



TRİİYODOANİLİN'İN SENTEZLENMESİ, NANOSÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI, *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU VE RADYOKONTRAST ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

*SYNTHESIS OF TRIODOANILINE, PREPARATION OF NANOSUSPENSIONS, IN VITRO
CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF RADIOCONTRAST PROPERTIES*

Mehmet KOCA¹ , Emrah ÖZAKAR² , Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR^{2,*} 

¹ Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 25240, Erzurum,
Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Suda çözünürlüğü bulunmayan iyot bazlı triiyodoanilin (TIA) radyokontrast bileşiğinin sentezini ve nanosüspansiyonunu yapmak, karakterizasyonlarını gerçekleştirmek ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) görüntüleme sıklıkla kullanılan iopromid ve ioheksol ile kıyaslamak.

Gereç ve Yöntem: TIA sentezi ultrasonik ses dalgaları kullanılarak ve nanokristaller ise sentezlenen bu maddeden hareketle nanopresipitasyon yöntemi ile elde edilmiştir. TIA'nın karakterizasyonu için NMR ve Q-TOF analizleri yapılmıştır. Nanokristallerin karakterizasyonu için ise optik mikroskop, zeta potansiyel, partikül boyutu ve dağılımı, SEM ve FT-IR analizleri yapılmıştır. Elde edilen nanosüspansiyon, BT tekniği ile iopromid ve ioheksol ile radyokontrast özellikleri açısından kıyaslanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Sentezlenen saf TIA'dan hareketle hazırlanan nanokristallerin boyutları ~699 nm, zeta potansiyelleri ise ~(-)16 mV olarak bulunmuştur. SEM ve optik mikroskop görüntüleri ile morfolojileri belirlenmiştir. Elde edilen nanokristallerin, sentezlenen TIA'dan farklı bir yapı sergilemediği FT-IR ile tespit edilmiştir. BT görüntülerinde TIA nanosüspansiyonunun, aynı miktardaki iopromid ve ioheksolden yaklaşık %40 daha fazla kontrast özellik sergilediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak nanokristallerin kendi sahip oldukları eşsiz özellikleri ile daha az radyokontrast madde kullanılarak benzer nitelikte görüntüleme yapılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede daha düşük dozda kullanım sunması sebebiyle daha az yan etki ve/veya toksik etki oluşturması muhtemeldir. Elde edilen bu başarılı sonuçlar ışığında, klinik deneyler ile bu çalışmanın gelecekte detaylandırılması planlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Rukiye Sevinç Özakar
e-posta / e-mail: rukiyeso@atauni.edu.tr

Anahtar Kelimeler: BT görüntüleme, nanokristal, nanosüspansiyon, radyokontrast ajan, triiodoanilin

ABSTRACT

Objective: *Synthesis and nanosuspension preparation of iodine-based triiodoaniline (TIA) radiocontrast compound, which is not soluble in water, perform their characterization and compare with iopromide and iohexol, which are frequently used in Computed Tomography (CT) imaging.*

Material and Method: *TIA synthesis was obtained using ultrasonic sound waves, and nanocrystals were obtained by nanoprecipitation method from this synthesized substance. NMR and Q-TOF analyzes were performed for the characterization of TIA. For the characterization of nanocrystals, optical microscope, zeta potential, particle size, and distribution, SEM and FT-IR analyzes were performed. The obtained nanosuspension was compared by the CT technique with iopromide and iohexol in terms of radiocontrast properties.*

Result and Discussion: *The size of the prepared nanoparticles based on the synthesized pure TIA was found to be ~699 nm and zeta potentials as ~ (-)16 mW. Morphologies were determined by SEM and optical microscope images. It was determined by FT-IR that the obtained nanocrystals do not exhibit a different structure than the synthesized TIA. On CT images, TIA nanosuspension was found to exhibit ~ 40% more contrast than the same amount of iopromide and iohexol. As a result, it has been shown that nanocrystals can perform similar imaging by using less radiocontrast materials with their unique properties. In this way, it is likely to cause fewer side effects and/or toxic effects due to the lower dosage. In the light of these successful results, it is planned to detail this study with clinical trials in the future.*

Keywords: *CT imaging, nanocrystal, nanosuspension, radiocontrast agent, triiodoaniline*

GİRİŞ

Kontrast ajanlar, anatomi veya fizyopatolojideki farklılıklar temelinde, tanısal görüntülemelerde vücut dokuları arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Bunu da yapıyı bitişik dokulardan daha görünür hale getirerek gerçekleştirirler. İyot bazlı kontrast ajanlar, bir hedef organ veya kan damarında x-ışını radyasyonunun daha fazla emilmesini ve saçılmasını sağlarlar [1].

İyot, molekül ağırlığının yüksek olmasından ötürü oldukça iyi bir kontrast ajan olup diagnostik amaçla kullanılan X-ışınlarını belirgin ölçüde absorbe etme yeteneğine sahiptir. İnorganik iyotlu bileşikler fazlasıyla iyonlaşma eğiliminde olduklarından organ görüntülemelerde kullanılamazlar. Ancak organik yapıdaki iyotlu bileşikler klinikte, özellikle de BT görüntüleme başta olmak üzere çeşitli tetkiklerde (koroner anjiyografi, beyin anjiyografi, periferik anjiyografi, intravenöz pyelografi ve voiding sistoürografi gibi) kontrast artırıcı kimyasallar olarak kullanılmaktadırlar [1, 2].

On yıllardır görüntülemelerde kullanılan ajanlar ile kontrast ajan odaklı tedaviler devam etmekle birlikte mevcut toksisite ve organ fonksiyon bozukluklarına sebep olmaları durumu üzerinde yeni tasarımlar pek fazla ön plana çıkmamıştır. Özellikle toksisite riskini ya da yan etki riskini azaltmaya yönelik yeni moleküllerin sentezi ve/veya bunların modifikasyonu üzerinde çalışmalar literatürde bir eksik olarak karşımıza çıkmaktadır [3]. Bu bağlamda, gelişen nanoteknoloji ile mevcut kontrast ajanlara alternatif olabilecek daha az miktar kimyasal ajan kullanılarak görüntülemenin gerçekleştirilebilmesi ve bu sayede daha az yan/toksik etki gözlenmesi muhtemeldir.

Nanosüspansiyonlar, suda ve yağda çözünme problemi yaşayan saf etkin madde partiküllerinin uygun bir polimer ve/veya yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş, taşıyıcı bir sistem veya uygulama

aracı olmadan hazırlanan kristal yapıda, nano boyutlu, sıvı, mikron altı kolloidal dispersiyonlar olarak tanımlanır. Bu nanokristal yapılar, bir polimerik matriks (polimerik nanopartikül) veya bir lipidik matriksten (lipozom, nanoemülsiyon, lipid nanopartikül) oluşan matriks nanopartiküller ile karşılaştırıldığında, tamamen farklı bir farmasötik teknoloji ve üretim tekniğidir [4, 5]. Yüksek miktarda ilaç içermesi (% 100'e yakın) sayesinde, hücrelere giren ilacın yüksek oranda verimli bir şekilde taşınmasına, yeterince yüksek terapötik konsantrasyonların elde edilmesine ve farmakolojik etkilerin maksimum düzeye çıkarılmasına yardımcı olabilir. Günümüzde, ilaç taşınması için nanosüspansiyon teknolojisinin uygulanabilirliğini ve verimliliğini kanıtlayan çok sayıda araştırma mevcuttur [4, 6, 7]. Suda çözünmeyen çeşitli ilaçlarla ilgili bu çalışmalar, parenteral ve parenteral olmayan yollar da dâhil olmak üzere pek çok dozaj formunda ve uygulamasında etkinliklerini değerlendirmektedir. Örneğin çeşitli çalışmalarda genel ticari formülasyonlarla karşılaştırıldığında, nanosüspansiyonların suda çözünmeyen ilaçlar için artırılmış antitümör etkinliği ve azaltılmış toksisitesi ile kanser tedavisi için mükemmel bir ilaç taşıyıcı sistem olabileceği bildirilmiştir [7].

Serbest ilaç moleküllerine nazaran nanopartikül haldeki ilaçların Cmax, AUC ve böbrek farmakokinetiğini etkileyebilecek parametreleri, böbrek için etkili ilaçların geliştirilmesi için göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Nanopartiküllerden ilaç salımından sonra Cmax nadiren serbest ilacın intravenöz enjeksiyonu ile elde edilen seviyelere ulaşır. Bu kinetik, ilaca bağlı toksisiteyi azaltabileceğinden tedavi için büyük bir avantajdır. Yani nanopartiküllerin Cmax ile ilişkili toksisiteyi azaltabileceği anlamına gelmektedir [8]. Kaldı ki yığın materyalden hareketle nanometre boyutuna inildiği zaman partiküller inanılmaz farklı optiksel, elektriksel ve fizikokimyasal özellikler sergilemeye başlamaktadır [9].

Nanopartiküllerin kullanımı, geleneksel uygulama yöntemleriyle kullanıldığında (oral, i.v. gibi) toksisite oluşturan ilaçların yan etkilerinin azaltılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca nanopartiküller, molekülleri vücutta bozulmaya karşı koruyabilir. İşlevsel bir nanopartikül tasarlanarak görüntüleme fonksiyonu oluşturulabilmektedir [10]. Moleküler görüntüleme de nano boyutlu kontrast ajanları geliştirmek için yararlı bir platformdur. Çoğu, dokuya nüfuz edecek kadar küçük olmakla birlikte standart radyolojik yöntemlerle tespit edilmek üzere tasarlanabilmektedirler [11]. Moleküler görüntüleme her zaman hedef bölgede kontrast madde birikimini gerektirir, bu genellikle kontrast madde içeren nanopartiküllerin hedeflendirilebilme özellikleriyle en verimli şekilde elde edilir. Düşük duyarlılığa sahip görüntüleme modaliteleri için, çoklu kontrast grupları taşıyan nanopartiküller sinyal amplifikasyonu sağlar. Ayrıca nanopartiküller hem kontrast ajanı hem de ilacı taşıyabilir ve böylece biyolojik dağılımın ve terapötik aktivitenin izlenmesine izin verir [12]. Bu nedenlerle nanotaşıyıcıların moleküler görüntülemede kullanımları artmaya başlamıştır.

İyodoanilin türevlerinin suda çözünürlüğü bulunmamakla birlikte [13, 14] özellikle TIA, yapısında barındırdığı iyot miktarı ile (~%81) görüntülemede kullanılma potansiyeli oldukça yüksek bir

radyokontrast özellik taşımaktadır [15]. Hali hazırda BT görüntülemeye kullanılan mevcut iyot bazlı radyokontrast ajanlar ile kıyaslandığında (ioheksol, iopromid gibi) molekül ağırlığına (MA) kıyasla yapısında barındırdığı bu yüksek miktar iyot sayesinde (Tablo 1), görüntüleme için toplamda daha az kimyasal ajan kullanılarak aynı görüntüleme sonuçları alınabileceği fikri ile bu çalışmanın temeli oluşturulmuştur.

Tablo 1. BT görüntülemeye kullanılan kontrast madde molekül ağırlıkları ve içeriklerindeki iyot miktarları (g/mol)

Kontrast Madde	MA	İyot
İopromid	791.10	380.712
İoheksol	821.14	380.712
TIA	470.82	380.712

Çalışmamızda sentezlediğimiz suda çözünürlüğü olmayan TIA'dan hareketle nanosüspansiyon formülasyonu oluşturulmuştur. Dolayısıyla hazırlanan bu yeni nanosüspansiyon ile vücuda daha az kimyasal girişi ile görüntülemenin yapılabilmesi, hipoksi ve vazokonstrüksiyon gibi yan etkilerin azalması ve/veya böbrekte daha az zarar oluşturması düşünülmektedir. Aynı zamanda literatür araştırmamızda iyot içeren ve taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın yapılmış bir nanosüspansiyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu yönüyle de çalışmamız literatüre bir yenilik katmaktadır. Sentezlenen ve suda çözünürlüğü olmadığı halde iyot içeren, bir kontrast ajan olma potansiyeli taşıyan TIA'nın basit, hızlı, tekrar edilebilir, enerji gereksinimi az ve maliyeti düşük bir yöntem [16] olan nanopresipitasyon yöntemiyle nanosüspansiyon formülasyonu geliştirilmiş ve in vitro karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen nanosüspansiyon, BT görüntüleme yönteminde hali hazırda kullanılan ioheksol ve iopromid ile kontrast özellik bakımından kıyaslanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

TIA sentezi için gerekli olan anilin, iyot ve hidrojen peroksit Sigma®'dan temin edilmiştir. Nanosüspansiyonun hazırlanmasında kullanılan Tween 60 ve PVA (MA: 130000, % 99 hidrolize), sırasıyla Merck®'den ve Sigma®'dan, dimetilsülfoksit (DMSO) ise Sigma®'dan temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik derecede saflığa sahiptir. Tüm analiz ve ölçümler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Atatürk Üniversitesi DAYTAM ve Erzurum Teknik Üniversitesi YUTAM laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

TIA'nın (2,4,6-triiodoanilin) Sentezlenmesi

Anilin (2 mmol) ve moleküler iyot (4 mmol), distile su (10 mL) içerisinde oda sıcaklığında karıştırılmış, karışımın üzerine H₂O₂ % 30 (m/V) (8 mmol) ilave edilmiş ve elde edilen karışım oda

sıcaklığında 60 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur (Şekil 1). Reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile uygun çözücü sistemi kullanılarak takip edilmiştir. Uygun süre sonunda sodyum tiyosülfatın doyurulmuş sulu çözeltisi (10 mL) balon içerisine dökülmüş ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım, etil asetat (20 mL) ile 3 kez ekstrakte edilerek ayrılmıştır. Sonrasında organik faz, MgSO₄ ile kurutulup adi süzgeç kâğıdından süzölmüş ve organik çözücü evaporatör yardımıyla alçak basınç altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ham katı madde, kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır [17].

TIA'nın NMR ve Q-TOF Analizi

Elde edilen TIA'nın saflığını belirlemek ve yapısını doğrulamak adına ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları ile kütle analizi gerçekleştirilmiştir. TIA'nın erime derecesi Elektrothermal 9100 erime derecesi aleti kullanılarak belirlenmiştir. Bileşiğin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları solvent olarak dötero DMSO (d₆-DMSO) içerisinde, standart olarak tetrametilsilan kullanılarak Bruker FT-400 (100) MHz cihazı ile alınmıştır. Bileşiğin kütle analizi (Q-TOF) ise Agilent 6530 spektrometre cihazı ile yapılmıştır.

TIA Nanosüspansiyonunun Hazırlanması

Nanosüspansiyonun hazırlanmasında "Nanopresipitasyon" yöntemi kullanılmıştır [18]. Sentezlenen 100 mg saf TIA, 2.5 mL DMSO içerisinde çok noktalı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldürölmüştür. Süre sonunda bu çözelti üzerine Tween 60 ilave edilmiştir. Bir süre karıştırıldıktan sonra elde edilen organik faz çok noktalı manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 rpm hızda karışmakta olan 2.5 mL polivinil alkol (PVA, % 0.1, a/h) çözeltisi içerisine 5 dakika süreyle bir enjektör yardımıyla damlatılmıştır. Ultrasonik banyo içerisinde 1 dakika süreyle sonikasyona tabi tutulduktan sonra, homojen haldeki nanosüspansiyon 40 dakika süreyle 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve çöken nanokristaller saf su ilavesiyle yeniden süspande edilerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanmış ve DMSO'nun uzaklaştırılması sağlanmışır. Nanokristaller, bir gece -20 °C'de dondurulmuş ve devamında 24 saat süreyle liyofilize edilerek kuru toz halde elde edilmişlerdir. Kuru toz haldeki nanokristaller ileriki deneylerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında bir desikatör içerisinde karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Verim, Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Dağılımı Analizi

Verim, liyofilize TIA nanokristallerin miktarının, formölasyonu hazırlarken kullanılan toplam madde (etkin madde, stabilizan gibi) miktarına bölünmesi ile elde edilen sonucun % olarak ifade edilmesi şeklinde değerlendirilmiştir (n=3). Zeta potansiyel, polidispersite indeksi (PdI) ile partikül boyutu ve dağılımı ölçümlerini gerçekleştirmek üzere taze hazırlanmış nanosüspansiyon kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrar şeklinde "Malvern Zetasizer Nano ZSP" marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

100 µL nanosüspansiyon, 900 µL saf su ile seyreltilerek zeta hücrelerinin içinde oda sıcaklığında ölçülmüştür.

TIA Nanosüspansiyonunun Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

“Quanta FEG 250” marka SEM ile yığın haldeki saf TIA ve seyreltik halde liyofilize edilmiş TIA nanokristalleri morfolojik olarak incelenmiştir. Saf TIA ve nanokristaller doğrudan numune üzerinden ve yüksek çözünürlükle görüntülenmiştir.

TIA Nanosüspansiyonunun FT-IR Analizi

FT-IR analizleri, formülasyon bileşenleri ile etkin maddenin/maddelerin etkileşimlerini incelemek ve aralarında herhangi bir geçimsizlik olup olmadığını anlamak üzere yapılmaktadır. Saf TIA ile hazırlanan liyofilize nanokristallerin, 4000–400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, doğrudan toz numune üzerinden “Bruker VERTEX 70v” marka FT-IR spektrofotometresi ile spektrumları alınmıştır.

TIA Nanosüspansiyonunun BT Görüntüleme Analizi

BT tetkikleri, 256-kesitli BT cihazı (Somatom® Definition Flash, Siemens Healthcare, Forchheim, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Görüntüler üzerine ROI (region of interest) konularak dansite değerleri bulunmuştur. Dansite değerleri üzerinden kontrast miktarları kıyaslanmıştır [19, 20]. Hali hazırda BT görüntüleme için kullanılan iopromid ve ioheksol, TIA nanokristalleri ile kıyaslanmıştır. Bu amaçla her bir etkin maddeden 20 mg tartılmış ve bir enjektör içerisinde 1 mL saf su ile çözündürülmüş/dispers edilmiştir. Bu sayede eşit miktar kimyasal madde kullanımı ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Eşit miktar kullanılan kimyasal maddelerin kontrast etkiyi oluşturan iyot miktarları ise Tablo 2’de verilmiştir.

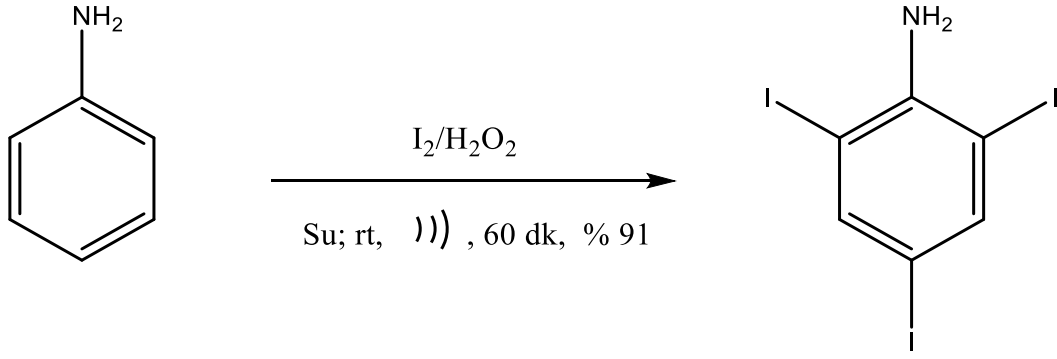
Tablo 2. BT görüntüleme için kullanılan eşit miktar kontrast maddelerin içerdikleri iyot miktarları (mg)

İopromid	İoheksol	TIA nanokristalleri
9.62	9.27	16.2

SONUÇ VE TARTIŞMA

TIA’nın (2,4,6-triiodoanilin) Sentezlenmesi

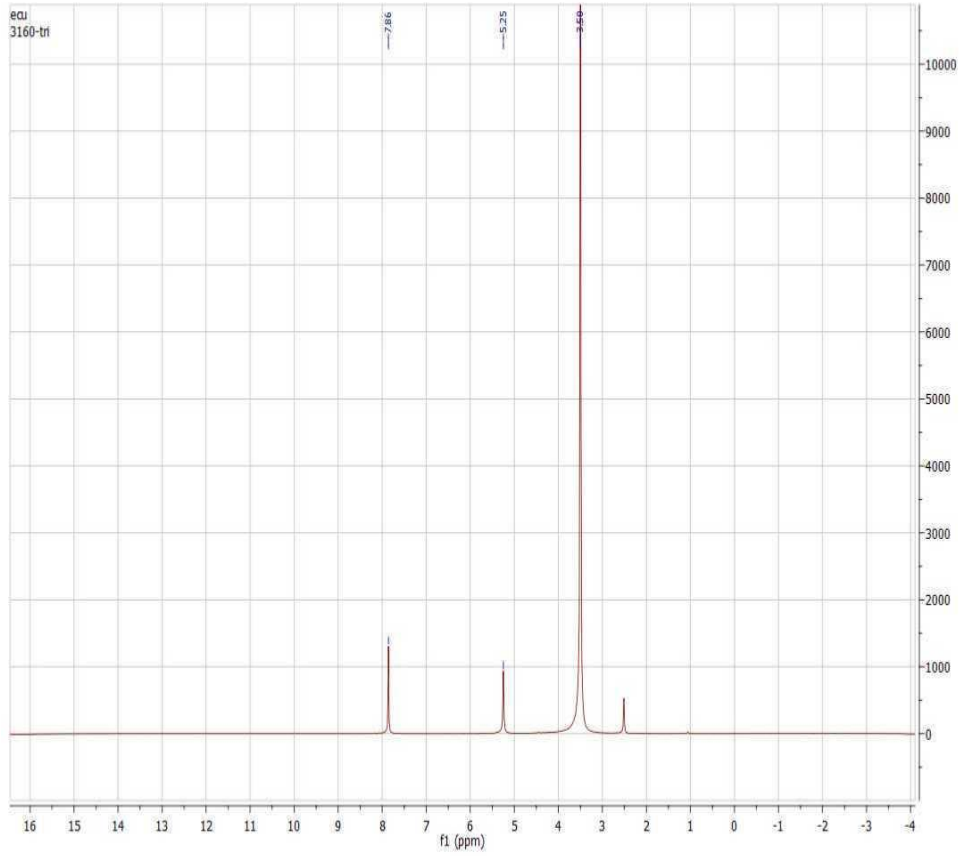
TIA, yüksek saflıkta ve verimde elde edilmiştir. Elde edilen ürüne ait sentez şeması Şekil 1’de verilmiştir [14].



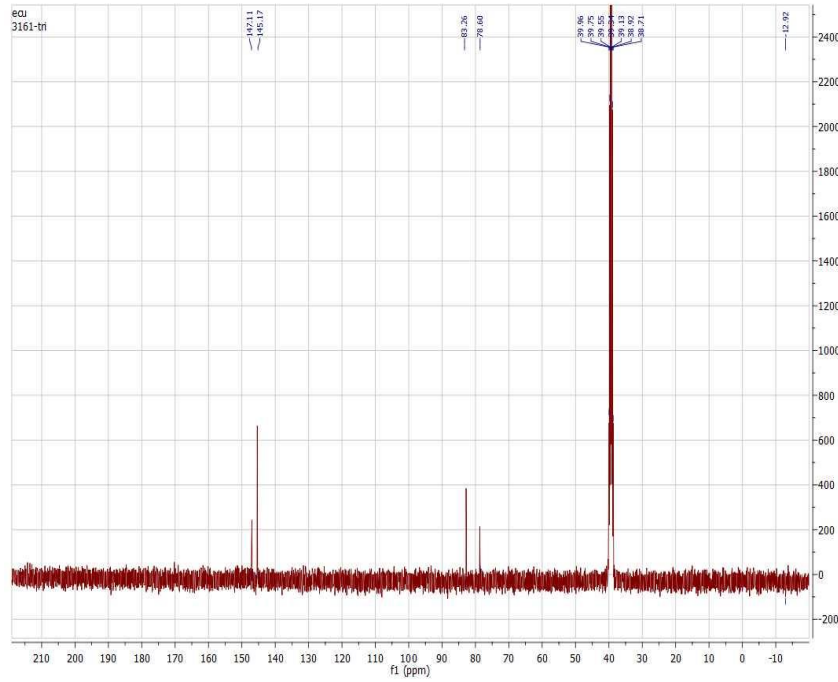
Şekil 1. 2,4,6-triiodoanilin'in sentezi

TIA'nın NMR ve Q-TOF Analizi

TIA'ya ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 2'de, $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu Şekil 3'te ve Q-TOF analiz sonucu Şekil 4'te verilmiştir.

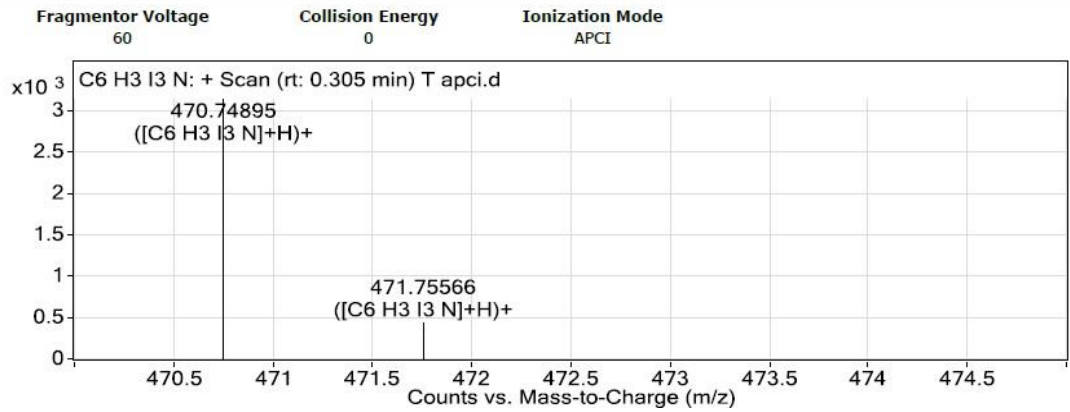


Şekil 2. Saf TIA'nın $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



Şekil 3. Saf TIA'nın ^{13}C -NMR Spektrumu

User Spectra

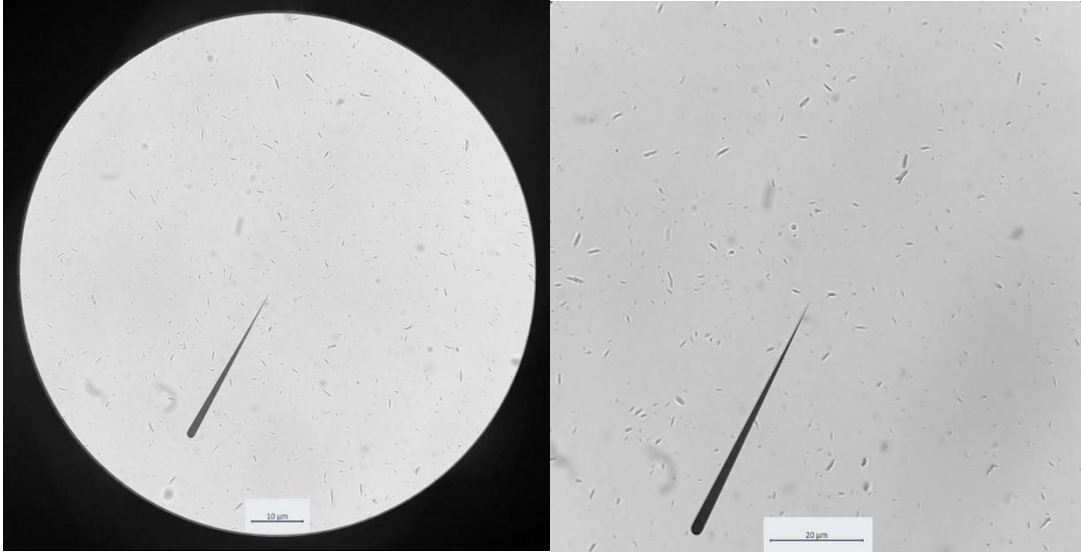


Şekil 4. Saf TIA'nın Q-TOF Spektrumu

TIA'nın verimi 91%, erime derecesi ise 183-185 °C olarak bulunmuştur. ^1H -NMR sonucu: (400 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 5.25 (s, 2H, NH_2), 7.86 (s, 2H, J:8.5 Ar-H). ^{13}C -NMR sonucu: (100 MHz, d_6 -DMSO) δ (ppm): 78.60 (CHAR-Ipara), 83.26 (2xCHAR-Iorto), 145.17 (2xCHAR), 147.11 (CHAR-NH2). Q-TOF sonucu: m/z 470.7478 (hesaplanan), 470.7489 (bulunan).

TIA Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

Nanopresipitasyon yöntemi ile % 92.35 verimle başarılı bir şekilde TIA nanokristalleri hazırlanmıştır. Taze hazırlanmış nanosüspansiyonlara ait optik görüntüler Şekil 5'te verilmiştir.



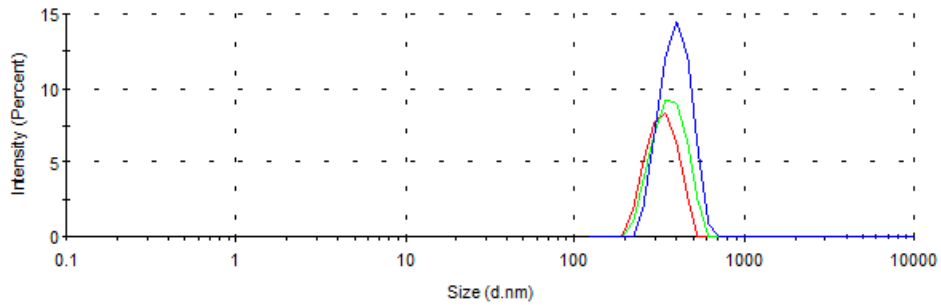
Şekil 5. TIA nanosüspansiyonuna ait optik görüntü (40x ve 100x)

Verim, Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Dağılımı Analizi

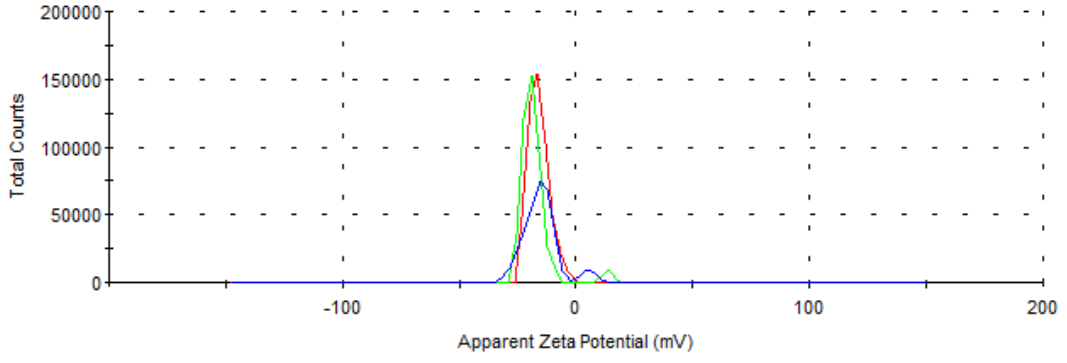
Taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonu verim, zeta potansiyel, polidispersite indeksi, partikül boyutu ve dağılım sonuçları ortalama ve standart sapma şeklinde Tablo 3'te verilmiştir. Zeta potansiyel ile partikül boyutu dağılım grafikleri ise Şekil 6 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Verim, partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Verim (%)	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
92.35±3.36	699.6±48.19	0.650±0.23	-16.23±1.46



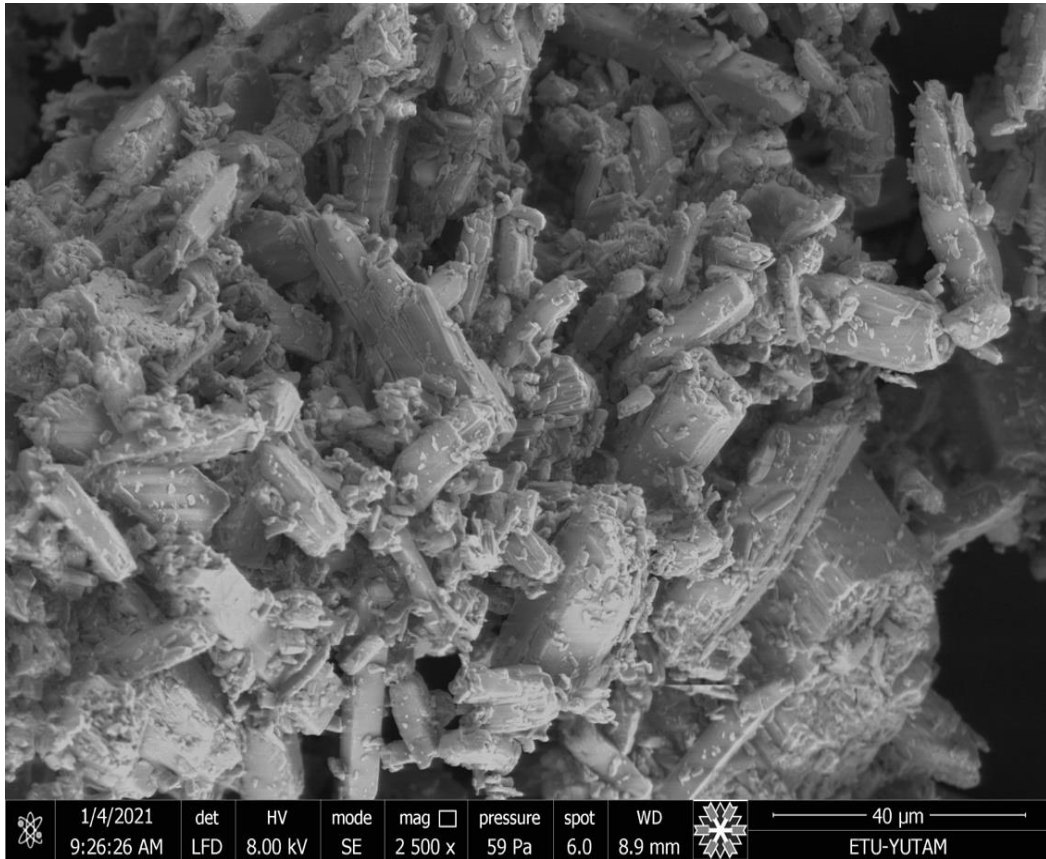
Şekil 6. TIA nanosüspansiyonu partikül boyutu dağılım grafiği (n=3)



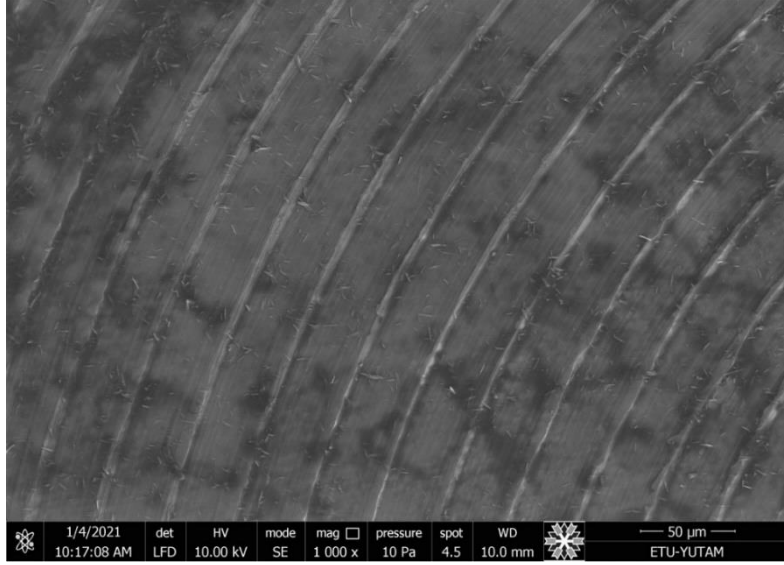
Şekil 7. TIA nanosüspansiyonu zeta potansiyel dağılım grafiği (n=3)

TIA Nanosüspansiyonun Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Saf TIA'nın ve liyofilize TIA nanosüspansiyonlarını oluşturan nanokristallerin SEM görüntüleri Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. Görüntülere bakıldığında yığın materyalden hareketle hazırlanan nanokristallerin homojen bir dağılım sergilediği ve çubuk yapısında olduğu görülmektedir.



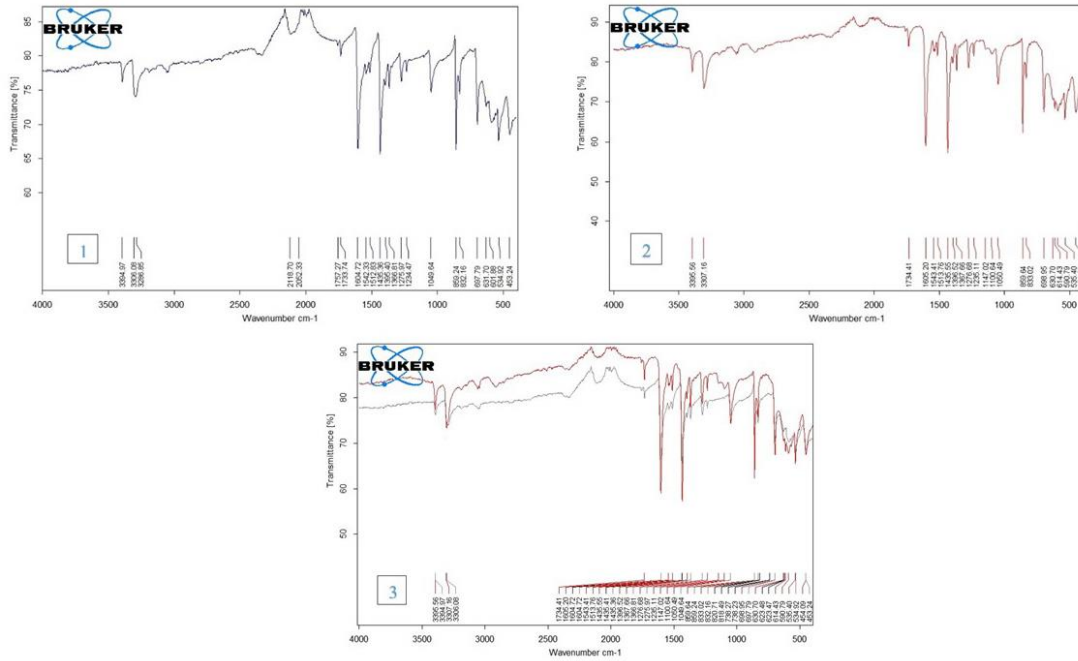
Şekil 8. Saf TIA'ya ait SEM görüntüsü



Şekil 9. TIA nanokristallerine ait SEM görüntüsü

TIA Nanosüspansiyonun FT-IR Analizi

Elde edilen spektrumlar Şekil 10’da gösterilmiştir. 1 numaralı spektrum saf TIA bileşiğine aitken 2 numaralı spektrum TIA nanokristallerine aittir. 3 numaralı spektrumda ise her iki spektrumun karşılaştırılması görülmektedir. Spektrumlar incelendiğinde, ana yapının bütünlüğünü koruduğu ve nano boyuta indirgenen TIA’nın herhangi bir yardımcı madde ile etkileşime girmediği ve/veya hazırlama aşamasındaki işlemler neticesinde karakteristik kimyasal bağlarında herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir.



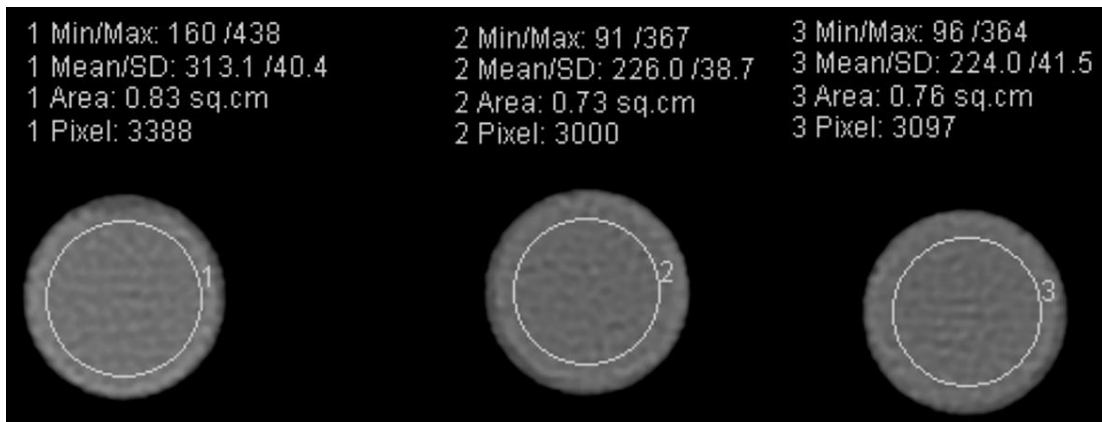
Şekil 10. Saf TIA (siyah) ve TIA nanokristallerine (kırmızı) ait spektrumlar

TIA Nanosüspansiyonun BT Görüntüleri

Örneklerin BT görüntüleme öncesi görüntüsü Şekil 11’de, elde edilen BT görüntüleri ise Şekil 12’de verilmiştir. Görüntülerdeki kontrast özellik yapıda var olan iyot miktarına bağlı olarak dansite üzerinden hesaplanmıştır. BT görüntüleme hazırlanan TIA nanosüspansiyonunun verdiği kontrast miktarı (313.1), referans kontrast ajanların (iopromid: 226, ioheksol: 224) kontrast miktarlarına kıyasla ~% 40 fazla (daha parlak) çıkmıştır. Sonuç olarak ~14.5 mg TIA nanosüspansiyonu ile 20 mg hali hazırdaki yaygın olarak BT görüntüleme kullanılan iopromid ve ioheksol ile aynı kontrast görüntü başarılı bir şekilde elde edilebilir durumdadır. Burada özellikle suda çözünürlüğü olmayan bir bileşiğin referans kontrast ajanlara kıyasla daha düşük miktarda kullanımı ile bir kontrast özellik oluşturabiliyor olması, nano boyuta inmenin verdiği bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, nano boyutun sunduğu eşsiz optiksel, elektriksel ve fiziko-kimyasal özelliklerin bir tezahürüdür [9].



Şekil 11. BT görüntüleme öncesi TIA nanosüspansiyonu (1), iopromid (2) ve ioheksol (3)



Şekil 12. TIA nanosüspansiyonunun (1), iopromidin (2) ve ioheksolün (3) BT görüntüleme sonuçları

Yeni sentezlenen ilaç moleküllerinin bir çoğu (yaklaşık % 60), suda çözünmeyen veya az çözünen bir yapı ile düzensiz absorpsiyon sergilerler. Bu nedenle yeni formülasyonları ve yeni ilaç taşıyıcı sistemleri gerektirirler. Bu durum Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki (Biopharmaceutical Classification System, BCS) Sınıf II ve Sınıf IV ilaçlar için geçerlidir. Mikronizasyon, nanonizasyon, kompleksleştirme (örn., siklodekstrinler ile), lipozomların hazırlanması, amorf katı dispersiyonlar, kosolvan kullanılarak çözünürleştirme, permeasyon artırıcıların kullanımı, yağlı çözeltiler, yüzey aktif madde dispersiyonları, tuz oluşumu, çöktürme teknikleri vb. kullanılarak bu tür ilaçların sistemik absorpsiyonu, dolayısıyla da biyoyararlanımı artırılmaktadır. Her bir tekniğin kendi içinde sınırlamaları bulunmaktadır. Nanosüspansiyonlar, çoğu ilaç için ilaç etkinliğini ve farmakoekonomiyi artıran, alternatif ve gelecek vaat eden evrensel bir formülasyon yaklaşımıdır. Bir nanosüspansiyon, ilaç nanokristallerinden, stabilizan ajanlardan ve bir sıvı dispersiyon ortamından oluşur. Nanosüspansiyon teknolojisinin en büyük avantajı, çoğu ilaca uygulanabilirliği ve basitliğidir. Nanosüspansiyon teknolojisi, sadece ilacın çözünürlüğünü değil aynı zamanda ilacın farmakokinetiğini de değiştirmekte ve böylece ilaç güvenliğini ve etkinliğini artırmaktadır. İlacın nano boyuta indirilmesi, aşağıdan yukarıya (bottom-up) veya yukarıdan aşağıya (top-down) yöntemler kullanılarak sağlanabilir. Aşağıdan yukarıya doğru teknolojiler daha çok çöktürme yöntemleridir. Yukarıdan aşağıya doğru teknolojiler ise kaba ilaç partiküllerinden başlanarak geliştirilir [21].

Mevcut kontrast ajanların akut böbrek hasarı oluşturma riski fazla olduğu için [22, 23] görüntülemelerde tercih edilmemekle birlikte daha yüksek maliyetli ve uzun süren tetkiklere yönelinmektedir [24]. Özellikle suda çözünen bileşiklerin vücut içerisinde oluşturdukları osmotik basınç ve çözünen moleküllerin hücrelerde ve/veya organlarda bırakacağı hasar oldukça risk taşımaktadır [25]. Ancak kontrast bileşiğin nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nanokristal formunun sunacağı avantajlar oldukça fazladır. Bunlardan en önemlisi de nanosüspansiyon içerisindeki nanokristallerin sulu ortamda çözünmemesidir. Dolayısı ile vücuda intravenöz yolla verildiğinde nano boyutlu suda çözünmeyen TIA kristalleri kanda osmotik basınç oluşturmayacaktır. Osmotik basınç çözeltilerin koligatif bir özelliğidir [26] ve çözünmeyen hiçbir maddenin izotoniye etkisi de bulunmamaktadır. Nanokristallerin kandaki osmolariteyi artırmamasından dolayı, görüntülemelerde yeni bir yaklaşım olarak kullanılabilirlikleri bulunmaktadır.

Geliştirilmiş biyomarkerler ile, farklı böbrek hastalıklarının ve klinik sendromların teşhis ve tedavisi için ihtiyaç duyulmaktadır ve nano boyutlu kontrast maddeler ile gelecekte çeşitli böbrek hastalıklarının tedavisi sağlanabilir [14].

Nanopartiküller, şimdilerde nanotıp olarak bilinen tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller ayrıca PET, MRI, fotoakustik ve floresans görüntüleme gibi çeşitli tıbbi görüntüleme yöntemleri için izleyici bir ajan veya kontrast madde olarak kullanılırlar. Nanopartiküllere olan bu ilginin birçok nedeni vardır. Genel olarak, nanopartiküller küçük moleküller

ile karşılaştırıldığında yüksek miktarda kontrast madde taşırlar. Bu biyomedikal ortamlarda nanopartiküllerin uygulanmasından elde edilen bilgiler, BT için kontrast maddelerinin geliştirilmesinde uygulanmaktadır. BT için kontrast madde içeren nanopartiküllerin birçok heyecan verici uygulaması vardır. Örneğin, nanopartiküllerin dolaşım yarı ömürlerinin 15 saat kadar sürdüğü, oysa iyot moleküllerin ise dolaşım yarı ömürlerinin sadece dakikalar olduğu bildirilmiştir. Nanopartiküller, in vivo olarak hücre takibine izin vermek için kullanılabilir. Hedeflenen BT kontrast maddelerinin nanopartikülleri dokulardaki proteinlere veya hücrelere ulaştırabilmektedir [27]. Ek olarak nanopartiküller, çok işlevli olabilir ve bu nedenle BT, MRI ve floresans gibi çoklu görüntüleme yöntemleri için kontrast sağlayabilir veya terapötik etkiler sağlayabilir. Son olarak nanopartiküller, geleneksel iyotlu kontrast maddelerin böbrek yetmezliği veya alerjik tepkiler nedeniyle kontrendike olduğu hastalarla uyumlu olabilir [28]. Nanopartiküller, uzun dolaşım süreleri ve hedeflenme yetenekleri sayesinde ilaçların taşıma verimliliğini arttırmakta ve serbest ilacın spesifik olmayan dağılım gibi yan etkilerini azaltmaktadırlar [29]. Literatürde, iyot bazlı kontrast ajanların nanoboyuta indirilerek yapıldığı görüntüleme çalışmaları giderek artmaktadır [28, 30, 31]. Günümüzde X ışınları ile görüntülemeye (özellikle kalp, damar, akciğer, kemik, dalak, karaciğer gibi) pek çok nanopartikül kontrast ajan kullanılarak çalışmalar yapılmaktadır [27]. Örneğin literatürde, böbreklerde lokalize olabilen nanopartikül yapıda kontrast ajan çalışmaları da mevcuttur [32].

Nanosüspansiyonlar, sadece suda çözünürlüğü olmayan ilaçların çözünürlüğünü ve/veya biyoyararlanımını artırmakla kalmaz, aynı zamanda da onları işlevsel hale getirebilir. Kılcal damarlarda herhangi bir blokaj olmaksızın suda çözünürlüğü olmayan ilaçların intravenöz uygulama olasılığını da mümkün kılar ve ilaçların farmakokinetiğini değiştirir, ilaç güvenliğini ve etkinliğini de artırır [33, 34]. Örneğin, ratlarda denenilen itrakonazol intravenöz nanosüspansiyonunun, çözelti formuna göre mantar önleyici etkinliğini arttırdığını göstermiştir [35]. Paklitaksel nanosüspansiyonunun, ortalama tümör yükünü azaltmada üstünlüğü bildirilmiştir [36]. Klofazimin nanosüspansiyonunun klofazimin stabilitesini artırmasının yanı sıra, Mycobacterium avium ile enfekte dişi farelerde kullanılan klofazim lipozom formülasyonuna kıyasla daha yüksek bir etkililikte iyileşme sağlamıştır [37].

Hazırladığımız nanosüspansiyonda PVA iyi bir stabilizan olmasına karşılık yapıya eklediğimiz yardımcı sürfaktan (Tween 60) sayesinde boyutun küçültülmesi sağlanmış ve devamında sonikasyon işlemi ile homojen boyut dağılımı sağlanmıştır. Literatürde benzer çalışmalarda bu durum gösterilmiştir [38].

Nanosüspansiyonlarda fiziksel stabilite çok önemlidir. Yalnızca elektrostatik itme ile stabilize edilmiş fiziksel olarak kararlı bir nanosüspansiyon için, minimum olarak ± 30 mV'luk bir zeta potansiyeli gereklidir. Ancak hem elektrostatik hem de sterik stabilizasyon durumunda ise, ± 20 mV'luk bir zeta potansiyel yeterlidir [39]. Ama formülasyon bileşenlerine ve proseslerine göre bu durum değişkenlik gösterebilir [38, 40, 41]. Taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonunu oluşturan

nanokristallerin partikül boyutları ortalama 699.6 ± 48.19 nm ve zeta potansiyelleri ise yine ortalama (-16.23 ± 1.46) mV olarak bulunmuştur. TIA nanosüspansiyonu hazırlandıktan sonra iki hafta süreyle oda sıcaklığı şartlarında bekletilmiş ve sonrasında tekrar boyut ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde boyutun ortalama 721.7 ± 21.78 nm, zeta potansiyelinin ise ortalama (-13.9 ± 1.21) olduğu tespit edilmiştir ($n=3$). Ayrıca taze hazırlanmış TIA nanosüspansiyonunun PDI değeri ise 0.650 ± 0.23 , iki hafta süreyle beklettiğimiz TIA nanosüspansiyonun PDI değeri ise 0.552 ± 0.029 olarak bulunmuştur. PDI, partikül boyutu dağılımının genişliği ve nanosüspansiyonların uzun süreli stabilitesi hakkında bir gösterge verdiği için nanosüspansiyon teknolojisinde önemli bir parametredir. 0.1–0.25 arasındaki bir PDI değeri, dar bir boyut dağılımının olduğu anlamına gelirken, 0.5'ten büyük bir PDI değeri çok geniş bir boyut dağılımının olduğu anlamına gelir (42, 43). PDI sonuçlarımız incelendiğinde, değerlerimiz 0.5'in üzerinde çıkmıştır ve bu da dağılımın geniş olmasına yol açmaktadır.

Yapılan çalışmalarda özellikle ± 5 mV'un altında zeta potansiyeli değerine sahip nanopartiküllerin/nanosüspansiyonların agregat oluşturma potansiyelleri olduğu belirtilmiştir [44, 45]. Ayrıca formülasyonumuzda hem elektrostatik hem de sterik (elektrosterik) stabilizasyonu sağlayan PVA kullanılmıştır [46]. Abdelbary ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, aripiprazol nanosüspansiyonları üzerinde farklı polimerik stabilizanların etkilerini incelemişlerdir ve yapılan çalışma sonucunda polimerik stabilizanların nanokristal yüzeyine adsorbe olduğu sırada stabilizanın yüksek yüzey konsantrasyonu ve hidrofilik zincirlerinin sulu fazda uzamasının kristal üzerindeki polimer tabakasının kalınlığını artırdığını ve bu durumun zeta potansiyel değerinde bir azalmaya neden olsa bile nanosüspansiyonların sterik engelleme ile stabilizasyonun sağlandığını ifade etmişlerdir. Hazırlanmış oldukları bütün nanosüspansiyonlarda zeta potansiyel değerleri (-3.44 ± 0.131) mV ile (-18.73 ± 3.35) mV arasında bulunmuştur [47]. Müller ve Jacobs yaptıkları bir çalışmada da sterik olarak stabilize edici katman yeterince kalın olduğunda, daha düşük zeta potansiyeli değerlerine rağmen nanosüspansiyonların stabilitesinin korunabileceği sonucuna varmışlardır [48]. Ali ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada hidrokortizon nanosüspansiyonlarını hazırlamış ve fiziksel stabiliteyi değerlendirebilmek amacıyla 3 hafta süreyle 25 °C'de bekletmişlerdir. Taze nanosüspansiyonların boyutları 500 nm iken bekletme sonrasında 187 nm'lik bir artışla 687 nm'ye ulaşmıştır. Taze nanosüspansiyonların zeta potansiyel değeri ise (-18) mV olarak bulunmuştur ve bu değerlere sahip nanosüspansiyonların stabil halde kaldıklarını belirtmişlerdir [42]. Bu bilgilerden yola çıkarak formülasyonumuz için kısa süreli olarak sıvı ortam içerisinde stabilizasyonu sağlayabildiğimizi söyleyebiliriz ancak uzun süre sıvı ortam içerisinde stabilizasyon sağlamak için ilave çalışmalar yapılması öngörülmektedir.

Nanokristaller kazandıkları farklı optiksel, elektriksel ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde eşsiz bir kullanım alanı sunmaktadırlar. Özellikle suda çözünürlüğü olmayan etkin maddeler için

kullanışlı bir platformdur. Dolayısıyla hazırladığımız TIA içeren yeni nanosüspansiyon formülasyonunun hipoksi, vazokonstriksiyon etkilerinin az olması ve böbrekte daha az zarar oluşturması muhtemeldir. Bu çalışmada TIA'nın nanosüspansiyonu başarılı bir şekilde hazırlanmış ve radyokontrast özelliğinin hali hazırda var olan kontrast ajanlara göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca daha düşük doz bileşik kullanılarak elde edilen daha yüksek kontrast özellik neticesinde görüntüleme için vücuda alınan kimyasal miktarın azalması ile bu yan/toksik etki oluşumunun azalması muhtemeldir. Tüm bu in vitro başarılı sonuçların prelinik ve klinik deneyler ile desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

BT görüntülerinin alınmasında desteğini esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Recep SADE'ye teşekkürlerimizi sunarız.

YAZAR KATKILARI

Kavram: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Tasarım: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Denetim: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Kaynaklar: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Malzemeler: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Veri toplama ve/veya işleme: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Literatür taraması: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Makalenin yazılması: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Kritik inceleme: M.K., E.Ö., R.S.Ö.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Caschera, L., Lazzara, A., Piergallini, L., Ricci, D., Tuscano, B., Vanzulli, A. (2016). Contrast agents in diagnostic imaging: Present and future. *Pharmacological Research*, 110, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.023>
2. Koc, M.M., Aslan, N., Kao, A.P., Barber, A.H. (2019). Evaluation of X-ray tomography contrast agents: A review of production, protocols, and biological applications. *Microscopy Research and Technique*, 82(6), 812-848. <https://doi.org/10.1002/jemt.23225>
3. Almen, T. (1985). Development of nonionic contrast-media. *Investigative Radiology*, 20(1), 2-9. <https://doi.org/10.1097/00004424-198501002-00003>.

4. Müller, R.H., Gohla, S., Keck, C.M. (2011). State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
5. Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D. (2013). Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 172, 1126-1141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>
6. Gao, L., Liu, G., Ma, J., Wang, X., Zhou, L., Li, X. (2012). Drug nanocrystals: In vivo performances. *Journal of Controlled Release*, 160, 418-430. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.013>
7. Wang, L.L., Du, J., Zhou, Y.Q., Wang, Y.C. (2017). Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(2), 455-469. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.007>
8. Kamaly, N., He, J.C., Ausiello, D.A., Farokhzad, O.C. (2016). Nanomedicines for renal disease: current status and future applications. *Nature Reviews Nephrology*, 12(12), 738-753. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.156>
9. Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
10. Williams, R.M., Jaimes, E.A., Heller, D.A. (2016). Nanomedicines for kidney diseases. *Kidney International*, 90(4), 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.041>
11. Thurman, J.M., Serkova, N.J. (2013). Nanosized contrast agents to noninvasively detect kidney inflammation by magnetic resonance imaging. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 20(6), 488-499. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2013.06.001>
12. Debbage, P., Jaschke, W. (2008). Molecular imaging with nanoparticles: Giant roles for dwarf actors. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(5), 845-875. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0511-y>
13. Chemical Book Web site. (2017). Retrieved September 28, from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5125267.htm.
14. Chemical Book Web site. (2017). Retrieved September 29, from https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb5110557.htm.
15. ChemSpider Web site. (2020). Retrieved September 29, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.193223.html>.
16. Sahu, B.P., Das, M.K. (2014). Nanosuspension for enhancement of oral bioavailability of felodipine. *Applied Nanoscience*, 4(2), 189-197. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0188-3>
17. Ferreira, I.M., Casagrande, G.A., Pizzuti, L., Raminelli, C. (2014). Ultrasound-promoted rapid and efficient iodination of aromatic and heteroaromatic compounds in the presence of iodine and hydrogen peroxide in water. *Synthetic Communications*, 44(14), 2094-2102. <https://doi.org/10.1080/00397911.2013.879900>

18. Rao, J.P., Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887-913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
19. Pirimoglu, B., Sade, R., Sakat, M.S., Ogul, H., Levent, A., Kantarci, M. (2018). Low-dose noncontrast examination of the paranasal sinuses using volumetric computed tomography. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 42(3), 482-486. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000699>
20. Pirimoglu, B., Sade, R., Sakat, M.S., Polat, G., Kantarci, M. (2019). Low-dose non-contrast examination of the temporal bone using volumetric 320-row computed tomography. *Acta Radiologica*, 60(7), 908-916. <https://doi.org/10.1177/0284185118802597>
21. Ravichandran, R. (2009). Nanoparticles in drug delivery: Potential green nanobiomedicine applications. *International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine*, 1(2), 108-130. <https://doi.org/10.1080/19430850903430427>
22. De Simone, B., Ansaloni, L., Sartelli, M., Gaiani, F., Leandro, G., De' Angelis, G.L., Di Mario, F., Coccolini, F., Catena, F. (2018). Is the risk of contrast-induced nephropathy a real contraindication to perform intravenous contrast enhanced Computed Tomography for non-traumatic acute abdomen in Emergency Surgery Department?. *Acta Biomedica*, 89(9-S), 158-<https://doi.org/172.10.23750/abm.v89i9-S.7891>.
23. Mohammed, N.M.A., Mahfouz, A., Achkar, K., Rafie, I.M., Hajar, R. (2013). Contrast-induced nephropathy. *Heart Views : The Official Journal of the Gulf Heart Association*, 14(3), 106-116. <https://doi.org/10.4103/1995-705X.125926>
24. Cosmai, L., Porta, C., Privitera, C., Gesualdo, L., Procopio, G., Gori, S., et al. (2020). Acute kidney injury from contrast-enhanced CT procedures in patients with cancer: White paper to highlight its clinical relevance and discuss applicable preventive strategies. *ESMO Open*, 5(2), 1-8. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000618>.
25. Sovak, M., Ranganathan, R. (1980). Stability of nonionic water-soluble contrast media: implications for their design. *Investigative Radiology*, 15(6), S323-328. <https://doi.org/10.1097/00004424-198011001-00068>
26. The LibreTexts Web site. (2006). Retrieved January 05, 2021, from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Chemistry_-_The_Central_Science_\(Brown_et_al.\)/13%3A_Properties_of_Solutions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Chemistry_-_The_Central_Science_(Brown_et_al.)/13%3A_Properties_of_Solutions)
27. Cormode, D.P., Naha, P.C., Fayad, Z.A. (2014). Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 9(1), 37-52. <https://doi.org/10.1002/cmml.1551>
28. Ashton, J.R., West, J.L., Badea, C.T. (2015). In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00256>
29. Williams, R.M., Shah, J., Tian, H.S., Chen, X., Geissmann, F., Jaimes, E.A., Heller, D.A. (2018). Selective nanoparticle targeting of the renal tubules. *Hypertension*, 71(1), 87-94. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09843>
30. Han, X.J., Xu, K., Taratula, O., Farsad, K. (2019). Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale*, 11(3), 799-819. <https://doi.org/10.3390/nano10091700>

31. Hainfeld, J.F., Ridwan, S.M., Stanishevskiy, Y., Smilowitz, N.R., Davis, J., Smilowitz, H.M. (2018). Small, long blood half-life iodine nanoparticle for vascular and tumor imaging. *Scientific Reports*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31940-2>
32. Kim, J., Lee, N., Hyeon, T. (2017). Recent development of nanoparticles for molecular imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 375(2107), 1-17. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0022>
33. Patel, V.R., Agrawal, Y. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), 81-87. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
34. Sutradhar, K.B., Khatun, S., Luna, I.P. (2013). Increasing possibilities of nanosuspension. *Journal of Nanotechnology*, 2013, 346581. <https://doi.org/10.1155/2013/346581>
35. Rabinow, B., Kipp, J., Papadopoulos, P., Wong, J., Glosson, J., Gass, J., Sun, C.S., Wielgos, T., White, R., Cook, C., Barker, K., Wood, K. (2007). Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, 339(1-2), 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.030>
36. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R. (2003). Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 113-120. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00251-8)
37. Peters, K., Leitzke, S., Diederichs, J.E., Borner, K., Hahn, H., Müller, R.H., Ehlers, S. (2000). Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine Mycobacterium avium infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 77-83. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.77>
38. Kalvakuntla, S., Deshpande, M., Attari, Z., Kunnatur, K. (2016). Preparation and characterization of nanosuspension of aprepitant by H96 process. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(1), 83-90. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.013>
39. Singare, D.S., Marella, S., Gowthamrajan, K., Kulkarni, G.T., Vooturi, R., Rao, P.S. (2010). Optimization of formulation and process variable of nanosuspension: An industrial perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1-2), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.041>
40. Singh, S., Singh, S.K., Chauhan, M.G., Kumar, B., Pandey, N.K., Kaur, B., Kumar, A., Mohanta, S., Gulati, M., Wadhwa, S., Yadav, A.K., Singh, P.K., Kumari, Y., Kaur, G., Khursheed, R., Clarisse, A. (2019). Quality by design-based optimization of formulation and process variables for controlling particle size and zeta potential of spray dried incinerated copper nanosuspension. *Recent Innovations in Chemical Engineering*, 12(3), 248-260. <https://doi.org/10.2174/2405520412666190627144845>
41. Karakucuk, A., Celebi, N. (2020). Investigation of formulation and process parameters of wet media milling to develop etodolac nanosuspensions. *Pharmaceutical Research*, 37(6), 111. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02815-x>
42. Ali, H.S., York, P., Blagden, N. (2009). Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *International Journal of Pharmaceutics*, 375(1-2), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.029>

43. Patravale, V.B., Date, A.A., Kulkarni, R.M. (2004). Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 827-840. <https://doi.org/10.1211/0022357023691>
44. Moorthi, C., Krishnan, K., Manavalan, R., Kathiresan, K. (2012). Preparation and characterization of curcumin–piperine dual drug loaded nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(11), 841-848. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60241-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60241-X)
45. Afifi, S.A., Hassan, M.A., Abdelhameed, A.S., Elkhodairy, K.A. (2015). Nanosuspension: An emerging trend for bioavailability enhancement of etodolac. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 938594. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/938594>
46. Wiśniewska, M., Ostolska, I., Szewczuk-Karpisz, K., Chibowski, S., Terpiłowski, K., Gun'ko, V.M., Zarko, V.I. (2015). Investigation of the polyvinyl alcohol stabilization mechanism and adsorption properties on the surface of ternary mixed nanooxide AST₅₀ (Al₂O₃–SiO₂–TiO₂). *Journal of Nanoparticle Research*, 17(12), 1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-014-2831-2>
47. Abdelbary, A.A., Li, X., El-Nabarawi, M., Ellassasy, A., Jasti, B. (2013). Effect of fixed aqueous layer thickness of polymeric stabilizers on zeta potential and stability of aripiprazole nanosuspensions. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(3), 730-735. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2012.727001>.
48. Müller, R., Jacobs, C. (2002). Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 237(1-2), 151-161. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00040-6).