (2017). Reflection paper on the chemical structure and properties criteria to be considered for the evaluation of New Active Substance (NAS) status of chemical substances for veterinary medical products. EMA/CVMP/QWP/3629/2016. European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-chemical-structure-properties-criteria-be-considered-evaluation-new-active_en.pdf

EMA (2018). Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/SWP/377245/2016. European Medical Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-veterinary-medicinal-products_en.pdf

EMA (2018a). EMA/805330/2018, CVMP assessment report regarding the request for an opinion under Article 30(3) of Regulation (EC) No. 726/2004 For veterinary medicinal products containing gentamicin for parenteral administration to horses. European Medicines Agency. Erişim: 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/cvmp-assessment-report-regarding-request-opinion-under-article-303-regulation-ec-no-726/2004_en.pdf

EMA (2018b). Press Release. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/documents/press-release/ema-reviewing-medicines-containing-valsartan-zhejiang-huahai-following-detection-impurity_en.pdf

EMA (2019). Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container EMA/CHMP/CVMP/QWP/850374/2015 European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021 https://www.ema.europa.eu/en/documents/comments/overview-comments-received-draft-guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance_en.pdf

EMA (2019a). Nitrosamine Impurities. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021. https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities

EMA (2020). Implementation of risk assessment requirements to control elemental impurities in veterinary medicinal products. EMA/CVMP/ QWP/631010/2017-Rev.2. European Medicines Agency. Erişim 07.08.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/implementation-risk-assessment-requirements-control-elemental-impurities-veterinary-medicinal_en.pdf

Emerce Gürsel E. (2013). Astım Tedavisinde Kullanılan Montelukastın Safsızlıklarının Tayini ve Olası Genotoksik Etkilerinin İn Vitro Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı.

Engin, B., Gümüştaş, M., Oktar, M., Kurbanoğlu S., Özkan, S.A. (2017) Analitik Yöntem Geçerliliği. Türk Farmakope Dergisi 2 (1):74-92.

Erdur, N. (2021). Koyunlarda Bazı İvermektin Preparatlarının Biyoyararlanımlarının Karşılaştırmalı İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Erkekoğlu, Ü., Şahin, G., Baydar, T. (2014). Toksikoloji Açıdan İlaç Safsızlıkları. Türkiye Klinikleri J Pharm Sci, cilt.3, ss.65-73

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2019). Online, 10th Edition. Arama Kelimesi: N,N-dimethylaniline. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim: 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2019a). Online, 10th Edition. Arama Kelimesi: 2,6-xylidine. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim: 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020). 2.2.3. POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF pH. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020a). 2.2.46. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION TECHNIQUES. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020b). 2.5.12. WATER: SEMI-MICRO DETERMINATION. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020c). 2.8.18. DETERMINATION OF AFLATOXIN B1 IN HERBAL DRUGS. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020d). 2.8.21. TEST FOR ARISTOLOCHIC ACIDS IN HERBAL DRUGS. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020e). *2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids.* European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020f). CICLESONIDE. 01/2017:2703. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020g). CILASTATIN SODIUM. 01/2017:1408. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020h). CISATRACURIUM BESILATE. 04/2016:2763. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020ı). DIRITHROMYCIN. 01/2017:1313. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020i). FULVESTRANT. 01/2017:2443. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020j). FUSIDIC ACID. 01/2012:0798. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020k). Ivermectin. 01/2017:1336. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020l). LINCOMYCIN HYDROCHLORIDE. 01/2017:0583. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020m). MISOPROSTOL 04/2010:1731. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020n). OXYTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE. 01/2020:0198. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020o). PACLITAXEL. 01/2017:1794. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020p). PERINDOPRIL tert-BUTYLAMINE. 04/2020:2019. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020r). PREDNISOLONE. 04/2021:0353. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020s). TESTOSTERONE. 04/2020:1373. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020t). TRIAMCINOLONE HEXACETONIDE. 01/2017:0867. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.1 (2020u). VANCOMYCIN HYDROCHLORIDE. 04/2021:1058. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Erişim 07.08.2021. https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/

Fathima, N., Mamatha, T., Qureshi, H. K., Anitha, N., & Venkateswara Rao, J. (2011). Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(6), 66–71.

FDA (1992). Development of New Stereoisomeric Drugs. U.S.Food and Drug Administration.

FDA (2011). Current FDA Perspective on Leachable Impurities in Parenteral and Ophthalmic Drug products. U.S.Food and Drug Administration, Erişim Tarihi; 04.03.2020. https://www.dalton.com/Content/files/FDA-Extractable-Leachable.pdf

FDA (2018). Press Announcements. U.S.Food and Drug Administration, Erişim 07.08.2021. https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm613532.htm

FDA (2020). Inactive Ingredient Database. U.S.Food and Drug Administration. Erişim 07.08.2021. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm

FDA (2020a). Information about Nitrosamine Impurities. U.S.Food and Drug Administration. Erişim 07.08.2021. https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications.

FDA (2020b). Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. U.S.Food and Drug Administration. Erişim 07.08.2021. https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts

Fink, D. W. (1988). Ivermectin. In Analytical profiles of drug substances (Vol. 17, pp. 155-184). Academic Press.

Fiorito, F., Ciarcia, R., Granato, G. E., Marfe, G., Iovane, V., Florio, S., De Martino, L., & Pagnini, U. (2011). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced autophagy in a bovine kidney cell line. Toxicology, 290(2–3), 258–270. https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.004

Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S., & Carmichael, P. (2012). Reduction of misleading (“ false”) positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 742(1–2), 11–25. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.014

Föllmann, W., Degen, G., Oesch, F., & Hengstler, J. G. (2013). AMES Test. Içinde Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition (C. 1). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00048-6

Fujimura, S., Sato, T., & Watanabe, A. (2017). In silico Evaluation of Impurities Found in Some Generic Drugs of Piperacillin/Tazobactam. J Antimicrob Agents, 3(138), 2472-1212.

Gianelli, L., Mellerio, G. G., Siviero, E., Rossi, A., Cabri, W., & Sogli, L. (2000). Mass spectrometry of Avermectins: structural determination of two new derivatives of Ivermectin B1a. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 14(14), 1260-1265.

Gosar, A., Sayyed, H., & Shaikh, T. (2018). Genotoxic Impurities and Its Risk Assessment in Drug Compounds. Drug Designing & Intellectual Properties International Journal, 2(4), 227-232.

Görög, S. (Ed.). (2000). Identification and determination of impurities in drugs. Elsevier.

Görög, S. (2006). The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. Trends Anal. Chem. 25, 755–757 (2006) 13.. https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.011

Görög, S. (2007). The changing face of pharmaceutical analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26(1), 12-17.

Görög, S. (2012). The paradigm shifting role of chromatographic methods in pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 69, 2–8. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.031

Görög, S. (2015). Identification in drug quality control and drug research. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 69, 114–122. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.020

GraphPad Prism version 9.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

Guncum, E., Bakirel, T., Anlas, C., Isiklan, N., Alkan, F. U., Charehsaz, M., & Aydin, A. (2021). The screening of the safety profile of polymeric based amoxicillin nanoparticles in various test systems. Toxicology Letters, 348, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.05.001

Holm, R., Elder, D. P. (2016). Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 87, 118–135. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.007

ICH (1990). History. International Conference on Harmonisation. Erişim 11.11.2019. https://www.ich.org/about/history.html

Jacobson-Kram, D., McGovern, T. (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. Advanced Drug Delivery Reviews, 59(1), 38–42. https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.10.007

Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., & Luckas, B. (2001). Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography.

Journal of Chromatography A, 929(1–2), 43–49. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01181-5

Jamrógiewicz, M., & Pieńkowska, K. (2019). Recent breakthroughs in the stability testing of pharmaceutical compounds. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 111, 118–127. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.007

Johnston, A., Holt, D. W. (2014). Substandard drugs: a potential crisis for public health. British journal of clinical pharmacology, 78(2), 218-243. https://doi.org/10.1111/bcp.12298

Karras, S., Petroczi, A., Anagnostis, P., & Naughton, D. P. (2015). Vitamin D epimer: a significant bioregulator or an inactive compound? Osteoporosis International, 26(9), 2345–2346. https://doi.org/10.1007/s00198-015-3198-7

Kilcoyne, J., McCarron, P., Twiner, M. J., Nulty, C., Crain, S., Quilliam, M. A., Rise, F., Wilkins, A. L., & Miles, C. O. (2014). Epimers of azaspiracids: Isolation, structural elucidation, relative LC-MS response, and *in vitro* toxicity of 37-epi-azaspiracid-1. Chemical Research in Toxicology, 27(4), 587–600. https://doi.org/10.1021/tx400434b

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., & Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters, 140–141, 63–74. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00498-8

Laing, R., Gillan, V., & Devaney, E. (2017). Ivermectin–old drug, new tricks?. Trends in parasitology, 33(6), 463-472.

Lankas, R., Gordon, L.R. (1989). Ivermectin and abamectin. Toxicology. Editor: Campbell, William C. (Ed.) Springer p(89-112).

Larsen, J., Cornett, C., Jaroszewski, J. W., & Hansen, S. H. (2009). Reaction between drug substances and pharmaceutical excipients: Formation of citric acid esters and amides of carvedilol in the solid state. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 49(1), 11-17.

Lepercq, P., Gérard, P., Béguet, F., Raibaud, P., Grill, J. P., Relano, P., Cayuela, C., & Juste, C. (2004). Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by Clostridium baratii isolated from human feces. FEMS Microbiology Letters, 235(1), 65–72. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.011

Li, Y., Chen, D.H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R.A., Zhang, Y., Biris, A.S., Heflich, R.H., Chen, T., 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 745, 4–10. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010

Lieberman, H., Vemuri, N.M. (2015) Book Chapter, Chemical and Physicochemical Approaches to Solve Formulation Problems. The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition, 2015, pp. 767–791

Lifschitz, A., Pis, A., Alvarez, L., Virkel, G., Sanchez, S., Sallovitz, J., ve ark. (1999) Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 22, 27-34.

Lifschitz, A., Virkel, A., Pis, A., Imperiale, F., Sanchez, S., Alvarez, L. ve ark. (1999a). Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil based formulation to cattle. Veterinary Parasitology, 86, 203-215.

Lifschitz, A., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lorda, J. J., & Lanusse, C. (2004). Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. Veterinary Parasitology, 119(2-3), 247-257.

Liu K.T., Chen, C.H. (2019). Determination of Impurities in Pharmaceuticals: Why and How?. In Quality Management and Quality Control-New Trends and Developments. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.83849

Lo, P.K.A., Fink, D.W., Williams, J.B. ve Blodinger, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin: Effects of formulation. Veterinary Research Communications, 9, 251-268.

Lorge, E., Moore, M. M., Clements, J., O'Donovan, M., Fellows, M. D., Honma, M., Kohara, A., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M.

J., & Tanir, J. Y. (2016). Standardized cell sources and recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 809, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.08.001

Maggio, R. M., Calvo, N. L., Vignaduzzo, S. E., & Kaufman, T. S. (2014). Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 101, 102–122. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.016

Mahto, S. K., Chandra, P., & Rhee, S. W. (2010). *İn vitro* models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2(2), 87–93. https://doi.org/10.1007/BF03216487

Manjappa, A. S., Goel, P. N., Vekataraju, M. P., Rajesh, K. S., Makwana, K., Ukawala, M., Nikam, Y., Gude, R. P., & Murthy, R. S. R. (2013). Is an Alternative Drug Delivery System Needed for Docetaxel? the Role of Controlling Epimerization in Formulations and beyond. Pharmaceutical Research, 30(10), 2675–2693. https://doi.org/10.1007/s11095-013-1093-5

Maron, D. M., & AMES, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 113(3-4), 173-215.

McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & AMES, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 72(12), 5135-5139.

Mike F, Pehlivan SB, Öner L, (2013). Farmasötik Ürünlerde Tasarımla Kalite Yaklaşımı. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, (2), 203-230.

Miller, T. W., Chaiet, L., Cole, D. J., Cole, L. J., Flor, J. E., Goegelman, R. T., ... & Putter, I. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. Antimicrobial agents and chemotherapy, 15(3), 368-371.

Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M. A., & Larramendy, M. L. (2009). *İn vitro* genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. Journal of Hazardous Materials, 165(1–3), 1074–1082. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.083

Molinari, Gabriela, Kujawski, M., Scuto, A., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2013). DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated chinese hamster ovary cells. Journal of Applied Toxicology, 33(11), 1260–1267. https://doi.org/10.1002/jat.2782

Montes-Vergara, D., De la Ossa V, J., & Pérez-Cordero, A. (2017). Comet assay to determine genetic damage by the use of ivermectin in zebu cows (Bos taurus indicus). Revista MVZ Córdoba, 22(2), 5959-5965.

Morita, T., Uno, Y., Honma, M., Kojima, H., Hayashi, M., Tice, R. R., & Schechtman, L. (2015). The JaCVAM international validation study on the *in vivo* comet assay: selection of test chemicals. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 786, 14-44.

Müller, L., Mauthe, R. J., Riley, C. M., Andino, M. M., Antonis, D. De, Beels, C., DeGeorge, J., De Knaep, A. G. M., Ellison, D., Fagerland, J. A., Frank, R., Fritschel, B., Galloway, S., Harpur, E., Humfrey, C. D. N., Jacks, A. S., Jagota, N., Mackinnon, J., Mohan, G., Yotti, L. (2006). A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 44(3), 198–211. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.12.001

Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. International journal of biomedical science: IJBS, 2(2), 85.

Nohmi, T. (2019). My career development with AMES test: A personal recollection. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 847(September), 503095. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.503095

OECD (2014), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264224292-en.

OECD (2015). Genetic Toxicology Guidance Document. Tg 488, 1–58. https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf

OECD (2016), Test No. 473: *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264649-en.

OECD (2016a), Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264786-en.

OECD (2016b), Test No. 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264861-en.

OECD (2016c) 489 *In vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Organisation for Economic Co-operation and Development

OECD (2018). Guidance Document on Good *In vitro* Method Practices (GIVIMP). OECD Guidline for the Testing of Chemicals, 1(286), 1–264. Organisation for Economic Co-operation and Development

OECD (2020). Introduction to (Quantitative) Structure Activity Relationships. Organisation for EconomicCo-operation and Development. Erişim 07.08.2021 https://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/introductiontoquantitativestructureactivityrelationships.htm

OECD (2020a). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 471, 24. Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD (2020b), Test No. 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264203907-en.

Otubanjo, O. A., Mosuro, A. A., & Ladipo, T. F. (2007). An *in vivo* evaluation of induction of abnormal sperm morphology by ivermectin MSD (Mectizan). Pakistan journal of biological sciences: PJBS, 10(1), 90-95.

Padivitage, N., Adhikari, S., & Rustum, A. M. (2021). Assay of Ivermectin Including Determination and Identification of Its Related Substances in Ivermectin Injectable Product by a Stability-Indicating RP-HPLC Method. Chromatographia, 1-9. https://doi.org/10.1007/s10337-021-04088-x

Pan, C., Liu, F., Ji, Q., Wang, W., Drinkwater, D., & Vivilecchia, R. (2006). The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40(3), 581–590. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.08.020

Peternel, L., Kotnik, M., Preželj, A., & Urleb, U. (2009). Comparison of 3 cytotoxicity screening assays and their application to the selection of novel antibacterial hits. Journal of biomolecular screening, 14(2), 142-150.

Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. Journal of bioluminescence and chemiluminescence, 10(1), 29-34.

Pilaniya, K., Chandrawanshi, H. K., Pilaniya, U., Manchandani, P., Jain, P., & Singh, N. (2010). Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research, 1(3), 302–310. https://doi.org/10.4103/0110-5558.72422

Pindelska, E., Sokal, A., & Kolodziejski, W. (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. Advanced Drug Delivery Reviews, 117, 111–146. https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014

Pivnichny, J. V., Arison, B. H., Preiser, F. A., Shim, J. S. K., & Mrozik, H. (1988). Base-Catalyzed isomerization of avermectins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36(4), 826–828. https://doi.org/10.1021/jf00082a039

Plošnik, A., Vračko, M., & Dolenc, M. S. (2016). Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, 67(3), 169–182. https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2801

Promega (2020). CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Erişim 07.08.2021. https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570

Qiu, F., & Norwood, D. L. (2007). Identification of pharmaceutical impurities. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 30(5–7), 877–935. https://doi.org/10.1080/10826070701191151

Rägo, L., & Santoso, B. (2008). Drug regulation: History, present and future. Drug Benefits and Risks: International Textbook of Clinical Pharmacology, 65–77.

Raza, S., Shahin, F., Zhai, W., Li, H., Alvisi, G., Yang, K., ... & Guo, A. (2020). Ivermectin inhibits bovine herpesvirus 1 DNA polymerase nuclear import and interferes with viral replication. Microorganisms, 8(3), 409.

Roy, J., Islam, M., Khan, A. H., Das, S. C., Akhteruzzaman, M., Deb, A. K., & Alam, A. M. (2001). Diclofenac sodium injection sterilized by autoclave and the occurrence of cyclic reaction producing a small amount of impurity. Journal of pharmaceutical sciences, 90(5), 541-544.

Riviere, J. E., Papich, M. G. (Eds.). (2017). Veterinary pharmacology and therapeutics 10th edition. John Wiley & Sons. (88-89).

Sewell, A. C., Heil, M., Podebrad, F., & Mosandl, A. (1998). Chiral compounds in metabolism: A look in the molecular mirror. European Journal of Pediatrics, 157(3), 185–191. https://doi.org/10.1007/s004310050793

Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. Arabian Journal of chemistry, 10, S1409-S1421.

Singh, N. P. (2016). The comet assay: reflections on its development, evolution and applications. Mutation research/Reviews in mutation research, 767, 23-30.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research, 175(1), 184-191

Slater, K. (2001). Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. Current Opinion in Biotechnology, 12(1), 70-74.

Smith, S. W. (2009). Chiral toxicology: It's the same thing only different. Toxicological Sciences, 110(1), 4–30. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp097

Song, L., Pan, M., Zhao, R., Deng, J., & Wu, Y. (2020). Recent advances, challenges and perspectives in enantioselective release. Journal of Controlled Release, 324(May), 156–171. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.019

Stefela, A., Kaspar, M., Drastik, M., Holas, O., Hroch, M., Smutny, T., Skoda, J., Hutníková, M., Pandey, A. V., Micuda, S., Kudova, E., & Pavek, P. (2020). 3β-Isoobeticholic acid efficiently activates the farnesoid X receptor (FXR) due to its epimerization to 3α-epimer by hepatic metabolism. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 202(May), 105702. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105702

Sweify, K. M., Abd, I., Darwish, E. M., Demerdash, D., El, A., & Hafez, M. (2015). The cytogenetic potential of ivermectin on bone marrow cells of mice *in vivo*. IOSR Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology Ver. III, 9(2), 2319–2399. https://doi.org/10.9790/2402-09231729

Sweify, K. M., Darwish, I. A. E. M., & Hafez, D. D. A. E. M. (2018). The effect of ivermectin on secondary spermatocytes and serum total proteins. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 31(6).

Sweify, K. M., El Moneim Darwish, I. A., & El Monem Hafez, D. D. A. (2019). The mutagenic effects of ivermectin in germinal cells and serum protein of the mouse. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 32(2).

Şekeroğlu, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi, 4(3), 221-229.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and molecular mutagenesis, 35(3), 206-221.

TİTCK, (2018). Geri Çekme Duyurusu. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Erişim 07.08.2021. https://www.titck.gov.tr/duyuru?aramaTipi=geriCekme

UN, (2019). List of diagnostic and analytical laboratory specializations. United Nations, Erişim 07.08.2021. https://www.un.org/disarmament/wmd/secretary-general-mechanism/appendices/appendix-v/

USP (2011). Ivermectin Injection. United States Pharmacopoeia Monograph.

Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms, Birth Defects Res C Embryo Today, Jun; 105(2): 140–156. DOI: 10.1002/bdrc.21096

VICH (1993). International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Erişim 07.08.2021. https://vichsec.org/en/about/what-is-vich.html

VICH (1998). Guideline onValidation of analytical procedures: definition and terminology CVMP/VICH/590/98-FINAL International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (1998a). Guideline on Validation of analytical procedures: validation CVMP/VICH/591/98-FINAL International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2005). GL39 (Quality). Test procedures and acceptance criteria for new veterinary drug substances and new medicinal products: chemical substances. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. EMEA/CVMP/VICH/810/04

VICH (2007). VICH GL10 (Quality), Impurities In New Veterinary Drug Substances. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. CVMP/VICH/837/99 Rev.1

VICH (2007a). VICH GL11 (Quality), Impurities In New Veterinary Medicinal Products. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. CVMP/VICH/838/99 Rev.1

VICH (2007b). VICH GL3 (Quality), Guideline On Stability: Stability Testing of New Veterinary Drug Substances And Medicinal Products. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. Doc. Ref.EMEA/CVMP/VICH/899/99-Rev.1.

VICH (2009), VICH GL33 (Safety), Studies To Evaluate The Safety Of Residues Of Veterinary Drugs In Human Food: General Approach To Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products.

VICH (2011). VICH GL18 (Quality), Impurities: Residual Solvents In New Veterinary Medicinal Products, Active Substances And Excipients. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. CVMP/VICH/502/99-Rev.1

VICH (2014). VICH GL23 (Safety), Studies To Evaluate The Safety Of Residues Of Veterinary Drugs In Human Food: Genotoxicity Testing. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products

Wang, L., Zheng, J., Gong, X., Hartman, R., & Antonucci, V. (2015). Efficient HPLC method development using structure-based database search, physico-chemical prediction and chromatographic simulation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 104, 49–54. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.032

Waterman, K. C., Adami, R. C., Alsante, K. M., Antipas, A. S., Arenson, D. R., Carrier, R., Hong, J., Landis, M. S., Lombardo, F., Shah, J. C., Shalaev, E., Smith, S. W., & Wang, H. (2002). Hydrolysis in pharmaceutical formulations. Pharmaceutical

Development and Technology, 7(2), 113–146. https://doi.org/10.1081/PDT-120003494

WHO (2018). Ivermectin 4 (Ivermectinum) Draft Monograph For Inclusion In The International Pharmacopoeia. Erişim: 07.08.2021. https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/2018-05-30IvermectinQAS16-691.pdf?ua=1 The World Health Organisation.

WHO, (2019). Information Note. Update On Nitrosamine Impurities. The World Health Organisation.

WHO (2020). Essential medicines selection. 21st Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines.. Erişim 07.08.2021 https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/21/applications/s6_ivermectin.pdf The World Health Organization

WHO (2021). Glossary. Erişim 07.08.2021 https://www.who.int/medicines/areas/coordination/English_Glossary.pdf The World Health Organization.

Wimalasinghe, R. M., Zhao, D., Wang, L., & Rustum, A. (2021). Development and Validation of a Stability-Indicating Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Method for Identification, Assay, and Estimation of Related Substances of Ivermectin Drug Substance. Journal of AOAC International. https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab088

Wu, Y., Levons, J., Narang, A. S., Raghavan, K., & Rao, V. M. (2011). Reactive impurities in excipients: Profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. AAPS PharmSciTech, 12(4), 1248–1263. https://doi.org/10.1208/s12249-011-9677-z

Ziegelbauer HE, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ., (2009). “Applications of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity”, Toxicol Lett. 2009, 186, 36-44.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TÜRKİYE'DE RUHSATLI İVERMEKTİN ÇÖZELTİLERİNİN SAFSIZLIK TAYİNİ VE OLASI GENOTOKSİK-SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN IN VITRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	%4
2	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Atatürk University Öğrenci Ödevi	<%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
5	www.gmpru.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	kms.kaysis.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
	www.sanayi.gov.tr	