

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TRANSMUKOZAL ETKİN MADDE SALIMI İÇİN
S-ADENOZİL-L-METİYONİN'İN (SAmE) HIZLI
ÇÖZÜNEN SUBLİNGUAL FİLMLERİNİN TASARIMI
VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Çağda Gizem ÇELİK GÜLMEZ

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL

**Bu araştırma TÜBİTAK 1002 Projeleri kapsamında 119S223 proje numarası ile
desteklenmiştir**

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Transmukozal Etkin Madde Salımı İçin S-Adenozil-L-Metiyonin'in (SAME) Hızlı Çözünen Sublingual Filmlerinin Tasarımı ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Çağda Gizem ÇELİK GÜLMEZ

Tarih: 31.01.2020

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Çağda Gizem ÇELİK GÜLMEZ tarafından hazırlanan
“Transmukozal Etkin Madde Salımı İçin S-Adenozil-L-Metiyonin’in (SAME) Hızlı
Çözünen Sublingual Filmlerinin Tasarımı ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31.01.2020

Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sevdâ ŞENEL
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Üye

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu Tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Oral Filmler	1
1.1.1. Ağızda Dağılan (Orodispersible) Filmler	2
1.1.2. Bukkal Filmler	2
1.1.3. Palatal Filmler	3
1.1.4. Sublingual Filmler	4
1.1.4.1. Sublingual Filmlerin Avantajları ve Dezavantajları	5
1.1.4.2. Sublingual Film Formülasyonlarının Kompozisyonu	6
1.1.4.3. Sublingual Filmlerden Etkin Madde Absorpsiyonu	13
1.1.4.4. Sublingual filmlerin hazırlanma yöntemleri	20
1.1.4.5. Sublingual Filmlerin Karakterizasyonu	23
1.2. S-Adenozil-L-Metiyonin (SAmE)	28
1.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri	29
1.2.2. SAmE'nin Metabolizması ve Fonksiyonları	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Gereçler	36
2.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2. Deneylerde Kullanılan Araçlar	37
2.1.3. Deneylerde Kullanılan Ortamlar ve İçerikleri	38
2.2. Yöntemler	39
2.2.1. SAmE'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	39
2.2.1.1. SAmE'nin Su ve Tükürük Ortamında UV Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi	39
2.2.1.2. SAmE'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi ile miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	40
2.2.2. SAmE'nin Su ve Tükürük Ortamlarındaki Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonu	41
2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	41
2.2.2.2. Doğruluk	42
2.2.2.3. Kesinlik	43
2.2.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	45
2.2.3. Sublingual film Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	46
2.2.3.1. Etkin Madde İçermeyen Sublingual Filmlerin Hazırlanması	51
2.2.3.2. Etkin Madde İçermeyen Sublingual Filmlerin Kalite Kontrol Testleri	56
2.2.3.3. SAmE Yüklü Sublingual Filmlerin Hazırlanması	59
2.2.3.4. SAmE Yüklü Filmler İçin Yapılan Kontroller	61

3. BULGULAR	68
3.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	68
3.1.1. SAME'nin UV Spektrumları	68
3.1.1.1. SAME'nin Su ve Tükürük Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular	69
3.1.2. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Spektrumu	71
3.1.2.1. SAME'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular	72
3.2. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonu	72
3.2.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin UV Spektrofotometrik Kalibrasyonunun Validasyonu	73
3.3. Sublingual Film Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar	79
3.3.1. SAME'nin HPLC Kalibrasyonunun Validasyonu	79
3.3.2. Etkin madde içermeyen sublingual filmlerin hazırlanması	83
3.3.2.1. Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin İncelenmesi	84
3.3.2.2. Filmlerin Katlanma Dayanımlarının İncelenmesi	84
3.3.2.3. Filmlerin Dağılma Zamanlarının İncelenmesi	84
3.3.2.4. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	86
3.3.2.5. Formülasyonların Çözeltilerinin Viskozitesinin Ölçülmesi	87
3.3.2.6. İn vitro mukoadesyon testi	88
3.3.3. SAME Yüklenen Filmler Üzerinde Yapılan Kontroller	89
3.3.3.1. SAME Yüklenen Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin İncelenmesi	89
3.3.3.2. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Katlanma Dayanımlarının İncelenmesi	90
3.3.3.3. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Dağılma Zamanlarının İncelenmesi	90
3.3.3.4. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	91
3.3.3.5. Etkin Madde Yüklenen Formülasyonların Çözeltilerinin Viskozitesinin Ölçülmesi	92
3.3.3.6. İn Vitro Mukoadesyon Testi	92
3.3.3.7. SAME yüklenen formülasyon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesi	94
3.3.3.8. SAME Yüklenen Filmlerin İçerik Tektürlüğünün İncelenmesi	94
3.3.3.9. SAME Yüklenen Filmlerin Nem İçeriklerinin İncelenmesi	94
3.3.3.10. SAME Yüklenen Filmlerin Filmlerden Etkin Madde Salım Profilinin İncelenmesi	94
3.3.2.11. İn vitro Permeasyon Çalışmaları	96
3.3.3.11. Film Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi	98
3.3.3.12. Film Formülasyonlarının Görüntülenmesi	99
3.3.3.13. Stabilité Çalışmaları	101
4. TARTIŞMA	102
4.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	102
4.1.1. SAME'nin Su ve Tükürük Ortamındaki UV Spektrofotometrisi Analizi	102
4.1.2. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi	103
4.2. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	103
Sublingual Film Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	105
4.3.	105
4.3.1. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin Değerlendirilmesi	109
4.3.1.1. Filmlerin Dağılma Zamanlarının Değerlendirilmesi	110

4.3.1.2. Filmlerin Katlanma Dayanımlarının Değerlendirilmesi	112
4.3.1.3. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	112
4.3.1.4. Film Çözeltilerinin Viskozite Özelliklerinin Değerlendirilmesi	114
4.3.1.5. Filmlerin Mukoadazyon Testinin Değerlendirilmesi	114
4.3.2. SAME Yüklenen Sublingual Filmlerin Üzerinde Yapılan Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	115
4.3.2.1. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin Değerlendirilmesi	116
4.3.2.2. Filmlerin Dağılma Zamanlarının Değerlendirilmesi	116
4.3.2.3. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	116
4.3.2.4. Filmlerin Mukoadazyon Testinin Değerlendirilmesi	117
4.3.2.5. Filmlerin İçerik Tektürlüğünün İncelenmesi	118
4.3.2.6. Filmlerden Etkin Madde Salım Profillerinin Değerlendirilmesi	118
4.3.2.7. İn vitro Permeasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	119
4.3.2.8. Film Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi	120
4.3.2.9. Filmlerin ve Etkin Maddenin SEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi	121
4.3.2.10. Filmlerin Stabilitelerinin İncelenmesi	121
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	123
ÖZET	124
SUMMARY	125
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	132

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında düşük biyoyararlanıma sahip ve zayıf stabilite özellikleri gösteren endojen molekül, S-adenozil-L-metiyonin'in (SAdMe) biyoyararlanımının arttırılması ve stabilitesinin iyileştirilmesi için sublingual film şeklinde bir dozaj formunun hazırlanması amaçlanmıştır.

Gerek yüksek lisans eğitimim boyunca gerekse tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ilgisini, yardımını, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma disiplini, üretkenliği ve etik düşünceleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sn. Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL'e sevgi, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca sıklıkla bilgisine başvurduğum, ilgisini ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Zerrin SEZGİN BAYINDIR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda birçok aşamada gerek deneylerimde yardımcı olan gerekse bilgi birikimiyle beni aydınlatan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Özge İNAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecim boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan, yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Dr. Ahmet Doğan ERGİN'e teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans tez çalışmamı 119S223 no'lu araştırma projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programı Başkanlığı'na çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri ilgi ve yardımlarından dolayı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve araştırma görevlilerine çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında birlikte vakit geçirdiğim, desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımının her aşamasında bana sonsuz güvenen, ilgi ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, bugün olduğum kişi olmamı sağlayan, evlatları olmaktan gurur duyduğum sevgili annem Nilüfer ÇELİK'e, sevgili babam Erol ÇELİK'e, bana her daim neşe ve mutluluk veren canım kardeşim Eda Deniz ÇELİK'e ve aldığım her kararda arkamda duran, desteğini ve ilgisini hiç esirgemeyen, hayattaki motivasyonumu arttıran sevgili eşim Halim Görkem GÜLMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSS	Bağıl Standart Sapma
°C	Santigrad derece
cP	Centipoise
CMC	Karboksi Metil Selüloz
Da	Dalton
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
E%	Yüzde uzama (elongation)
EC	Etil Selüloz
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
EP	Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu (Food Drug Administration)
GI	Gastrointestinal
HEC	Hidroksi Etil Selüloz
HPC	Hidroksi Propil Selüloz
HPMC	Hidroksi Propil Metil Selüloz
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Kongresi
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MA	Molekül Ağırlığı
MC	Metil Selüloz
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Poli Vinil Prolidon
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPM	Dakikada devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Standart Hata

SS	Standart Sapma
TS	Gerilme direnci (Tensile Strength)
USP	Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopoeia)
UV	Ultra Viyole
λ_{max}	Maksimum absorbansın gözleendiği dalga boyu



ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Oral filmlerin oral boşluktaki farklı uygulama yerleri	1
Şekil 1.2: Bukkal film uygulaması	3
Şekil 1.3: Sublingual film uygulaması	4
Şekil 1.4: HPMC'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.5: PVA'nın kimyasal yapısı	9
Şekil 1.6: Polivinil alkol-polietilen glikol graft kopolimerin kimyasal yapısı	10
Şekil 1.7: Pullulanın kimyasal yapısı	10
Şekil 1.8: Sublingual mukozanın anatomik yapısı	15
Şekil 1.9: Sublingual bölgedeki kan damarları	16
Şekil 1.10: Çözücü buharlaştırma tekniği ile çalışan film oluşturuu cihaz	21
Şekil 1.11: Sıcakta eritmeli ekstrüder cihazı	22
Şekil 1.12: Silindir yöntemi	23
Şekil 1.13: SAME'nin moleküler yapısı	29
Şekil 1.14: SAME'nin rasemizasyonu	30
Şekil 1.15: SAME'nin biyosentezi ve metabolik yolları (THF, tetrahidrofolat; GSH, glutatyon; SAH, S-adenozilhomosistein)	33
Şekil 2.1: Manesty tablet dağılma cihazı	57
Şekil 2.2: Ta.XT Plus Texture Analyser Cihazı	58
Şekil 2.3: Ohaus-MB 45 nem ölçüm cihazı	63
Şekil 2.4: Çözünme cihazı ve dikey difüzyon hücreleri	65
Şekil 2.5: PAMPA Sistemi	66
Şekil 3.1: SAME'nin su ortamındaki UV spektrumu	68
Şekil 3.2: SAME'nin tükürük ortamındaki UV spektrumu	69
Şekil 3.3: SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ortamında elde edilen standart doğrusu	70
Şekil 3.4: SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak tükürük ortamında elde edilen standart doğrusu	70
Şekil 3.5: SAME'nin su ortamındaki HPLC spektrumu	71
Şekil 3.6: SAME'nin su ortamındaki standart doğrusu	72
Şekil 3.7: Filmlerin kalınlık ve ağırlık değeri	84
Şekil 3.8: Film formülasyonlarının dağılma zamanları ($\pm$ SH)	85
Şekil 3.9: F6 filminin gerilme dayanımının zamana karşı grafiği	86
Şekil 3.10: F10 filmini yüzeyden ayırma gerilimi ve adezyon işini gösteren grafik	88
Şekil 3.11: Etkin madde yüklenmesi planlanan film formülasyonlarını yüzeyden ayırma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm$ SH)	89
Şekil 3.12: F7S ve F10S'in kalınlık ve ağırlık değeri ($\pm$ SH)	90
Şekil 3.13: F7S ve F10S'in dağılma zamanları ($\pm$ SH)	91
Şekil 3.14: F7S filminin gerilme gerinim grafiği	91
Şekil 3.15: F10S filmini yüzeyden ayırma kuvvetini ve adezyon işini gösteren grafik	93
Şekil 3.16: F7S ve F10S filmlerini yüzeyden ayırma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm$ SH)	93
Şekil 3.17: F7S ve F10S'nin etkin madde salım profillerinin karşılaştırmalı gösterimi ($\pm$ SH)	95

Şekil 3.18: F7S ve F10S'in etkin madde permeasyon profili	96
Şekil 3.19: F7S, F10S ve SAME çözeltisinin permeasyon profili	97
Şekil 3.20: SAME, Kollicoat, Kollicoat-SAME fiziksel karışımı ve F7S filminin DSC termogramı	98
Şekil 3.21: SAME, pullulan, pullulan-SAME fiziksel karışımı ve F10S filminin DSC termogramı	99
Şekil 3.22: Final formülasyonlarda polimerler, filmler ve etkin maddenin SEM görüntüleri (A: F7, B: F7S, C: F10, D: F10S, E ve F: F10S'in yandan kesiti, G ve H: SAME)	100
Şekil 4.1: Filmlerdeki çözücünün buharlaşmasındaki "coffee ring effect"ın gösterimi	109



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1: Oral boşlukta kullanılmak üzere hazırlanan film formülasyonlarında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması	7
Çizelge 1.2: SAME'nin fizikokimyasal özellikleri	30
Çizelge 2.1: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar ve işlem parametreleri	47
Çizelge 2.2: Etkin Madde İçermeyen Sublingual Film Formülasyonlarından seçilen formülasyonlar ve bileşenleri	52
Çizelge 3.1: SAME'nin su ortamındaki HPLC analiz yöntemine ait analiz şartları	71
Çizelge 3.2: SAME'nin UV Spektrofotometri ile miktar tayini için su ve tükürük ortamlarında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı değerleri ile ilgili parametreler	73
Çizelge 3.3: UV spektrofotometrisinde yapılan SAME'nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları	74
Çizelge 3.4: UV spektrofotometrisinde yapılan SAME'nin tükürük ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları	75
Çizelge 3.5: SAME'nin UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.6: SAME'nin su ortamında UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar	77
Çizelge 3.7: SAME'nin tükürük ortamında UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.8: SAME'nin UV spektrofotometrisinde yapılan kalibrasyon doğrularından elde edilen LOD ve LOQ değerleri	78
Çizelge 3.9: SAME'nin HPLC ile miktar tayini için su ortamında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı ile ilgili parametreler	79
Çizelge 3.10: HPLC'de yapılan SAME'nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları	80
Çizelge 3.11: SAME'nin HPLC'de yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar	81
Çizelge 3.12: HPLC'de yapılan SAME'nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen ara kesinlik sonuçları	82
Çizelge 3.14: HPLC'de yapılan kalibrasyon doğrularından elde edilen LOD ve LOQ değerleri	83
Çizelge 3.15: Film formülasyonlarının ortalama dağılma zamanları	85
Çizelge 3.16: Film formülasyonlarının gerilme direnci, Young modülü ve uzama yüzdesi değerleri ($\pm$ SH)	87
Çizelge 3.17: Etkin madde yüklenmesi planlanan formülasyonların çözeltilerinin viskozite değerleri	88
Çizelge 3.18: Etkin madde yüklenmesi planlanan film formülasyonların kopma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm$ SH)	89
Çizelge 3.19: F7S ve F10S'in gerilme direnci, Young modülü ve uzama yüzdesi değerleri ($\pm$ SH)	92
Çizelge 3.20: F7S ve F10S'in çözeltilerinin viskozite değerleri	92

Çizelge 3.21: F7S ve F10S'in kopma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm SH$)	93
Çizelge 3.22: F7S filminden SAME'nin salım verilerine matematiksel modellerin uygulanması ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	95
Çizelge 3.23: F10S filminden SAME'nin salım verilerine matematiksel modellerin uygulanması ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	96
Çizelge 3.24: Saf SAME, F7S ve F10S'in permeabilite katsayıları.	97
Çizelge 4.1: Etkin madde içermeyen filmler ve SAME yüklenen filmlerin mekanik özelliklerinin karşılaştırması	117
Çizelge 4.2: Etkin madde içermeyen filmler ve SAME yüklenen filmler	117

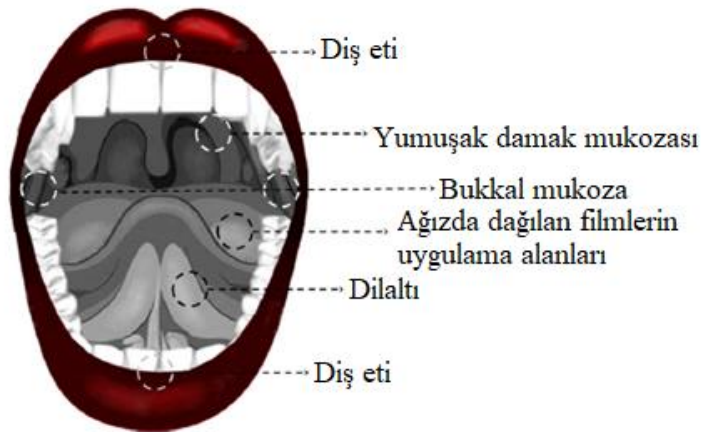


1. GİRİŞ

1.1. Oral Filmler

Oral boşluğa uygulanan filmler, etkin madde salım platformları olarak verimli bir şekilde kullanılabilecek karmaşık polimerik matrislerdir. Bu polimerik matrisler çeşitli bileşenlerden oluşabilse de genellikle hidrofilik polimerler yapının başlıca materyalidir. Başlangıçta oral filmler nefes tazeleme formülasyonları olarak ortaya çıksa da hızlı bir şekilde, taşınması ve uygulaması kolay bir etkin madde salım sistemi olarak farklı pazar ihtiyaçlarına cevap vermek üzere geliştirilmiştir (Bala ve ark., 2013).

Oral filmler genel olarak mukoadheziv ve mukoadheziv olmayan filmler şeklinde iki sınıfta değerlendirilebilmektedir. Mukoadheziv olmayan filmler ağızda hızlıca dağılan orodispersible filmlerdir. Mukoadheziv filmler ise Şekil 1.1’de görülen oral boşluktaki uygulama yerine göre bukkal, sublingual ve palatal olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Borges ve ark., 2015).



Şekil 1.1: Oral filmlerin oral boşluktaki farklı uygulama yerleri

1.1.1. Ağızda Dağılan (Orodispersible) Filmler

Avrupa İlaç Ajansı (EMA), ağızda dağılan (orodispersible) filmleri, ağız boşluğu içinde hızlıca çözünen ince filmler olarak, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ise kolayca çözünebilen filmler olarak tanımlamıştır (Borges ve ark., 2015). Adeziv olmayan (non-adeziv) hızlı çözünen filmler genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip (yaklaşık 1 000 ila 9 000 Da) hidrofilik polimerlerden oluşmaktadır. Ağızda dağılan filmlerin çoğunluğu mukoadeziv olarak tasarlanmamasına rağmen kullanılan polimerlerin molekül ağırlığı, kimyasal yapısı gibi doğal özelliklerinden dolayı bir dereceye kadar mukoadezivlik gösterebilmektedir. Bununla birlikte, bu formülasyon tipi için en yaygın kullanılan polimerlerin molekül ağırlıkları genellikle 200 000 Da altındadır. Bu filmler, ağız boşluğunda hızla dağılma, yutulma ve gastrointestinal (GI) kanaldan sistemik dolaşıma absorbe edilme amacıyla tasarlanmaktadır.

1.1.2. Bukkal Filmler

Avrupa farmakopesine (EP7) göre bukkal filmler, bukkal mukozaya yapışan ve çözünebilen tek veya çok katmanlı tabakalar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.2). Mukoadeziv bukkal filmler, içerdikleri etkin maddeyi doğrudan biyolojik alt tabakaya salan rezervuar dozaj formlarıdır. Bu filmler ince olmalarının yanı sıra topikal olarak ağız boşluğuna etkin maddeleri yavaş ve önceden belirlenmiş bir hızda salıvermektedir (Preis ve ark., 2014). Mukoadeziv filmler doğrudan biyolojik bir substratla etkileşirler.



Şekil 1.2: Bukkal film uygulaması

Bukkal filmlerin tasarımında mukoadezivliğin derecesi, içerik tekdüzeliği, permeasyon oranı, etkin maddelerin kontrollü salımı gibi kritik özelliklerin karakterizasyonu önemli araştırma alanlarını temsil etmektedir (Morales ve McConville, 2011). Formülasyonları ise temel olarak polimer ve plastizer olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Kullanılan polimerlerin taşınması gereken bazı özellikler vardır: Güçlü hidrojen bağlayıcı gruplar, güçlü anyonik veya katyonik yükler, yüksek moleküler ağırlık, zincir esnekliği, mukus tabakasına yayılmaya elverişli yüzey enerjisi özellikleri bu özelliklerden bazılarıdır. Ayrıca polimer nontoksik olmalı, mukoza zarını tahriş etmemeli, dozaj formunun esnekliğini ve konforunu sağlamalıdır. Nemli dokuya hızlıca yapışmalı ve alan özgüllüğü olmalıdır ve etkin madde salımına engel teşkil etmemelidir. Mukoadeziv olarak kullanılan polimerlerler çoğunlukla şişebilen ve bukkal mukozadaki müsin molekülleri ile zincir etkileşimine girebilen hidrofilik polimerlerdir.

1.1.3. Palatal Filmler

Damak bölgesine yerleştirilerek kullanılan, oromukozal yoldan etkin madde geçişini hedefleyen ilaç taşıyıcı sistemdir.

1.1.4. Sublingual Filmler

Hızlı çözünen sublingual filmler, dilaltına yerleştirilen, parçalanma için suya ve çiğnenmeye ihtiyaç duymayan, etkin maddenin dilaltından sistemik dolaşıma geçmesi için etkin maddeyi serbest bırakmak üzere hızla parçalanarak taşıyıcı sistemlerdir (Bhupinder ve Sarita, 2012) (Şekil 1.3). Ağız boşluğunda kullanılan filmlerin gelişimi, son on yılda çarpıcı bir şekilde artmıştır; çünkü peptitler, aşılarda ve nanopartiküller de dahil olmak üzere çeşitli terapötik sınıflar için filmler alternatif bir dozaj formu oluşturmaktadır.

Sublingual hızlı çözünen filmlerin, sublingual yoldan alınması ile hızlı bir etki başlangıcı sağlanmaktadır. Dilaltı mukozası, ince membran yapısı nedeniyle nispeten geçirgen olduğundan ve yüksek oranda perfüzyona izin verdiğinden, hızlı etkin madde absorpsiyonunu, dolayısıyla hızlı terapötik etki başlangıcını mümkün kılmaktadır. Etkin madde doğrudan sistemik dolaşıma geçtiğinden, GI sistemde degradasyondan ve ilk geçiş etkisinden de korunmuş olmaktadır (Singh ve ark., 2018).



Şekil 1.3: Sublingual film uygulaması

1.1.4.1. Sublingual Filmlerin Avantajları ve Dezavantajları

Oral filmler özel hasta grupları ve klinik açıdan klasik dozaj formlarına göre bazı üstünlükler göstermektedir. Ayrıca ticari açıdan da etkin maddelerin yaşam siklusunu uzatma olanağı sunmaktadırlar (Borges ve ark., 2015). Oral filmlerin avantajları şunlardır (Bhupinder ve Sarita, 2012; Hoffman ve ark., 2011):

- Küçük ve ince tasarım,
- Geniş yüzey alanı nedeniyle hızlı dağılma,
- Hızlı absorpsiyon,
- Taşıma kolaylığı,
- Etkin maddenin ilk geçiş eliminasyonuna uğramaması,
- Etkin maddenin GI sistem etkilerine maruz kalmaması,
- Zihinsel rahatsızlığı olan hastalara, yaşlı hastalara, çocuk hastalara uygulama kolaylığı,
- Doz hassasiyeti,
- Geliştirilmiş hasta uyuncu,
- İyi stabilite,
- Herhangi bir doz aşımı veya yan etki durumunda kolay uzaklaştırılabilirlik.

Bu avantajlar yanısıra oral filmlerin bazı dezavantajları söz konusudur (Bhupinder ve Sarita, 2012; Hoffman ve ark., 2011):

- Düşük ağırlık, ince form ve küçük olması nedeniyle etkin madde yükleme kapasitesinin düşük olması,
- Mukozal bariyer,
- Sürekli tükürük salgılanması nedeni ile etkin madde kaybı,
- Stabilite ve saklama – taşıma açısından özel ambalajlama gereksinimi.

1.1.4.2. Sublingual Film Formülasyonlarının Kompozisyonu

1.1.4.2.1. Etkin Madde

Antiülser (omeprazol), antiastmatik (salbutamol sülfat), antitüsif, antihistaminik, nonsteroidal antienflamatuvar (parasetamol, meloksikam, valdekoksib) etkin maddeler dahil olmak üzere birçok etkin madde sınıfı ağızda çözünen filmler şeklinde formüle edilebilir. Film formülasyonunda olması gereken etkin madde ağırlık yüzdesi farklı literatürlerde farklı oranlarda belirtilmektedir: %1-25 (Arya ve ark., 2010); %1-30 (Hoffman ve ark., 2011); %5-30 (Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.2.2. Polimerler

Polimerler, oral filmlerin ana yapısını oluşturmaktadır. Polimerler, istenen film özelliklerini elde etmek için tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılabilirler. Elde edilecek film, uygulama ve taşıma sırasında hasar görmeyecek kadar sağlam olmalıdır. Filmlerin sağlamlığı polimerin tipine ve formülasyondaki miktarına bağlıdır. Ayrıca film formülasyonundan etkin maddenin salım biçimini de kullanılan polimerin tipi ve miktarı belirlemektedir. Hızlı çözünen oral film dozaj formu, ağız içine yerleştirildiğinde saniyeler içinde parçalanma ve içerdiği etkin maddeyi anında ağız boşluğuna verme özelliğine sahip olmalıdır. Bukkal filmlerde kontrollü salım hedefleniyorsa ise etkin madde belirli zaman aralıklarında, belirli hızda ve miktarda salınmalıdır. Kullanılan polimerin çeşidi bu farklılığı belirlemektedir.

Kullanılan polimerlerin taşıması gereken özellikler bazı özellikler vardır (Morales ve McConville, 2011):

- Toksik olmamalıdır.
- Mukoza zararını tahriş etmemelidir.
- Dozaj formunun esnekliğini ve kolay uygulanabilirliğini sağlamalıdır,
- Etkin madde salımına engel teşkil etmemelidir.
- İmpürite içermemelidir.
- Belirgin bir tadı olmamalıdır.
- Islanma ve yayılma özelliği ile dağılma süresi uygun olmalıdır.
- Uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır.

Oral boşlukta kullanılmak üzere tasarlanan film formülasyonlarında kullanılabilecek polimerler Çizelge 1.1’de gösterildiği şekilde sınıflandırılabilir.

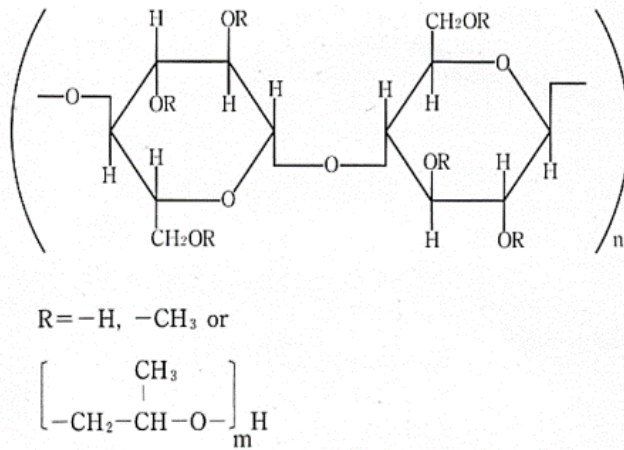
Çizelge 1.1: Oral boşlukta kullanılmak üzere hazırlanan film formülasyonlarında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması

Kriter	Kategori	Örnek
Elde edildiği kaynak	Yarı Sentetik-Doğal	Agar, Kitozan, Jelatin, Pullulan
		Hyaluronik Asit
		Zamlar (Guar, Ksantan, Sodyum aljinat...)
	Sentetik	Selüloz Türevleri (HPMC, MC, CMC...)
		Poliakrilik asit bazlı polimerler (Karbomer, Poliakrilat, Poli(2-hidroksietilmetakrilat))
		Diğer PVP, PVA...
	Katyonik	Aminodekstran, Kitozan,
	Anyonik	CMC, Pektin, İnülin
	Noniyonik	PVA, PVP, HEC
Potansiyel biyoadeziv kuvvetler	Kovalan bağ	Siyanokrilat
	Hidrojen bağı	Akrilatlar, PC, PVA
	Elektrostatik etkileşimler	Kitozan
Suda çözünürlük	Suda çözünen	HEC, HPC, HPMC
	Suda çözünmeyen	Kitozan, EC

Bu çalışmada HPMC (Pharmacoat C600®), PVA ve pullulan polimerleri ile PVA-PEG graft kopolimeri (Kollicoat® Protect) kullanılmıştır.

- Hidroksipropil metil selüloz -HPMC (Pharmacoat C600®):

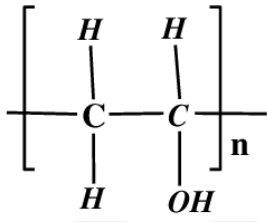
Hidroksipropil metilselüloz (HPMC), selülozun anhidroglikoz terminaline bağlı düşük miktarlarda propilen glikol eter grupları ile modifiye edilen, oral yolla veriliş için tasarlanan formülasyonlarda kullanılan en önemli hidrofilik film oluşturu polimerlerden birisidir (Şekil 1.4). HPMC, kokusuz, tatsız, lifli/granül, serbest akışlı bir tozdur. Gastrointestinal ortamda ve oral mukozada tükürük ortamında çözünürlük özellikleri, esnekliği, stabilitesi, yardımcı maddelerle geçimli olması gibi sebeplerden ötürü sıklıkla tercih edilmektedir (Ghosal ve ark., 2011). Yüksek şişebilirlik özelliği sayesinde etkin maddenin salım kineği üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Su veya biyolojik sıvı ile temas ettikten sonra yayılarak hacim genişmesi ile polimer zincirinin gevşemesi sonucunda etkin maddenin çıkışı sağlanmaktadır (Siepmann ve Peppas, 2012).



Şekil 1.4: HPMC'nin kimyasal yapısı

- Polivinil alkol (PVA):

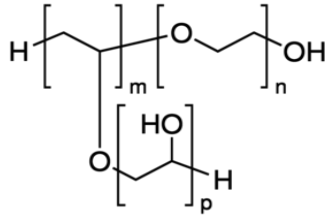
Polivinil alkol (PVA), vinil asetatın polimerleştirilmesiyle elde edilen poli(vinil asetat)'ın hidrolize edilmesiyle üretilmektedir (Şekil 1.5). Hidrolizasyon derecesi, poli(vinil asetat)'ın PVA üretmek için hidrolize edilme derecesini temsil etmektedir. PVA, biyouyumlu, toksik olmayan iyi bir film oluşturuucu polimerdir. Suda çözünür olduğundan dolayı, PVA filmler, organik çözücülere ihtiyaç duyulmaksızın sulu polimer çözeltilerinden, çözücü buharlaştırma yöntemi ile kolayca hazırlanabilmektedir. Elde edilen filmler berrak, homojen ve yırtılmaya karşı dayanıklıdır (Chan ve ark., 1999).



Şekil 1.5: PVA'nın kimyasal yapısı

- Polivinil alkol-polietilen glikol graft kopolimer (Kollicoat® Protect):

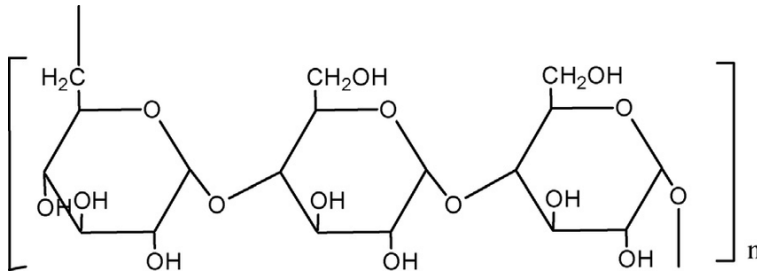
Kollicoat® Protect, suda çözünür Kollicoat® IR ve polivinil alkolün bir kombinasyonudur (Şekil 1.6). Kollicoat® IR ise bir polivinil alkol (PVA) – polietilen glikol (PEG) graft kopolimeridir. İçeriğindeki plastizer sayesinde esnek olmakla beraber formüle edilmesi ve işlenmesi kolaydır. Oda sıcaklığında formülasyonlar oluşturulabilmektedir (Xu ve ark., 2014). Polimerin viskozitesi düşüktür, hidrofiliktir. Kollicoat® Protect, anında salım yapan formülasyonlar için kaplama polimeri olarak ve oral yolla kullanılan film formülasyonlarında film oluşturuucu polimer olarak sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 1.6: Polivinil alkol-poli(etilen glikol) graft kopolimerin kimyasal yapısı

- Pullulan

Pullulan, *Aureobasidium pullulans* gibi kara mayaların fermentasyon ortamından elde edilen, doğal, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, suda çözünabilir özellikte film oluşturu bir polisakkarittir (Şekil 1.7). Film oluşturma derecesi çok iyidir. Pullulan filmler hidrofilik, tatsız, renksiz ve ısıya dayanıklıdır; toksik, immünojenik, mutajenik ve kanserojen değildir; Bu özellikleri ve avantajları nedeni ile pullulan, hem eczacılık hem de gıda sektöründe film oluşturu olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Prajapati ve ark., 2017). Çalışmamızda kullanılan pullulanın % 10 a/a çözeltisinin viskozitesi $100-180 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dir.



Şekil 1.7: Pullulanın kimyasal yapısı

1.1.4.2.3. Plastizerler

Filmlerin formülasyonunda yer alan plastizerler bitmiş ürüne güç, esneklik ve parlaklık kazandırıp, mekanik özelliklerini iyileştirirler (Panda ve ark., 2012). Plastizerin konsantrasyonu iyi bir film elde etmek için etkin madde, polimerler ve

diğer yardımcı maddeler ile optimize edilmelidir. Genel olarak formülasyonda kuru polimer ağırlığının %0-20'si arasında kullanılmaktadır (Bala ve ark., 2013). Bununla birlikte %18 üzerindeki yüksek plastizer konsantrasyonları, stabilite problemlerine veya yapışkan film oluşumuna neden olabilmektedir (Hoffman ve ark., 2011). Yaygın olarak tercih edilen plastizelere ftalat esterleri, fosfat esterleri, stearatlar, polietilen glikol, gliserin, triasetin, dimetil ftalat örnek verilebilir.

1.1.4.2.4. Tat Maskeleyici Ajanlar

Birçok etkin madde hoş olmayan bir tada sahip olduğundan, hasta uyuncu için tat maskeleyici yardımcı maddelerin kullanımı çoğu zaman gereklidir. Filmdeki etkin maddenin (çözülmüş veya dağılmış) fiziksel durumuna ve tükürükteki çözünürlüğüne bağlı olarak, farklı tat maskeleyici teknikleri kullanılabilmektedir. Bu teknik formülasyona sakkarin, aspartam gibi bir tatlandırıcı eklemek olabildiği gibi etkin maddenin kaplanması, enkapsülasyonu, iyon değiştirici reçinelerin kullanımı veya siklodekstrin ile kompleksleştirme gibi daha ileri yöntemler de olabilmektedir (Hoffman ve ark., 2011).

1.1.4.2.5. Aroma Verici Ajanlar

Lezzet algısı, tat ve aromayı birlikte içermekte ve etnik köken, yaş, cinsiyet ve beğeniye bağlı olarak bireyden bireye değişebilmektedir. Nane, portakal ve limon aroması daha çok geriyatrik popülasyon tarafından beğenilirken; karışık meyve, ahududu vb. gibi aromalar daha çok genç jenerasyonlar tarafından tercih edilmektedir. Kullanılan aromanın seçimi, formülasyonda kullanılacak etkin maddenin kullanım amacına da bağlı olabilmektedir (Dixit ve Puthli, 2009).

Aroma verici ajanlar, sentetik uçucu yağlardan, oleoresinlerden, bitkilerin yaprak, meyve ve çiçek gibi çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktlardan

seçilebilmektedir. Tatlandırıcılar tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılabilirler. Nane yağı, tarçın yağı, küçük hindistan cevizi yağı aromatik yağlara örnekken; vanilya, kakao, kahve, çikolata ve narenciye meyveli aromalara örnek teşkil etmektedir. Elma, ahududu, kiraz, ananas meyve esansı tipine birkaç örnektir. Tadı maskeleyerek için gereken aroma miktarı her ne kadar aroma tipine ve gücüne bağılı olarak değışse de oral film formölasyonlarında genel olarak %10 a/a oranında kullanılmaktadır (Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.2.6. Tatlandırıcılar

Tatlandırıcılar, oral film formölasyonlarında önemli bir role sahiptir. Hasta uyuncu açısından özellikle pediatrik popölasyonda formölasyonun tadı daha önemlidir. Film formölasyonlarında doğal ve yapay tatlandırıcılar ürünün tadını iyileştirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Formölasyonlarda tatlandırıcıların genel kullanım aralığı %3-6 a/a'dır (Bala ve ark., 2013). Klasik tatlandırıcı kaynakları dekstroz, fruktoz, glikoz, sıvı glikoz ve maltozdur. Diyabetik hastalarda doğal şeker kullanımı sınırlı olduğundan farmasötik preparatlarda daha çok yapay tatlandırıcılar kullanılmaktadır. Birinci kuşak yapay tatlandırıcılar arasında siklamat ve aspartam bulunurken, ikinci kuşak tatlandırıcılara asesülfam-K, sukraloz, alitam ve neotam örnek verilebilir (Mahboob ve ark., 2016).

1.1.4.2.7. Tükürük Uyarıcı Ajanlar

Tükürük uyarıcı ajanların kullanılmasının amacı, tükürük üretim hızını arttırarak hızlı çözünen oral film formölasyonlarının daha hızlı parçalanmasına yardımcı olmaktır (Hoffman ve ark., 2011). Sitrik asit, malik asit, laktik asit, askorbik asit ve tartarik asit, tükürük uyarıcılardan en çok tercih edilenlerdir. Bu ajanlar tek başlarına ya da film ağırlığının %2 ila 6'sı oranında kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Tatlandırıcılar da tükürük uyarıcı olarak kullanılabilir (Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.2.8. Renklendiriciler

Dozaj formunun hasta tarafından kabul edilebilirliğini arttırmak için filmin aromasıyla renginin uyumlu olması tercih edilmelidir (Panda ve ark., 2012). Titanyum dioksit veya ülkelerin resmi kurumlarınca güvenliği tespit edilerek listelenmiş gıda ve ilaç boyaları %1 oranını geçmeyecek şekilde formülasyonlarda kullanılabilmektedir (Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.2.9. Stabilizatör ve kıvam verici ajanlar

Viskoziteyi ve formülasyonun kıvamını arttırmak için formülasyona stabilizatör ve kıvam artırıcı ajanlar eklenebilmektedir. Bu amaçla ksantan zımkı, karagen gibi doğal zımkılar ağırlıkça %5'e kadar bir oranda oranda kullanılabilmektedir (Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.2.10. Yüzey Aktif Maddeler

Yüzey aktif maddeler çözündürücü, ıslatıcı veya dağıtıcı ajan olarak kullanılabilmektedir. Oral filmlerdeki kullanım amaçları genellikle filmin ısanabilirliğini arttırmaktır (Arya ve ark., 2010). Oral film formülasyonlarında polioksietilen alkil eter (Brij), polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri (Tween) gibi noniyonik yüzey aktif maddeler tercih edilmektedir (Panda ve ark., 2012).

1.1.4.3. Sublingual Filmlerden Etkin Madde Absorpsiyonu

Sublingual terimi kelime anlamı olarak “dilaltı”nı ifade etmektedir. İlacın dilaltı uygulaması, ilacın dilin altına yerleştirilmesi anlamına gelmektedir. Etkin madde, dilin ventral yüzeyi ve ağız tabanından doğrudan kan akımına geçmektedir. Çözünmüş haldeki etkin madde hızlı bir şekilde oral mukozanın altında yer alan

retiküle ven içine absorbe edilmekte ve fasiyal venler, iç juguler ven ve brakiosefalik ven içinden taşınarak daha sonra sistemik dolaşıma geçmektedir (Goswami ve ark., 2008).

İlacın oral mukozadan absorpsiyonunda ana mekanizma, lipoidal membrandan pasif difüzyondur. İlacın dilaltı yoldan absorpsiyonu oral yoldan 3 ila 10 kat daha fazladır. Sublingual yol için tasarlanan formülasyonların oral boşlukta dağılması için az miktarda tükürük hacmi yeterli olmaktadır (Narang ve Sharma, 2011).

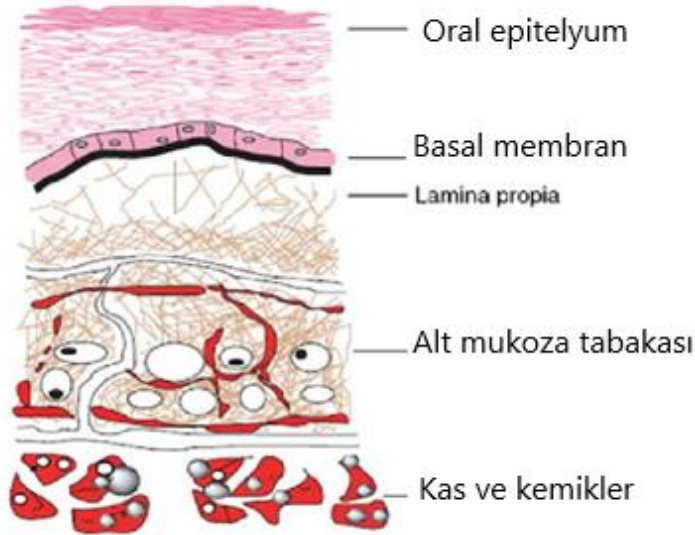
Etkin maddelerin oral mukozadan emilimi 1847 yılında nitrogliserinin kaşifi Sobrero tarafından fark edilmiştir. Sobrero, dilin ucuna yerleştirilen nitrogliserinin birkaç saat süren şiddetli baş ağrısına neden olduğunu gözlemlemiştir. Murrell, sublingual nitrogliserin damlasının anjina pektorisli hastalardaki klinik etkisini 1879 yılında kanıtlamıştır. Walton ve Lacey'in 1935 yılındaki çalışmaları, oral boşluğun verimli bir alternatif etkin madde transport sistemi olduğunu göstermiştir. Tüm bu çalışmaların sağladığı bilgi birikimi ile 1960'ta sublingual nitrogliserin tabletler Amerika Birleşik Devletleri'nde piyasaya sürülmüştür (Goswami ve ark., 2008).

Permeabilite açısından, ağız boşluğunun dilaltı bölgesi, bukkal bölgeden, bukkal bölge ise palatal alandan daha geçirgendir. Geçirgenlikteki farklılıklar genellikle dokuların bağıl kalınlığına, kanlanmaya ve bu dokuların keratinizasyon derecesine bağlıdır. Çeşitli mukoza bölgelerinin geçirgenliğindeki farklılıklara ek olarak, etkin maddenin taşınması, etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinden de etkilenmektedir (Narang ve Sharma, 2011).

1.1.4.3.1. Sublingual Mukoza

Sublingual mukozanın anatomik yapısı

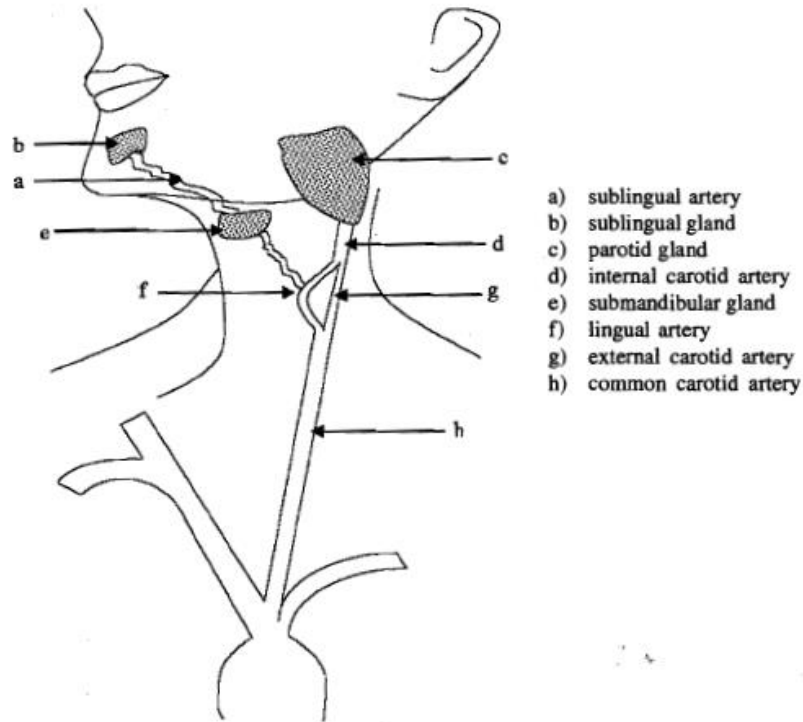
Sublingual mukoza epitel ve bağ doku olmak üzere iki katmandan meydana gelmektedir. Dilaltı epiteli, tabakalı, keratinize olmayan bir skuamöz (pullu) epitel türüdür. Mitotik olarak aktif bazal hücre tabakası birçok değişken ara katmandan yüzeysel tabakaya doğru devam etmektedir. Hücreler bazal tabakadan epitel yüzeyine gelirken, boyut olarak artarken yassılaşmaktadır. Sublingual epitel bukkal epitele göre daha incedir. Sublingual epitel 8-12 hücre tabakasından oluşurken bukkal epitel 40-50 hücre tabakası kalınlığındadır. Epitelin bittiği yer bazal lamina olarak adlandırılmaktadır. Bazal lamina, epitel dokuyu bağ dokuya bağlayan 1-2 μm kalınlığında bir tabakadır. Bağ doku bölgesi, 150-500 μm kalınlığında olup, lamina propria ve submukoza bölgesinden oluşmaktadır (Goswami ve ark., 2008). Lamina propria ise kolajen fibriller, kan damarları ve sinir liflerini içermektedir. Lamina proprianın alt katmanları submukozaya bağlıdır. Submukoza, birkaç yardımcı tükürük bezi içeren nispeten yoğun bağ dokusudur. Şekil 1.8’de görüldüğü gibi epitel dokuda kılcal kan damarları bulunmamasına rağmen bağ dokudaki kılcalların ve küçük kan damarlarının varlığı etkin madde moleküllerinin sublingual mukozadaki bu bölgeye ulaşmasını sağlamaktadır (Naimish ve ark., 2013).



Şekil 1.8: Sublingual mukozanın anatomik yapısı

Sublingual mukozaya kan temini

Dilaltı bölgesi, submukozadaki mukoza yüzeyine paralel uzanan zengin bir kan damarı kaynağı olan çok vasküler bir bölgedir. Şekil 1.9’da görüldüğü gibi dilaltı arter, tükürük bezlerine kan vermektedir ve çevredeki kaslara, ayrıca ağız, dil ve diş etlerinin diğer mukus zarlarına dallanmaktadır (Goswami ve ark., 2008). İki simetrik arter dalı, dilin altındaki çene kemiğinin arkasına doğru hareket etmekte ve bir başka dal da fasiyal arterin alt dalı ile birleşmektedir. Dil altı arteri, dile ve ağız bölgesi tabanına birincil kan beslemesini oluşturan lingual artere dayanmaktadır. Lingual arter dış karotid arterden dallanmaktadır. Bu bölgedeki kan damarları, dilaltı bölgeye, kapiler damarların sadece saç kökleriyle bağlantılı olarak bulunduğu ciltten daha fazla profüzyon sağlamak için bitişik damarlarla birleşerek daha küçük kan damarlarına dallanmaktadır (Goswami ve ark., 2008).



Şekil 1.9: Sublingual bölgedeki kan damarları

Tükürük

Dilaltı bölgesi, dişleri ve mukozal bölgeyi kaplayan tükürük adı verilen bir sıvı filmi ile nemli tutulmaktadır. Tükürük %99 su, %1 organik ve inorganik maddeden oluşan kompleks bir sıvıdır. %1'lik kısmı elektrolitler (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} ve HCO_3^-), mukopolisakkaritler, glikoproteinler, immünglobulinler (IgA, IgG, IgM) ve enzimler (amilaz, müsin, histatin, lizozim, lingual lipaz) oluşturmaktadır (Lam ve ark., 2013)

Tükürük, tükürük bezlerinde üretilip tükürük kanallarına boşaltılmaktadır. İnsan ağız boşluğunda submandibular, parotid ve sublingual olmak üzere üç ana çift tükürük bezi bulunmaktadır. Ayrıca çok sayıda küçük tükürük bezi bulunmaktadır. Tükürüğün pH değeri 6,7-7,4 arasında değişmektedir.

Oral epitel hücreleri mukus adı verilen hücreler arası sıvıyla kaplıdır. Mukus, protein ve karbonhidratlardan oluşan kompleks bir yapıdır. Mukusun ana bileşeni müsinidir. Tükürük müsininin kayganlaştırma, yiyecekleri yumuşatma, besinlerin sindirimine yardımcı olma gibi görevleri vardır. Tükürükte yüksek molekül ağırlıklı müsin (MA >1000 kDa) ve düşük molekül ağırlıklı müsin glikoprotein-2 (MA = 125 kDa) olmak üzere iki çeşidi vardır (Goswami ve ark., 2008).

1.1.4.3.2. Sublingual Mukozanın Permeabilitesi

Keratinize olmayan dilaltı mukozası, stratum korneum gibi keratinize bariyerler ile karşılaştırıldığında, belirgin bir geçirgenlik engeli oluşturmamaktadır. Ancak epitelin yüzeyel tabakaları, dilaltı mukoza boyunca moleküllerin taşınmasında önemli bir engel teşkil etmektedir. Bu bariyer, potansiyel olarak zararlı eksojen bileşiklerin ve etkin maddelerin bu zar boyunca penetrasyonunu sınırlamaktadır.

Dilaltı mukozadaki geçirgenlik bariyeri, "membran kaplama granülleri (MCGs)" denilen hücreler arası bir yapının sonucudur (Şenel ve Hıncal, 1995). Etkin maddenin permeasyonu için epitelin bariyer niteliği, epitelin yüzeysel hücre tabakalarında bulunan MCG'lerin içeriğinin ekstrüzyonuna bağlanmaktadır; dilaltı bölgede MCG'lerde mevcut başlıca lipitler, kolesterol, kolesterol esterleri ve glikosifingolipitlerdir (Goswami ve ark., 2008).

1.1.4.3.3. Etkin Maddenin Sublingual Mukozadan Permeasyon Mekanizmaları

Dilaltı yolla uygulanan dozaj formlarındaki etkin maddelerin çoğunun basit difüzyonla emildiğine dair kanıtlar mevcuttur (Narang ve Sharma, 2011). Basit difüzyonun yanı sıra kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport, pinositoz ve fagositoz da gözlemlenebilmektedir. Ancak oral mukozanın katmanlı yapısı nedeniyle fagositoz ve pinositoz önemli bir rol oynamamaktadır (Goswami ve ark., 2008). Günümüze kadar, glukoz, glutatyon gibi küçük moleküllerin, ağız mukozası boyunca taşıyıcı aracılı taşınımı konusunda elde edilen bilgiler sınırlıdır. İnsan dilaltı hücre hattında p-glikoprotein dışa atım (efflux) taşıyıcısının varlığı üzerine tahminlerde bulunmuştur. Bununla birlikte, dilaltı mukozasında bu gibi taşıyıcı aracılı transportun varlığını kanıtlamak için kesin bir çalışma veya veri sunulmamıştır. Araştırmaların çoğu dilaltı bariyeri boyunca ana transport mekanizması olarak pasif difüzyonu işaret etmektedir (Patel ve ark., 2011).

Sublingual mukozadan ilaç etkin maddelerinin transportu lipoidal yolak ve sulu yolak olmak üzere başlıca iki transport yolağından gerçekleşmektedir. Hücreler arası boşlukta bulunan MCG'lerden salınan lipit ve glikolipit içeriği, epitel hücrelerinin kohezyonunu sağlamaktadır. İnterselüler boşluk %50 oranında fosfolipit ve glikozilseramid gibi polar lipitlerle doludur. Lipoidal veya nonpolar yol hem interselüler hem de transselüler taşımayı içermektedir. Su molekülleri, hücreler arasındaki lipitler arasındaki polar başlar tarafından tutulduğundan, sulu veya polar

yol da permeasyona uğrayan etkin madde için kullanılabilir bir yoldur. Bu nedenle bu yol aynı zamanda paraselüler yol olarak da adlandırılmaktadır. Permeasyona uğrayan bir molekül bu sulu kanallar vasıtasıyla bariyeri geçebilmektedir. Bu durumlarda transport davranışı, maddenin kanal içindeki difüzivitesine bağlıdır. Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri, etkin maddenin sublingual permeasyonunun hangi yol gerçekleşeceğinin belirleyicisidir. Etkin maddenin, sublingual mukoza ya da herhangi bir biyolojik bariyer içindeki transport mekanizmasını anlamak için hangi rotadan gideceğini iyi analiz etmek gerekmektedir. Çünkü etkin maddenin permeasyon yolunu anlamak, ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında ve permeasyon arttırıcı ajanların seçiminde bir temel oluşturmaktadır. Bir etkin maddenin noniyonize formunun, pH partiyon hipotezine göre, baskın olarak lipit biyolojik membranlardan geçirgenliği iyonik türlerden daha büyüktür (Wang ve Chang, 2014).

1.1.4.3.4. Sublingual Absorpsiyona Etki Eden Faktörler

Etkin maddenin lipofilitesi: Bir etkin maddenin dilaltı yoldan pasif permeasyon ile tamamen absorpsiyonu için, GI absorpsiyon için gerekli olandan biraz daha yüksek lipit çözünürlüğüne sahip olması gerekmektedir (Narang ve Sharma, 2011).

Tükürük ortamında çözünürlük: Yüksek lipit çözünürlüğüne ek olarak, etkin maddenin sulu bukkal sıvılarda da çözünür olması gerekir, yani absorpsiyon için bifazik çözünürlük gerekmektedir (Narang ve Sharma, 2011).

Tükürüğün pH'ı ve pKa'sı: Tükürüğün ortalama pH'sı 6,7-7,4 aralığında olduğu için, bu pH'da noniyonize formda kalan etkin maddelerin absorpsiyonunu kolaylaştırır. Buna göre oral mukoza yoluyla absorpsiyon için pKa değerinin asitler için 2'den büyük ve bazlar için 10'dan az olması gerekmektedir (Narang ve Sharma, 2011).

Oral mukozaya bağlanma: Oral mukozaya bağlanan ilaçların sistemik dolaşıma geçme oranı düşüktür (Narang ve Sharma, 2011).

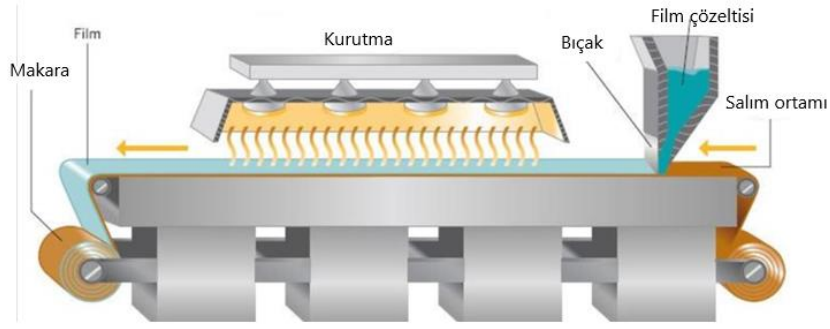
Oral epitel kalınlığı: Dilaltı epiteli kalınlığı bukkal kalınlığa göre daha düşük (100-200 μm) olduğundan etkin maddenin absorpsiyonu, daha ince epitel ve daha küçük tükürük hacminde bulunması nedeniyle daha hızlıdır (Narang ve Sharma, 2011; Patel ve ark., 2011).

Yağ/su partisyon katsayısı: Dilaltı absorpsiyon için etkin maddelerin yağ/su partisyon katsayısının 40-2 000 aralığı ideal kabul edilmektedir (Narang ve Sharma, 2011).

1.1.4.4. Sublingual filmlerin hazırlanma yöntemleri

1.1.4.4.1. Çözücü Buharlaştırma / Çözücü Döküm Kalıbı Yöntemi (Solvent Casting)

Bu yöntemin işlem basamakları sırasıyla şu şekildedir: Önce etkin madde, film yapıcı polimer ve çeşitli yardımcı maddeler kullanılarak döküm çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan çözelti havadan yani kabarcıklardan arındırılır. Daha sonra uygun miktardaki çözelti uygun büyüklükte bir kalıba (genellikle petri kabı) aktarılır. Döküm çözeltisi oda sıcaklığında veya bir etüv içinde kurutulur. İstenen etkin madde miktarını içerecek şekilde nihai dozaj biçimi kesilir. Elde edilen film uygun bir şekilde paketlenir (Morales ve McConville, 2011). Bu işlem manuel olarak veya Şekil 1.10'da görüldüğü gibi bir cihaz yardımıyla yapılabilir.



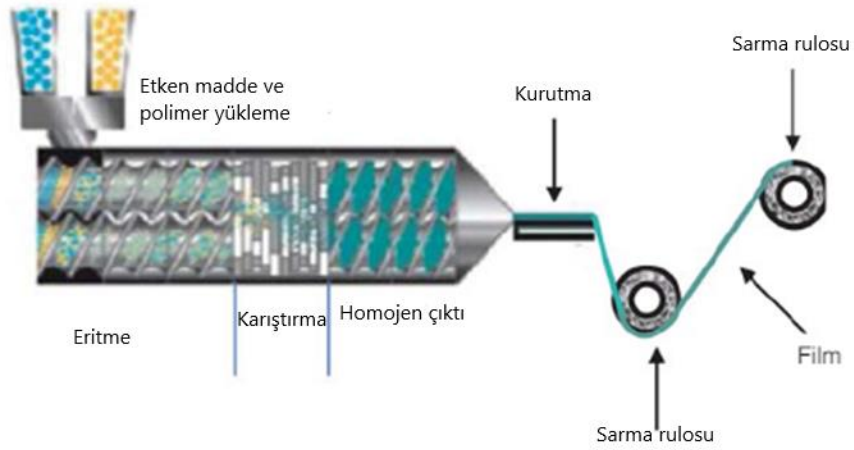
Şekil 1.10: Çözücü buharlaştırma tekniği ile çalışan film oluşturuu cihaz

Çözücünün seçimi genellikle etkin maddeye bağı olarak değişmektedir. Tercihen ICH Sınıf-3 kategorisinden olan solventler tercih edilmelidir (Dixit ve Puthli, 2009). Etkin maddenin reolojik özellikleri, ısıya duyarlılığı, polimorfik formu, çözücü ile uyumu dikkatlice incelenmelidir (Amin ve ark., 2015). Aynı şekilde yardımcı maddelerin seçiminde de etkin madde ve çözücünün özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Göz önünde bulundurulması gereken başlıca faktörler viskozite, çözelti kütlesi ve içerik tekdüzeliğidir. Çözücü döküm kalıbı yöntemi diğer yöntemlere göre daha kolay ve düşük maliyetlidir.

Birçok araştırmacı çözücü buharlaştırma yöntemini film üretim yöntemi olarak seçmiştir. Bala ve ark., (2013) apremitantın sublingual filmini, polimer olarak doğal bir polisakkarit olan pullulan ve polietilen glikol 400 (PEG400) kullanarak çözücü döküm kalıbı yöntemi ile hazırlamışlardır. Başka bir çalışmada Mashru ve ark., (2005) salbutamol sülfat etkin maddesinin astım hastalığında kullanılmak üzere sublingual filmini hazırlamışlardır. Bu çalışmada polimer olarak polivinil alkol, plastizer olarak gliserol ve dolgu maddesi olarak mannitol kullanılarak, mekanik özellikleri ve etkin madde salımı göz önünde bulundurularak, çözücü döküm kalıbı yöntemi ile farklı formülasyonlar üretilmiştir.

1.1.4.4.2. Sıcakta Eriterek Ekstrüzyon (Hot-Melt Extrusion)

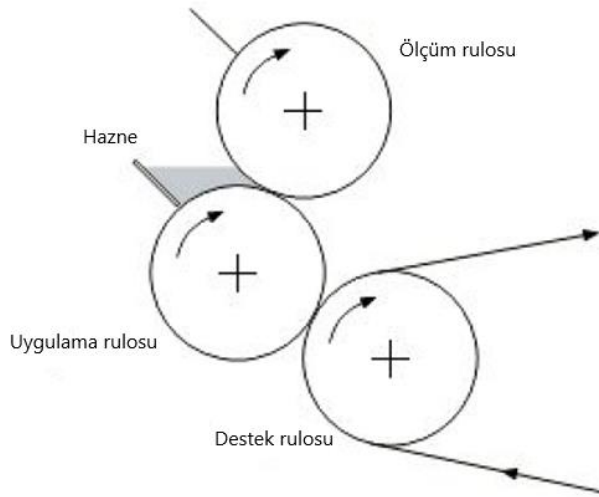
Sıcak eriyik ekstrüzyon yönteminde ilk önce etkin madde veya maddeler taşıyıcı ile katı halde karıştırılır. Daha sonra ısıtıcısı olan ekstruder karışımı eritir. Eriyen karışım cihazın kalıbı yardımı ile şekillendirilir (Şekil 1.11). Bu yöntem basittir, su kullanılmasına gerek yoktur ve iyi bir içerik tekdüzeliği sağlamaktadır. Ancak ısıdan etkilenen etkin maddeler için uygun değildir (Arya ve ark., 2010). Sıcakta eritme ile ekstrüzyon, kontrollü salım yapan matris tabletlerin, granüllerin ve ağızda dağılan filmlerin üretimi için kullanılmıştır. Bununla birlikte mukoadesiv bukkal filmlerin üretimi için kullanılması sadece birkaç ürün için olmuştur (Morales ve McConville, 2011).



Şekil 1.11: Sıcakta eritmeli ekstrüder cihazı

1.1.4.4.3. Silindir Yöntemi (Rolling Method)

Bu yöntemde, etkin maddenin film oluşturu polimer ile hazırlanan çözeltisi veya süspansiyonu dönen silindirler üzerine dökülür. Çözelti veya süspansiyon belirli reolojik karakterlere sahip olmalıdır. Çözücü esas olarak sudur veya bir su-alkol karışımıdır. Film silindirler üzerinde kurutulduktan sonra istenilen boyutlarda kesilir (Panda ve ark., 2012) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12: Silindir yöntemi

1.1.4.4. Püskürtme Yöntemi

Film oluşturuucu polimer ve diğer yardımcı maddeleri içeren bir çözücü sistemi uygun taşıyıcı bir malzeme üzerine püskürtülerek veya kaplanarak kurutulur ve bir film elde etmek için sıyrılır. Film için kullanılan taşıyıcı malzemeler cam, kraft kağıdı veya polietilen film gibi malzemeler olabilmektedir (Panda ve ark., 2012).

1.1.4.5. Sublingual Filmlerin Karakterizasyonu

Film formülasyonlarının geliştirilmesi ve bitmiş ürün olarak karakterizasyonu için aşağıda verilen kalite kontrol testleri uygulanmaktadır.

1.1.4.5.1. Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliği

Filmlerin kalınlığını ölçmek için mikrometre kullanılmaktadır. Üretilen total filmin farklı bölgelerinden alınan film örneklerinin ölçülmesi, filmin kalınlık tekdüzeliğinin belirlenmesi açısından önemlidir.

Filmin ağırlık tekdüzeliğini belirlemek için ise her bir partiden 3 cm² çapında üç filmin ağırlığı tek tek elektronik terazide tartılarak ortalama ağırlık hesaplanacaktır (Li ve ark., 2017).

1.1.4.5.2. İçerik Tekdüzeliği

Farmakopelerde belirtildiği şekilde filmin içerdiği etkin maddenin miktar tayini yapılır. İçerik tekdüzeliği sınırı %85-115'tir (Bala ve ark., 2013).

1.1.4.5.3. Formülasyon Parametreleri

Oral boşluğa uygulanacak bir film oluşturulurken kullanılan polimerlerin molekül ağırlığı, hidrofilik özellikleri, bağ özellikleri, zincir esneklikleri, mukus tabakasına yayılmaya elverişli yüzey enerjisi (mukoadeziv özellikleri), elektriksel yükleri, suda çözünürlükleri gibi parametreler gözönüne alınarak farklı polimerler ve farklı polimer oranları ile filmlerin hazırlanıp etkin madde salımı ve permeasyon yetenekleri değerlendirilmelidir. Kullanılan polimerlerin nontoksik olması, etkin maddenin dozaj formundan salımına engel olmaması, mukozayı tahriş etmemesi, dozaj formunun esnekliğini ve konforunu sağlaması istenen özelliklerdendir (Morales ve McConville, 2011).

Film formülasyonlarında yer alan plastizerler, bitmiş film ürününe güç, esneklik ve parlaklık kazandırdıklarından, iyi bir film elde etmek için plastizerlerin konsantrasyonunun, etkin madde, polimerler ve diğer yardımcı maddeler varlığında optimize edilmesi gerekmektedir (Panda ve ark., 2012).

1.1.4.5.4. Katlanma Dayanımı (Folding Endurance)

Katlanma dayanıklılığı, bir filmin mekanik özelliklerini tahmin etmek için kullanılan bir prosedürdür. Film aynı noktaya denk gelecek şekilde tekrar tekrar katlanır. Filmin aynı yerden kırılmadan katlanma sayısı, katlanma dayanımı değerini vermektedir.

Yüksek katlanma dayanımı değeri, bir filmin mekanik gücünü göstermektedir. Film formülasyonunda kullanılan plastizer oranı filmin mekanik özelliklerini, dolayısıyla katlanma dayanımı değerini etkilemektedir (Irfan ve ark., 2016).

1.1.4.5.5. Filmlerin Mekanik Özellikleri

Gerilme direnci (Tensile strength)

Bir filme çekme kuvveti uygulandığında kırıldığı veya kalıcı deformasyonun meydana geldiği anda uygulanan kuvvettir (Eşitlik 1.1). Filmde kusur oluşmadan önce maruz kalabileceği maksimum gerilim stresi olarak da tanımlanabilmektedir (Dixit ve Puthli, 2009).

$$\text{Gerilme direnci} = \frac{\text{Kırılma Anındaki Kuvvet}}{\text{Film kalınlığı} \times \text{Film Genişliği}} \quad (\text{Eşitlik 1.1})$$

Gerilme Yüzdesi

Bir filme kuvvet uygulandıktan sonra, filmin esnemesi gerinim olarak adlandırılmaktadır. Gerinim yüzdesi film örneğinin boyundaki uzamanın

başlangıçtaki uzunluğuna bölünmesiyle elde edilmektedir (Bala ve ark., 2013; Dixit ve Puthli, 2009). Yüzde uzama, film formülasyonunda kullanılan plastizer miktarı ile orantılıdır. Genellikle film formülasyonunda plastizer konsantrasyonunun artması, filmin uzamasında artışa neden olmaktadır. Gerinim yüzdesi aşağıdaki formül ile belirlenmektedir (Eşitlik 1.2):

$$\% Gerinim = \frac{\text{Filmin boyundaki uzama} \times 100}{\text{Filmin başlangıç uzunluğu}} \quad (\text{Eşitlik 1.2})$$

Yırtılma direnci

Bir filmin yırtılması için gereken maksimum kuvvet, yırtılma direnci değeri olarak ölçülmektedir. Bir filmin yırtılma direnci genellikle gerilme-gerinim eğrilerinden elde edilmektedir, ancak bu değerin elde edilebilmesi için çok düşük bir yükleme hızı uygulanmaktadır (Morales ve McConville, 2011).

Elastik modül (Young Modulus)

Young modülü, filmin sertliğinin bir ölçütüdür (Irfan ve ark., 2016). Aynı zamanda filmin elastik bölgede nasıl deforme olduğunu gösteren bir değerlendirmedir. Deformasyonun başlangıçtaki elastik fazında tanımlanmaktadır. Uygulanan gerilme ve karşılık gelen gerinim oranından elde edilmektedir (Morales ve McConville, 2011) (Eşitlik 1.3).

$$\text{Young modülü} = \frac{\text{Eğim} \times 100}{\text{Kalınlık} \times \text{Çapraz Kafa Hızı}} \quad (\text{Eşitlik 1.3})$$

1.1.4.5.6. Dağılma Zamanı

Dağılma zamanı, filmin kırılmaya ya da parçalanmaya başladığı zaman olarak tanımlanabilmektedir. Bu süre filmlerin formülasyonuna, kullanılan polimerin ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özelliklerine göre değişmektedir. Oral filmlerin dağılma zamanını ölçmek için farmakopelerde özel bir kılavuz bulunmamakla birlikte petri kabı metodu, “slide frame” metodu gibi yöntemler veya USP’de yer alan dağılma aparatı kullanılarak ölçülebilmektedir. Ağızda dağılan tabletlerin FDA’ya göre 30sn’den kısa sürede, Avrupa Farmakopesi 9.1’e göre 3 dk’dan kısa sürede dağılması gerektiği, bu sürenin oral filmler için de geçerli olabileceği bildirilmiştir (Cilurzo ve ark., 2018; Dixit ve Puthli, 2009).

1.1.4.5.7. İn vitro çözünme ve salım çalışmaları

Farmakopelerdeki standart sepet veya palet yöntemi kullanılmaktadır. Çözünme ortamının seçimi sink koşula ve etkin maddenin dozuna bağlı olarak değişebilmektedir. Çözünme ortamı tükürük ortamı veya su olabilmektedir. Ortam sıcaklığı genellikle $37 \pm 0,5$ °C olarak belirlenmektedir (Bala ve ark., 2013; Lai ve ark., 2018).

1.1.4.5.8. İn vitro permeasyon çalışmaları

Oral mukozanın geçirgenliği, ciltten 4-1000 kat fazla olmasına rağmen film formülasyonlarının permeasyon çalışmaları yapılmalıdır (Bala ve ark., 2013). Bu amaçla Franz difüzyon hücreleri sıklıkla kullanılsa da farklı deneysel çalışmalar yapılabilmektedir. Permeasyon oranını belirlemek için hayvanların taze çıkarılmış bukkal/sublingual mukozaları kullanılabildiği gibi yapay membranlardan da faydalanılabilmektedir. Her ne kadar yapay membranlar, yüksek yapısal homojenlik ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlasa da hayvanlardan elde edilen bukkal mukozadaki gibi tabakalı bir nonkeratinize epitel bulunmadığından fizyolojik koşulları taklit

etmede yetersiz kalmaktadır. Kullanılabilirlik, kalınlık ve geçirgenlik özellikleri açısından, domuz mukozasının en uygun hayvan modeli olduğu görülmekte ve literatürde geniş bir şekilde gösterilmektedir (Bala ve ark., 2013; Morales ve McConville, 2011). Bu çalışmalarda sıcaklık, reseptör ve döner ortamın bileşimi, pH, hücre boyutları ve hidrodinamik koşullar gibi parametreler kontrol altında tutulmalıdır. Permeabilite değeri Eşitlik 1.4 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$P = \frac{\frac{dQ}{dt}}{(AC_s)} \quad (\text{Eşitlik 1.4})$$

P: Permeabilite katsayısı, (cm sa⁻¹)

dQ/dt: Penetrasyon eğrisinin düz kısmının eğimi (µg sa⁻¹)

A: Yüzey alanı , (cm²)

C_s: Donör fazdaki etkin maddenin doygunluk konsantrasyonu (mg cm⁻³)

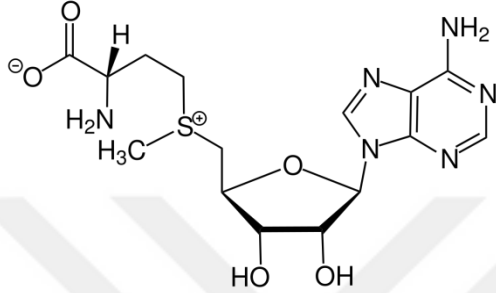
1.1.4.5.9. Organoleptik kontroller

Final ürünün tadı, geniş bir popülasyon kitlesi için kabul edilebilir, lezzet özelliklerine sahip olmalıdır. Tat kontrolü amacı ile özel kontrollü insan tat panelleri kullanılmaktadır (Dixit ve Puthli, 2009).

1.2. S-Adenozil-L-Metiyonin (SAME)

S-Adenozil-L-Metiyonin (SAME), yapısal olarak esansiyel aminoasit metiyonin ve adenzin trifosfattan, adenziltransferaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile meydana gelmektedir (Şekil 1.13). Genel olarak SAME, AdoMet, SAM olarak adlandırılmaktadır. SAME, 1952 yılında Giulio Leonardo Cantoni tarafından keşfedilmiştir. Endojen bir madde olarak her canlı hücrede

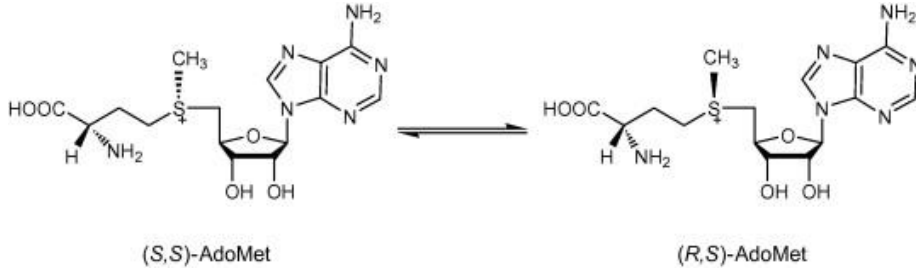
bulunmakta ve metiltransferaz enzimleri ile katalize edilen, birçok farklı reaksiyonda metil gruplarının donörü (transmetilasyon) olarak görev yapmaktadır. Ayrıca SAME, poliaminlerin sentezini yönlendiren transaminopropilasyon yolağında ve glutatyon sentezini yönlendiren transsülfürasyon yolağında öncü molekül olarak da rol oynamaktadır (Huber ve ark., 2016).



Şekil 1.13: SAME'nin moleküler yapısı

1.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri

SAME'nin kapalı formülü $C_{15}H_{22}N_6O_5S^+$ 'tir. IUPAC okunuşu: (2S)-2-amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopürin-9-il)-3,4-dihidroksoksolan-2-il]metil-metilsülfonio]bütnoat şeklindedir. SAME'nin kendisi iki stereoizomer (S, S)-SAME ve (R, S)-SAME şeklinde bulunur. Sülfonyum merkezindeki kiralite biyolojik aktivite için önemli bir belirleyicidir. (S, S) enansiyomeri, biyolojik olarak aktif form iken (R, S) formu inaktiftir. İzole edildikten veya hazırlandıktan sonra, (S, S)-AdoMet kendiliğinden aktif olmayan (R, S)-AdoMet'e dönüşmektedir (Zhang ve Klinman, 2015) (Şekil 1.14). SAME'nin bazı önemli fizikokimyasal özellikleri Tablo 1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 1.14: SAME'nin rasemizasyonu

Çizelge 1.2: SAME'nin fizikokimyasal özellikleri

Kapalı formül	$C_{15}H_{22}N_6O_5S$
Sudaki çözünürlük	1,19 mg/ml
Kaynama noktası	78 °C
Partisyon katsayısı	-2 ve -5,3
Fizyolojik net yük	+1
pK _a	1,71
pK _b	9,41
Yarılma ömrü	100 dk
Refraktivite	93,23 m ³ .mol ⁻¹

1.2.2. Same'nin Metabolizması ve Fonksiyonları

SAME doğal formunda stabil olmadığından ve çok hızlı degrade olduğundan, moleküler yapısı 1952 yılında keşfedilmiş olmasına rağmen 1973 yılına kadar herhangi bir klinik çalışması bulunmamaktadır. SAME'nin klinik uygulamasına doğru atılan en kritik adım, ürünün raf ömrü boyunca üstün kalitede yeterli stabilite sağlayan tuzların geliştirilmesidir. Bu üstün kalitenin spesifik yönleri, bileşiğin daha iyi stabilitesini, daha az bozunmayı, oral uygulamadan sonra yeterli absorpsiyonu ve hedeflenen organlara yeterli penetrasyonudur. Farmasötik formülasyonlarında

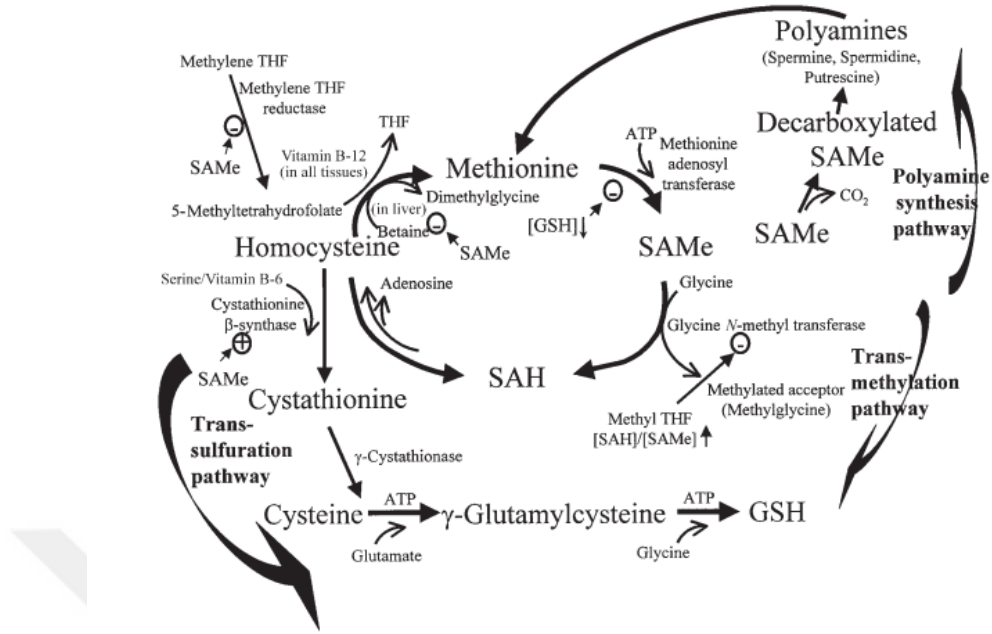
kullanılan stabil tuz formları, tosilat disülfat, toluen sülfonat ve 1,4-bütan disülfonat tuzlarıdır. SAME'nin klinik endikasyonları arasında depresyon, osteoartrit, ağrı, demans ve kronik karaciğer hastalıkları bulunmaktadır.

SAME nükleik asitlerin ve poliaminlerin metabolizması, membranların yapısı ve işlevi ve glutatyonun öncüsü olarak temel öneme sahiptir. SAME'nin önemi, metil donörü olmasından ve aminopropil grupları ile karaciğerdeki glutatyonun öncülü olmasından kaynaklanmaktadır. Çeşitli patolojik durumlar esnasında bu süreçler genellikle ciddi şekilde değiştirilebilmekte, ancak basitçe metiyonin uygulanarak düzeltilmemektedir. Örneğin, metiyonini SAME'ye aktive eden enzimin bozulmasına bağlı karaciğer hastalığında, metiyonin takviyesi yetersizdir ve kullanılmadığından dolayı biriktiği için toksik hale gelebilmektedir. Bu nedenle, enzim aktivasyonundaki eksiklik gözardı edilerek ilk başta SAME eksikliği giderilerek tedavi gerçekleştirilmelidir (Lieber ve Packer, 2002).

SAME, bağlı karbonların her birini nükleofilik atağa doğru harekete geçiren yüksek enerjili bir sülfonyum iyonu içerir. Bu iyon, SAME'ye, üç ana reaksiyon tipine katılma yeteneği vermektedir: transmetilasyon, transülfürasyon ve transaminopropilasyon. Transmetilasyon reaksiyonlarında, SAME öncelikle nükleik asitler, proteinler, fosfolipitler ve biyolojik aminler dahil olmak üzere çeşitli alıcılara evrensel metil donörü olarak görev yapmaktadır. Her ne kadar spesifik bir enzim bu reaksiyonların her birini katalize etse de tüm metilasyon reaksiyonlarının ortak ürünü S-adenosilhomosisteindir (SAH) (Şekil 1.15). SAME'ye bağlı metilasyon reaksiyonlarının çoğu, SAH'daki artışlar ve SAME konsantrasyonlarında azalma ile kuvvetli bir şekilde inhibe edilir. Bu nedenle, SAH'ın S-adenosilhomosistein hidrolaz enzimi ile homosistein ve adenosine hidrolize edilmesi gerekmektedir. Bu hidrolizin, SAH sentezini destekleyen, tersinir bir reaksiyon olsa da in vivo olarak reaksiyon, sadece ürünler, adenosin ve homosistein, hızlı bir şekilde çıkarıldığında hidroliz yönünde ilerlemektedir (Mato ve ark., 1997).

Homosisteini metabolize eden 2 yol vardır: remetilasyon ve transsülfürasyon (Şekil 1.15). Remetilasyon yolunda, homosistein, N-5 metiltetrahidrofolattan veya betainden metiyonini yeniden oluşturmak için bir metil grubu elde etmektedir. Betain ile reaksiyon, esas olarak karaciğerde meydana gelir ve insanlarda homosisteinin genel metabolizması için küçük önem taşımaktadır. N-5 metiltetrahidrofolat ile reaksiyon ise tüm dokularda meydana gelir ve B-12 vitaminine bağlıdır. Karaciğerle sınırlı olan betain ile reaksiyon, B-12 vitamininden bağımsız bir reaksiyondur. Transsülfürasyon yolağında homosistein serinle birleşerek sistatyonini oluşturur. Bu reaksiyon, kofaktör olarak B-6 vitamininin varlığında, sistatyonin β -sentetaz tarafından katalize edilen geri dönüşümsüz bir reaksiyondur. Sistatyonin, sistein ve α -ketobütirat oluşturmak üzere γ -sistatyonaz ile hidrolize edilir. Sistein, memeli organizmalarında primer endojen hücresel antioksidan savunma molekülü olan tripeptit glutatyonunu oluşturmak için 2 ardışık reaksiyonla glutamat ve glisin ile reaksiyona girer. Poliaminlerin sentezi için SAM propilamin grubunun transferi bu molekülün bir başka önemli işlevidir. Bu yolda, SAME, SAME dekarboksilaz tarafından dekarboksilatlanır ve aminopropil grubu, önce putresinine, sonra da spermidine, poliaminler oluşturmak üzere transfer edilir. Normal koşullar altında, bu yol mevcut SAME' nin %5'ini oluşturmaz, ancak bu yüzde karaciğer rejenerasyonunda olduğu gibi, artan poliamin sentezi koşulları altında belirgin şekilde artar (Lieber ve Packer, 2002).

SAME enzim aktivitelerinin bir düzenleyicisi olup remetilasyon ve transsülfürasyon yollarını koordine etmektedir. SAME, metilen tetrahidrofolateredüktazın allosterik bir inhibitörü ve bir sistatyonin β -sentetaz aktivatörü olarak görev yapmaktadır. Bu şekilde SAME, remetilasyon reaksiyonları için gerekli olan önemli bir substrat olan N-5-metiltetrahidrofolatın sentezini baskılayıp, transsülfürasyonun başlangıç reaksiyonunu destekler. Bu nedenle, hücre içi SAME konsantrasyonu, homosisteinin vücuttaki akibetinin önemli bir belirleyicisidir (Lieber ve Packer, 2002).



Şekil 1.15: SAMe'nin biyosentezi ve metabolik yolları (THF, tetrahidrofolat; GSH, glutatyon; SAH, S-adenozilhomosistein)

Birçok çalışma, major depresif bozukluğa (MDB) sahip birçok hastanın tek karbon metabolizmasında düzensizlik olduğunu göstermektedir. SAMe, homosistein ve 5-metilen tetrahidrofolat (5MTHF) ile sentezlendiğinden ve folatın metabolik bir ürünü olduğundan dolayı uzun zamandır tek karbon döngüsünün son ürünlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Levkovitz ve ark., 2012). Depresyon, demans, alkolizm, epilepsi ve organik psikoz gibi çeşitli psikiyatrik hastalıklar, düşük düzeyde folat seviyeleri ile korelasyon göstermektedir. Daha ciddi afektif hastalık ve kötü tedavi cevabı, düşük folat seviyeleri ile ilişkilidir. Folat takviyesi depresyonun iyileşmesini hızlandırmakta ve güçlendirmektedir. Vitamin B12 ve folatın (vitamin B9) herhangi birinin eksikliği ise vücutta SAMe düzeylerini de azaltmaktadır (Kagan ve ark., 1990).

Asetilkolin, serotonin, norepinefrin ve dopamin dahil olmak üzere MDB'de bilişsel işlev bozukluğunun patofizyolojisi ve tedavisinde yer alan çeşitli nörotransmitterlerin sentezi ve bakımı için SAMe'nin gerekli olduğu ileri

sürülmektedir. Örneğin, SAME merkezi sinir sistemi kolin düzeylerinin korunmasında önemli bir faktördür. Önemli bir nörotransmitter olan asetilkolinin bir öncüsü olan kolin, beyinden net akışa uğramaktadır. Bu akış N-metil nikotinamid tarafından engellenebilir. SAME bağımlı metilasyon ile N-metil nikotinamid oluşturulduğundan SAME, N-metil nikotinamidin oluşum hızını etkileyerek MSS'deki asetilkolin konsantrasyonunu dolaylı olarak düzenleyebilmektedir (Levkovitz ve ark., 2012). Paralel olarak, SAME ile yapılan tedavinin, beyin muskarinik reseptör konsantrasyonlarında in vitro bir artışa neden olduğu gösterilmektedir (Levkovitz ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada ise, SAME öncüsü olan metiyoninin tek büyük oral dozlarının (10-20 g) uygulanması, "kronik şizofren" tanısı alan hastaların %40-%50'sinde akut psikoza neden olduğu görülmüştür (Fava ve Davidson, 1996). Bu metiyonin çalışmaları, çeşitli halüsinojenlerin kimyasal yapılarının metillenmiş nörotransmitterlerinkilere benzediği ve şizofreninin aşırı aktif bir metilasyon sistemine bağlı olabileceği hipotezinin ilham almıştır (Kagan ve ark., 1990). Metiyoninin ana hücrel metil donör olarak işlev görmesi için, önce S-adenosilmetiyonine aktive edilmesi gerekmektedir (Lieber ve Packer, 2002).

SAME'nin MDB'de bilinci etkileyebileceği alternatif bir çalışma Alzheimer demans hastalarının tedavisidir. Fare denekler kullanılarak yapılan bu çalışmada, SAME'nin hastalarda oksidatif hasarı ve bilişsel bozukluğu önleyebildiğinin gözlemlenmesi, tedavide terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir (Tchantchou ve ark., 2006).

Yayınlanmış farklı klinik çalışmalarda, parenteral (intravenöz veya intramüsküler) SAME'nin plasebodan üstün olduğu ve trisiklik antidepresanlar kadar etkili olduğu gösterilmiştir (Mischoulon ve Fava, 2002). Oral SAME'nin de denekler üzerinde, trisiklik antidepresanlarınkine benzer ve plasebodan üstün olduğu, 800

ile 1600 mg/gün arasındaki dozlarda etkili olduğu gözlenmiştir (Spillmann ve Fava, 1996). Bununla birlikte, bazı çalışmalar, erken oral SAME preparatlarının çözünmesi ve stabilitesi ile ilgili problemler nedeniyle belirsiz sonuçlar elde edilmiştir (Spillmann ve Fava, 1996).

Diğer antidepresanlar etkisini 4-8 hafta gibi bir sürede gösterirken SAME kullanıldığında bu süre 2 haftaya kadar düşmektedir (McMillan ve ark., 2005). Yapılan klinik çalışmalarda SAME ve olası metabolitlerinin toksik olmadığı kanıtlanmıştır. Ayrıca çocuklarda ve hamilelerde yapılan az sayıda çalışmada güvenilir olduğu bulunmuştur (Mischoulon ve Fava, 2002; Papakostas, 2009). SAME, oral alımdan sonra ince bağırsakta duodenumdan absorbe olmaktadır; fakat düşük permeabiliteye sahiptir. Mutlak biyoyararlanımı %1 civarındadır. Bunun nedeni olarak düşük permeabilitesi yanısıra karaciğerde yüksek ilk geçiş etkisine uğraması gösterilmektedir (McMillan ve ark., 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril (HPLC grade)	Sigma Aldrich
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck
Gantrez	Sigma Aldrich
Gliserin	Riedel-de Haën
Heptanosulfonik asit sodyum tuzu	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit (%37 a/h)	Riedel de Haën
Hidroklorik asit	Merck
İnülin	Sigma Aldrich
Kollicoat® Protect	BASF
Metanol	Sigma Aldrich
Pharmacoat C606®	Sigma Aldrich
Potasyum hidroksit	Merck
Potasyum fosfat monobazik	Daejung
Propilen glikol	Sigma Aldrich
Pullulan USP-NP	Hayashibara
PAA	Sigma Aldrich
PVA	Sigma Aldrich
S- adenzil L-metiyonin 1,4 butandisülfonat	Carbosynth NA
Sitrik asit	Sigma Aldrich
Sodyum fosfat dibazik	Fluka
Sodyum fosfat monobazik	Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Merck

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Araçlar

Cam petri	Interlab, Türkiye
Dağılma test cihazı	Manesty, Slovenya
Diferansiyel tarama kalorimetresi	Shimadzu DSC- 6 0, Japonya
Dissolüsyon cihazı	Agilent 708-DS, ABD
Diyaliz membran	Sigma Aldrich, Almanya
Hassas terazi	Sartorius BL 2 10S, Almanya
HPLC kolonu Kinetex® 2.6 µm Biphenyl 100 Å LC	Phenomenex, ABD
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Membran filtre (Selüloz asetat 0,45 µm)	Sartorius, Almanya
Mikrometre	NSK, Japonya
Mikropipet	Rainin, Almanya
Nem ölçer	Ohaus, MB 45, İsviçre
pH metre	Mettler Toledo S - 2 0K, İsviçre
Polistiren petri	Interlab, Türkiye
Rodak petri	Interlab, Türkiye
SEM	Zeis-Evo-40, USA
Spektrofotometre küveti	Hellma, Almanya
Tekstür analiz cihazı	TA.XT, Stable, İngiltere
UV spektrofotometre	Agilent Cary 60, ABD
Vakumlu etüv	Jeioke TechOV 12, Kore
Viskozimetre	Brookfield DV II, İngiltere
Vorteks	Heidolph reax-top, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent 1260 Infinity, ABD

2.1.3. Deneylerde Kullanılan Ortamlar ve İçerikleri

Yapılan deneylerde kullanılan ortamlar ve içerikleri şu şekildedir:

A. Suni Tükürük Ortamı (pH 6,8)

Sodyum klorür	8 g
Potasyum fosfat monobazik	0,19 g
Sodyum fosfat dibazik	2,38 g
Deiyonize su	1 L

Hazırlanışı: Sodyum klorür, potasyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik deiyonize suda çözülür. Çözeltinin pH'sı 6.8'e tamamlandıktan sonra balonjojede 1 L'ye tamamlanır (Marques ve ark., 2011)

B. Mobil faz çözeltisi (pH 6)

Heptanosülfonik asit sodyum tuzu	2 g
Sodyum fosfat monobazik	6 g
Metanol	200 ml
Ultrasaf su	1 L

Hazırlanışı: Heptanosülfonik asit sodyum tuzu ve sodyum fosfat monobazik ultrasaf suda çözülür. Üzerine metanol ilave edilir. Çözeltinin pH'sı 6'ya ayarlanır ve ultrasaf su ile balonjojede 1 L hacme tamamlanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kullanımından önce 0,2 µm'lik selüloz asetat membrandan süzülerek 15 dk ultrasonik banyoda degaze edilir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

SAMe'nin miktar tayini için UV spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

2.2.1.1. SAMe'nin Su ve Tükürük Ortamında UV Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Tükürük ortamının bileşimi ve hazırlanışı Bölüm 2.1.3'te verilmiştir.

2.2.1.1.1. SAMe'nin Su ve Tükürük Ortamlarındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAMe'nin su ve tükürük ortamında, 50 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin 200 – 400 nm arasında spektrumu alınarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir.

a. SAMe'nin Su Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAMe'nin su içinde 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle farklı konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 µg/ml) bir seri çözelti hazırlanarak çözeltilerin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) analizleri yapılmış ve konsantrasyonlar x eksenine, buna karşılık okunan absorbans değerleri y eksenine konularak kalibrasyon doğruları çizilmiş, standart doğru denklemleri hesaplanmıştır. İşlemler üç farklı stok çözelti üzerinde çalışarak hazırlanmıştır.

b. SAMe'nin Tükürük Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAMe'nin Bölüm 2.1.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan tükürük ortamı içinde 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiden yapılan seyreltmelerle farklı konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 µg/ml) bir seri çözelti hazırlanarak çözeltilerin maksimum absorbens verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) analizleri yapılmış ve bilinen konsantrasyonlar x eksenine, buna karşılık okunan absorbens değerleri y eksenine konularak kalibrasyon doğruları çizilmiş ve standart doğru denklemleri hesaplanmıştır. İşlemler üç farklı stok çözelti üzerinde çalışarak hazırlanmıştır.

2.2.1.2. SAMe'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi ile miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

SAMe'nin su ortamındaki çözeltileri hazırlanmış ve Bölüm 2.1.3'te bileşimi verilen mobil faz kullanılarak, UV dedektörü ile 200 – 400 nm arasında spektrumu alınmış, maksimum absorbens gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir.

2.2.1.2.1. SAMe'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAMe'nin su içerisinde 50 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltiden yapılan seyreltmelerle farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg/ml) bir seri çözelti oluşturulmuştur. Çözeltilerin maksimum absorbens verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) analizleri yapılarak bilinen konsantrasyonlar x eksenine, buna karşılık okunan alan değeri y eksenine koyularak standart doğruları çizilmiş ve standart doğru denklemleri hesaplanmıştır. Bunların yanında alıkonma

zamanları da kaydedilmiştir. İşlemler üç farklı stok çözelti üzerinde çalışarak uygulanmıştır.

2.2.2. SAMe'nin Su ve Tükürük Ortamlarındaki Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonu

SAMe'nin UV spektrofotometresi kullanılarak su ve tükürük ortamlarında; HPLC kullanılarak su ortamında yapılan miktar tayin yöntemleri için analitik validasyonlar yapılmıştır. İncelenen validasyon parametreleri doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirlenmiştir. Bu parametrelerin değerlendirilmesinde resmi kılavuzlar, kitaplar ve bilimsel çalışmalar referans alınmıştır (European Medicines Agency, 2019; International Center of Harmonization, 2019; Özkan ve v.d., 2011).

2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Doğrusallık, örnek içinde bulunan etkin madde miktarının ölçülen absorbans değeri ile orantılı bir ilişkiye sahip olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Aralık ise mevcut olan doğrusal ilişkinin devam ettiği veya bozulmaya başladığı konsantrasyon değerlerini göstermektedir (ICH Q2 (R1)).

SAMe'nin miktar tayininde kullanılacak olan standart doğrularını tespit etmek amacıyla SAMe'nin ortam sıvılarında 50 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle, çözeltiler kendi ortamıyla seyreltilerek seri çözeltileri oluşturulmuştur. UV spektrofotometrisinde stok çözeltilerden hareketle 2,5-50 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerin su ve tükürük ortamı içinde; HPLC analizinde ise 0,5- 10 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerin su ortamında analizi yapılmıştır. UV spektrofotometrisinde bilinen konsantrasyonlar x ekseninde, elde edilen alan

absorbanslar y ekseninde grafiğe geçirilerek standart doğruları çizilmiştir. HPLC analizinde ise bilinen konsantrasyonlar x ekseninde, kaydedilen alanlar y ekseninde grafiğe geçirilerek standart doğruları çizilmiştir. Sonuç standart doğrusunun güven sınırı (%95) içerisinde olup olmadığı belirlenmiştir.

2.2.2.2. Doğruluk

Gerçek değer veya referans değer ile analiz sonucunda oluşturulan doğru denkleminde elde edilen değerlerin yakınlığının ölçüsüdür (ICH Q2(R1), Özkan ve ark., 2011).

UV Spektrofotometrisinde SAME'nin miktar tayininde kullanılacak olan kalibrasyonlardan elde edilen doğruluk ve yüzde geri eldeyi tespit etmek amacıyla SAME'nin su ve tükürük içerisinde yüksek, orta, düşük olmak suretiyle üç farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır.

Spektrofotometredeki miktar tayinlerinde doğruluk ve geri elde çalışmalarında su ortamında 40, 20 ve 10 µg/ml; tükürük ortamında 40, 30 ve 10 µg/ml konsantrasyonunda ardarda 5 kez ölçüm yapılmıştır. Okunan absorbans değerleri standart doğru denkleminde yerine konulmuş ve konsantrasyon değerleri hesaplanarak buradan % geri elde ve % bağlı standart sapma değerleri (BSS) hesaplanmıştır.

HPLC'de SAME'nin su ortamı içerisinde yüksek, orta, düşük olmak suretiyle üç farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar 1, 4 ve 10 µg/ml olarak belirlenerek, bu konsantrasyonlarda art arda 5 kez ölçüm yapılmıştır. Okunan alan değerleri standart doğru denkleminde yerine konulmuş ve

konsantrasyon değerleri hesaplanarak buradan % geri elde ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.2.3. Kesinlik

Geliştirilen yöntem kullanılarak aynı numuneden yapılan çoklu örneklemenin doğruluğunun birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar %BSS olarak ifade edilmektedir. Analizi yapılacak zltnin en az 5 ölçümü yapılır. Kesinlik üç aşamada değerlendirilmektedir:

- Tekrarlanabilirlik (repeatability),
- Ara kesinlik (intermediate precision)
- Tekrar edilebilirlik (reproducibility).

SAMe'nin miktar tayini yönteminin kesinliğini belirlemek için yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve ara kesinlikleri incelenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Kısa zaman aralığında aynı işlem koşulları altındaki kesinliğin ölçüsü olarak ifade edilmektedir. rnek hazırlamada meydana gelebilecek hataları gösteren bir parametredir.

UV Spektrofotometrisinde yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları için su ortamında 25 $\mu\text{g/ml}$, tükürük ortamında 35 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında SAMe zltisi analiz edilmiştir. Numuneler 10 defa okunmuştur. Okunan absorbans

değerleri standart doğru denkleminde yerlerine konularak bulunan konsantrasyonların % BSS değerleri hesaplanmıştır.

HPLC’de yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları için su ortamında 8 µg/ml konsantrasyonda SAME çözeltisi analiz edilmiştir. Numuneler 10 defa okunmuştur. Okunan absorbans değerleri standart doğru denkleminde yerlerine konularak bulunan konsantrasyonların % BSS değerleri hesaplanmıştır.

Ara kesinlik

Laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir parametredir. Farklı günler veya farklı analistler tarafından elde edilen sonuçlar değerlendirilerek çalışmanın kesinliği belirlenmektedir; % BSS değeri kullanılarak ifade edilmektedir.

UV Spektrofotometrisinde yapılan ara kesinlik çalışmaları için su ortamında 25 µg/ml, tükürük ortamında 35 µg/ml konsantrasyonlarında SAME çözeltisi analiz edilmiştir. Numuneler spektrofotometrede 5 defa okunmuş, okunan değerler standart doğru denkleminde yerlerine konularak bulunan konsantrasyonların % BSS değerleri bulunmuştur.

HPLC’de yapılan ara kesinlik çalışmaları için su ortamında 8 µg/ml konsantrasyonunda SAME çözeltisi analiz edilmiştir. Numuneler HPLC cihazında 10 defa okunmuş, okunan değerler standart doğru denkleminde yerlerine konularak bulunan konsantrasyonların % BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Teşhis Sınırı (Limit of Detection = LOD)

Analizi yapılacak örneği tayin edilebilen fakat nicel miktarı saptanamayan en düşük konsantrasyon derişimidir.

Aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır:

$$LOD = \frac{\sigma}{S} \times 3,3 \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

σ : Doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması

S: Standart doğrunun eğimi

Tayin sınırı (Limit of Quantification = LOQ)

Maddenin uygun kesinlik ve doğrulukta tayin edilebilen, doğrusallık sınırlarında nicel olarak saptanabilen en düşük konsantrasyon derişimidir (Eşitlik 2.2).

$$LOQ = \frac{\sigma}{S} \times 10 \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

σ : Doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması

S: Standart doğrunun eğimi

2.2.3. Sublingual film Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Film formülasyonlarının geliştirilmesi için pek çok polimerle birlikte işlem koşulları değerlendirilmiştir. Bu formülasyonlar ve işlem koşulları Çizelge 2.1’de verilmiştir. Bu deneme formülasyonlarını takiben seçilen formülasyonlarla ileriki çalışmalara devam edilmiştir.



Çizelge 2.1: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar ve işlem parametreleri

İçindekiler	FD1	FD2	FD3	FD4	FD5	FD6	FD7	FD8	FD9	FD10
Pharmacoat C600®	100 mg	100 mg	300 mg			600 mg	50 mg	100 mg	200 mg	255 mg
Gantrez d.m.		50 mg								
Gantrez y.m.										
PAA				400 mg						
PVA					500 mg					
İnülün										
Kollicoat® Protect										
Pullulan										
Propilen glikol	50 mg	50 mg								
PEG400	50 mg	50 mg	50 mg		64 mg	64 mg	16 mg	16 mg	16 mg	16 mg
Gliserin				200 mg						
Sitrik asit					15 mg	15 mg				
Tween 80					0,06 ml	0,06 ml				
Mannitol					15 mg	15 mg				
MCC				2 g						
Etanol		10 ml								
Metil alkol										
Ultra saf su	20 ml	10 ml	20 ml	20 ml	16 ml	16 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
İşleme ait değişkenler										
Kurutma ortamı	Laboratuvar ortamı	Laboratuvar ortamı	Laboratuvar ortamı	Laboratuvar ortamı	Vakumlu etüv	Vakumlu etüv	Vakumlu etüv	V.etüv- Çeker ocak	V.etüv- Çeker ocak	V.etüv- Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Karıştırma süresi	45 dk	60 dk	45 dk	45 dk	60 dk	45 dk	45 dk	45 dk	45 dk	45 dk
Sıcaklık	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C-25 °C
Kurutma süresi	4 gün	4 gün	4 gün	4 gün	1 gün	1 gün	5 gün- 1 gün	5 gün- 1 gün	5 gün- 1 gün	5 gün- 1 gün
Film oluşumu	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var-var

Çizelge 2.1: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar ve işlem parametreleri (Devam)

İçindekiler	FD11	FD12	FD13	FD14	FD15	FD16	FD17	FD18	FD19	FD20	FD21
Pharmacoat C600®	100 mg	200 mg		542,17 mg	1,0869 g					150 mg	
Gantrez d.m.			100 mg								
Gantrez y.m.			100 mg								
PAA											
PVA				361,5 mg						100 mg	
İnülün						400 mg	500 mg				100 mg
Kollcoat® Protect								731 mg	765 mg		
Pullulan											
Propilen glkol	16 mg	16 mg	40 mg								
PEG400											
Giserin								117 mg	118 mg	50 mg	60 mg
Sitrik asit				120,48 mg	124 mg	30 mg	35 mg				
Tween 80											
Mannitol			10 mg								
IMCC											
Etanol			10 ml								
Metil alkol								5 ml	5 ml		
Ultra saf su	5 ml	5 ml	10 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
İşleme alt değişkenler											
Kurutma ortamı	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak	Vakumlu etüv	Vakumlu etüv
Karıştırma hızı (rpm)	90	90	90	80	80	90	50	50	80	80	80
Karıştırma süresi	45 dk	45 dk	150 dk	40 dk	60 dk	40 dk	40 dk	60 dk	60 dk	40 dk	40 dk
Isıcılık	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
Kurutma süresi	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	3 saat	3 saat	3 saat	3 saat	5 gün	5 gün
Film oluşumu	Var	Var	Yok	Var	Yok (parçalanma)	Yok (parçalanma)	Yok (parçalanma)	Var	Var	Var	Yok

Çizelge 2.1: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar ve işlem parametreleri (Devam)

İçindekiler	FD22	FD23	FD24	FD25	FD26	FD27	FD28	FD29	FD30	FD31
Pharmacoat C600®										
Gantrez d.m.										
Gantrez y.m.										
PAA										
PVA										
İnülün	200 mg									
Kollicoat® Protect										
Pullulan		200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	150 mg	100 mg	100 mg	150 mg	150 mg
Propilen glikol				50 mg	100 mg					30 mg
PEG400						20 mg	10 mg			
Gliserin		40/50 mg	100 mg					20 mg	20 mg	
Sitrik asit						10 mg	10 mg			
Tween 80										
Mannitol										
MCC										
Etanol										
Metil alkol										
Ultra saf su	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
İşleme ait değişkenler										
Kurutma ortamı	Vakumlu etüv									
Karıştırma hızı (rpm)	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Karıştırma süresi	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk	40 dk
Sıcaklık	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
Kurutma süresi	5 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün	1 gün
Film oluşumu	Yok	var -hafif yapışkan	yok-petriye yapıştı	var-delik oluşumu	var	var-yapışkan	var-yapışkan	var-yapışkan	var-yapışkan	var

Çizelge 2.1: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar ve işlem parametreleri (Devam)

İçindekiler	FD32	FD33	FD34
Pharmacoat C600®			150 mg
Gantrez d.m.			
Gantrez y.m.			
PAA			
PVA			100 mg
İnülin			
Kollicoat® Protect			
Pullulan	150 mg	200 mg	
Propilen glikol	60 mg		
PEG400		100 mg	
Gliserin			50 mg
Sitrik asit			
Tween 80			
Mannitol			
MCC			
Etanol			
Metil alkol			
Ultra saf su	5 ml	5 ml	5 ml
İşleme ait değişkenler			
Kurutma ortamı	Çeker ocak	Çeker ocak	Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	80	80	80
Karıştırma süresi	40 dk	40 dk	40 dk
Sıcaklık	25 °C	25 °C	25 °C
Kurutma süresi	1 gün	1 gün	1 gün
Film oluşumu	var	var-sert ve yağlı	var

2.2.3.1. Etkin Madde İçermeyen Sublingual Filmlerin Hazırlanması

Öncelikle, etkin madde eklenmeden önce film oluşturucu polimer ve plastizerler kullanılarak boş filmler hazırlanmıştır. Filmlerin hazırlanmasında çözücü buharlaştırma (solvent casting) yöntemi kullanılmıştır. Formölasyonların geliştirme çalışmaları sonucunda elemeler yapılmış, seçilen formölasyonlar Çizelge 2.2’de verilmiştir. Hazırlanan boş filmlerin karakterizasyon testleri yapılarak hangi formölasyonların etkin madde yüklemesine uygun olacağına karar verilmiştir.



Çizelge 2.2: Etkin madde içermeyen sublingual film formülasyonlarından seçilen formülasyonlar ve bileşenleri

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Pharmacoat C600®	50 mg	100 mg	200 mg	100 mg	200 mg	150 mg				
PVA						100 mg				
Kollocoat® Protect							731 mg	765 mg		
Pullulan									150 mg	150 mg
Gliserin						50 mg	117 mg	118 mg		
PEG400	16 mg	16 mg	16 mg							
Propilen Glikol				16 mg	16 mg				30 mg	60 mg
Sitrik Asit										
Metanol							5 ml	5 ml		
Ultra saf su	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

2.2.3.1.1. Pharmacoat C600® Filmlerin Hazırlanması

Film oluşturuucu polimer olarak Pharmacoat C600® farklı miktarlarda kullanılarak 4 farklı formülasyon oluşturulmuştur (F1-F5). 5 ml su eklenmiş olan behere plastizer olarak polietilen glikol 400 (PEG400) veya propilen glikol eklenerek, plastizerin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra tartılan miktarlarda (50 mg, 100 mg, 150 mg ve 200 mg) Pharmacoat C600® eklenerek farklı konsantrasyonlarda seriler oluşturulmuştur. Beherler manyetik karıştırıcıda 90 rpm’de 40 dakika karıştırılmıştır. 40 dakika ultrasonik banyoda tutulup hava kabarcıkları giderildikten sonra ayrı ayrı 5 cm çaplı polistiren petri kaplarına dökülmüş ve çeker ocak altında oda sıcaklığında (25°C’de) kurumaya bırakılmıştır (n=3). Formülasyon içerikleri Çizelge 2.2’de, işleme ait değişkenler Çizelge 2.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3: HPMC film formülasyonlarının üretilmesinde işleme ait değişkenler

İşleme ait değişkenler	F1-F2-F3-F4-F5
Kurutma ortamı	Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	90
Karıştırma süresi (dk)	40
Sıcaklık (°C)	25
Kurutma süresi (gün)	1

2.2.3.1.2. Pharmacoat C600® - PVA filmlerin hazırlanması

Tartılan miktarda PVA 5 ml su içinde 90°C’ye ısıtılarak manyetik karıştırıcıda 80 rpm’de 10 dk karıştırılmıştır. Tartılan miktardaki Pharmacoat C600®, sıcak PVA çözeltisi içinde dağıtılarak soğuyana kadar karıştırılmaya devam edilmiştir (Niese ve Quodbach, 2019). Soğuk çözeltiye gliserin ilave edilmiştir. Oluşan karışım ultrasonik

banyoda 30 dakika daha karıştırıldıktan sonra 5 cm çaplı, polistiren petri kaplarına dökülmüştür. Filmler, çeker ocak altında oda sıcaklığında 1 gün kurumaya bırakılmıştır (F6) (n= 3). Formülasyon içeriği Çizelge 2.2’de, işleme ait değişkenler Çizelge 2.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4: HPMC:PVA film formülasyonlarının üretilmesinde işleme ait değişkenler

İşleme ait değişkenler	F6
Kurutma ortamı	Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	80
Karıştırma süresi (dk)	40
Sıcaklık (°C)	25
Kurutma süresi (gün)	1

2.2.3.1.3. Kollicoat® Protect filmlerin hazırlanması

Film oluşturucu polimer olarak Kollicoat® Protect farklı miktarlarda kullanılarak 2 farklı formülasyon oluşturulmuştur (F7-F8). Her iki formülasyonda da önce gliserol 5 ml suya, Kollicoat® Protect 5 ml metil alkole eklenmiştir. Beherler manyetik karıştırıcıda 80 rpm’de 15 dk karıştırıldıktan sonra gliserol-su çözeltileri polimer çözeltilerinin üzerine yavaş yavaş eklenmiştir. 45 dk daha karıştırıldıktan sonra 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Her iki formülasyon petri kaplarına dökülmüştür. Çeker ocak altında oda sıcaklığında 1 gün kurumaya bırakılmıştır (n=3). Formülasyon içerikleri Çizelge 2.2’de, işleme ait değişkenler Çizelge 2.5’te, gösterilmiştir.

Çizelge 2.5: Polivinil alkol-polietilen glikol graft kopolimer film formülasyonlarının üretilmesinde işleme ait değişkenler

İşleme ait değişkenler	F7-F8
Kurutma ortamı	Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	80
Karıştırma süresi (dk)	60
Sıcaklık (°C)	25
Kurutma süresi (gün)	1

2.2.3.1.4. Pullulan filmlerin hazırlanması

Önce tartılan miktarda pullulan 5 ml suda çözünmüştür. Daha sonra farklı formülasyonlar için plastizer olarak propilen glikol, gliserin, sitrik asit veya PEG400 farklı oranlarda karışıma eklenmiştir. Beherler, manyetik karıştırıcıda 80 rpm’de karıştırılmıştır. 40 dk karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoya alınarak burada da 30 dk bekletilerek kabarcıkların giderilmesi sağlanmıştır. Çözeltiler petri kabına dökülerek çeker ocak altında 1 gün kurumaya bırakılmıştır (n=3). Formülasyon içerikleri Çizelge 2.2’de, işleme ait değişkenler Çizelge 2.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6: Pullulan film formülasyonlarının üretilmesinde işleme ait değişkenler

İşleme ait değişkenler	F9-F10-F11-F12
Kurutma ortamı	Çeker ocak
Karıştırma hızı (rpm)	80
Karıştırma süresi (dk)	40
Sıcaklık (°C)	25
Kurutma süresi (gün)	1

2.2.3.2. Etkin Madde İçermeyen Sublingual Filmlerin Kalite Kontrol Testleri

Petri kapları içindeki filmler kuruduktan sonra hemen test yapılacak olanlar kenar kısımları atılıp 3x1 cm² boyutlarında kesildikten sonra incelenmiş; daha sonra test yapılacak olanlar ise kesildikten sonra alüminyum folyoya sarılarak ambalajlanıp, kapaklı petri kaplarına konulup kullanıma kadar 25°C oda sıcaklığında cam bir desikatör içinde saklanmıştır.

2.2.3.2.1. Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin İncelenmesi

Filmlerin kalınlığını ölçmek için mikrometre kullanılmıştır. Ortalama kalınlıklar ölçülerek kaydedilmiştir. Filmlerin ağırlık tekdüzeliliğini belirlemek için ise her bir partiden 3x1 cm² çapında kesilen üç filmin ağırlığı tek tek elektronik terazide tartılarak ortalama ağırlık hesaplanmıştır (Li ve ark., 2017).

2.2.3.2.2. Filmlerin Katlanma Dayanımlarının İncelenmesi

Filmler kırılıncaya kadar tekrar tekrar aynı yerden katlanmış ve katlanma sayısı belirlenmiştir (Avachat ve ark., 2013).

2.2.3.2.3. Filmlerin Dağılma Zamanlarının İncelenmesi

Filmlerin dağılma testi için Amerikan Farmakopesi'nde yer alan “tabletler için dağılma testi” monografında yer alan direktifler gözönünde bulundurularak tablet dağılma cihazı modifiye edilerek kullanılmıştır (Şekil 2.1). Dağılma ortamı olarak 800 ml pH 6,8 tükürük ortamı kullanılmıştır. Bu beher cihazın su banyosu içine yerleştirilerek sıcaklığı 37°C'ye getirilmiştir. Cihazın tablet yerleştirilen 6'lı hücreleri içerisine ucunda kısıkaç bulunan bir tel yardımı ile 3 cm² boyutlarında

filmler sarkıtılarak, sabit hızda olacak şekilde konumlandırılmıştır. Cihaz dakikada 30 kez inip çıkacak şekilde çalıştırıldığı anda kronometre başlatılarak filmin dağılmaya başladığı süre tespit edilmiştir. Bu işlem tüm film tipleri için 3 paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 2.1: Manesty tablet dağılma cihazı

2.2.3.2.4. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanmış olan filmlerden kesilen $3 \times 1 \text{ cm}^2$ boyutlarında kesitler tekstür analiz cihazı ve cihazın “Tensile Grip” aparatı kullanılarak gerilme modunda (tensile mode) mekanik olarak incelenmiştir (Şekil 2.2). Mekanik özellikler olarak gerilme direnci, uzama yüzdesi ve elastik modül (Young modülü) değerleri Bölüm 1.1.4.5’te anlatıldığı şekilde belirlenmiştir (Avachat ve ark., 2013; Lai ve ark., 2018).



Şekil 2.2: Ta.XT Plus Texture Analyser Cihazı

2.2.3.2.5. Formülasyonların çözeltilerinin viskozitesinin ölçülmesi

Yapılan kontrol testlerinin sonucunda etkin madde yüklenmesine karar verilen formülasyon çözeltilerinin akış tipi ve viskozite değerleri Brookfield rotasyon viskozimetresi ile incelenmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yapılmış, 30 mL hacimli beher ve S61 kodlu spindle kullanılmıştır.

2.2.3.2.6. İn vitro mukoadhezyon testi

Yapılan kontrol testlerinin sonucunda etkin madde yüklenmesine karar verilen formülasyonların filmleri üzerinde mukoadhezyon çalışması yapılmıştır. Mukoadhezyon, tekstür analiz cihazının mukoadhezyon aparatı yardımı ile, 0,5 g müsinin 5 ml suda dağıtılması ile hazırlanan %10 a/h müsin çözeltisi kullanılarak filmin mukozal yüzeyden tamamen ayrılması için gereken süre gözlenip kaydedilerek yapılmıştır. Bu aparatın alt tarafında müsin çözeltisi içine batırılmış filtre kağıdı, temas alanı olarak kullanılmıştır. Filmler çift taraflı bant kullanılarak 12 mm çaplı bir silindirik probun (P/0.5R) alt tarafına aynı çapta kesilerek sabitlenmiştir. Prob, aparatın alt tarafındaki müsin filmle temas edinceye kadar indirilmiş ve takiben 1 N'luk bir temas kuvveti ile 60 sn süre ile temasta bırakılmıştır.

(Kilicarslan ve ark., 2018). Mukoadhezyon testi, 0,5 mm/s hızda gerçekleştirilmiştir. Tetik noktasından (trigger point) uzaklaşırken maksimum mesafe ve müsin ile proba tutturulan filmin temas süresi belirlenmiştir. Filmi müsin yüzeyinden ayırmak için gereken kuvvet, maksimum kuvvet (F; N) ve adezyon işi (W_{ad} ; Nmm) eğri altında kalan alandan hesaplanmıştır (n=3) (Ivarsson ve Wahlgren, 2012; Kilicarslan ve ark., 2018).

2.2.3.3. SAME Yüklü Sublingual Filmlerin Hazırlanması

Boş filmler üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları sonrasında seçilen 4 formülasyona (F6, F7, F9 ve F10) SAME ilave edilmiştir. Filmleri oluştururken polimer çözeltisi 2,5 cm yarıçapında petrilere döküldüğü için, polimer çözeltisine alan hesabı yapılarak 50 mg/3 cm² olacak miktarda SAME eklenmiştir. Her bir formülasyon 3 kez ayrı ayrı hazırlanıp 3 farklı petriye dökülmüştür. Hazırlanan etkin madde yüklü film formülasyonları Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7 : SAME yüklü film formülasyonlarının bileşenleri

	F6S	F7S	F9S	F10S
SAME	312,5 mg	312,5 mg	312,5 mg	312,5 mg
Pharmacoat C600®	150 mg			
PVA	100 mg			
Kollicoat® Protect		731 mg		
Pullulan			150 mg	150 mg
Gliserin	50 mg	117 mg		
PEG400				
Propilen Glikol			30 mg	60 mg
Metanol		5 ml		
Ultra saf su	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Filmleri oluştururken polimer çözeltisi 2,5 cm yarıçaplı petrilere döküldüğü için polimer çözeltisine alan hesabı yapılarak belirlenen miktarda SAME eklenmiştir. 3 cm²'lik bir filmde 50 mg olacak şekilde hesaplamalar yapılarak 5 ml'lik çözeltiye 312,5 mg SAME eklenmiştir. Her bir formülasyon 3 kez ayrı ayrı hazırlanıp 3 farklı petriye dökülmüştür.

a. F6S Numaralı Formülasyonun Hazırlanması

Tartılan miktarda PVA 3 ml su içinde 90°C'de manyetik karıştırıcıda 80 rpm'de karıştırılmıştır. Pharmacoat C600®, sıcak PVA çözeltisi içine ilave edilmiş ve soğuyana kadar 45 dk boyunca karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. SAME bu karışıma eklenip 45 dk daha karıştırılmıştır. Oluşan çözeltiler ultrasonik banyoda hava kabarcıkları giderilene kadar bekletildikten sonra petri kaplarına dökülmüştür. Filmler, çeker ocak altında 1 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır (n=3).

b. F7S Numaralı Formülasyonların Hazırlanması

Gliserol 4 ml suya, Kollicoat® Protect 4 ml metil alkole eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 80 rpm'de 15 dk karıştırıldıktan sonra gliserol-su çözeltisi organik polimer çözeltisi üzerine yavaş yavaş eklenmiştir. Çözelti 45 dk daha karıştırıldıktan ve homojen bir görüntü elde edildikten sonra 2 ml suda çözülen SAME karışıma ilave edilip çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra beher ultrasonik banyoya alınarak hava kabarcıkları giderilene kadar bekletilmiştir. Daha sonra çözeltiler petrilere dökülerek filmler, çeker ocak altında 1 gün kurumaya bırakılmıştır (n=3).

c. F9S Numaralı Formülasyonun Hazırlanması

Pullulan 3 ml suda çözülüp plastizer olarak 30 mg propilen glikol eklenerek manyetik karıştırıcıda 80 rpm’de 30 dk karıştırıldıktan sonra 2 ml suda çözülen SAME eklenmiş ve ilaveten 30 dk daha karıştırılmıştır. Bu çözelti, ultrasonik banyoya alınarak burada da 30 dk bekletilerek hava kabarcıklarının giderilmesi sağlanmıştır. Çözelti petri kabına dökülerek çeker ocak altında 1 gün bekletilmiştir (n=3).

d. F10S Numaralı Formülasyonun Hazırlanması

Pullulan 3 ml suda çözülüp plastizer olarak 60 mg propilen glikol eklenerek manyetik karıştırıcıda 80 rpm’de 30 dk karıştırıldıktan sonra 2 ml suda çözülen SAME eklenmiş ve ilaveten 30 dk daha karıştırılmıştır. Bu çözelti, ultrasonik banyoya alınarak burada da 30 dk bekletilerek hava kabarcıklarının giderilmesi sağlanmıştır. Çözelti, petri kabına dökülerek çeker ocak altında 1 gün bekletilmiştir (n=3).

2.2.3.4. SAME Yüklü Filmler İçin Yapılan Kontroller

Etkin madde yüklenen formülasyonlardan film oluşturulabilen formülasyonlar seçilerek, filmler yeniden üretilmiştir. Oluşturulan filmler üzerinde bölüm 2.2.3.2’de anlatılan karakterizasyon testleri yapılmıştır.

Etkin madde yüklü filmler üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum film formülasyonları olarak Kollicoat® Protect içeren F7S kodlu formülasyon ve pullulan içeren F10S kodlu formülasyon seçilmiş, etkin madde

içermeyen filmlere yapılan kontrol testlerinin yanısıra aşağıda anlatılan kontrol testleri yapılmıştır:

2.2.3.4.1. Final Formülasyonların Çözeltilerinin pH'larının Ölçülmesi

Kollicoat içeren F7S ve pullulan içeren F10S kodlu formülasyonların çözeltileri Bölüm 2.2.3.3'te anlatıldığı gibi hazırlanmış, hazırlanan çözeltilerin pH'sı pHmetre ile ölçülerek çözeltilerin pH'ları belirlenmiştir.

2.2.3.4.2. Final Formülasyonlardan Hazırlanan Filmlerinin İçerik Tekdüzeliliğinin İncelenmesi

SAME yüklü filmlerdeki etkin madde içerik tekdüzeliği şu şekilde belirlenmiştir: Etkin madde yüklenen formülasyonlardan 1x1 cm olacak şekilde filmler kesilerek 10 ml ultra saf suda çözünmesi sağlanmıştır. Bu çözeltilerden 250 µl alınarak 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti viallere aktarılarak Bölüm 2.2.1.2'de verilen yöntemle göre HPLC ile analiz edilmiştir.

2.2.3.4.3. Final Formülasyonlardan Hazırlanan Filmlerinin Nem İçeriklerinin İncelenmesi

Etkin madde yüklenen filmlerin 500 mg'ı nem ölçer (Şekil 2.3) içerisine yerleştirilerek sabit hızda 105°C ye kadar ısıtılmış ve su kaybının sabit olduğu andaki % nem içerikleri tespit edilmiştir.



Şekil 2.3: Ohaus-MB 45 nem ölçüm cihazı

2.2.3.4.4. Final Formülasyonlardan Hazırlanan Filmlerinin Etkin Madde Salımının İncelenmesi

İn vitro salım testi için palet yöntemi kullanılmıştır. Test çözünme testi cihazının mini kiti kullanılarak 200 ml, pH 6,8 tükürük ortamında, $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Filmler (1 cm x 1 cm), bir damla tükürük ortamıyla ıslatılarak palete yapıştırılmıştır. Daha sonra paletin dönü hızı 100 rpm olarak ayarlanarak deneye başlanmıştır. 2, 5, 10, 15, 30 ve 60 dk sürelerde 1'er ml numune 0,45 µm membran filtre takılı enjektörlerle çekilmiştir: Sonra aynı hacimde çözünme ortamı hücrelere ilave edilmiştir Numunelerdeki çözünmüş SAm miktarının tayini için UV spektrometresi ile 260 nm dalga boyunda absorpsanlar belirlenmiş; Bölüm 2.1.3'te belirtildiği şekilde oluşturulan doğru denklemden salınan etkin madde miktarı tayin edilmiştir (Koland ve ark., 2010, Song ve ark., 2018) (n=3).

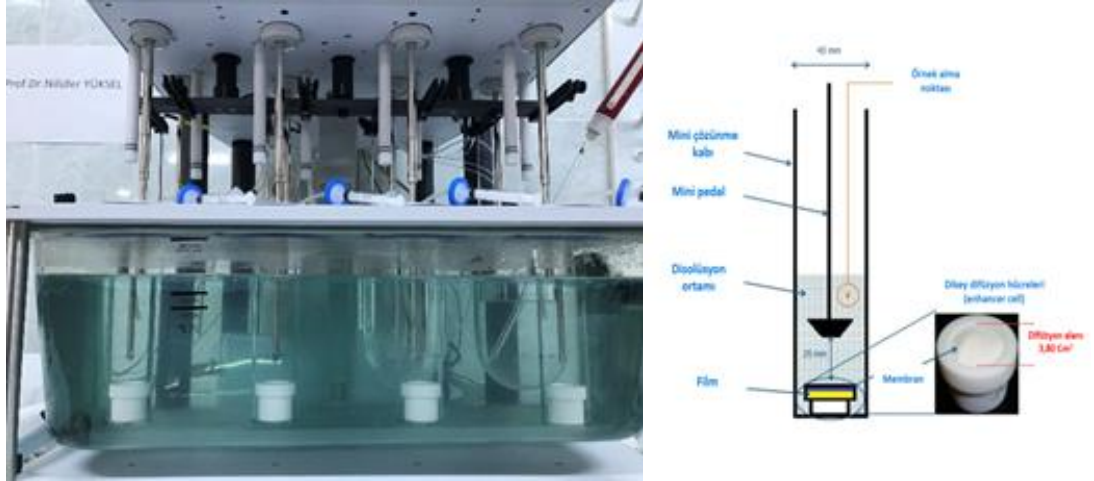
Zaman bağlı olarak belirlenen etkin madde salım miktarlarından hareketle oluşturulan etkin madde salım profilleri, farklı kinetik modellerle değerlendirilerek salım mekanizmasının tanımlanmasına çalışılmıştır (Yüksel ve ark., 2000). Bu amaçla Excel programının DDSolver eklentisi kullanılmıştır.

2.2.3.4.5. İnvitro Permeasyon Çalışmaları

Dikey difüzyon hücreleri ile permeabilite tayini

İn vitro permeasyon çalışmaları çözünme testi cihazının dikey difüzyon hücreleri (enhancer cell) kullanılarak palet yöntemi ile yürütülmüştür. Etkin madde yüklenen 1 cm² boyutunda filmler Şekil 2.4'te belirtilen dikey difüzyon hücrelerine yerleştirilmiş, üzerine 2 ml tükürük ortamı eklendikten sonra üzeri birkaç saat boyunca tükürük ortamında bekletilen diyaliz membran (Sigma Aldrich- avg. flat width 23 mm, MWCO 12400) ile kapatılmıştır. Hücreler, içinde 200 ml tükürük ortamı bulunan çözünme hızı cihazının mini kitleri içine konarak 37±0,5°C sıcaklığında 100 rpm palet dönü hızında çalıştırılmıştır.

Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 dk ve 24 saat) 1'er ml numune 0,45 µm membran filtre takılı enjektörlerle çekilmiştir: Numuneler çekildikten sonra aynı hacimde çözünme ortamı hücreye ilave edilmiştir. Bu numunelerdeki çözünmüş SAMe miktarının tayini için UV spektrometresi ile 260 nm dalga boyunda absorpsiyonlar belirlenmiş, oluşturulan doğru denkleminde salınan etkin madde miktarı tayin edilmiştir (n=3). Eşitlik 1.4 yardımı ile permeabilite katsayısı hesaplanmıştır.

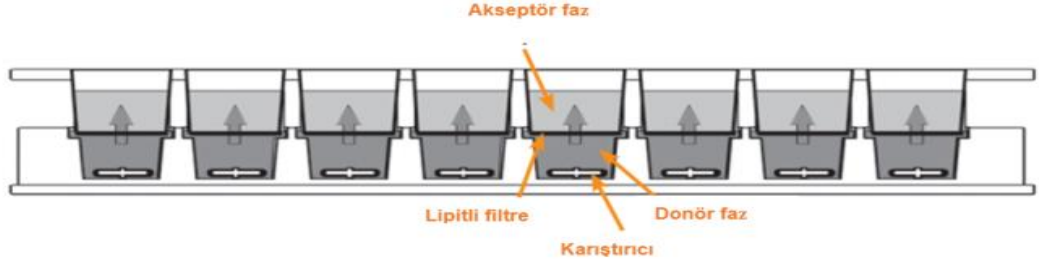


Şekil 2.4: Çözünme cihazı ve dikey difüzyon hücreleri

Yapay membran (PAMPA) modeli kullanılarak permeabilite tayini

Saf SAME ve SAME içeren film formülasyonlarının paralel yapay membran sistemi (PAMPA) ile permeabilite testleri yapılmıştır. Test numuneleri şu şekilde hazırlanmıştır: Her bir filmde $0,125 \text{ cm}^2$ 'lik kesitler alınarak 2 ml tükürük ortamında vorteks yardımı ile çözünmesi sağlanmıştır. Lipit membranlı 96 kuyucuklu plaka permeabilite çalışmasında reseptör faz, diğer 96 kuyucuklu plaka ise donör faz olarak kullanılmıştır; -20°C 'de saklanan PAMPA sistemi buzdolabından çıkarılarak yarım saat oda sıcaklığında tutulduktan sonra test numunesinden (Saf SAME, film formülasyonları) 300 μl örnek alınarak donör plakanın her bir kuyucuğuna eklenmiştir. Reseptör plaklara ise 200 μl simüle tükürük ortamı konulmuştur. Numune içeren donör plaka, membranın alt kısmı ortam ile temas edecek biçimde reseptör plakanın üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra donör-reseptör sisteminin üzeri parafilm ile kapatılarak buharlaşmanın önüne geçilmiştir. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C 'de, 25 rpm sabit hızda karıştırılan sistemden 1, 3, 5 ve 24. saatlerde 100'er μl numune alınarak, lipit membrandan geçen SAME miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu ölçüm yapılmadan önce 100 $\mu\text{g/mL}$ stok SAME çözeltisinden hareketle ile farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$) 3 seri SAME çözeltileri hazırlanmıştır. Mikroplaka kullanılarak UV

spektrofotometrisinde absorbansları okunmuş, standart doğruları oluşturulmuştur. PAMPA sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.5’te yer almaktadır.



Şekil 2.5: PAMPA Sistemi

2.2.3.4.6. Final Formülasyonlardan Hazırlanan Filmlerinin Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

Etkin maddenin, film oluşturu polimerlerin, film formülasyonunu oluşturan bileşenlerin fiziksel karışımlarının ve filmlerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazı ile termal davranışları incelenmiştir. Bu amaçla her bir formülasyon için Çizelge 2.8’de belirtilen materyallerden 2-4 mg aralığında numune, kapaklı alüminyum pan içine tartılarak 10°C/dk sıcaklık artış hızında, 20-300°C aralığında analiz edilerek termogramları elde edilmiştir.

Çizelge 2.8 : DSC analizi için hazırlanan numuneler

Formülasyon kodu	1. GRUP	2. GRUP
a	SAMe	SAMe
b	Kollicoat® Protect	Pullulan
c	SAMe, Kollicoat® Protect , gliserin fiziksel karışımı	SAMe, pullulan, propilen glükol fiziksel karışımı
d	F7S film	F10S film

2.2.3.4.7. Final Formülasyonlardan Hazırlanan Filmlerinin Filmlerinin Görüntülenmesi

Saf SAME, SAME içermeyen boş filmler ve SAME içeren filmlerden alınan örnekler altınla kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile 10 kV hızlanma geriliminde, 10,5 mm mesafede görüntülenmiştir.

2.2.3.4.8. Final formülasyonlardan hazırlanan filmlerin stabiliteilerinin incelenmesi

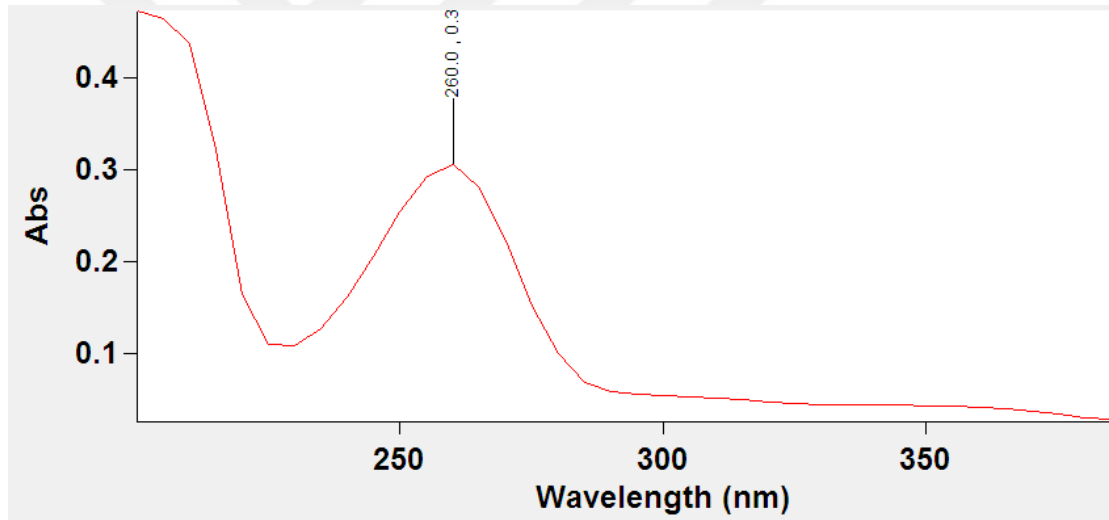
Seçilen formülasyonlardan 3 cm² alanında kesilen filmler tek tek alüminyum folyoya sarılarak petrilere konulmuş, kapakları kapatıldıktan sonra alüminyum folyoyla sarılmıştır. Üretilen film formülasyonlarının, International Conference on Harmonisation'un (ICH) yayınladığı Q1F kılavuzu dikkate alınarak, oda sıcaklığında 25 ± 2°C, %60±5 bağıl nemde ve 5±3°C buzdolabı koşullarında başlangıçtaki etkin madde içeriği, 20.gün ve 40. gün sonundaki etkin madde içerikleri ve nem içerikleri test edilerek stabilitei incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

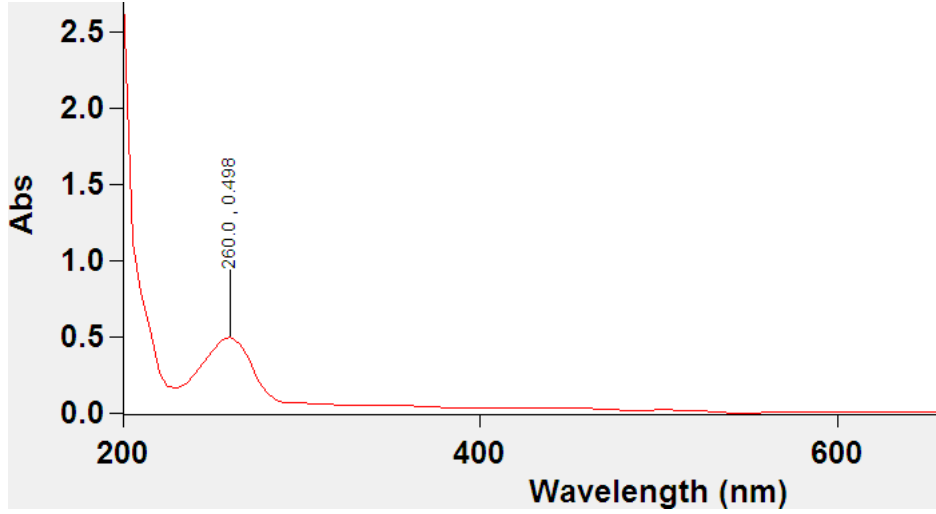
3.1.1. SAME'nin UV Spektrumları

SAMe'nin su ortamında 50 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltisinden hazırlanan düşük konsantrasyondaki (15 µg/ml) çözeltisinin 200 – 400 nm arasında alınan spektrumunda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 260 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: SAMe'nin su ortamındaki UV spektrumu

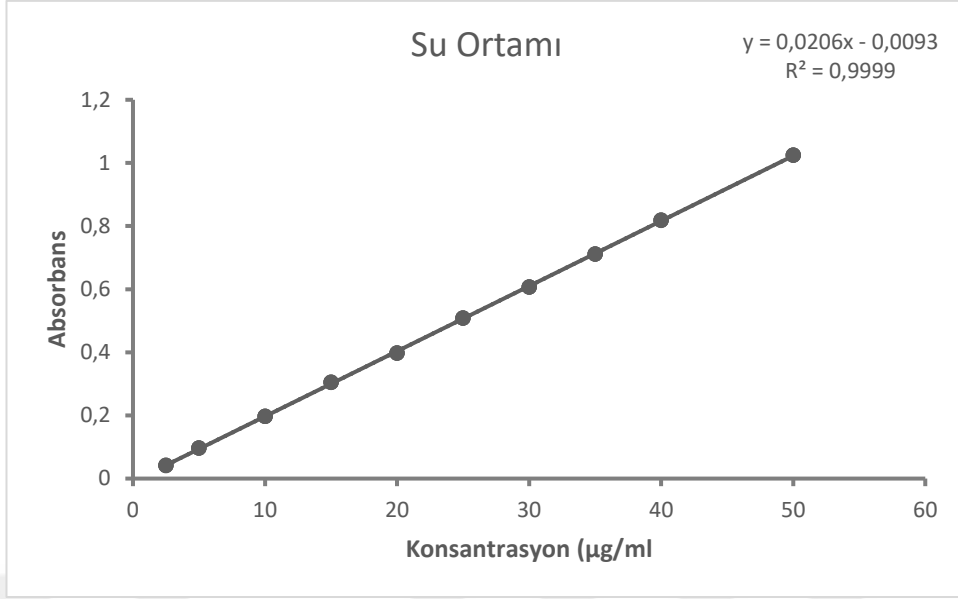
Aynı şekilde SAMe'nin tükürük ortamında 50 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltisinden hazırlanan orta konsantrasyondaki (35 µg/ml) çözeltisinin 200 – 400 nm arasında alınan spektrumunda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun değişmediği, 260 nm olduğu görülmüştür (Şekil 3.2).



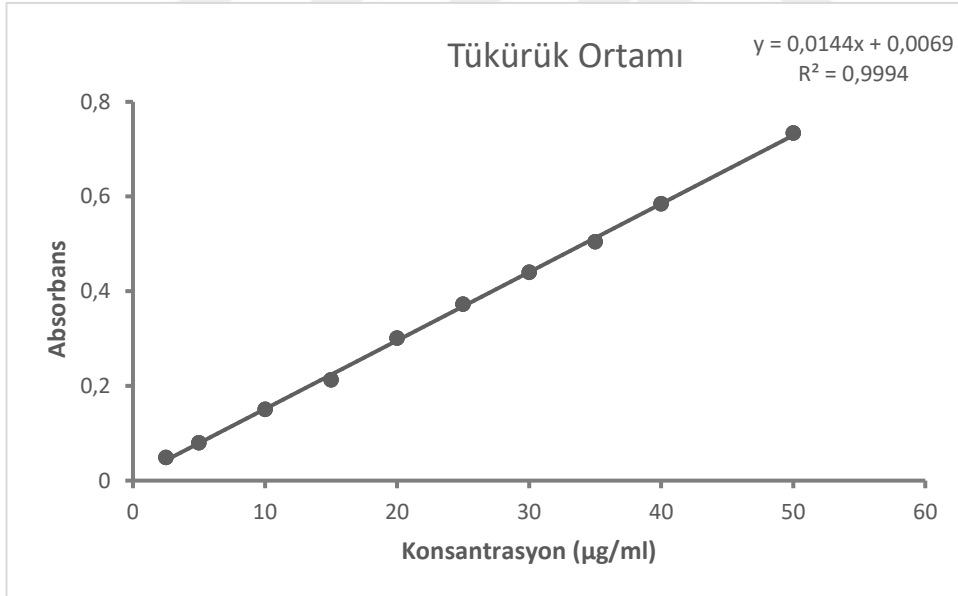
Şekil 3.2: SAME'nin tükürük ortamındaki UV spektrumu

3.1.1.1. SAME'nin Su ve Tükürük Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular

Bölüm 2.2.1.1.1.'de anlatılan şekilde hazırlanan 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerinden hareketle hazırlanan seri çözeltilerinin (2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 µg/ml) (λ_{max}) 260 nm'de gösterdikleri absorbans değerleri kullanılarak su ve tükürük ortamları için ayrı ayrı standart doğrular oluşturulmuştur (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.3: SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ortamında elde edilen standart doğrusu



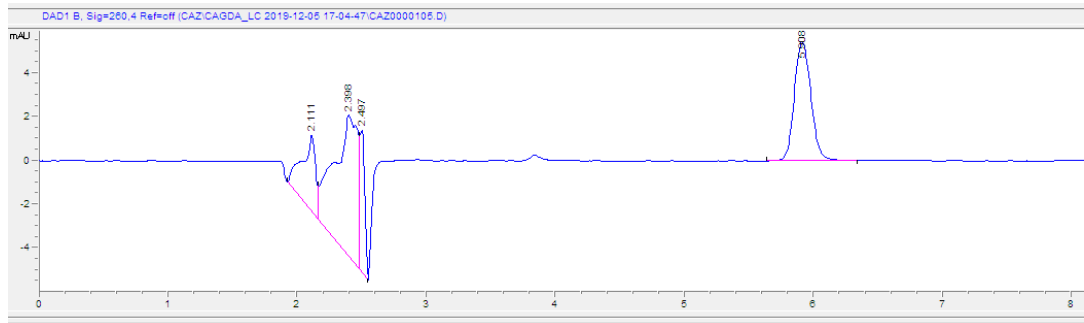
Şekil 3.4: SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak tükürük ortamında elde edilen standart doğrusu

3.1.2. SAMe'nin Su Ortamındaki HPLC Spektrumu

SAMe'nin sudaki çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında HPLC'de alınan spektrumunda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 260 nm olarak bulunmuştur. SAMe'nin su ortamında miktar tayini çalışmaları için belirlenen koşullar Çizelge 3.1'de ve elde edilem kromatogram ise Şekil 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.1: SAMe'nin su ortamındaki HPLC analiz yöntemine ait analiz şartları

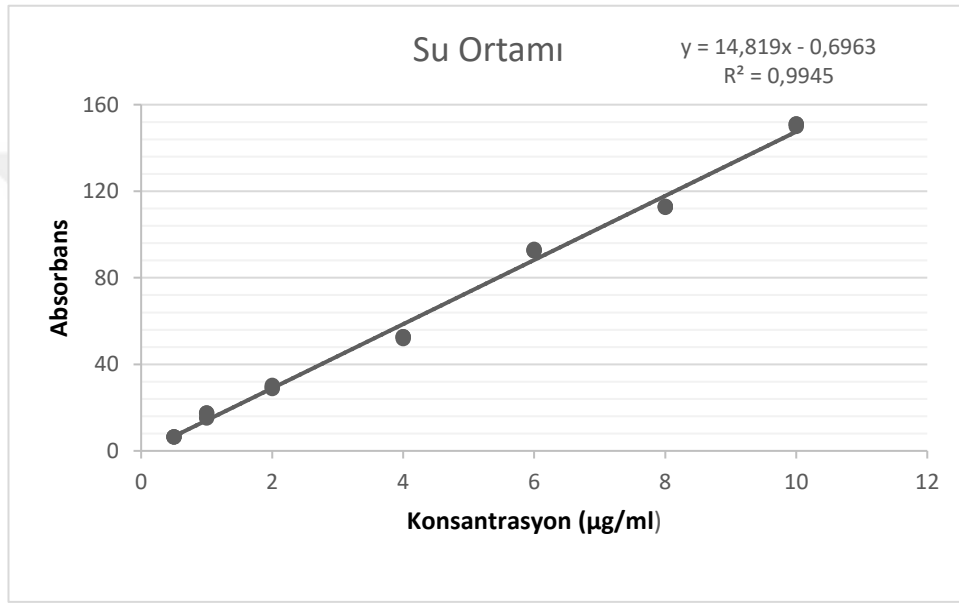
Sıcaklık	30°C
Cihaz	Agilent 1260 Infinite
Kolon	Kinetex® 2,6 µm Biphenyl 100 Å LC
Dalga Boyu	260 nm
Mobil faz	Heptanosülfonik asit sodyum tuzu 1 g Sodyum fosfat monobazik 3 g Metanol 100 ml Ultra saf su 500 ml (pH 6)
Akış hızı	1 ml/dak
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Alıkonma zamanı	5,91 dk



Şekil 3.5: SAMe'nin su ortamındaki HPLC spektrumu

3.1.2.1. SAME'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular

SAMe'nin HPLC analizi final filmlerdeki etkin madde miktarını saptamak amacı ile yapılmıştır. Bölüm 2.2.1.2.1'de anlatılan şekilde oluşturulan standart doğrusu Şekil 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.6: SAMe'nin su ortamındaki standart doğrusu

3.2. SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonu

SAMe'nin Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılan analitik validasyon çalışmalarından elde edilen bulgular aşağıda verilen şekildedir.

3.2.1. SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin UV Spektrofotometrik Kalibrasyonunun Validasyonu

Doğrusallık ve Aralığı

SAMe'nin UV spektrofotometrik miktar tayini için su ve tükürük ortamlarında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı tespit edilmiş, bu doğrular ile ilgili parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2: SAMe'nin UV Spektrofotometri ile miktar tayini için su ve tükürük ortamlarında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı değerleri ile ilgili parametreler

	Su Ortamı	Tükürük Ortamı
Doğrusallık ve Aralığı	2,5-50 µg/mL	2,5-50 µg/mL
Eğim	0,0206	0,0144
Eğimin %95 Güven Aralığı	Alt Sınır: 0,021 Üst Sınır: 0,021	Alt Sınır: 0,014 Üst Sınır: 0,015
Eğimin Önemlilik Değeri	< 0,001	< 0,001
Kesişim	-0,009	-0,007
Kesişimin % 95 Güven Aralığı	Alt Sınır: -0,012 Üst Sınır: -0,007	Alt Sınır:0,003 Üst Sınır:0,011
Determinasyon Katsayısı	0,9999	0,9994

Doğruluk

SAMe'nin su ve tükürük ortamlarında miktar tayinleri için geliştirilen spektrofotometrik yöntemin doğruluk ve geri elde çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış olup yapılan çalışmaların bulguları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3: UV spektrofotometrisinde yapılan SAMe'nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

10 µg/ml			20 µg/ml			40 µg/ml		
Absorbans	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Absorbans	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Absorbans	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde
0,1973	10,03	100,29	0,3968	19,71	98,57	0,8179	40,16	100,39
0,1970	10,02	100,15	0,3974	19,74	98,71	0,8181	40,17	100,42
0,1969	10,01	100,10	0,3973	19,74	98,69	0,8184	40,18	100,45
0,1969	10,01	100,10	0,3973	19,74	98,69	0,8185	40,18	100,46
0,1970	10,01	100,15	0,3971	19,73	98,64	0,819	40,21	100,52
Ortalama		100,16	Ortalama		98,66	Ortalama		100,45
SS		0,0798	SS		0,0579	SS		0,0511
% BSS		0,0796	% BSS		0,0587	% BSS		0,0508

Çizelge 3.4: UV spektrofotometrisinde yapılan SAmE'nin tükürük ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

10 µg/ml			30 µg/ml			40 µg/ml		
Absorban	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Absorban	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Absorban	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde
0,1499	9,93	99,31	0,4402	30,09	100,30	0,5845	40,11	100,28
0,1502	9,95	99,51	0,4397	30,06	100,16	0,5844	40,10	100,26
0,1507	9,98	99,86	0,4404	30,10	100,35	0,5845	40,11	100,28
0,1501	9,94	99,44	0,4406	30,12	100,39	0,5848	40,13	100,33
0,1505	9,97	99,72	0,4408	30,13	100,44	0,5846	40,12	100,30
Ortalama		99,57	Ortalama		100,33	Ortalama		100,29
SS		0,2218	SS		0,0977	SS		0,0263
% BSS		0,2227	% BSS		0,0973	% BSS		0,0263

Kesinlik

SAmE'nin su ve tükürük ortamlarında miktar tayinleri için geliştirilen spektrofotometrik yöntemin kesinliği Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

SAmE'nin UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5: SAME'nin UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Su Ortamı (25µg/mL)				Tükürük Ortamı (35µg/mL)			
Analiz No	Absorbans	C _{Pratik} (µg/ml)	Geri Kazanım (%)	Analiz No	Absorbans	C _{Pratik} (µg/ml)	Geri Kazanım (%)
1	0,5087	25,15	100,58	1	0,5042	34,54	98,67
2	0,5087	25,15	100,58	2	0,5043	34,54	98,69
3	0,5087	25,15	100,58	3	0,5045	34,56	98,73
4	0,5085	25,14	100,54	4	0,5045	34,56	98,73
5	0,5085	25,14	100,54	5	0,5043	34,54	98,69
6	0,5085	25,14	100,54	6	0,5043	34,54	98,69
7	0,5086	25,14	100,56	7	0,5044	34,55	98,71
8	0,5085	25,14	100,54	8	0,5046	34,56	98,75
9	0,5085	25,14	100,54	9	0,5045	34,56	98,73
10	0,5085	25,14	100,54	10	0,5054	34,62	98,91
Ortalama	100,56			Ortalama	98,76		
SS	0,0184			SS	0,0872		
BSS (%)	0,0183			BSS (%)	0,0883		

Ara kesinlik

SAMe'nin UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.6: SAMe'nin su ortamında UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Analiz No	Analist 1	Analist 1	Analist 2
	C _{Pratik} (µg/ml)	C _{Pratik} (µg/ml)	C _{Pratik} (µg/ml)
	1.gün	2. gün	
1	25,06	25,33	25,17
2	25,06	25,33	25,16
3	25,06	25,33	25,16
4	25,05	25,33	25,16
5	25,05	25,34	25,15
Ortalama	25,06	25,33	25,16
SS	0,0055	0,0045	0,0070
BSS (%)	0,0219	0,0177	0,0281

Çizelge 3.7: SAME'nin tükürük ortamında UV spektrofotometrisinde yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Analiz No	Analist 1	Analist 1	Analist 2
	C _{Pratik} (µg/ml) 1.gün	C _{Pratik} (µg/ml) 2. gün	C _{Pratik} (µg/ml)
1	34,54	34,87	35
2	34,54	34,88	35
3	34,56	34,88	35
4	34,56	34,87	34,99
5	34,55	34,87	34,99
Ortalama	34,55	34,87	34,99
SS	0,01	0,0055	0,0055
BSS (%)	0,0289	0,0157	0,0157

Teşhis ve Tayin Sınırları

UV spektrofotometrisi’de yapılan standart doğrularından elde edilen teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.2’de belirtildiği gibi hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8: SAME'nin UV spektrofotometrisinde yapılan standart doğrularından elde edilen LOD ve LOQ değerleri

	Su Ortamı (µg/ml)	Tükürük Ortamı (µg/ml)
LOD	1,8566	2,4135
LOQ	6,1268	7,9647

3.3. Sublingual Film Formülasyonları Üzerine Yapılan Çalışmalar

3.3.1. SAME'nin HPLC Kalibrasyonunun Validasyonu

Doğrusallık ve Aralığı

SAME'nin HPLC ile miktar tayini için su ortamında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı çalışmaları Bölüm 2.2.2' de anlatıldığı gibi yapılmış olup, doğrusallık ve aralığı ile ilgili parametreler Çizelge 3.9'da yer almaktadır.

Çizelge 3.9: SAME'nin HPLC ile miktar tayini için su ortamında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı ile ilgili parametreler

Su Ortamı	
Doğrusallık ve Aralığı	0,5-10 µg/mL
Eğim	14,819
Eğimin %95 Güven Aralığı	Alt Sınır: 14,271 Üst Sınır: 15,367
Eğimin Önemlilik Değeri	< 0,001
Kesişim	-0,955
Kesişimin %95 Güven Aralığı	Alt Sınır: -4,031 Üst Sınır: 2,122
Determinasyon Katsayısı	0,9945

Doğruluk

SAME'nin su ortamında miktar tayini için geliştirilen HPLC yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış olup, yapılan çalışmaların bulguları Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10: HPLC’de yapılan SAm’e’nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

0,5 µg/ml			4 µg/ml			8 µg/ml		
Alan	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Alan	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde	Alan	C _{Pratik} (µg/ml)	% Geri Elde
6,6	0,49	98,47	52,8	3,61	90,25	113	7,67	95,90
6,5	0,49	97,12	52,8	3,61	90,25	113,1	7,68	95,99
6,4	0,48	95,77	52	3,56	88,90	112,6	7,65	95,57
6,6	0,49	98,47	53,4	3,65	91,26	111,7	7,59	94,81
6,6	0,49	98,47	54,8	3,75	93,62	111,6	7,58	94,72
Ortalama		97,66	Ortalama		90,86	Ortalama		95,40
SS		1,2071	SS		1,7597	SS		0,6000
% BSS		1,2360	% BSS		1,9368	% BSS		0,6283

Kesinlik

SAm’e’nin su ve tükürük ortamlarında miktar tayinleri için geliştirilen HPLC yönteminin kesinliği Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

SAMe'nin HPLC'de yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.11: SAMe'nin HPLC'de yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Su Ortamı (8 µg/ml)			
Analiz No	Alan	C _{Pratik} (µg/ml)	Geri Kazanım (%)
1	113	7,67	95,90
2	113,1	7,68	95,99
3	112,6	7,66	95,57
4	111,7	7,59	94,81
5	111,6	7,58	94,72
6	111	7,54	94,22
7	111,4	7,56	94,56
8	112	7,61	95,06
9	112,6	7,65	95,57
10	110,6	7,51	93,88
Ortalama		95,03	
SS		0,7160	
BSS (%)		0,7534	

Ara kesinlik

SAMe'nin HPLC'de yapılan miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışmaları Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış, elde edilen sonuçlar Tablo Çizelge 3.12'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.12: HPLC'de yapılan SAMe'nin su ortamındaki miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen ara kesinlik sonuçları

Analiz No	Analist 1	Analist 1	Analist 2
	C_{Pratik} (8 $\mu\text{g/ml}$) 1.gün	C_{Pratik} (8 $\mu\text{g/ml}$) 2. gün	C_{Pratik} (8 $\mu\text{g/ml}$)
1	7,67	7,78	7,76
2	7,68	7,77	7,76
3	7,65	7,81	7,74
4	7,61	7,82	7,73
5	7,6453	7,8486	7,77
Ortalama	7,6494	7,8049	7,75
SS	0,0293	0,0309	0,0159
BSS (%)	0,3825	0,3960	0,2056

Teşhis ve Tayin Sınırları

HPLC’de yapılan standart doğrularından elde edilen teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.2’de belirtildiği gibi hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Çizelge 3.13: HPLC’de yapılan standart doğrularından elde edilen LOD ve LOQ değerleri

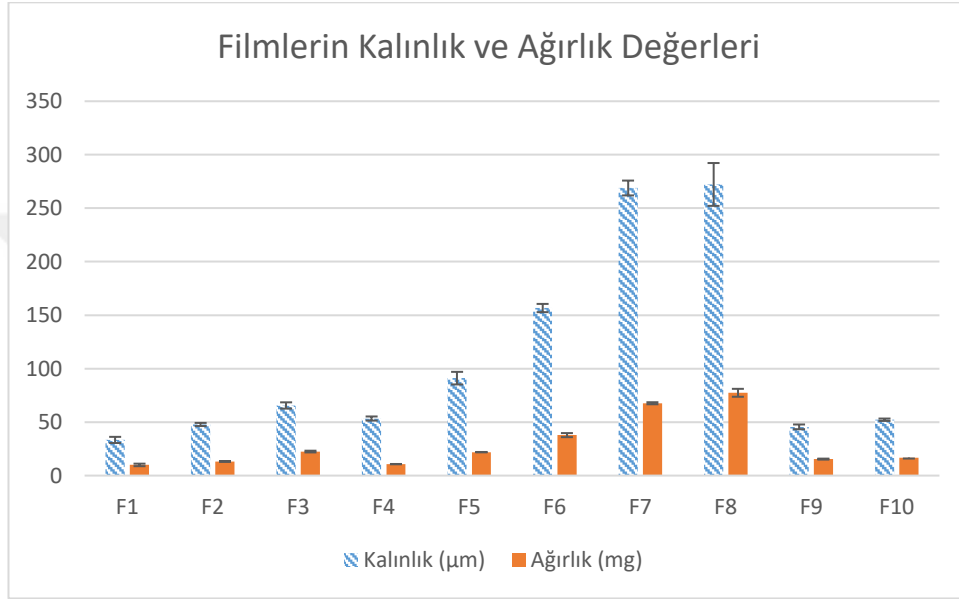
	Su Ortamı (µg/ml)
LOD	0,0157
LOQ	0,0517

3.3.2. Etkin madde içermeyen sublingual filmlerin hazırlanması

Çizelge 2.1’de görülen formülasyonlar içinde film oluşturabilen polimerler, uygun plastizerler, işlem koşullar belirlenmiştir. Ayrıca aynı çizelgede film oluşumuna ilişkin bilgiler de yer almaktadır. Bu bilgiler ışığında Çizelge 2.2’de verilen formülasyonlar hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi FD7, FD8, FD9, FD10, FD12, FD14, FD15, FD18, FD19, FD20, FD23, FD26, FD31, FD32 ve FD33’te uygun film oluşumu gözlenmiştir. Bu formülasyonlardan oluşan filmlerin fiziksel özellikleri değerlendirilerek Çizelge 2.2’de görülen formülasyonlar yeniden hazırlanmıştır. Oluşturulan film formülasyonlarının kontrol testleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.1. Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin İncelenmesi

Bölüm 2.2.3.2.1’de anlatıldığı gibi kalınlıkları ve ağırlıkları ölçülen filmlerin ağırlık ve kalınlık değerleri ile bu değerlere ait standart hatalar Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7: Filmlerin kalınlık ve ağırlık değerleri

3.3.2.2. Filmlerin Katlanma Dayanımlarının İncelenmesi

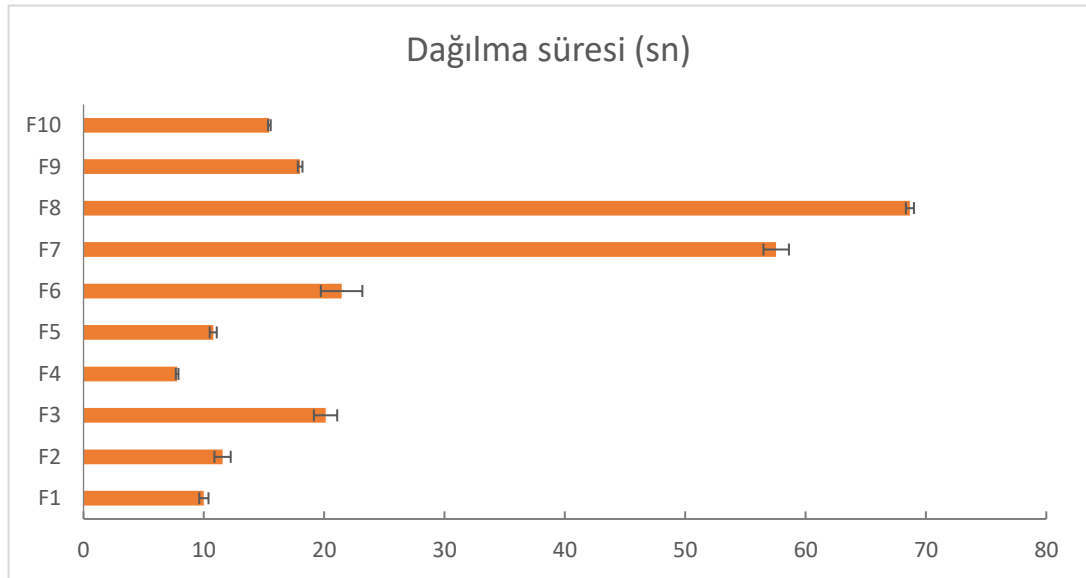
Bölüm 2.2.3.2.2’de anlatıldığı gibi katlanma dayanımları incelenen filmlerin hepsinin katlanma dayanımı 300’den fazla bulunmuştur.

3.3.2.3. Filmlerin Dağılma Zamanlarının İncelenmesi

Bölüm 2.2.3.2.3’te anlatıldığı gibi dağılma zamanları ölçülen filmlere ait bulgular Çizelge 3.14’te; dağılma zamanlarını ve bu değerlerin standart hatalarını gösteren grafik Şekil 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.14: Film formülasyonlarının ortalama dağılma zamanları

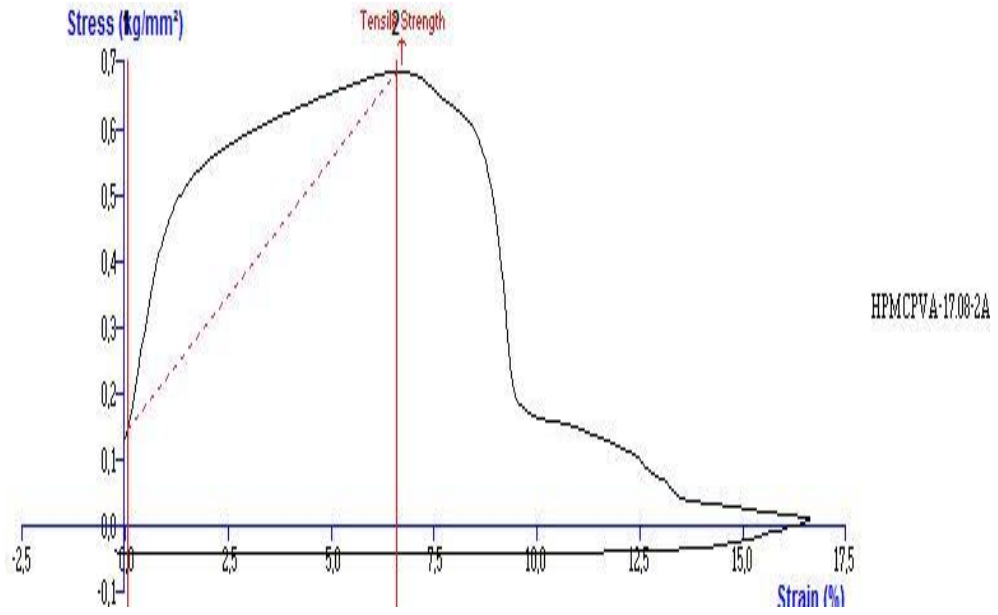
Formülasyon	Dağılma süresi ortalama (sn) ($\pm$ SH)
F1	10 $\pm$ 0,67
F2	11,56 $\pm$ 1,23
F3	20,12 $\pm$ 1,78
F4	7,78 $\pm$ 0,23
F5	10,78 $\pm$ 0,56
F6	21,45 $\pm$ 3,45
F7	57,56 $\pm$ 1,89
F8	68,67 $\pm$ 0,67
F9	18 $\pm$ 0,34
F10	15,45 $\pm$ 0,23



Şekil 3.8: Film formülasyonlarının dağılma zamanları ($\pm$ SH)

3.3.2.4. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Filmlerin mekanik özellikleri (gerilme dayanımı, elastik modül, uzama yüzdesi) TA.XT tekstür analiz cihazı kullanılarak Bölüm 2.2.3.2.4.'te anlatıldığı şekilde incelenmiştir. F6 kodlu filme ait mekanik özellikleri gösteren grafik Şekil 3.9'da, filmlerin mekanik özelliklerine ait parametreler Çizelge 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.9: F6 filminin gerilme dayanımının zamana karşı grafiği

Çizelge 3.15: Film formülasyonlarının gerilme direnci, Young modülü ve uzama yüzdesi değerleri ($\pm SH$)

Sütun1	Gerilme Direnci (mPa)	Young Modülü (mPa)	Uzama Yüzdesi (%)
F1	9,37 $\pm$ 3,51	0,47 $\pm$ 0,33	2,24 $\pm$ 1,1
F2	19,19 $\pm$ 0,66	0,64 $\pm$ 0,24	2,87 $\pm$ 0,9
F3	26,81 $\pm$ 1,77	1,29 $\pm$ 0,37	1,93 $\pm$ 0,64
F4	16,83 $\pm$ 6,93	0,7 $\pm$ 0,36	2,23 $\pm$ 0,84
F5	19,02 $\pm$ 2,32	0,89 $\pm$ 0,07	1,93 $\pm$ 0,17
F6	7,76 $\pm$ 1,08	0,19 $\pm$ 0,08	4,11 $\pm$ 1,29
F7	6,69 $\pm$ 0,45	0,04 $\pm$ 0,01	16,2 $\pm$ 0,94
F8	8,76 $\pm$ 1,43	0,05 $\pm$ 0,01	16,67 $\pm$ 0
F9	33,16 $\pm$ 2,89	1,66 $\pm$ 0,46	2,03 $\pm$ 0,7
F10	25,68 $\pm$ 4,53	1,55 $\pm$ 0,25	1,67 $\pm$ 0,17

Elde edilen verilerden hareket ile etkin madde ilave edilmesi planlanan 4 formülasyonun viskozite ve mukoadezyon çalışmaları yapılmıştır.

3.3.2.5. Formülasyonların Çözeltilerinin Viskozitesinin Ölçülmesi

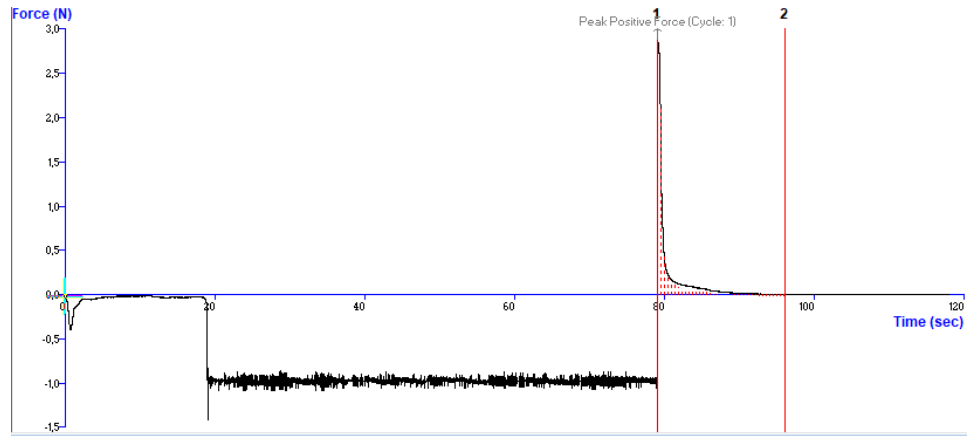
Bölüm 2.2.3.2.5.'te anlatıldığı gibi, etkin madde ilave edilmesi planlanan formülasyonların çözeltilerinin viskozite değerleri ölçülmüştür. Bulunan değerler Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.16: Etkin madde yüklenmesi planlanan formülasyonların çözeltilerinin viskozite değerleri

Formülasyon	Viskozite (cP)
F6	36
F7	32
F9	24
F10	16

3.3.2.6. İn vitro mukoadesyon testi

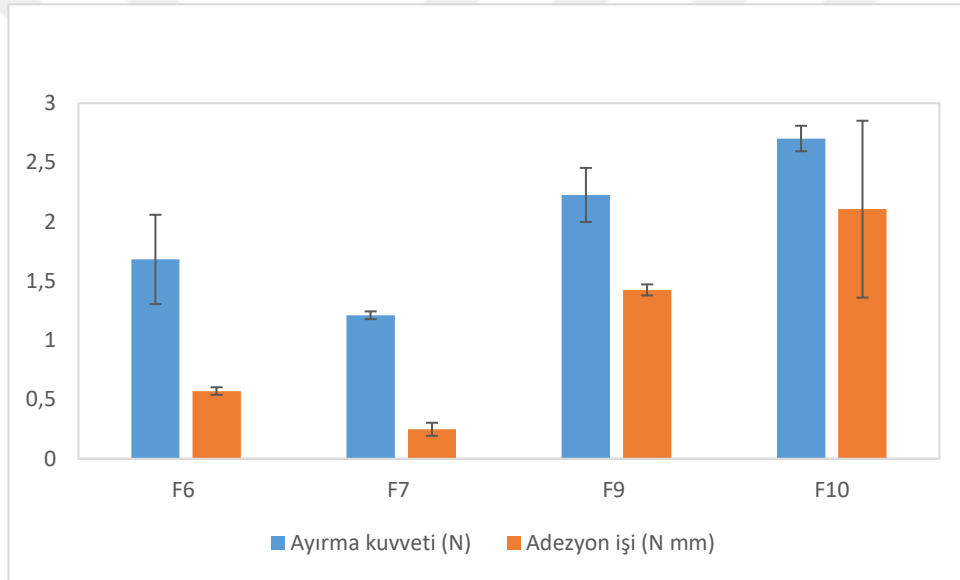
Bölüm 2.2.3.2.6’da anlatıldığı gibi, etkin madde yüklenmesi planlanan film formülasyonların mukoadesyon testleri yapılmıştır. Filmlerin kopma kuvvetleri ve adezyon işleri Çizelge 3.17’de bu değerlerin standart hatalarını gösteren grafik Şekil 3.11’de, F10 filminin müsinli yüzeyden koparılma/ayırma kuvvetini ve adezyon işini gösteren grafik Şekil 3.10’de verilmiştir.



Şekil 3.10: F10 filmini yüzeyden ayırma gerilimi ve adezyon işini gösteren grafik

Çizelge 3.17: Etkin madde yüklenmesi planlanan film formülasyonların kopma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm SH$)

Formülasyon	Temas süresi (sn)	Müsinli yüzeyden ayırma kuvveti (N)	Adezyon işi (N.mm)
F6	60	1,69 $\pm$ 0,75	0,58 $\pm$ 0,07
F7	60	1,22 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,11
F9	60	2,23 $\pm$ 0,44	1,43 $\pm$ 0,1
F10	60	2,71 $\pm$ 0,21	2,11 $\pm$ 1,43

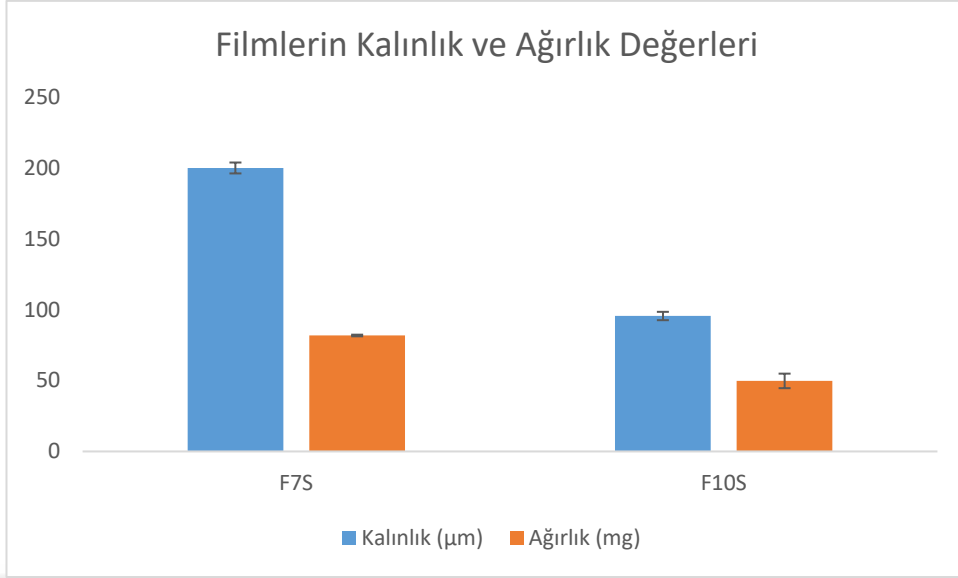


Şekil 3.11: Etkin madde yüklenmesi planlanan film formülasyonlarının yüzeyden ayırma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm SH$)

3.3.3. SAME Yüklenen Filmler Üzerinde Yapılan Kontroller

3.3.3.1. SAME Yüklenen Filmlerin Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzelığının İncelenmesi

Bölüm 2.2.3.2.1’de anlatıldığı gibi kalınlıkları ve ağırlıkları ölçülen SAME yüklenen filmlerin ağırlık ve kalınlık değerleri ile bu değerlere ait standart hatalar Şekil 3.12’de verilmiştir.



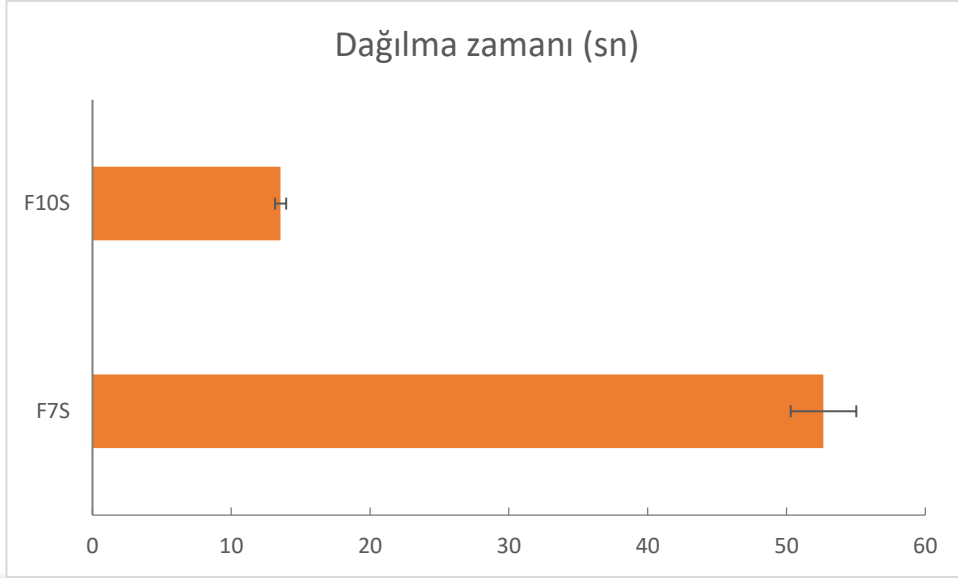
Şekil 3.12: F7S ve F10S'in kalınlık ve ağırlık değerleri ($\pm$ SH)

3.3.3.2. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Katlanma Dayanımlarının İncelenmesi

Bölüm 2.2.3.2.2'de anlatıldığı gibi katlanma dayanımları incelenen SAME yüklü filmlerin katlanma dayanımları 300'den fazla bulunmuştur.

3.3.3.3. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Dağılma Zamanlarının İncelenmesi

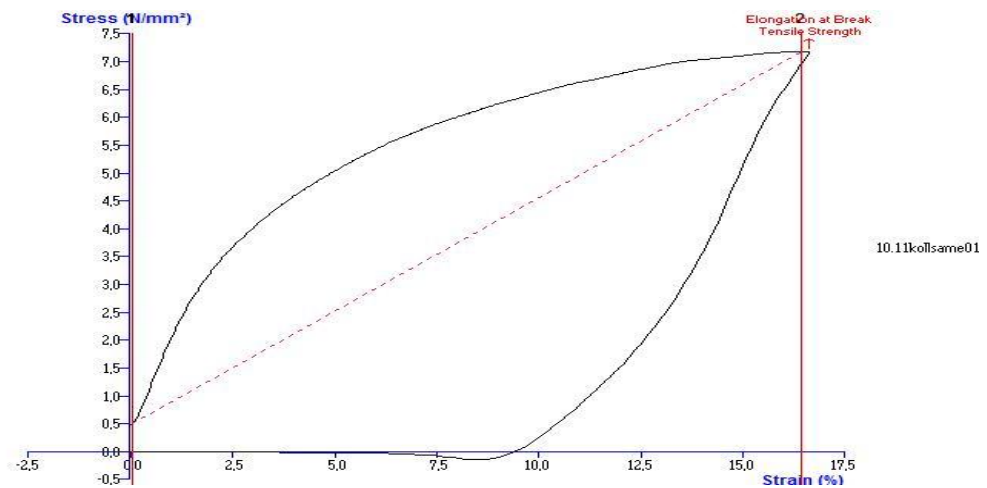
Bölüm 2.2.3.2.3'te anlatıldığı gibi etkin madde yüklenen filmlerin dağılma zamanları ölçülmüş, elde edilen veriler Şekil 3.13'te belirtilmiştir.



Şekil 3.13: F7S ve F10S'in dağılma zamanları ($\pm SH$)

3.3.3.4. Etkin Madde Yüklenen Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Filmlerin mekanik özellikleri (gerilme dayanımı, elastik modül, uzama yüzdesi) TA.XT tekstür analiz cihazı kullanılarak Bölüm 2.2.3.2.4'te anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Filmlerin mekanik özelliklerine ait parametreler Çizelge 3.18 ile verilmiştir. F7S kodlu formüle ait mekanik özellikleri gösteren grafik ise Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.14: F7S filminin gerilme gerinim grafiği

Çizelge 3.18: F7S ve F10S'in gerilme direnci, Young modülü ve uzama yüzdesi değerleri ($\pm SH$)

Sütun1	Gerilme Direnci (mPa)	Young Modülü (mPa)	Uzama Yüzdesi (%)
F7S	7,68 $\pm$ 0,11	0,05 $\pm$ 0,01	16,67 $\pm$ 0
F10S	2,31 $\pm$ 0,62	0,09 $\pm$ 0,08	3,64 $\pm$ 2,71

3.3.3.5. Etkin Madde Yüklenen Formülasyonların Çözeltilerinin Viskozitesinin Ölçülmesi

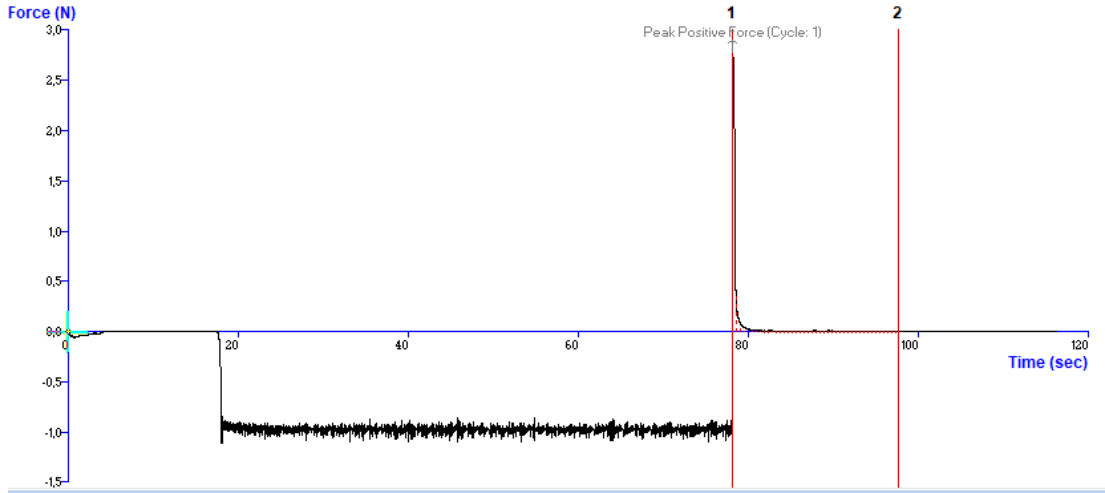
SAMe yüklenen formülasyonların çözeltilerinin viskozite değerleri Bölüm 2.2.3.2.5'te anlatıldığı gibi ölçülmüştür. Bulunan değerler Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.19: F7S ve F10S'in çözeltilerinin viskozite değerleri

Formülasyon	Viskozite (cP)
F7S	29.4
F10S	10.2

3.3.3.6. İn Vitro Mukoadezyon Testi

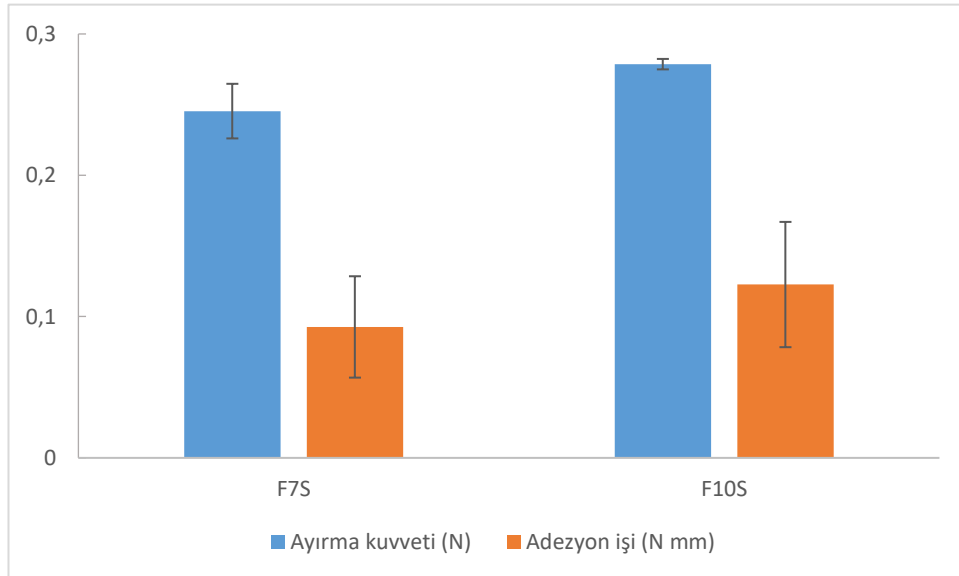
SAMe yüklenen filmlerin mukoadezyon testi Bölüm 2.2.3.2.6.'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Filmlerin kopma kuvvetleri ve adezyon işleri Çizelge 3.20'de, bu değerlerin standart hatalarını gösteren grafik Şekil 3.16'da, F10S'ye ait mukoadezyon grafiği Şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.15: F10S filmini yüzeyden ayırma kuvvetini ve adezyon işini gösteren grafik

Çizelge 3.20: F7S ve F10S'in kopma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm SH$)

Formülasyon	Temas süresi (sn)	Ayırma kuvveti (N)	Adezyon işi (N mm)
F7S	60	$0,25 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,07$
F10S	60	$0,28 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,09$



Şekil 3.16: F7S ve F10S filmlerini yüzeyden ayırma kuvvetleri ve adezyon işleri ($\pm SH$)

3.3.3.7. SAMe yüklenen formülasyon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesi

Kollicoat® Protect içeren F7S ve pullulan içeren F10S formülasyonlarının Bölüm 2.2.3.3'te anlatıldığı şekilde belirlenen pH değerleri sırasıyla 1,7 ve 2,16'dır.

3.3.3.8. SAMe Yüklenen Filmlerin İçerik Tekdüzeliliğinin İncelenmesi

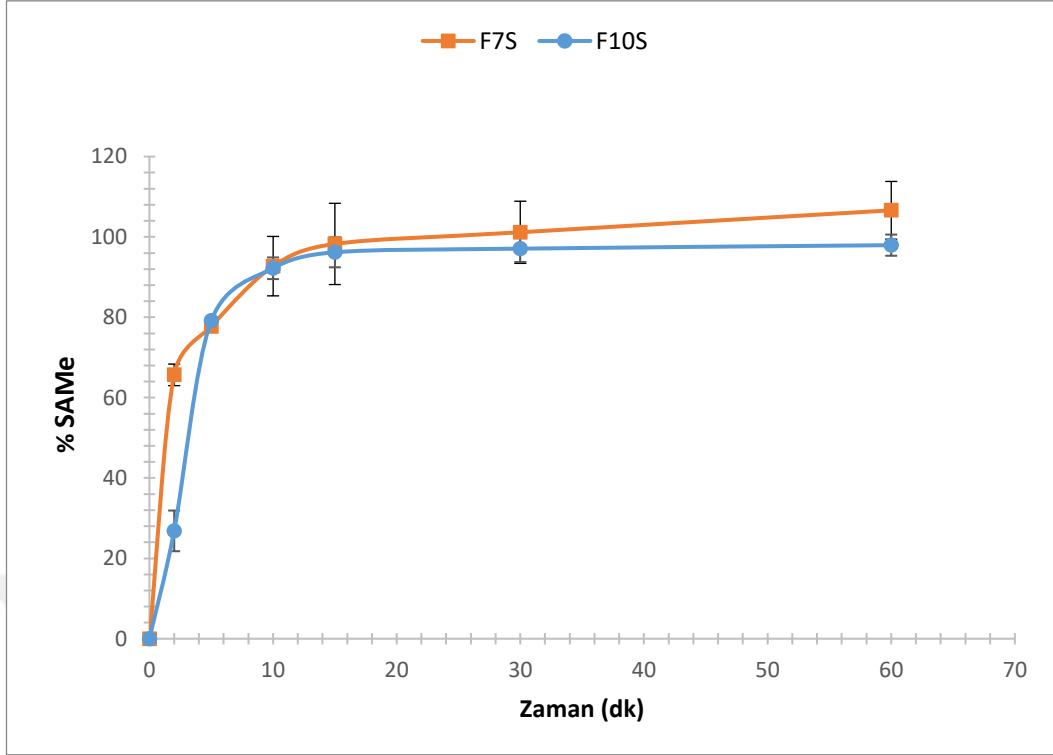
F7S ve F10S filmlerinin içerik tekdüzeliliği çalışması Bölüm 2.2.4.4'te anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Kollicoat® Protect içeren F7S filminin % etkin madde içeriği $40,39 \pm 6,03$; pullulan içeren F10S filminin % etkin madde içeriği $62,24 \pm 4,92$ olarak bulunmuştur.

3.3.3.9. SAMe Yüklenen Filmlerin Nem İçeriklerinin İncelenmesi

Etkin madde yüklenen filmlerin nem içerikleri Bölüm 2.2.3.4.3'te anlatıldığı gibi ölçülmüştür. Kollicoat® Protect içeren F7S filminin nem içeriği $6,38 \pm 0,03$; pullulan içeren F10S filminin nem içeriği $2,95 \pm 0,24$ olarak ölçülmüştür.

3.3.3.10. SAMe Yüklenen Filmlerin Filmlerden Etkin Madde Salım Profilinin İncelenmesi

F7S ve F10S filmlerinin in vitro çözünme çalışması Bölüm 2.2.3.4.4.'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, etkin madde salım profilleri Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.17: F7S ve F10S'nin etkin madde salım profillerinin karşılaştırmalı gösterimi ($\pm$ SH)

Weibull matematiksel modelinin SAME'nin F7S ve F10S filmlerinden salım verilerine uygulanması ile SAME'nin salım profilleri kinetik açıdan incelenmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.21'de verilmiştir.

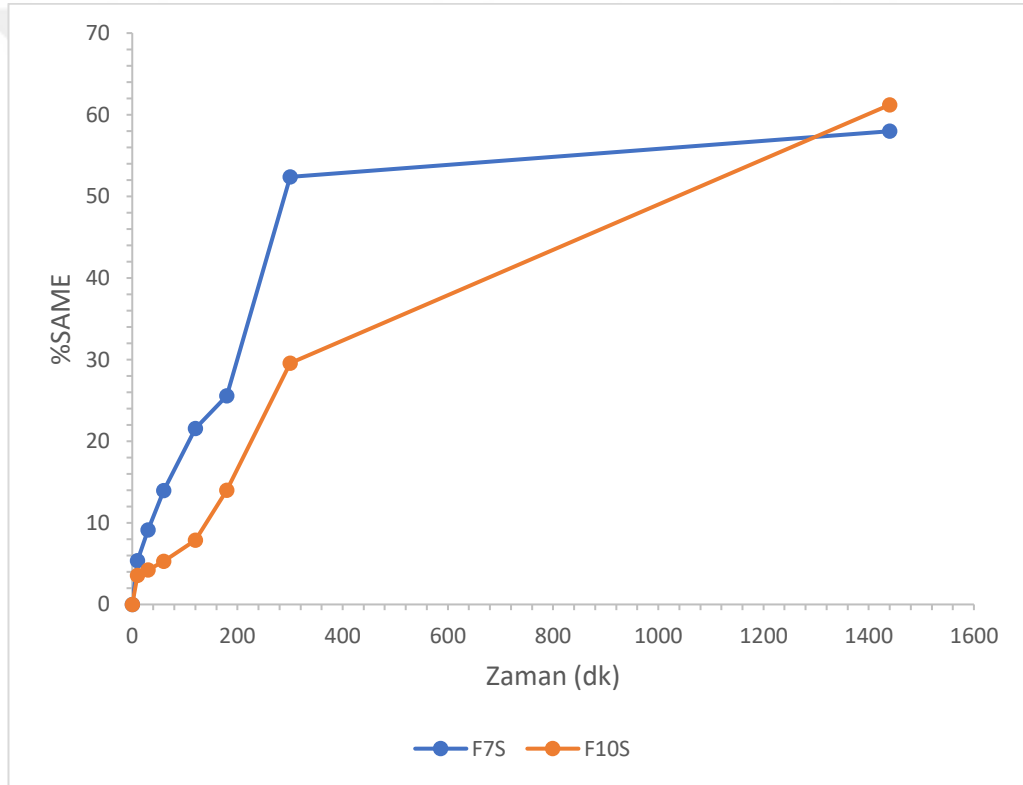
Çizelge 3.21: F7S ve F10S filminden SAME'nin salım verilerine Weibull matematiksel modelinin uygulanması ve kinetiğin parametreleri

	Eşitlik	R^2	$R^2_{adjusted}$	AIC	MSC	τd	β
F7S	$\log[\ln(1/1-Q)] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d$	0,9969	0,9939	30,5624	3,3384	2,66	0,3250
F10S	$\log[\ln(1/1-Q)] = \beta \log \tau \beta \log \tau d$	0,9702	0,9553	45,5431	1,9386	3,11	0,9436

3.3.2.11. İn vitro Permeasyon Çalışmaları

Dikey difüzyon hücreleri ile permeasyon tayini

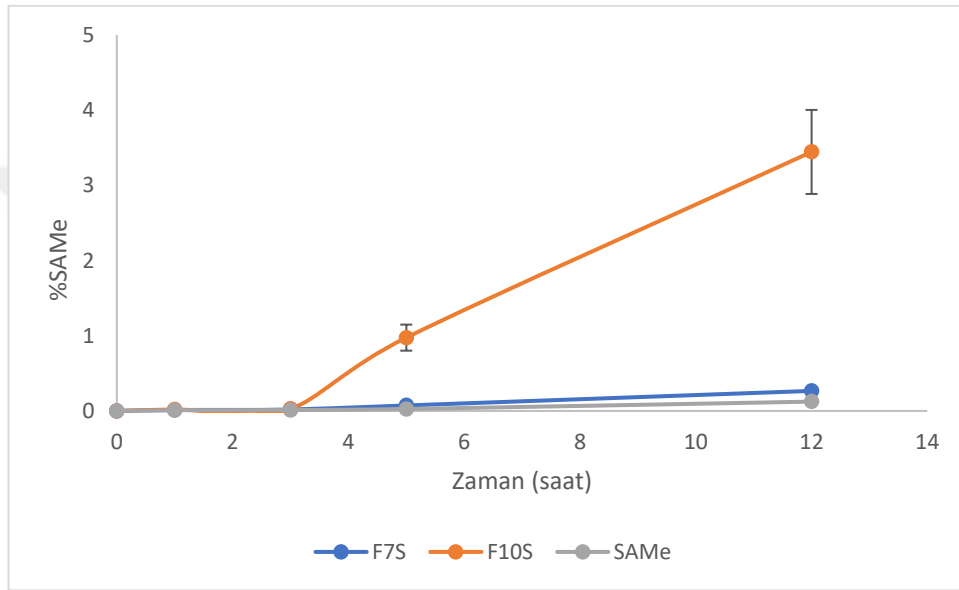
Etkin madde yüklü filmlerden etkin maddenin permeasyon tayini Bölüm 2.2.3.4.5'te anlatıldığı gibi dikey difüzyon hücreleri (enhancer cells) kullanılarak palet yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 3.18 ve Çizelge 3.23'te verilmiştir.



Şekil 3.18: F7S ve F10S'in etkin madde permeasyon profili

PAMPA ile permeasyon tayini

Etkin madde yüklü filmlerden etkin maddenin yapay membranlardan permeasyon tayini Bölüm 2.2.3.4.5'te anlatıldığı gibi yapılmış, elde edilen bulgular Şekil 3.19'da ve Çizelge 3.22'de verilmiştir.



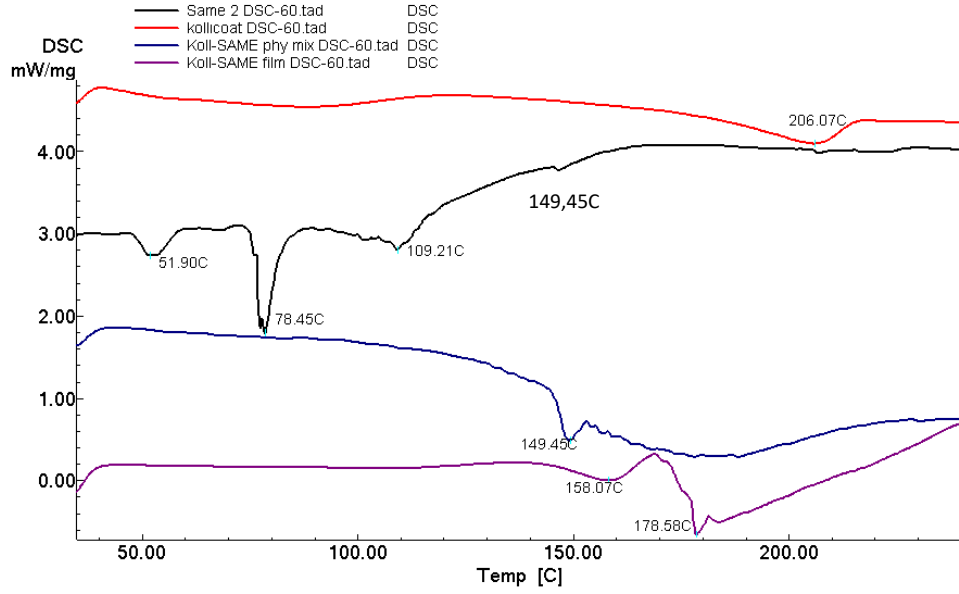
Şekil 3.19: F7S, F10S ve SAME çözeltisinin permeasyon profili

Çizelge 3.22: Saf SAME, F7S ve F10S'in permeabilite katsayıları

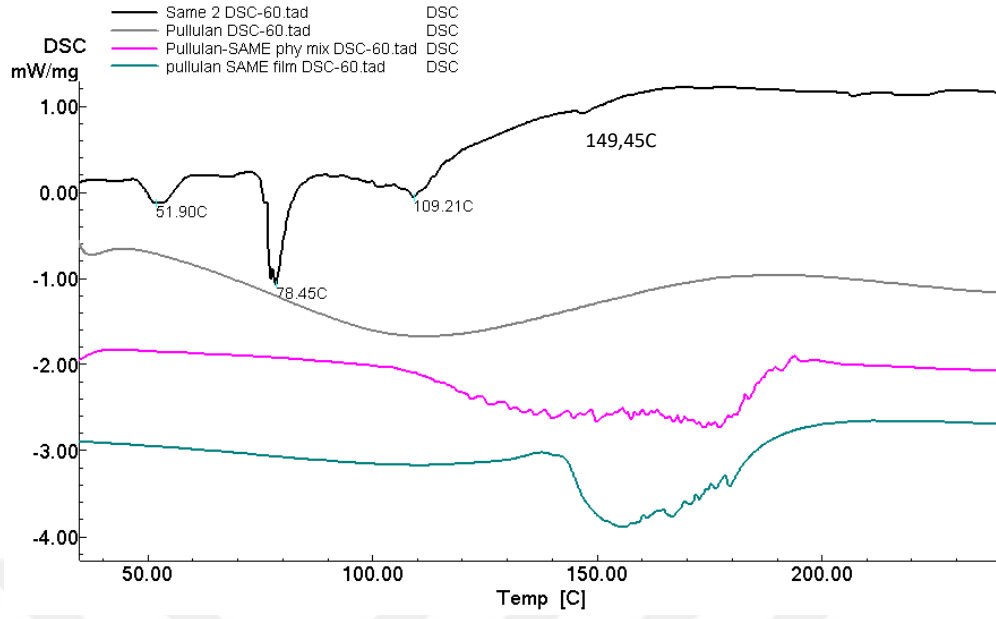
Örnekler	Yöntem	
	PAMPA modeli	Dikey difüzyon hücresi
	Permeabilite katsayısı (cm/sa)	
Saf SAME	55,5x10 ⁻⁶	-
F7S	93x10 ⁻⁶	424,82x10 ⁻⁶
F10S	544x10 ⁻⁶	452,27x10 ⁻⁶

3.3.3.11. Film Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

SAMe'nin, pullulan ve Kollicoat® Protect'in, film formülasyonunu oluşturan bileşenlerin fiziksel karışımlarının ve SAMe yüklenen filmlerin DSC analizleri Bölüm 2.2.3.4.6'da anlatıldığı şekilde yapılmış, elde edilen termogramları Şekil 3.20 ve 3.21'de verilmiştir.



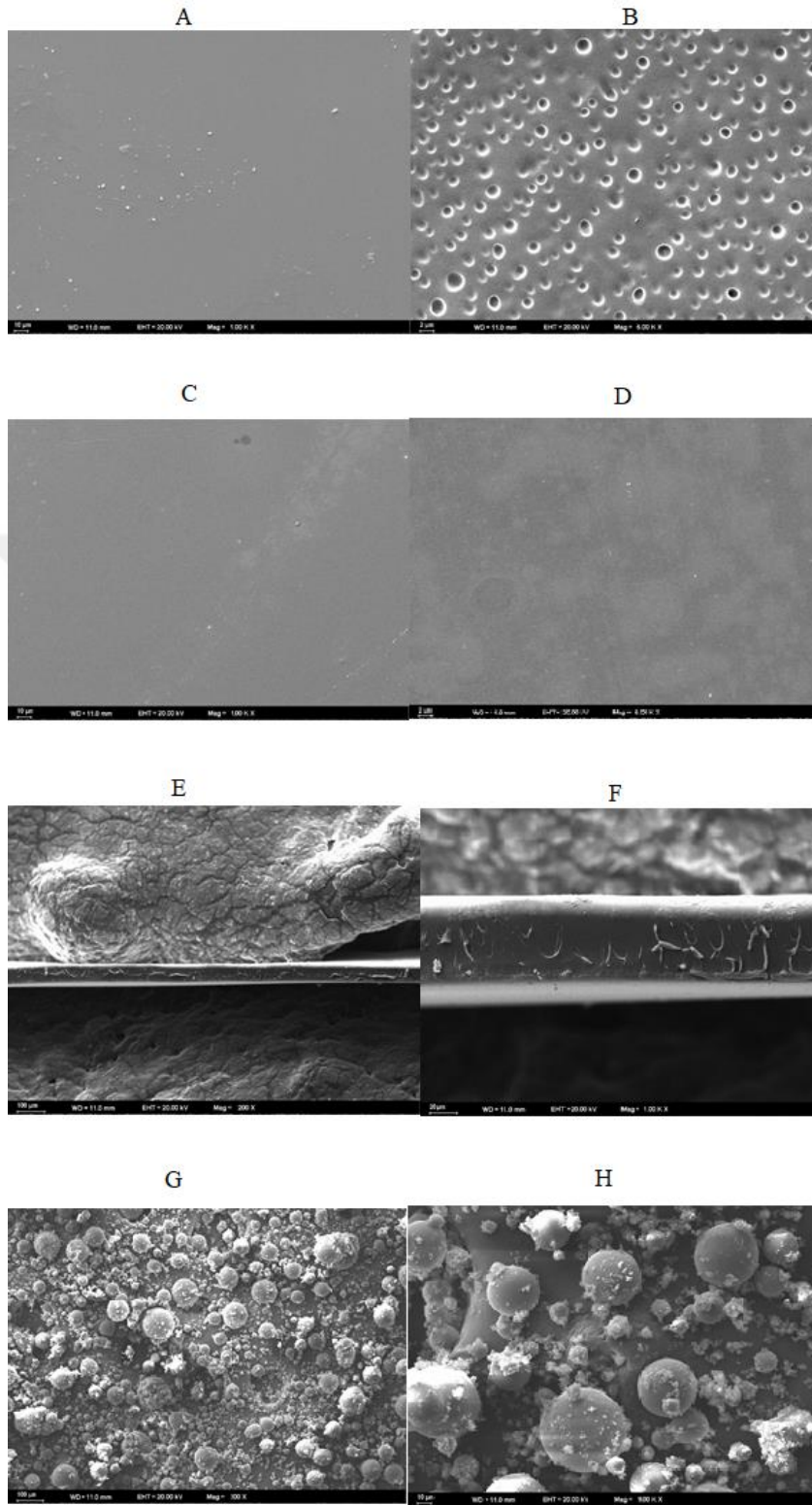
Şekil 3.20: SAMe, Kollicoat, Kollicoat-SAMe fiziksel karışımı ve F7S filminin DSC termogramı



Şekil 3.21: SAmE, pullulan, pullulan-SAmE fiziksel karışımı ve F10S filminin DSC termogramı

3.3.3.12. Film Formülasyonlarının Görüntülenmesi

SAmE, SAmE içermeyen boş filmler (F7 ve F10) SAmE yüklenen filmlerden (F7S ve F10S) alınan örnekler Bölüm 2.2.3.4.7’de anlatılan yöntem ile görüntülenmiş, elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.22’de verilmiştir.



Şekil 3.22: Final formülasyonlarda polimerler, filmler ve etkin maddenin SEM görüntüleri (A: F7, B: F7S, C: F10, D: F10S, E ve F: F10S'in yandan kesiti, G ve H: SAME)

3.3.3.13. Stabilite Çalışmaları

Bölüm 2.2.3.4.8’de anlatıldığı şekilde SAME yüklü filmlerin stabilitesi incelenmiş, elde edilen bulgular Çizelge 3.23’te verilmiştir.

Çizelge 3.23: F7S ve F10S’in stabilite sonuçları ($\pm$ SH)

Etkin madde içeriği					
	Başlangıç	20.gün		40.gün	
	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3 °C	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3 °C
F7S	% 40,39 $\pm$ 6,03	% 33,7 $\pm$ 3,3	% 39 $\pm$ 3,24	% 32,35 $\pm$ 5,99	% 36,31 $\pm$ 2,51
F10S	% 62,24 $\pm$ 4,92	% 60,36 $\pm$ 3,18	% 54,23 $\pm$ 6,11	% 57,34 $\pm$ 3,22	-
Nem içeriği					
	Başlangıç	20.gün		40.gün	
	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3 °C	25 $\pm$ 2°C, %60 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3 °C
F7S	% 6,38 $\pm$ 0,03	% 6.47	% 8.96	% 7.42	% 9.84
F10S	% 2,95 $\pm$ 0,24	% 4.22	% 4.75	% 5.33	-

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda S-adenozin-L-metiyon'ın (SAME) oral yolla kullanımında gösterdiği düşük permeabilitesi ve ilk geçiş etkisine uğraması nedeni ile düşük olan biyoyararlanımının arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı film oluşturuçu polimerler ve yardımcı maddeler kullanılarak, etkin maddenin anında emilip sistemik dolaşıma katılabilmesi için sublingual film formülasyonları hazırlanmıştır. SAME'nin oral yolla kullanımındaki biyoyararlanımı %1, intramüsküler yolla kullanımındaki biyoyararlanımı ise %80-90 olarak belirlenmiştir (García-Trevijano ve ark., 2000; Mc Millan ve ark., 2005).

SAME'nin yapısında bulunan sülfonyum iyonu etkin maddenin stabilite problemlerine yol açmaktadır. Bu nedenle etkin maddenin farmasötik alanda kullanılabilmesi için tuz formları oluşturulmuştur. SAME'nin stabil tuz formları tosilat disülfat, toluen sülfonat ve 1,4-bütan disülfonat tuzlarıdır (Morana ve ark., 2000). SAME ile yapılan klinik çalışmalarda, stabilitesi açısından en çok tercih edilen tuzunun 1,4-bütan disülfonat olması nedeni ile tez çalışmasında bu formu kullanılmıştır.

4.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

4.1.1. SAME'nin Su ve Tükürük Ortamındaki UV Spektrofotometrisi Analizi

SAME'nin su ve tükürük ortamında 200-400 nm aralığında alınan spektrumlarında, maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları $\lambda_{\text{max-su}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max-tükürük}} = 260 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur. Bulunan değerler literatür verileriyle uyumludur (Cannon ve ark., 2002) (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Tespit edilen , λ_{max}

değerlerinde farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerle yapılan ölçümler sonucunda standart doğrular çizilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Standart doğru denklemlerinin determinasyon katsayısı (r^2) su ortamı için 0,9999 ve tükürük ortamı için 0,9994 olarak bulunmuştur. Bu yüksek değerler, ölçülen absorbans değerlerinden konsantrasyon değerlerinin yüksek bir doğrulukta hesaplanabileceğini göstermektedir.

4.1.2. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi

SAME'nin su ve ortamında maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu $\lambda_{\text{max-su}}$ = 260 nm olarak belirlenmiştir ; alıkonma zamanı 5,91 dk'dır (Şekil 3.5). Bulunan değerler literatür verileriyle uyumludur (Cannon ve ark., 2002). Çizelge 3.1'de belirtilen koşullarda farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerle yapılan ölçümler sonucunda SAME'nin su ortamındaki standart doğrusu çizilmiştir (Şekil 3.6). Standart doğru denkleminin determinasyon katsayısı (r^2) 0,9945 olarak bulunmuştur. SAME'nin içerik tekdüzeliği çalışmalarında bu standart doğru denklemi kullanılmıştır.

4.2. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ve tükürük ortamlarında; HPLC kullanılarak su ortamında yapılan miktar tayin yöntemleri için analitik validasyonlar yapılmıştır. İncelenen validasyon parametreleri doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) olarak belirlenmiştir.

SAME'nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ve tükürük ortamlarında; HPLC kullanılarak su ortamında yapılan miktar tayin yöntemlerinin doğruluk ve geri

elde çalışmaları Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ICH kılavuzunda (1996) doğrusallık ve aralığı çalışmalarının minimum 5 noktada ölçüm yapılması gerektiği belirtilmiştir. Bu değerler en az 3 tekrarlı okumalarla hesaplanıp standart sapma ve bağıl standart sapması hesaplanmalıdır. UV spektrofotometrisi ile elde edilen standart doğruların doğrusallık ve aralığı ile ilgili istatistikler Çizelge 3.2’de; HPLC analizi ile elde edilen standart doğruların doğrusallık ve aralığı ile ilgili istatistikler Çizelge 3.9’da verilmiştir. Elde edilen standart doğru denklemlerinin eğim ve kesişimleri % 95’lik güven aralığı içerisinde. FDA’ya (2014) göre okunan absorbans ve alanlardan hesaplanan konsantrasyon değerlerinin güvenilir olduğunu gösteren determinasyon katsayısı değeri $r^2 \geq 0,995$ olmalıdır. Elde edilen tüm standart doğru denklemleri doğrusaldır ($r^2 \geq 0,995$).

SAMe’nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ve tükürük ortamlarında; HPLC kullanılarak su ortamında yapılan miktar tayin yöntemlerinin doğruluk ve geri elde çalışmaları (Bölüm 2.2.2) ilişkin bulgular Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.10’da verilmiştir. ICH kılavuzunda, bu testler için en az 3 farklı derişimden 3 tekrarlı okuma yapılması önerilmektedir. Konsantrasyonlar yüksek, orta ve düşük olmak üzere seçilmektedir. SAMe’nin UV spektrofotometrisinde ve HPLC’de yapılan miktar tayini yöntemlerinin doğruluk ve geri elde çalışmaları sonuçları literatürlerce belirlenen parametrelere göre değerlendirilmiştir. EMA (1995), doğruluk testine ait veriler sonucunda bulunan % BSS değerlerinin %2’den küçük olması ($BSS < \% 2$) gerektiğini bildirmektedir. Yapılan tüm doğruluk ve geri elde çalışmalarından elde edilen verilerin bağıl standart sapmaları % 2’den küçük olduğundan doğruluk tespit edilmiştir.

SAMe’nin UV spektrofotometrisi kullanılarak su ve tükürük ortamlarında; HPLC kullanılarak su ortamında yapılan miktar tayin yöntemler kesinliği Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi yapılmış olup tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarının bulguları Çizelge 3.5, Çizelge 3.6, Çizelge 3.6, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’de

verilmiştir. Tekrarlanabilirlik tayini için yapılan tekrarlı okumalar sonucunda elde edilen % BSS değerleri UV spektrofotometrisinde yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında %1'den küçük; HPLC'de yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında %2'den düşük bulunduğundan miktar tayini yöntemlerinin tekrarlanabilirliği tespit edilmiştir. Ara kesinlik sonuçları literatürlerde verilen kabul kriterlerine uymaktadır. Elde edilen tüm verilerin bağıl standart sapmaları %2'den küçük olduğundan, SAME'nin miktar tayinlerinin ara kesinliği tespit edilmiştir.

HPLC ve UV spektrofotometri yöntemleri için belirlenen teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.2'de belirtildiği gibi hesaplanmış, sonuçlar Çizelge 3.8'de ve Çizelge 3.13'te verilmiştir. HPLC yöntemi için hesaplanan teşhis ve tayin sınırları, UV spektrofotometriye göre daha düşük değerlerdir. HPLC, UV'den daha hassas olduğundan dolayı bu durum beklenmektedir

4.3. Sublingual Film Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Film şeklindeki bir dozaj formunun öncelikle homojen görünümlü, pürüzsüz yüzeye sahip olması, esnek olması ve şeffaf olmasıdır. Filmlerin oluşturulmasında kullanılacak pek çok polimer seçeneği bulunmaktadır. Kabul edilebilir özelliklere sahip filmlerin oluşturulabilmesi için formülasyon çalışmalarında ilk aşamada, Pharmacoat C600[®], Gantrez[™], PAA, PVA, inülin, Kollicoat[®] Protect, ve pullulan polimerleri; plastizer olarak propilen glikol, PEG400, gliserol, sitrik asit ve Tween80; tatlandırıcı ve dağıtıcı ajan olarak mannitol; dolgu maddesi olarak MCC kullanılmıştır. Kullanılan polimerler ve yardımcı maddeler literatürlerden yola çıkılarak seçilmiş (Bhupinder ve Sarita; Koland ve ark., 2010; Lai ve ark., 2018; Li ve ark., 2017; Liew ve ark., 2013; Mashru ve ark., 2005; Preis ve ark., 2014; Singh ve ark., 2018; Song ve ark., 2018; Vuddanda ve ark., 2014), polimer plastizer geçimsizliği olmamasına dikkat edilmiştir. Literatürlerde filmlerin üretim yöntemleri incelendiğinde çözücü buharlaştırma yönteminin en sık kullanılan film üretim

yöntemi olduğu, sıcakta eriterek ekstrüzyon yöntemine göre daha iyi kalınlık tekdüzeliği, daha ince, daha esnek, homojen ve kusursuz bir film sağladığı (Milind ve ark., 2013); bunun yanı sıra çözücü buharlaştırma işleminin sıcaklıktan etkilenen etkin maddeler için daha uygun olduğu, bir cihaz yardımıyla veya manuel olarak yapılabildiği görülmüştür. SAME'nin termolabil yapıda olması sıcakta eriterek ekstrüzyon yöntemini seçeneklerden çıkarmıştır. Bu nedenle ve diğer avantajlarından ötürü film üretiminde çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır.

Kurutma yöntemi olarak laboratuvar ortamı, vakumlu etüv ve çeker ocak belirlenmiştir. İşlem parametreleri kullanılan polimerlerin özelliklerine göre Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi belirlenmiştir. Filmlerin üretiminde formülasyon geliştirme sürecinde çeşitli kurutma yöntemleri denenmiştir. Etkin madde SAME sıcakta bozunmaya uğradığı, yani termolabil olması nedeniyle etüvde sıcakta kurutma yapılamamıştır. İlk üretilen formülasyonlarda Pharmacoat C600® ve PAA polimerleri kullanılmış (FD1, FD2, FD3 ve FD4) oda sıcaklığında, üstü cam huni ile kapatılarak kurutma çalışmaları yürütülmüştür. Ancak 4 gün geçmesine rağmen formülasyon çözelti halinde kalmış, film oluşturulamamıştır. Bunun üzerine farklı polimer ve yardımcı maddeler kullanılarak vakumlu etüvde oda sıcaklığında kurutma çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Vakumlu etüvde 5 gün kurutma işlemi yapıldıktan sonra bazı formülasyonlarda film oluşumu gözlenmiştir (FD7, FD8, FD9 ve FD10). Ancak 5 gün film elde etmek için çok uzun bir süre olduğundan başarılı olan formülasyonlar çeker ocak altında kurutulmaya başlanmıştır. Formülasyonlar çeker ocak altında bırakıldıktan 1 gün sonra film oluşumu gerçekleşmiştir. Daha sonra yeni polimerle çalışılmaya başlanmış, bundan sonraki kurutma yönteminin hızlı kurutma sağlaması ve etkin maddenin stabilitesini bozmaması nedeniyle çeker ocak altında kurutma olmasına karar verilmiştir.

SAME'nin stabilitesi gözönünde bulundurularak genel olarak oda sıcaklığında su ortamında çözünebilen polimerler tercih edilmiştir (Çizelge 2.1). Polimerin

Fimlerin üretiminde her polimer için farklı polimer miktarları kullanılarak formülasyon denemeleri yapılmıştır. Düşük miktarda polimer kullanılarak üretilen filmlerin çok ince olduğu, yüksek miktarda polimer kullanılarak üretilen filmlerin ise kalın olduğu, katlanma dayanımlarının düşük olduğu gözlenmiştir. Örneğin ön formülasyon çalışmalarında Pharmacoat C600® kullanılarak üretilen filmlerde, 50 mg polimer kullanılan filmin (FD7) çok ince ve kırılgan olduğu, 255 mg polimer içeren içeren filmin (FD10) çok kalın ve sert olduğu aynı zamanda katlanma dayanımının çok düşük olduğu, 100 ve 200 mg polimer içeren filmlerin (FD8, FD9, FD11 ve FD12) ise daha iyi fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Polimer oranları aynı zamanda filmlerin dağılma zamanlarını ve mekanik özelliklerini de etkilemiştir. Daha kalın olan filmlerin dağılma zamanlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Pharmacoat C600® içeren formülasyonlar incelendiğinde plastizer olarak hem PEG400 hem de propilen glikolün uygun filmlerin oluşmasını sağladığı görülmüştür. Oluşan filmlerin fiziksel yapıları göz önüne alınarak Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi F1, F2, F3, F4 ve F5 formülasyonlarının filmleri hazırlanarak çalışmalara devam edilmiştir. Kollicoat® Protect içeren formülasyon denemelerinde suyun yanı sıra

metanol yardımcı çözücü olarak kullanılarak polimerin daha iyi çözünmesi sağlanmıştır. Formülasyon çalışmalarında plastizer olarak gliserin kullanılmış, oluşan filmler görüntü ve esneklik açısından iyi bulunduğundan Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi aynı formülasyonlarla (F7 ve F8) çalışmalara devam edilmiştir.

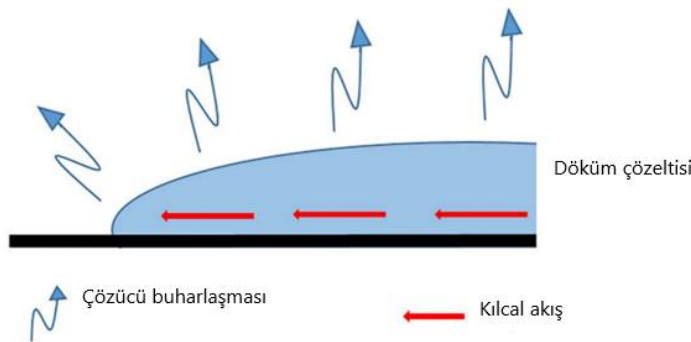
Pharmacoat C600® ve PVA’yı kombine olarak içeren formülasyonlar hazırlanmış (FD14, FD20 ve FD34), daha homojen bir görüntü elde edilen F6 formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi pullulan içeren formülasyonlarda (FD23-FD33) plastizer olarak gliserin, propilen glikol ve PEG400 kullanılmıştır. FD24 ve FD25 formülasyonları incelendiğinde kuru polimer ağırlığının %25’i oranda gliserin kullanılan FD24 formülasyonundan film oluşumu meydana gelirken, kuru polimer ağırlığının %50’si oranında gliserin içeren FD25 formülasyonundaki film petriye yapışmıştır. FD27, FD28, FD29 ve FD30 çok yapışkan olduklarından; FD33 çok yağlı ve sert olduğundan elenmiştir. Pullulan içeren formülasyonlar incelendiğinde plastizer olarak sitrik asit-PEG400 karışımı ve gliserin kullanılan filmler yapışkan ve işlenmesi zor bulunmuştur. Sadece PEG400 kullanılan film ise yağlı ve sert yapıdadır. Bu nedenle pullulan formülasyonlarında plastizer olarak propilen glikol kullanılması uygun görülmüştür. Genel olarak düşük oranda plastizer kullanımının esnek olmayan, sert yapıda filmlere neden olduğu, yüksek oranda plastizer kullanımının filmlerde yapışma meydana getirdiği fark edilmiştir Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi F9 ve F10 formülasyonlarının filmleri hazırlanarak çalışmalara devam edilmiştir.

Formülasyon geliştirme çalışmalarında yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı Çizelge 2.2’de görülen formülasyonlar seçilmiştir. PAA’nın kullanıldığı formülasyon FD4, Gantrez™’in kullanıldığı FD2 ve FD3, inülinin kullanıldığı FD16 ve FD17 formülasyonlarından film oluşturulamadığı için elenmiştir.

4.3.1. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin Değerlendirilmesi

Üretilen filmlerin kalınlıkları, kullanılan polimerin miktarına bağlı olarak 33-267 μm arasında değişmektedir. Farklı formülasyonlarla hazırlanıp 3 cm^2 boyutlarında kesilen filmlerin ağırlıkları da 10-77 mg arasında değişmektedir (Şekil 3.7). Kalınlık ve ağırlık ölçümlerinde her formülasyonun kesilen farklı parçalarında meydana gelen sapmaların nedeninin film üretim yöntemi olduğu düşünülmüştür. Çözücü buharlaştırma yönteminde çözücü buharlaşırken, damlacık kenarındaki buharlaşma akışı, kenarlara, merkezden uzağa doğru bir kılcal akış şeklinde indüklenmektedir. Bu durum çözünmüş bileşenlerin kenarlarda daha fazla birikmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda filmin ortasında ve kenarlarında kalınlıkta farklılıkları meydana gelmektedir. Çözücünün buharlaşma biçimi nedeniyle meydana gelen bu etki, literatürlerde “coffee ring effect” olarak (Şekil 4.1) adlandırılmaktadır (Foo ve ark.,2018; Mampallila ve Eral, 2018).



Şekil 4.1: Filmlerdeki çözücünün buharlaşmasındaki "coffee ring effect" in gösterimi

Bu etkinin yanısıra hazırlanan filmler el ile manuel olarak petrilere dökülüp kurutma ortamına yerleştirilmesi sırasında zemin eğiminden veya taşıma sırasında meydana gelen titreşim hareketleri yüzünden örneklerin ağırlık ve kalınlıklarında sapmalar meydana gelebilmektedir. Kalınlık ve ağırlık tekdüzeliği çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde kalınlık ve ağırlıkları en az sapma gösteren filmlerin, aynı zamanda en ince filmler olan Pharmacoat C600® ve pullulan içeren filmler olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 3.7).

4.3.1.1. Filmlerin Dağılma Zamanlarının Değerlendirilmesi

Sublingual uygulama için tasarlanan filmlerin hızlıca dağılması gerekmektedir. Bu nedenle formülasyonların değerlendirilmesinde dağılma zamanları başlıca kriterlerden birisidir. Filmlerin dağılma süreleri kullanılan polimer ve plastizer çeşidine göre değişmiştir (Çizelge 3.14; Şekil 3.8). Plastizerlerin filmlerin dağılma zamanlarına etkisini açıklayan birkaç teori mevcuttur. Polimerler, zincirleri boyunca molekülleri arasındaki gevşek bağlarla desteklenen zayıf bağ kuvvetlerinin (Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı) üç boyutlu bir ağ sistemi ile oluşmaktadır. Plastizerler, polimere zincirleri boyunca bağlanarak, polimer-polimer bağlantılarının sayısını azaltmakta ve polimer zincirlerini bir arada tutan güçleri engellemektedir. Bu yolla polimer zincirlerini ayırarak polimer molekülleri arasındaki boşluğu arttırmaktadır. Ayrıca polimere bağlı olmayan plastizer molekülleri, polimer moleküllerinin daha serbest hareket etmesini sağlamak ve lubrikant görevi yaparak polimer molekülleri arasındaki sürtünmeyi azaltmaktadır. Plastizerler hidrojen bağ oluşumları gibi intermoleküler ve intramoleküler etkileşimlere olanak sağlamaktadır. Polimerlerin camsı geçiş sıcaklıkları üzerinde de azaltma yönünde etkileri nedeniyle polimerik ağda bir gevşemeye neden olmaktadır. Bu nedenlerle plastizerler daha esnek, daha yumuşak ve daha kolay dağılabilir filmler oluşmasını sağlamaktadır (Mishra ve Pathak, 2017; Vuddanda ve ark., 2017).

Yüksek miktarda Kollicoat® Protect içeren F8 filmi dışında tüm filmlerin dağılma süreleri 1 dk'nın altında bulunmuştur. F8'in dağılma süresi ise ortalama 68,67 sn'dir. Filmlerin dağılma süreleri 2 dk'dan az olduğu için uygundur (Dixit ve Puthli, 2009; Singh ve ark., 2018). Pharmacoat C600® içeren formülasyonlar (F1, F2, F3, F4, F5) kendi aralarında değerlendirildiğinde, aynı plastizer miktarına (PEG400), ancak farklı polimer miktarlarına sahip olan F1, F2 ve F3 formülasyonlarından elde edilen filmlerin dağılma zamanları karşılaştırıldığında, artan polimer miktarının filmlerin dağılma süresini uzattığı gözlemlenmiştir. Bu durum literatürlerle uyumludur (Bhupinder ve Sarita, 2012; Singh ve ark., 2018). Aynı polimer miktarlarını içeren ancak farklı plastizerlerle hazırlanan F2 ve F4 formülasyonları ile F3 ve F5 formülasyonları karşılaştırıldığında plastizelere bağlı olarak hazırlanan filmlerin dağılma sürelerinin değiştiği gözlenmiştir. Buna göre plastizer olarak propilen glikol kullanıldığında (F4 ve F5) filmlerin dağılma süreleri, PEG400'ün plastizer olarak kullanıldığı formüllerden (F2 ve F3) hazırlanan filmlere göre daha kısa olmuştur. Bunun nedeninin PEG400'ün daha yüksek molekül ağırlığına sahip olması ve daha fazla oksijen atomu taşıması olduğu düşünülmüştür (Sothornvit ve Krochta, 2001). Kollicoat® Protect içeren F7 ve F8 filmleri karşılaştırıldığında, Pharmacoat C600® filmlerde olduğu gibi artan polimer miktarının dağılma süresini uzattığı görülmüştür. Pullulan içeren F9 ve F10 formülasyonlarında pullulan miktarı sabit tutulup plastizer miktarları değiştirilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak plastizer miktarı yüksek olan F10 filminin daha kısa sürede dağıldığı belirlenmiştir (Liew ve ark., 2013). Farklı plastizerler ile veya aynı plastizerin farklı miktarları ile hazırlanan filmlerin dağılma zamanındaki farklılıklar, plastizerlerin filmlerin mekanik özellikleri üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır (Vuddanda ve ark, 2017). Pharmacoat C600®: PVA karışımı içeren F6 formülasyonu, içerdiği polimer miktarıyla orantılı olarak sadece Pharmacoat C600® içeren formüllerden daha uzun sürede dağılmıştır.

4.3.1.2. Filmlerin Katlanma Dayanımlarının Değerlendirilmesi

Tüm filmlerin katlanma dayanımı 300'den yüksektir. Bu durum filmlerin esnekliği ve dayanıklılığının uygun olduğunu göstermektedir (Irfan ve ark., 2006; Singh ve ark., 2018).

4.3.1.3. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Gerilme direnci, uzama yüzdesi ve elastik modül verileri filmin mukavemet ve elastikiyetinin belirlenmesinde önemli parametrelerdir. Katı dozaj formları olarak filmlerin mekanik özellikleri, bir filmin çeşitli stres kaynaklarına dayanma kabiliyetini açıkladığından çok önemlidir. Başlangıçta, filmlerin imalat, kullanım ve yönetimin getirdiği strese dayanması gerekmektedir. Ek olarak, sublingual yolla iletim için filmlerin, etkin maddenin verilmesi devam ettiği sürece mukoza ile temas halinde kalabilmesi gerekmektedir. Bu durum, çeşitli ağız aktivitelerinden kaynaklanan mekanik stresi içermektedir. Bu nedenle filmlerin orta düzeyde bir mekanik dirençlerinin olması gerekmektedir (Morales ve ark., 2013). Zayıf ve yumuşak bir polimer, düşük bir gerilme direnci ve uzama yüzdesi ile karakterize edilir. Sert ve kırılğan bir polimer orta gerilme direnci ve düşük uzama yüzdesi gösterir. Yumuşak ve sağlam bir polimer orta gerilme direnci ve yüksek uzama yüzdesi ile karakterize edilirken sert ve sağlam bir polimer ise yüksek gerilme direnci ve uzama yüzdesi göstermektedir (Koland ve ark., 2010). Tekstür analiz cihazı ile yapılan ve F6 kodlu formüle ait mekanik özellikleri gösteren grafik bir örnek olmak üzere Şekil 3.9'da verilmiştir. Bu grafikten hareketle hesaplanan mekanik özellikler Çizelge 3.14'te verilmiştir. Pharmacoat C600® içeren formülasyonlarda (F1-F3) artan polimer miktarı, gerilme direncinin 9,37 mPa'dan 26,81 mPa'a artmasına neden olmuştur. Bu durum literatür verileriyle uyum göstermektedir (Bhupinder ve Sarita, 2012; Liew ve ark., 2013). Aynı şekilde Young modülü 0,47 mPa'dan 1,29 mPa'a artmıştır. Bu değer artışı ise filmlerin elastikiyeti, dolayısı ile uzamalarının/gerinimlerinin azalmasını göstermektedir. Bu

sonuç uzama yüzdelerinde azalan değerlerle de uyumaktadır. Bunun nedeni ise artan polimer miktarına karşılık plastizer miktarının sabit kalmasıdır. PEG400 ve propilen glikolün plastizer olarak kullanıldığı F2 ve F3 formülasyonlarından hazırlanan filmlerle F4 ve F5 formülasyonlarından hazırlanan filmlerin mekanik özellikleri karşılaştırıldığında propilen glikolün kullanıldığı filmlerin (F4 ve F5) gerilme dirençlerinin PEG400'ün kullanıldığı filmlerden (F2 ve F3) daha düşük olduğu gözlenmiştir; ancak diğer mekanik özellikler için belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

F6 formülasyonunda kullanılan polimer miktarının, sadece Pharmacoat C600® içeren formülasyonlardaki polimer miktarından fazla olmasına rağmen PVA ile birlikte kullanımının gerilme direnci değerini düşürdüğü, Young modülünü azalttığı ve uzama yüzdesini arttırarak daha esnek bir film oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kollicoat® Protect içeren F7 ve F8 filmlerinin gerilme dirençleri (sırasıyla 6,69 ve 8,76 mPa) polimer miktarının artmasıyla artış göstermiştir. F7 ve F8'in gerilme dirençleri yüksek polimer miktarına rağmen Pharmacoat C600® ve pullulan ile hazırlanan filmlerinkinden daha düşük, uzama yüzdeleri daha yüksek (sırasıyla % 16,20 ve % 16,67) ve elastik modülleri daha düşük (sırasıyla 0,04 ve 0,05) bulunmuştur. Bu veriler filmin esnek ve yumuşak olduğunu göstermektedir. Pullulan içeren F9 ve F10 formülasyonlarında, daha yüksek plastizer miktarına sahip olan F10 ile hazırlanan filmlerin gerilme direncinin ve elastik modülünün daha düşük olduğu görülmüştür. Plastizer miktarının artmasıyla gerilme direncinin düşmesi literatür verileriyle uyumludur (Bhupinder ve Sarita, 2012; Liew ve ark., 2013).

Etkin madde yüklenmesi için farklı mekanik özelliklere sahip dört formülasyon seçilmiştir. Böylece etkin maddenin filmlerin mekanik özellikleri üzerinde değişiklik yapma olasılığının da değerlendirilmesi amaçlanmıştır:

* F6 formülasyonu (Pharmacoat C600®: PVA; plastizer: gliserin) Orta derecede mekanik özelliklere sahiptir.

* F7 formülasyonu (Kollicoat® Protect; plastizer: gliserin): Orta derecede gerilme direnci, düşük Young modülü ve yüksek uzama yüzdesine sahiptir.

*F9 formülasyonu (düşük miktar pullulan; plastizer: propilen glikol): En yüksek gerilme direnci, en yüksek Young modülü ve düşük uzama yüzdesine sahiptir.

*F10 formülasyonu (yüksek miktar pullulan; plastizer: propilen glikol): Yüksek gerilme direnci, yüksek Young modülü ve düşük uzama yüzdesine sahiptir.

Etkin madde yüklenmeden önce seçilen formülasyonlarının çözeltilerinin viskoziteleri ölçülmüş ve üretilen filmlerin mukadezyon çalışmaları yapılmıştır.

4.3.1.4. Film Çözeltilerinin Viskozite Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çözeltilerin viskoziteleri 16-36 cP arasında değişmektedir. F9 ve F10 formülasyonlarının döküm öncesi çözeltileri düşük viskozite gösterdiği belirlenmiştir. F6 ve F7 film formülasyonlarının döküm öncesi çözeltilerinin viskoziteleri yaklaşık olarak 1,5-2 kat yüksek olmuştur. Homojen bir film edebilmek için literatürler çalışmalarında çok yüksek olmayan viskozite aralıklarının kullanılması ve kayma incelen polimerlerden yararlanılması önerilmektedir. Viskozite homojen bir ürün üretebilecek şekilde kolay karışma ve yayılmaya uygun değerlerde olmalıdır (Hariharan ve Bogue, 2009).

4.3.1.5. Filmlerin Mukoadezyon Testinin Değerlendirilmesi

Etkin madde yüklenen final formülasyonların sublingual uygulamasının yapılabilmesi için az da olsa adeziv özelliğinin bulunması gerekmektedir. Ancak sublingual filmin hızlıca parçalanıp etkin maddenin hemen sistemik dolaşıma geçmesi istendiğinden bukkal filmler kadar yüksek bir adevizlik derecesi göstermelerine gerek duyulmamaktadır. Formülasyonda kullanılan her polimerin mukoadezivlik derecesi farklıdır. Şekil 3.10'da mukoadezivliğin tayini için yapılan

incelemenin sonuçlarını gösteren tipik bir grafik verilmiştir (F10 formülasyonu). Bu grafikte pikin tepe noktası filmin müsinden ayrılması gereken kuvveti gösterirken bu eğri altındaki alan adezyon işini göstermektedir. Pullulan içeren F9 ve F10 formülasyonları ile hazırlanan filmlerin nın adevizliği F6 (Pharmacoat C600®:PVA) ve F7 (Kollicoat® Protect) formülasyonları ile hazırlanan filmlerinkinden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.17). Pullulan içeren formülasyonlar kendi aralarında kıyaslandığında daha yüksek plastizer oranına sahip olan F10 formülasyonunun adezivliğinin de daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.10). HPMC yapısında olan Pharmacoat C600® polimerinin içinde proton veren karboksil gruplarının bulunmaması nedeniyle nötr özellik göstermektedir. Bu durum polimerin mukoadezivliğini azaltmaktadır (Russo ve ark., 2016).

4.3.2. SAME Yüklenen Sublingual Filmlerin Üzerinde Yapılan Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Seçilen 4 formülasyona (Pharmacoat C600®:PVA içeren F6, Kollicoat® Protect içeren F7, pullulan içeren F9 ve F10) etkin madde yüklenmiş, ancak kurutma işleminden sonra F6 filminde etkin maddenin film içinde gözle görünür şekilde bazı noktalarda kümелendiği, homojen bir dağılım sağlamadığı ve esnek olmadığı görülmüştür. F9 filminin ise kuruma işleminden sonra petriye yapıştığı, petriden çıkarma işlemi sırasında parçalandığı belirlenmiştir. Bu nedenle hem görünürlük hem fiziksel özellikleri göz önünde bulundurularak başarılı olan F7 ve F10 formülasyonları üzerinden deneyler devam ettirilmiş, etkin madde yüklenen F7 formülasyonuna F7S, F10 formülasyonu F10S olarak adlandırılmıştır. F7S saydam, yumuşak ve elastik özelliklere sahiptir. F10S ise hafif beyaz renkli, F7S'ye göre daha saydam, yumuşak ve elastik özelliklere sahiptir.

4.3.2.1. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tekdüzeliliğinin Değerlendirilmesi

F7S ve F10S formülasyonlarının ağırlık ve kalınlık sapmaları incelendiğinde F7S filminin kalınlık sapmasının; F10S'in ağırlık sapmasının daha yüksek olduğu görülmüştür. Kalınlık ve ağırlık ölçümlerinde her formülasyonun kesilen farklı parçalarında meydana gelen sapmaların nedeninin film üretim yöntemi olduğu düşünülmüştür. Bölüm 4.3.1.2'de anlatıldığı gibi çözücü buharlaştırma işlemi sırasında meydana gelen “coffee ring effect”in filmlerin kalınlık ve ağırlık tekdüzeliliğini olumsuz etkilediği tahmin edilmektedir (Foo ve ark.,2018; Mampallila ve Eral, 2018).

4.3.2.2. Filmlerin Dağılma Zamanlarının Değerlendirilmesi

Etkin madde içermeyen F7 ve F10 ile SAME yüklenen F7S ve F10S kıyaslandığında dağılma sürelerinde büyük farklar görülmemekle beraber iki formülasyonun da dağılma sürelerinin bir miktar kısaldığı görülmüştür. Bu olaya etkin madde ve polimerler arasındaki etkileşimden meydana gelebileceği düşünülmüştür.

4.3.2.3. Filmlerin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Etkin madde içermeyen F7 ve F10 ile SAME yüklenen F7S ve F10S kıyaslandığında, Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi SAME yüklenen F7S'in gerilme direnci, yüzde uzama ve elastik modül değerlerinin F7 ile kıyasla neredeyse değişmediği; SAME yüklenen F10S in ise gerilme direncinin büyük oranda düştüğü, yüzde uzamasının arttığı, elastik modül değerinin ise düştüğü görülmüştür. Bu belirgin düşüşün etkin madde ile polimer arasındaki etkileşimler sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir. Bu noktada pullulanın plastizer gibi davranıp etkin madde zincirlerinin arasına girerek filmin esnekliğini arttırdığı düşünülmektedir (Morales ve ark., 2013).

Çizelge 4.1: Etkin madde içermeyen filmler ve SAME yüklenen filmlerin mekanik özelliklerinin karşılaştırması

Formülasyon	Gerilme Direnci (mPa)	Young Modülü (mPa)	Uzama Yüzdesi(%)
F7	6,69±0,45	0,04±0,01	16,2±0,94
F7S	7,68±0,11	0,05±0,01	16,67±0
F10	25,68±4,53	1,55±0,25	1,67±0,17
F10S	2,31±0,62	0,09±0,08	3,64±2,71

4.3.2.4. Filmlerin Mukoadezyon Testinin Değerlendirilmesi

Mukoadezyon, müsin ve polimerler arasındaki kimyasal etkileşimleri içeren kompleks bir süreçtir. Etkin madde içermeyen F7 ve F10 ile SAME yüklenen F7S ve F10S kıyaslandığında, Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere hem F7S’in hem de F10S’in kopma kuvvetlerinde düşüş meydana gelmiştir. Etkin maddenin eklenmesi filmlerin müsin tabakasına adezyonunu azaltmıştır.

Çizelge 4.2: Etkin madde içermeyen filmler ve SAME yüklenen filmler

Formülasyon	Temas süresi (sn)	Müsinli yüzeyden ayırma kuvveti (N)	Adezyon işi: Area (N.mm)
F7	60	1,22±0,07	0,25±0,11
F7S	60	0,25±0,04	0,1±0,07
F10	60	2,71±0,21	2,11±1,43
F10S	60	0,28±0,01	0,13±0,09

4.3.2.5. Filmlerin İçerik Tekdüzeliliğinin İncelenmesi

F7S formülasyonu ile hazırlanan filmin % etkin madde içeriği $40,39 \pm 6,03$; F10S'in % etkin madde içeriği $62,24 \pm 4,92$ olarak bulunmuştur. Etkin madde içeriği ölçülürken filmlerdeki etkin madde miktarının ölçümünde homojen ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek amacıyla filmin kenarları atılıp orta kısımlarından numuneler alınmıştır. Ancak bu durum etkin madde miktarının düşük bulunmasına neden olmuştur. Bölüm 4.3.1.2'de anlatıldığı gibi çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen filmlerde çözünmüş bileşenler petri kenarlarına doğru hareket etmektedir. Çözünmüş etkin maddenin ve polimerlerin petrinin kenarlarına göç etmesi kenarlardaki kalınlığı arttırmış, etkin maddenin bu bölgelerde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu durumu teyit etmek için kenarlardan da numune alınıp ölçüm yapılmıştır. F7S formülasyonu ile hazırlanan filmin etkin madde içeriği %79,98; P10S'in etkin madde içeriği %89,91 bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak petride ve çeker ocak altında kurutma tekniğinin uygun olmadığı görülmüştür. Sonraki çalışmalarda alınacak film üretim cihazıyla filmlerin ağırlık, kalınlık ve içerik tekdüzeliğinin iyileştirileceği tahmin edilmektedir.

4.3.2.6. Filmlerden Etkin Madde Salım Profillerinin Değerlendirilmesi

F7S ve F10S karşılaştırıldığında her iki filmde de ilk 10 dk'da etkin maddenin neredeyse tamamının çözünme ortamına geçtiği gözlenmiştir. Matematiksel modellerden salım verilerine en uygun modelin seçimi, determinasyon katsayısına (R^2), ayarlanmış belirlenme katsayısına, Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Seçim Kriterine (MSC) göre belirlenmektedir. AIC, model seçiminde kullanılan bir ölçüttür. Düşük bir AIC değeri, hangi modelin daha uygun olduğunu göstermektedir. MSC değerinin, 2 veya 3'ten büyük olması da yine modelin uyumluluğu hakkında fikir veren önemli bir parametredir (Ergin ve ark., 2019; Salome ve ark., 2013). Bu kriterler göz önüne alındığında ve filmlerden etkin madde salımının değerlendirilmesinde hem salım hızı hakkında hem de mekanizması hakkında bilgi

veren bir model olduğundan dolayı her iki filmde (F7S ve F10S) etkin madde çıkışı için en uygun modelin Weibull modeli olduğu belirlenmiştir. Weibull modeli için τ_d değerleri F7S için 2,66, F10S için 3,11 olmuştur. β değerleri ise F7S için 0,3250 ve F10S için 0,9436 olarak belirlenmiştir. Weibull modeline göre $\beta > 1$ olması başlangıçta yavaş etkin madde salımını takiben hızla bir platoya ulaşılması şeklinde oluşan çan eğrilerini ifade etmektedir. $B < 1$ olduğunda ise başlangıçta hızlı etkin madde salımını takiben basit birinci derece eğri ile uyumlu hızla platoya ulaşılması söz konusudur. Her iki filmin de β değerleri 1'den küçük bulunmuştur.

4.3.2.7. İn vitro Permeasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Filmlerden etkin maddenin permeasyonu Bölüm 3.3.2.11'de anlatıldığı gibi iki farklı yöntem ile belirlenmiştir. Dikey difüzyon hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada F7S filminden etkin maddenin permeabilite katsayısı $424,82 \times 10^{-6}$ cm/saat, F10S filminden etkin maddenin permeabilite katsayısı $452,23 \times 10^{-6}$ cm/saat olarak belirlenmiştir.

SAMe'nin PAMPA permeasyonu incelendiğinde saf SAMe çözeltisi ile F7S ve F10S numunelerinden etkin madde permeasyonunun ilk 3 saatte sırasıyla %0,012, %0,019 ve %0,007 olduğu görülmüştür. Üçüncü saatten sonra etkin madde membrandan reseptör faza geçmeye başlamıştır. PAMPA donör kuyucuklarına film parçası konularak permeasyon tayini yapılamamıştır. Bunun nedeni sink koşulun bozulmasıdır. Film parçası koymak yerine Bölüm 2.2.3.5'te anlatıldığı gibi film kesilerek sudaki çözeltisi hazırlanıp seyreltilerek kuyucuğa konulmuştur. Saf etkin maddenin permeabilite katsayısı $55,5 \times 10^{-6}$ cm/saat, F7S filminden 93×10^{-6} cm/saat ve F10S filminden 544×10^{-6} cm/saat bulunmuştur.

Pullulan içeren F10S'ten permeasyonun Kollicoat® Protect içeren F7S'e göre daha yüksek olmasının nedeninin pullulanın yapısındaki OH gruplarının katyonik

SAMe ile bağ oluşturarak hidrofobik hale getirmesi olabileceği düşünülmüştür. Lipit membrandan hidrofobik etkin maddelerin geçişi daha yüksektir. Ayrıca her iki filmin de içeriklerinde bulunan plastizerler etkin maddenin çözünürlüğünü arttırmış, permeasyon arttırıcı olarak etki göstermişlerdir. F10S formülasyonunda bulunan propilen glikol lipitler üzerinde etkili olmamasına rağmen proteinlerin hidrojen bağlanma bölgeleri için yarışma yeteneğine sahiptir. Protein denatürasyonu, hücreler arası lipitlerin akışkanlaşması, yerleşimlerinin değişmesi veya hücreler arası delaminasyon ve genişleme gibi etkiler yaratarak bariyer fonksiyonunu değiştirebilmektedir (Vijaya ve ark., 2011)

Dikey difüzyon hücreleri ile PAMPA sisteminde permeasyonun farklı olmasının temel nedeninin PAMPA sistemindeki lipit membran olduğu düşünülmektedir.

4.3.2.8. Film Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

Şekil 3.24 ve Şekil 3.25'te SAMe için 51,90°C ve 78,45°C'de endotermik geçiş pikleri ve 109,21 °C'de bir endotermik pik gözlenmiştir; 149,45°C'de küçük bir endotermik pik mevcuttur ve bu pik literatür verilerine göre SAMe'nin erime noktasına karşılık gelmektedir. SAMe'nin SEM mikrograflarında görüldüğü gibi yapısal olarak mikroküreler ve toz partikülleri şeklindedir (Şekil 3.26). DSC bulguları etkin maddenin hem amorf formda hem de kristalen halde bulunduğunu göstermektedir. Şekil 3.24'te Kollicoat® Protect-SAMe fiziksel karışımında etkin maddenin erime noktasına ilişkin pik yine 149,45°C'de görülmektedir. F10S filmlerinin termogramında ise etkin maddenin bu piki bulunmamaktadır. Bu durum etkin maddenin polimer içinde amorf halde bulunduğunu göstermektedir. Şekil 3.25'te hem pullulan-etkin madde fiziksel karışımında hem de filmlerde etkin maddenin tamamen amorf durumda bulunduğu anlaşılmaktadır.

Pullulan mukoadeziv polimerler arasında yer almaktadır. Yarı kristalen yapıdadır. Bukkal mukoadeziv film hazırlanması için pullulanın kullanıldığı bir çalışmada camsı geçiş sıcaklığı 63,08 °C ve kristalen erime noktası 118,18 °C olarak bulunmuştur (Vila ve ark., 2014). Şekil 3.22’de verilen termogram incelendiğinde pullulan için 120 °C’ civarında gözlenen endotermik geçişin maddenin erimesine ilişkin olduğu anlaşılmaktadır.

4.3.2.9. Filmlerin ve Etkin Maddenin SEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Şekil 3.26 C ve D’de görüldüğü gibi pullulan içeren F10 ve F10S filmlerinin pürüzsüz, düzgün görünümlü olduğu gözlemlenmiştir. Etkin madde film içinde tamamen çözünmüş durumdadır. Pullulan filmlerin görüntüleri literatür verileriyle uyumludur (Chang ve ark., 2019). Şekil 3.26 E ve F’de ise pullulan filmlerin kalınlığı gözlenmektedir. Pullulan filmlerin kalınlığı ölçülen kalınlıkları (95,56 µm) ile örtüşmektedir. Kollicoat® Protect filmlerin görüntüleri incelendiğinde filmin poröz yapısı dikkati çekmektedir. Bu poröz yapının, film oluşumu sırasında hızlı su buharlaşması nedeniyle büzülmelerden veya kuruma sırasında moleküler polimer zincirlerinin kristalen bölgeler oluşturmak üzere yeniden düzenlenmesinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Elde edilen bu görüntü literatür verileri ile uyumludur (Xu ve ark., 2014; Traore ve ark., 2018). SAMe’nin görüntüleri incelendiğinde mikroküreler ve toz partikülleri şeklinde olduğu gözlemlenmiştir.

4.3.2.10. Filmlerin Stabilitelerinin İncelenmesi

Filmlerin stabiliteleri incelendiğinde Kollicoat® Protect içeren F7S filminin nem içeriğinin hem 20. hem de 40. günlerde artış gösterdiği, buzdolabında saklanan filmlerin nem içeriğinin oda sıcaklığına göre daha çok arttığı gözlemlenmiştir. Filmlerin etkin madde yüzdeleri incelendiğinde buzdolabında saklanan numunelerin etkin madde yüzdelерinin oda sıcaklığında saklanana göre daha yüksek olduğu

gözlenmiştir. Bu yüzden F7S formülasyonunun saklanması için buzdolabı daha uygun bulunmuştur.

Pullulan içeren F10S filminin nem içeriği incelendiğinde 20. gün sonunda her iki ortamda da nem içeriğinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Filmlerden etkin madde tayini yapıldığında oda sıcaklığında saklanan numunenin etkin madde miktarının daha yüksek oranda muhafaza edildiği görülmüştür 40. gün sonunda buzdolabında saklanan film örneklerinin alüminyum folyolara yapıştığı görülmüş, bu yüzden bu filmlerin miktar tayinleri ve nem içeriği ölçümleri yapılamamıştır.

Her iki filmin de 20. ve 40. günlerden sonra yapılan ölçümlerinde nem içeriklerinin arttığı, filmler içindeki SAME miktarının azaldığı gözlemlenmiştir (Çizelge 3.24). Bu azalmaların polimer etkin madde etkileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra formülasyonlarda bulunan polimerlerin hidrofilik özellikleri nedeniyle ortamdaki nemi absorplayarak oksidasyon ve hidrolize karşı dayanıksız olan SAME'nin kimyasal stabilitesini bozduğu düşünülmektedir. Ayrıca F7S formülasyonunda bulunan gliserin ve F10S formülasyonunda bulunan propilen glikolün higroskopik etkili plastizerlerdir. Higroskopik özelliklerine bağlı olarak ortamdaki nemi absorpladıkları düşünülmektedir.

Filmlerin stabilite problemlerini çözmek amacıyla tekrar üretim yapıldığında filmlerin havayla etkileşiminin kesilip nem artışı sorununu engellemek ve oluşabilecek oksidasyonları önlemek amacı ile hava ve ışık geçirmeyen özel ambalajlama teknikleri kullanılabilir ve formülasyona antioksidan eklenebilir. Elde edilen sonuçlara göre oda sıcaklığında saklanan F10S'in ve buzdolabında saklanan F7S'in stabilitesi daha iyi bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bir endojen madde olan SAMe'nin sublingual film dozaj formu hazırlanmış, böylece sublingual alandan doğrudan emiliminin sağlanarak GI sistemde degradasyondan ve hepatik ilk geçiş etkisinden korunması tasarlanmıştır. Sublingual hızlı çözünen dozaj formu şeklinde hazırlanmasının, özellikle yaşlı hastalar, yatan hastalar ve psikiyatrik rahatsızlığa sahip olan hasta/hasta yakınlarına uygulama açısından kolaylık sağlayacağı öngörülmüştür.

Hem Kollicoat® Protect içeren F7S hem de pullulan içeren F10S formülasyonları ile hazırlanan filmler özellikleri bakımından kabul edilebilir olsa da pullulan içeren F10S formülasyonu % etkin madde içeriğinin daha yüksek olması, daha hızlı dağılması ve etkin madde çıkışının daha hızlı olması nedeniyle optimum formülasyon olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte her iki formülasyonda da iyileştirme çalışmalarının yapılması gerekecektir. Etkin madde içeriğinin artırılması için, kullanılan üretim yöntemi üzerinde modifikasyonlar yapılabileceği düşünülmektedir. Film dökme cihazı kullanılarak hazırlanan filmler kalınlık, ağırlık ve etkin madde dağılımını daha homojen bir şekilde sağlayacağı için filmlerin özelliklerini iyileştireceği tahmin edilmektedir. Her iki formülasyonun tadını düzeltmek amacıyla tatlandırıcı ve aroma vericiler, mukozadan emilimlerini arttırabilmek için permeasyon arttırıcılar ve stabilitelerini arttırabilmek amacı ile antioksidan maddelerin ilavesi ile film formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca filmlerdeki etkin maddenin stabilitesini arttırabilmek amacı ile hava ve ışık geçirmeyen kapalı ambalajlama sistemi kullanılmasının yararlı olacağı tahmin edilmektedir. Formülasyon optimizasyonları yapıldıktan sonra, antidepresan etkisinden faydanılmak üzere ürünün ticarileştirilebilmesi mümkün olacaktır.

ÖZET

Transmukozal Etkin Madde Salımı İçin S-adenozil-L-metiyonin'in (SAME) Hızlı Çözünen Sublingual Filmlerinin Tasarımı ve Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında endojen bir molekül olan SAME'nin hızlı çözünen sublingual film dozaj formlarının hazırlanması ve oluşturulan filmlerin gereken kontrol çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. SAME, S-adenozil, L metiyonin sentetaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonla sentezlenmektedir. Bu reaksiyonda reaksiyona giren maddeler L-metionin ve adenosin trifosfattır. SAME, tek karbon döngüsü yolu ile L-metionin amino asitinden sentezlenmektedir. DNA ve RNA nükleik asitleri, fosfolipitler, proteinler, epinefrin, melatonin ve kreatinin biyosentezinde rol oynayan metil radikali donörüdür. SAME, beyinde çeşitli nörotransmitterin sentezine dahil olduğundan dolayı antidepresan özelliklere sahip olduğu varsayılmaktadır. Bazı klinik çalışmalar değişen dozlarda oral veya parenteral yollardan uygulanan SAME'nin depresyon tedavisinde plasebodan daha üstün ve trisiklik antidepresanlarla karşılaştırılabilir seviyede etkili olduğunu göstermiştir.

SAME'nin gastrointestinal (GI) sistemde degradasyona uğraması ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramasından dolayı verilen dozun yaklaşık %1'i sistemik dolaşıma geçebilmektedir. Etkili bir tedavi için biyoyararlanımı artırılmalıdır. Bu çalışmada SAME'nin biyoyararlanımını ve stabilitesini arttırabilmek, gözlemlenen yan etkileri en aza indirilebilmek amacı ile SAME'nin hızlı çözünen sublingual filmlerinin formülasyonları hazırlanmıştır. Film formülasyonlarında film oluşturucu olarak Pharmacoat C600®, PVA, Polivinil alkol-polietilen glikol graft kopolimer (Kollicoat® Protect) ve pullulan; plastizer olarak gliserin, PEG400, propilen glikol ve sitrik asit kullanılmıştır. Film hazırlama yöntemi olarak çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilmiştir. Filmlerin kalınlık ve ağırlık tekdüzeliği, dağılma zamanı, katlanma dayanımı, mekanik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca filmlerden etkin madde salım profilleri incelenmiş, mukoadezyon çalışmaları ve permeasyon çalışmaları yapılmıştır. Pullulan içeren film formülasyonu, yüzde etkin madde içeriğinin daha yüksek olması, daha hızlı dağılması ve etkin madde çıkışının daha hızlı olması nedeniyle optimum formülasyon olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak SAME'nin sublingual film formunda hazırlanmasının biyoyararlanımı arttırabileceği, aynı zamanda uygulama kolaylığı sağlayacağı için hasta uyuncunu geliştirebileceği ön görülmektedir. Yapılan kontrol testlerinin sonucunda seçilen formülasyonun, daha detaylı çalışmalara tabi tutularak fonksiyonlarının geliştirilmesi mümkündür.

Anahtar Sözcükler: Kollicoat® Protect , Pullulan, SAME, Sublingual film.

SUMMARY

Design and Evaluation of Fast Dissolving Sublingual Films of S-adenosyl L-methionine (SAME) for Transmucosal Active Substance Release

In this thesis, preparing fast dissolving sublingual film dosage forms of SAME, which is an endogenous molecule, and evaluating these films are aimed. SAME is formed by a reaction that is catalyzed by S-adenosyl, L-methionine synthetase enzyme. The substances used in this reaction are L-methionine and adenosine triphosphate. SAME is synthesized from L-methionine amino acid with single carbon cycle pathway. It is a methyl radical donor that plays a role in the biosynthesis of DNA and RNA nucleic acids, phospholipids, proteins, epinephrine, melatonin and creatinine. Since SAME is involved in the synthesis of various neurotransmitters in the brain, it is assumed to have antidepressant properties. Some clinical studies have shown that SAME administered at varying doses orally or parenterally is superior to placebo and comparable to tricyclic antidepressants in the treatment of depression.

As SAME is degraded in the gastrointestinal (GI) system and affected by a first-pass effect in the liver, approximately 1% of the dose can pass into the systemic circulation. Bioavailability is needed to be increased for effective treatment. In this thesis, formulations of SAME's fast dissolving sublingual films were prepared in order to increase the bioavailability and stability of SAME and to minimize the observed side effects. In film formulations, HPMC based Pharmacoat C600®, PVA, polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer (Kollicoat Protect) and pullulan are used as film forming agents; glycerin, PEG400, propylene glycol and citric acid were used as plasticizers. The solvent casting method was preferred as the film preparation method. Thickness and weight uniformity, disintegration time, folding endurance and mechanical properties of the films were investigated. In addition, dissolution, mucoadhesion, and permeation studies were performed. The film formulation containing pullulan was determined as the optimum formulation because of its higher drug content, faster disintegration and faster drug release.

In conclusion, it has been found that the preparation of SAME in sublingual film form may increase bioavailability and improve patient compliance as it provides ease of application. The formulation selected by the result of characterization tests might be improved after further studies.

Keywords: Kollicoat® Protect , Pullulan, SAME, Sublingual film.

KAYNAKLAR

- AMIN PM, GANGURDE AB, ALAI PV (2015). Oral film technology: challenges and future scope for pharmaceutical industry. *Int J Pharm Pharm Res*, **3(3)**: 184-203.
- ARYA A, CHANDRA A, SHARMA V, PATHAK K (2010). Fast Dissolving Oral Films: An Innovative Drug Delivery System and Dosage Form. *International Journal of ChemTech Research CODEN(USA)*, **2**: 576-583.
- AVACHAT AM, GUJAR KN, WAGH KV (2013). Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. *Carbohydr Polym.*, **91(2)**: 537-542.
- BALA R, PAWAR P, KHANNA S, ARORA S (2013). Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *Int J Pharma Investig*, **3**: 67-76.
- BHUPINDER B, SARITA J (2012). Formulation and evaluation of fast dissolving sublingual films of Rizatriptan Benzoate. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **4(1)**: 133-143.
- BORGES AF, SILVA C, COELHO JFJ, SIMOES S (2015). Oral films: Current status and future perspectives — Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*, **206**: 1–19.
- CANNON LM, BUTLER FN, WAN W, ZHAOHUI SZ (2002). A stereospecific colorimetric assay for (S,S)-adenosylmethionine quantification based on thiopurine methyltransferase-catalyzed thiol methylation. *Analytical Biochemistry*, **308**: 358-363.
- CHAN LW, HAO JS, HENG PWS (1999). Evaluation of Permeability and Mechanical Properties of Composite Polyvinyl Alcohol Films. *Chem. Pharm. Bull.*, **47(10)**: 1412—1416.
- CHANG J, LI W, LIU Q, (2019). Preparation, properties, and structural characterization of β -glucan/pullulan blend films. *International Journal of Biological Macromolecules* **140**: 4-8
- CILURZO F, MUSAZZI UM, FRANZÉ S, SELMIN F, MINGHETTI P (2018). Orodispersible dosage forms: Biopharmaceutical improvements and regulatory requirements. *Drug Discov Today*. **23(2)**: 251-9.
- DIXIT RP, PUTHLI SP (2009). Oral strip technology: overview and future potential. *Journal of Controlled Release*, **139(2)**: 94-107.
- EMA - European Medicines Agency (1995). ICH Topic Q 2 (R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology: Note For Guidance On Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.
- ERGIN AD, BAYINDIR ZS, YUKSEL N (2019). Characterization and optimization of colon targeted S-adenosyl-L-methionine loaded chitosan nanoparticles. *J Res Pharm.*, **23(5)**: 914-926.

- EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE (2010). *European Pharmacopoeia*, **1**.
- FAVA M, DAVIDSON KG (1996). Definition And Epidemiology Of Treatment-Resistant Depression. *Psychiatric Clinics of North America*, **19(2)**: 179–200.
- FDA - Food and Drug Administration (2014). APPENDIX 1 – ORA Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods.
- FOO WC, KHONG YM, GOKHALE R, CHAN SY (2018). A novel unit-dose approach for the pharmaceutical compounding of an orodispersible film. *International Journal of Pharmaceutics*, **539**: 165-174.
- GARCIA-TREVIJANO ER, LATASA MU, CARRETERO MV, BERASAIN C, MATO JM, AVILA MA (2000). S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat hepatocytes: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance of the differentiated status of the liver. *FASEB Journal*, **14(15)**: 2511-2518.
- GHOSAL K, CHAKRABARTY S, NANDA A (2011). Hydroxypropyl methylcellulose in drug delivery, *Pelagia Research Library Der Pharmacia Sinica*, **2(2)**: 152-168.
- GOSWAMI T, JASTI B, LI X (2008). Sublingual drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **25(5)**: 449-484.
- HARIHARAN M, BOGUE BA (2009). Orally Dissolving Film Strips (ODFS): The final evaluation of orally dissolving dosage forms. *Drug Delivery Technology* **9 (2)**: 24-26.
- HOFFMANN EM, BREITENBACH A, BREITKREUTZ J (2011). Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.*, **8(3)**: 299-316.
- HUBER TD, JOHNSON BR, ZHANG J, THORSON JS (2016). AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art. *Current Opinion in Biotechnology*, **42**: 189–197.
- ICH - International Center of Harmonization (1996). Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.
- IRFAN M, RABEL S, BUKHTAR Q, QADIR MI, JABEEN F, KHAN A (2016). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **24**: 537–546.
- IVARSSON D, WAHLGREN M (2012). Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **92**: 353– 359.
- KAGAN BL, SULTZER DL, ROSENLICHT N, GERNER RH (1990). Oral S-Adenosylmethionine in depression: A randomized, double-blind, placebo-controlled Trial. *Am J Psychiatry*, **147(5)**: 591-595.

- KILICARSLAN M, ILHAN M, INAL O, ORHAN K (2018). Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **123**: 441–451.
- KOLAND M, SANDEEP VP, CHARYULU NR (2010). Fast Dissolving Sublingual Films of Ondansetron Hydrochloride: Effect of Additives on in vitro Drug Release and Mucosal Permeation. *J Young Pharm*, **2(3)**: 216-222.
- LADE MS, PAYGHAN SA, TAMBOLI ZJ, DISOUZA JI (2013). Polymer Based Wafer Technology: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, **4(6)**: 1060 – 1074.
- LAI KL, FANG Y, HAN H, LI Q, ZHANG S, LI HY, CHOW SF, LAM TN, LEE WYT (2018). Orally-dissolving film for sublingual and buccal delivery of ropinirole. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **163**: 9-18.
- LAM JKW, XU Y, WORSLEY A, WONG ICK (2013). Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **73**: 50-62.
- LEVKOVITZ Y, ALPERT JE, BRINTZ CE, MISCHOULON D, PAPAKOSTAS GI (2012). Effects of S-adenosylmethionine augmentation of serotonin-reuptake inhibitor antidepressants on cognitive symptoms of major depressive disorder. *European Psychiatry*, **27**: 518–521.
- LI XQ, YE ZM, WANG JB, FAN CR, PAN AW, LI C, ZHANG RB (2017). Mucoadhesive buccal films of tramadol for effective pain management. *Rev Bras Anesthesiol*, **67(3)**: 231-237.
- LIEBER CS, PACKER L (2002). S-Adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects-an introduction. *Am J Clin Nutr*, **76**: 1148–1150.
- LIEW KB, TAN YTF, PEH KK (2013). Effect of polymer, plasticizer and filler on orally disintegrating film. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **40(1)**: 110–119.
- MAHBOOB MBH, RIAZ T, JAMSHAD M, BASHIR I, ZULFIQAR S (2016). Oral Films: A Comprehensive Review. *International Current Pharmaceutical Journal*, **5(12)**: 111-117.
- MAMPALLILA D, ERAL HB (2018). A review on suppression and utilization of the coffee-ring effect. *Advances in Colloid and Interface Science*, **252**: 38-54.
- MARQUES MRC, LOEBENBERG R, ALMUKAINZI M (2011). Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. **18(3)**:15-28.
- MASHRU RC, SUTARIYA VB, SANKALIA MG, PARIKH PP (2005). Frovatriptan loaded hydroxy propyl methyl cellulose/treated chitosan based composite fast dissolving sublingual films for management of migraine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **31**: 25–34.
- MATO JM, ALVAREZ L, ORTIZ P, PAJARES MA (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther*, **73**: 265–80.

- MCMILLAN JM, WALLE UK, WALLE TS (2005). S-adenosyl-L-methionine: transcellular transport and uptake by Caco-2 cells and hepatocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**: 599–605.
- MISCHOULON D, FAVA M (2002). Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76(5)**: 1158–1161.
- MISHRA A, PATHAK AK (2017). Plasticizers: A Vital Excipient in Novel Pharmaceutical Formulations. *Current Research in Pharmaceutical Sciences* **07 (01)**: 01-10
- MORALES JO, MCCONVILLE JT (2011). Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **77**: 187–199.
- MORALES JO, SU R, MCCONVILLE JT (2013). The influence of recrystallized caffeine on water-swelling polymethacrylate mucoadhesive buccal films. *AAPS PharmSciTech*, **14 (2)**: 475–484
- MORANA A, DI LERNIA I, CARTENI M, DE ROSA R, DE ROSA M (2000). Synthesis and characterisation of a new class of stable S-adenosyl-L-methionine salts. *Int J Pharm*, **194(1)**: 61-68.
- NAIMISH AS, VIPUL PP, DEVANG JP (2013). Sublingual delivery: a promising approach to improve bioavailability. *Pharma Science Monitor*, **4(2)**: 3870-3889.
- NARANG N, SHARMA J (2011). Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3(2)**: 18-22.
- PANDA BP, DEY NS, RAO MEB (2012). Development of innovative orally fast disintegrating film dosage forms: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, **5(2)**: 1666-1673.
- PAPAKOSTAS GI (2009). Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, **70(5)**: 18-22.
- PATEL VF, LIU F, BROWN MB (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **153**: 106–116
- PRAJAPATI VD, CHAUDHARI AM, GANDHI AK, MAHERIYA P (2018). Pullulan based oral thin film formulation of zolmitriptan: Development and optimization using factorial design. *International Journal of Biological Macromolecules*, **107**: 2075–2085.
- PREIS M, WOERTZ C, SCHNEDER K, KUKAWKA J, BROSCHEIT J, ROEWER N, BREITKREUTZ J (2014). Design and evaluation of bilayered buccal film preparations for local administration of lidocaine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **86**: 552–561.

- RUSSO E, SELMIN F, BALDASSARI S, GENNARI CGM, CAVIGLIOLI G, CILURZO F, MINGHETTI P, PARODI B (2016). A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **32**: 113-125
- SALOME C., GODSWILL O, IKECHUKWU O (2013). Kinetics and Mechanisms of Drug Release from Swellable and Non Swellable Matrices: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **4(2)**: 97-103
- SENEL S, HINCAL AA (1995). Bukkal Mukoza ve İlaç Uygulamasındaki Yeri. *FABAD J.Pharm. Sci.*, **20**: 139-148.
- SIEPMANN J, PEPPAS NA (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 163–174.
- SINGH H, SINGLA YP, NARANG RS, PANDITA D, SINGH S, NARANG JK (2018). Frovatriptan loaded hydroxy propyl methyl cellulose/treated chitosan based composite fast dissolving sublingual films for management of migraine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **47**: 230-239.
- SONG Q, SHEN C, SHEN B, LIAN L, LIU X, DAI B, YUAN H (2018). Development of a fast dissolving sublingual film containing meloxicam nanocrystals for enhanced dissolution and earlier absorption. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **43**: 243–252.
- SOTHORNVIT R, KROCHTA JM (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, **50**: 149-155
- SPILLMANN M, FAVA M (1996). S-adenosyl-methionine (ademethionine) in psychiatric disorders. *CNS Drugs*, **6**: 416–425.
- SVENJA N, JULIAN Q (2019). Formulation development of a continuously manufactured orodispersible film containing warfarin sodium for individualized dosing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **136**: 93–101.
- TCHANTCHOU F, GRAVES M, ORTIZ D, CHAN A (2006). S-adenosyl methionine: a connection between nutritional and genetic risk factors for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*, **10**: 541–544.
- TRAORÉ YL, FUMAKIA M, HO EA (2018) Dynamic mechanical behaviour of nanoparticle loaded biodegradable PVA films for vaginal drug delivery. *J Biomater Appl.* **32(8)**:1119-1126.
- VIJAYA C, BINGI M, VIGNESHWARAN LV (2011). Transdermal delivery of venlafaxine hydrochloride: the effects of enhancers on permeation across pig ear skin. *Indian J. Pharm. Sci.*, **73 (4)**: 456-459
- VILA MD, TARDELLI ER, CHAUD MV, TUBINO M, BALCAO VM (2014). Development of buccal mucoadhesive film for fast dissolution: mathematical rationale, production and physicochemical characterization. *Drug Deliv.* **21(7)**: 530-539

- VUDDANDA PR, NICOLINI MM, MORALES JO, VELAGA S (2017). Effect of plasticizers on the physico-mechanical properties of pullulan based pharmaceutical oral films. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**: 290–298
- WANG Z, CHOW MSS (2014). Overview and appraisal of the current concept and technologies for improvement of sublingual drug delivery. *Ther. Deliv.*, **5(7)**: 807-816.
- XU LL, SHI LL, CAO QR, XU WJ, CAO Y, ZHU XY, CUI JH (2014). Formulation and in vitro characterization of novel sildenafil citrate- loaded polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer-based orally dissolving films. *International Journal of Pharmaceutics*, **473**: 398–406.
- YAN W, WEN S, LIU J (2009). Determination of reduced Young's modulus of thin films 983 using indentation test. *Acta Metall Sin*, **22**: 468–480.
- YUKSEL N., KANIK AE, BAYKARA T (2000). Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *International Journal of Pharmaceutics* **209**: 57–67
- ZHANG J, KLINMAN JP (2015). High-performance liquid chromatography separation of the (S,S)- and (R,S)-forms of S-adenosyl-L-methionine. *Analytical Biochemistry*, **476**: 81–83.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı
Soyadı
Doğum yeri ve tarihi
Uyruğu
Medeni Durumu
İletişim Adresi ve Telefonu

Çağda Gizem
Çelik Gülmez
Bursa-1992
T.C.
Evli
Turgut Özal Mahallesi 2146. Sok.
No: 9/16 Batıkent Yenimahalle
ANKARA- 0544 872 3025

II- Eğitim

Yüksek Lisans (02.2017 – devam ediyor)
Ankara Üniversitesi | Ankara | Türkiye
Eczacılık Fakültesi – Eczacılık

Lisans (09.2011 – 06.2016)
Ankara Üniversitesi | Ankara | Türkiye
Eczacılık Fakültesi – Eczacılık

Universita della Calabria | Cosenza | Italy
Department of Pharmacy, Health and
Nutritional Sciences

Lise (09.2006 – 06.2010)
Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi |
Ankara | Türkiye

İlköğretim (09.1998 – 06.2006)
Refika Aksoy İlköğretim Okulu Ankara |
Türkiye

III- Ünvanları

Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi

Çağda Gizem Eczaanesi eczacı ve mesul
müdür (07.2017- devam ediyor)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

-

VI- Bilimsel İlgi Alanları

-

VII- Bilimsel Etkinlikler

Aldığı burslar

Transmukozal Etkin Madde Salımı İçin S-adenozil-l-metiyonin'in (SAmE) hızlı çözünen sublingual filmlerinin tasarımı ve değerlendirilmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 1.09.2019- devam ediyor)

